

게르마늄 강화효모의 마우스에서의 암세포 억제 및 대식세포, NK 세포, B 세포의 활성화에 관한 연구

백대현* · 정진욱 · 손창욱 · 강종구^{1,2}

게란티제약(주) 중앙연구소, ^{1,2}충북대학교 수의과대학

Germanium-Fortified Yeast Activates Macrophage, NK Cells and B Cells and Inhibits Tumor Progression in Mice. Baek, Dae Heoun*, Jin Wook Jung, Tsang Uk Sohn, and Jong Koo Kang^{1,2}. Geranti Pharm. Ltd., 678-20 Yeoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080, Korea, ¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ²Biotoxtech Co., Ltd., Ochang Scientific and Industrial Complex, Changwon 363-883, Korea – Germanium-fortified yeast (GY) is a organic germanium-fortified yeast with potent immune modulating activities including anti-inflammatory effect. Through cell line studies, we observed that GY can modulate the diverse immune activity but little evidence was provided on the mechanism of GY in modulating immune activities in other higher animals. In this study, we investigated the effect of GY on modulation of immune function in mice. GY was administered in normal mice or tumor-bearing mice and then effect of GY on modulation of host immune system was analyzed by using *ex vivo* isolated macrophages, B cells, NK cells. Administration of GY in mice induced macrophage activation thereby increased effector function of macrophage such as increased phagocytosis, chemotaxis, adherence, O₂⁻ release, NO, TNF- α production. In addition, GY administration increased B lymphocyte activation and plaque forming cells. Furthermore, GY administration increased NK-cell mediated cytotoxicity. Furthermore, GY administration suppressed progression of tumor in mice by increasing TNF- α production and effector function of NK cells. Our results showed that GY has a potent immunostimulatory function *in vivo* mice model. Proper modulation and administration of GY in human could be helpful to maintaining immunological homeostasis by modulating host immune system.

Key words: Germanium-fortified yeast, Immunomodulator, Macrophage, NK cells and B cells, tumor suppression

서 론

게르마늄(Ge)은 자연계에서 동·식물의 체내 뿐만 아니라 흙과 물 등에 분포하며 전자산업 분야에서 광범위하게 이용되고 있다[12]. Ge는 1886년 최초 발견되었으며 원자번호 32와 원자량 72.6로 금속과 비금속의 특징을 가지고 있으며 [12] 일반적으로 식품 및 미량원소로 써 일일섭취량이 0.367에서 1.5 mg으로 알려지고 있다[28].

유기게르마늄은 인삼, 알로에, 마늘 등의 식물에 높은 함량이 존재하는 것으로 알려지고 있으며 화학적 측면에 의해 GeO₂로부터 합성되고 있다[9]. 유기게르마늄의 일반적 기능에 대해서는 항암 및 인터페론 유발효과에 의한 면역기능 활성이 보고 되었으며[9] 다양한 실험동물을 대상으로 한 연구결과에서 면역기능 향상과 정상화 효과가 있는 것으로 확인되었다[26]. 이들 면역기능 활성화 기작은 주로 활성산소

공급과 자유라디칼 억제 및 중금속 원소의 무독화 기작에 의한 것으로 알려지고 있으며[1-3, 26], 유기게르마늄 화합물은 동물을 대상으로 한 연구결과에서 다양한 항암효과와 T 세포 활성, B 세포 활성, NK 세포 활성과 대식세포 및 림프구의 활성화에 영향을 미치는 것으로 확인되었다[26]. Aso 등[2]과 Munakata 등[17]은 유기게르마늄 화합물이 인체 및 실험동물을 대상으로 한 경구투여에서 대식세포와 NK 세포의 활성화 및 각종 인터페론의 유도 및 생산증가에 기여한다고 보고하였다.

게르마늄 함유 건강식품은 1970년대 일본을 포함한 유럽 각국에서 강력한 항암효과가 있는 것으로 보고 되었으며[7, 25, 28], 최근 Badawi 등은 랫드를 대상으로 아미노산 함유 게르마늄이 인터루킨-12와 인터페론-감마의 활성을 유도한다고 보고하였다[3].

미생물은 게르마늄을 자체 축적하여 유기게르마늄으로 전환하는 것으로 확인되었으며 이는 고등동물에서도 무독화의 방편으로 이용되는 것으로 확인되었다[8]. 이는 많은 미생물들이 유기게르마늄 합성을 생체내 독성물질의 무독화의 과

*Corresponding author
Tel: 82-2-556-8275, Fax: 82-2-553-7851
E-mail: newvision@gerantiusa.com

정으로 이용하는 것으로 탈메틸화와 탈알킬화 과정을 거쳐 무독화하고 있으며 환경분야에서는 강력한 생물치료(bioremediation)법으로 이를 미생물의 기능에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 특히, 효모는 오랫동안 맥주가공과 제빵공정에 널리 이용되고 있으며 단백질, 비타민, 미네랄을 공급하는 새로운 기능성 단백질 공급원으로 관심이 집중되고 있으며[18] 이를 통한 유기계르마늄의 연구에 대한 획득법에 대한 연구도 진행되었다[7].

본 연구에서는 이러한 다양한 면역기능 증강 효과가 확인되고 있는 Ge를 용하여 유기계르마늄 강화효모인 GY[10-16, 23]를 제조하였으며 마우스에서 각종 면역세포인 대식세포, NK 세포, B 세포의 기능활성화와 항암효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Bis-Carboxyethyl Ge sesquioxide(Ge-132), RPMI 1640 배지, 6% dextrar, phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 Sigma(USA)로부터 구매하였고, 3% Proteose peptone broth와 Alsever solution은 Difco(USA)로부터 구매하였다. 기타 시약인 10% fetal calf serum(FCS), Ge dioxide(GeO₂) 및 rabbit anti-SRBC IgG는 Flow laboratories, PPM(Germany) 및 Cappel(Organon Teknika Co., USA) 등에서 구매해 이용하였다.

시험 물질

시험물질인 유기계르마늄 강화효모 분말(GY)은 빌효과정을 거친 유기계르마늄 화합물[10, 13, 14, 23]로서 4°C 냉장보관하면서 시험 SPF 폐쇄군ICR 마우스와 근교계C57BL/6 마우스에 10 ml/kg의 용량으로 조정하여 투여하였다.

실험 동물

실험에 이용된 5주령 수컷 ICR 마우스와 C57BL/6 마우스는 샘타코 사로부터 체중 24~30 g의 개체를 구입하여 이용하였으며 M.사로부터 구입한 폴리카보네이트 케이지를 이용하여 사육온도 23±2°C, 상대습도 55±10%, 통풍 10~15회/시간, 광도 150-300 lux에 명암 12시간주기로 조절된 동물실내에서 물과 사료를 자유급여하면서 1주간 적응시킨 다음 사용하였다. 실험군은 고용량 GY(2,000 mg/kg)군과 저용량 GY(200 mg/kg)군, 양성대조군으로는 무기계르마늄인 GeO₂(200 mg/kg)군과 유기계르마늄인 Ge-132 (200 mg/kg)군 및 음성대조군으로는 계르마늄 비강화 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904을 여러 경로로 투여하였다.

대식세포의 활성능시험

복강삼출세포의 변화측정: 상기와 같은 5군에 동일용량으로

각 시험물질을 단회 복강투여한 후에 1, 3, 5, 7일 및 9일에 시경과에 따라 각 군당 4마리씩 도살부검한 다음, 복강삼출세포를 회수하여 실험에 사용하였다. 특히 GY 및 효모는 여과멸균 및 고압멸균이 불가능하여 자외선하에서 멸균하여 사용하였다.

마우스를 시경과에 따라 각 군당 4마리씩 ether마취하에 방혈도살 한 다음, 복강내에 4의 Ca²⁺, Mg²⁺-free Phosphate Buffered Saline (PBS)(-) 10 ml를 주입하여 1분간 잘 맞사지하여 복강삼출액을 회수하였다. 이때 같은 군으로부터 회수한 복강삼출액을 pooling하여 1,500 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 0.83% NH₄Cl-Tris buffer를 첨가하여 잘 혼합하여 적혈구를 용혈시킨 다음, 다시 PBS(-)로 2차례 원심분리 세척한 후에 100 unit penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% fetal calf serum을 함유하는 minimum essential medium(MEM) 배지에 분산시켜 trypan blue exclusion법에 의하여 viability를 확인하여 시경과에 따른 세포 수를 측정하였다.

복강대식세포의 Rosette 형성능 및 텁식능 측정: 복강대식세포 활성능 검사를 위하여 마우스에 복강 투여 3일째 복강내에 10 ml의 PBS(-)를 주사한 후 잘 세척하여 상기와 같은 방법으로 복강삼출액을 회수하였다. 이때 회수한 복강삼출액을 10% FCS를 함유한 MEM배지에 5×10⁴ cells/0.5 ml/well이 되게 조정한 후 5% CO₂ 항온기내에서 37°C로 2시간 배양하였다. 이후 부착성이 없는 세포는 세척 제거하고 부착된 대식세포만을 시험에 사용하였다. 감작적혈구 텁식능 시험은 적혈구항체(EA)를 이용한 대식세포의 Fc receptor 결합에 의한 rosette assay 방법으로 수행하였다 [21]. 즉 실험에 필요한 EA는 무균 채혈한 혈액을 Alserver 용액(Difco, USA)과 동일량 혼합한 후 rabbit anti-SRBC IgG를 세척된 면양적혈구세포(SRBC)에 가해 37°C 항온기내에서 30분간 배양하여 1,500 rpm에서 3회 원심분리하여 얻은 것을 감작적혈구 항체(antibody-sensitized SRBC)로 하였다. 이때 rosette 활성능 측정을 위하여 대식세포 1 : 감작적혈구 50의 비율로 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 37의 배지로 5회 잘 씻은 다음 전조, 고정한 후 Wright-Giemsa염색을 하여 관찰하였다. 계산은 대식세포의 세포막 주위에 4개 이상의 적혈구가 부착된 것을 rosette형성으로 판정하여 100분율을 계산하였다. 감작적혈구 텁식능 측정은 대식세포 1 : 감작적혈구 100의 비율로 37°C에서 1시간 배양후, 0.83% NH₄Cl-Tris buffer를 가하여 텁식되지 않은 적혈구를 용혈시키고 다시 배지로 3회 잘 씻은 다음 상기와 같은 방법으로 관찰하였다. 즉 한 대식세포의 세포질내에 4개 이상의 적혈구가 함유된 것을 텁식작용을 한 것으로 판정하였다.

복강 대식세포의 NO 활성측정: GY의 경구투여에 따른 대식세포의 활성측정은 96 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10⁶ cells/ml를 분주하고 배양한 세포에 계르마늄 강화효모를 48시간 처리한 후 그 배양액을 ELISA reader를 이용

하여 NO₂(nitrite)를 측정하였으며 Lee 등[15]의 방법에 준해 LPS를 양성대조군으로 하여 비교하였다.

복강 대식세포의 TNF- α 생성활성 측정: 대식세포의 활성측정은 10% FCS와 10 ng/ml lipopolysaccharide (LPS)를 함유하는 RPMI 1640 medium을 이용하여 2×10^6 /ml 농도가 되도록 하여 36시간 경과된 배양상청액을 이용하여 TNF- α 생성량을 측정하였으며 시험군 투여군도 동일한 방법으로 측정하였다. 활성측정은 Lee 등[15]의 방법에 준해 ELISA kit(Chemicon, USA)를 이용하여 TNF- α 를 측정하였으며 양성대조군으로는 LPS 분말을 이용하였다.

활성산소(O₂)의 측정: 활성산소는 ferricytochrome C의 환원저해에 의한 superoxide dismutase(SOD) 분석법을 이용하여 측정하였다[29]. 상기와 같이 투여 3일째 분리된 복강대식세포를 96-well flat-bottomed cell culture plate에 0.2×10^6 /well의 농도로 가해 5% CO₂ 항온배양기에서 37°C로 2시간 배양한 후, 부착되지 않은 세포는 제거한 후 부착세포만 100 units SOD와 75 nM PMA의 존재 유무에서 160 μM cytochrome c를 함유하는 Hanks' 염 용액을 가해 37°C에서 배양하였다. 활성산소의 측정은 흡광광도계를 이용하여 550 nm에서 60분간 반응시켜 측정하였으며 3회 반복에 의한 평균활성으로 표시하였다.

체액성 면역에 미치는 영향

마우스 비장으로부터 면역세포 분리: GY 및 Ge 함유 게르마늄 화합물의 체액성면역조절에 대한 효과를 확인하기 위해 상기와 같이 5군으로 배치하여 동일용량으로 12일간 경구투여 하였다. 투여개시 8일째에 마우스 당 1×10^8 개의 항원(면양적혈구)/0.2 ml을 미정맥에 투여하여 면역시킨 다음 최종일인 12일에 도살부검하여 체중을 측정하고 비장을 적출한 다음 무게를 측정하였다. 무균상태에서 적출된 비장은 stainless mesh(No. 2224)에서 분쇄한 다음 회수한 비장부유액을 0.83% NH₄Cl-Tris 완충액에 재현탁 시켜 적혈구를 제거한 다음, PBS(-)로 1,500 rpm에서 10분간 2회 원심분리후 얻은 세포침전물을 RPMI 1640 medium을 가해 적정 농도로 희석하여 생존수를 확인하였으며 적정 세포의 농도는 10^6 /ml로 조정하여 이용하였다.

Plaque forming cell(PFC) 활성 측정: 시험물질 투여에 의한 항체형성능 평가는 T세포 의존성 B 세포의 활성화에 의한 PFC형성능으로 Faubert[5]의 방법에 준해 측정하였다. 즉 상기와 같은 방법으로 분리한 비장세포(100 μL)를 25 μL의 표적세포(즉 SRBC: 25%, v/v EBSS), 350 μL의 agarose (0.85%, w/v EBSS) 그리고 기니피보체 (50%, v/v EBSS)과 함께 혼합한 시험관을 42°C 항온수조에서 고르게 섞었다. 그 후 이 혼합액을 petri dish에 떨어드린 다음에 그위에 24 × 40 mm cover glass를 덮어서 용액이 살짝 퍼지도록 하고 상온에 잠시 방치하여 agarose를 굳힌 다음 37°C 배양기에서 3시간 배양하였다. plaque의 수는 plaque-viewer(Bellco

Glass, Vinland, NJ, USA)로 산정하였다. 비장세포내의 항체 형성세포수는 10^6 비장세포내의 anti-SRBC 항체(용혈반)를 분비하는 세포수로 평가하였다[20].

NK 세포 매개성 세포용해성(cytolytic activity, %) 측정

NK 세포의 활성평가는 암세포나 바이러스 감염세포에 대한 파괴활성과 암세포 전이의 억제력으로 평가하였다[6]. 활성측정은 GY를 포함한 다양한 Ge 함유 게르마늄 화합물을 대상으로 수행하였으며 각기 다른 농도로 6주에서 12주령의 체중 15~25 g의 C57BL/6 마우스에 경구투여 하고 대상 실험동물에 대해 1, 10, 100 μg/ml의 GY를 투여한 마우스에서 NK 세포를 분리하여 이들의 세포용혈활성을 측정하였고, 총 표적세포의 용해활성에 대한 백분율로 표시하였다.

세포용해성에 대한 활성평가는 아래와 같이 측정하였다.

Cytolytic activity (%)

$$= (\text{Experimental - effector spontaneous - target spontaneous}) / (\text{Target maximum-target spontaneous}) \times 100$$

복수암에 대한 종양억제 효과 측정

S-180 복수암유발 ICR마우스에 대한 GY 및 Ge 함유 화합물에 대한 항 종양활성을 알아보기 위하여 상기와 같은 5군으로 각 군당 12마리씩 배치하였다. 모든 마우스에는 S-180종양세포를 마리 당 1×10^6 개/0.2 ml의 농도로 조정하여 복강 투여하였다. 시험물질은 종양세포 투여 다음날부터 1일 간격으로 최종일 까지 경구투여하였다. 항종양 효과는 생존일수증양치, 연명률 및 복수암의 진행에 따른 체중증가로 평가하였다.

- 생존일수증양치 (MST, median survival time)

- 연명률 (ILS, Increase in MST over control)

$$= (T/C-1) \times 100$$

- T: 처치군의 MST, C: 대조군의 MST

고형암에 대한 종양억제 효과 측정

S-180 cell을 마우스 후지에 피하이식, 공형암을 유발하고 게르마늄 강화효모의 고형암 형성 억제효과를 확인하였다. 양성대조군으로는 doxorubicin 3 mg/kg을 투여기간중 4일마다 복강투여하여 시험물질군과 비교하였다. 고형암 형성 억제효과는 일주일에 2번의 체중 측정과 시험종료후 부검시 고형암을 적출하여 종양무게, 비장무게 및 고형암 형성 억제율을 확인하였다. 시험물질인 게르마늄 강화효모는 성인 1일 권장량 16 mg/kg/day의 150배인 2,400 mg/kg 고용량과 중용량(1,200 mg/kg) 및 저용량(600 mg/kg) 군으로 하였으며 멀균증류수에 10 ml/kg을 2주간 투여하였다. 양성대조군으로는 동일농도의 투여액량으로 4일간의 간격으로 3회 정액투여하였다. 시험에 이용된 암세포는 마우스 복강내에 1주일간 배양된 S-180 cell을 복수와 함께 채취하고 PBS를 첨가하여 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수

하였으며 동일과정을 2회 수행하여 순화된 세포를 6.0×10^6 cell/0.2 ml이 되게 조절하여 실험에 이용하였다. 고형암 억제실험은 확보된 S-180 세포 부유액을 왼쪽 서혜부에 피하 이식하고 24시간후부터 시험물질을 투여하였다. 시험종료시 부검하여 고형암을 적출하고 그 무게를 측정하고 고형암 형성억제 백분율(IR, %)을 구하였다.

억제활성은;

IR (inhibition rate, %) = $C_w - T_w / C_w \times 100$ (C_w : control solid tumor weight, T_w : tested solid tumor weight)로 하였다.

통계 처리

실험결과는 Levene's test에 준해 분산처리 하였다. 통계 처리는 one-way analysis of variance (ANOVA)에 의해 수행하였으며 대조군에 대한 변화를 Dunnett's *t*-test로 수행하여 유의성을 확인하였다.

결 과

GY에 의한 복강삼출세포수의 변화

GY와 다른 Ge 함유 게르마늄 화합물을 200~2,000 mg/kg 범위에서 마우스에 복강투여 한후 시경과에 따른 복강삼출세포 수의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 즉 모든 투여군에서 집중 1일째 보다는 3일째에 뚜렷한 세포수의 증가가 일어나고, 5일째부터는 계속 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 GY고용량 투여군과 저용량투여군은 다른 투여군에 비하여 유의한 증가가 관찰되었다.

복강대식세포의 Fc 수용체 매개성 활성에 미치는 효과

투여 3일째 회수한 Fc receptor 매개성 rosette 형성능 및 탐식능은 Table 1에 나타난 바와 같다. 저용량 및 고용량의 GY투여군에서는 대조군 및 기타 Ge 화합물 투여군에 비해 SRBC 결합에 따른 rosette 형성능이 최대 4.5배 증가되었으며 대식세포의 식세포 활성에서도 대조군인 비강화 효모군

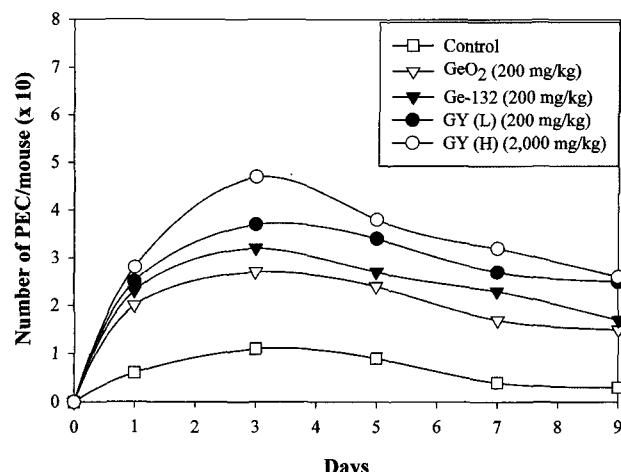


Fig. 1. GY induces macrophage activity. Peritoneal exudate cell response in the peritoneal cavity of mice inoculated with GY and other Ge compounds. Data at each time point represents the mean of 4 mice from each group. High and low content of GY or Ge compounds were shown to be effective than negative control.

에 비해 2배 증대된 활성을 나타내었다. 대식세포의 활성화에 대한 외형 변화에서도 Fig. 2에 표시한 바와 같이 혼미경 하에서 GY를 투여한 복강 대식세포(Fig. 2A)는 게르마늄 비

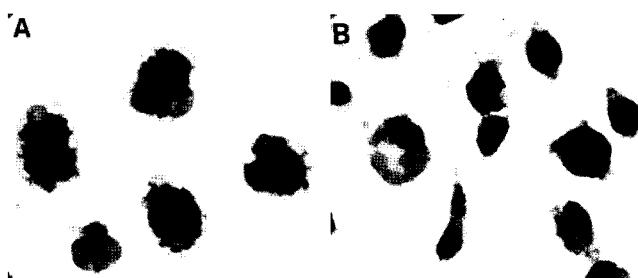


Fig. 2. Morphological changes of activated macrophage by GY treatment. Fc receptor mediated phagocytosis of peritoneal exudated macrophages isolated from mice administered with (A) GY and (B) Control. Wright-Giemsa stain ($\times 400$). Control: dehydrated powder of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904.

Table 1. Fc receptor-mediated phagocytosis and rosette formation of IgG coated SRBC by peritoneal macrophages (Mφ) with GY and other Ge compounds.

Group	Fc rosette			Fc phagocytosis		
	Mφ with bound SRBC (% of total)	Bound SRBC (mean/ Mφ)	Index*	Mφ with ingested SRBC (% of total)	Ingested SRBC (% of total)	Index
GY (H)	73	8	584	83	8	664
GY (L)	70	7	490	82	8	656
GeO ₂	67	6	402	73	7	511
Ge-132	74	8	592	82	8	656
Control	32	4	128	47	4	188

*Index: percentage of total macrophage (Mφ) with bound or ingested red cell \pm mean member of red cells bound or ingested/Mφ.

GY (H): 2000 mg/kg, GY (L): 200 mg/kg, GeO₂: 200 mg/kg, Ge-132: 200 mg/kg, Control: *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904 : 200 mg/kg.

강화 효모인 음성대조군(Fig. 2B) 투여에 비해 뚜렷한 탐식 능이 증대된 것이 관찰되었다.

복강대식세포의 NO 활성에 미치는 효과

대식세포 활성에 따른 NO 활성을 측정한 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 GY에 대해 농도의존적으로 NO 활성이 증가하였으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 최대의 활성이 확인되었으며 양성대조군이 LPS와 유사한 활성화 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 실험결과는 위의 대식세포 활성화에 대한 rosette 형성능과 더불어 GY가 실질적인 면역계 주요세포인 대식세포를 크게 활성화시키고 NO활성을 증가시키는 것으로 확인되었다.

복강대식세포의 TNF- α 활성에 미치는 효과

대식세포 활성에 따른 TNF- α 의 변화를 측정한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 GY에 대해 농도의존적으로 TNF- α 활성이 증가하였다. 이는 양성대조군인 LPS 투여군에서도 위의 대식세포활성화에 대한 현상과 일치되는 면역세포 활성화효과를 나타내는것으로 확인되어 GY가 면역계 주요세포인 대식세포의 활성화와 이를 통한 TNF- α 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다.

활성산소(O_2^-) 생성에 미치는 영향

GY와 Ge 함유 게르마늄 화합물이 복강 대식세포에 활성 산소 생성에 대한 영향은 Fig. 5에 나타낸 것과 같다. 실험 결과 GY는 농도의존적으로 활성산소 생성활성을 증가시키는 것으로 확인되었으며 생성된 활성산소는 고용량의 GY 처리군(100 mg/kg)에서 6.3 ± 0.3 nmole이 생성되었고 Ge-132(100 mg/kg)에서 4.2 ± 0.5 nmole의 활성산소가 생성되

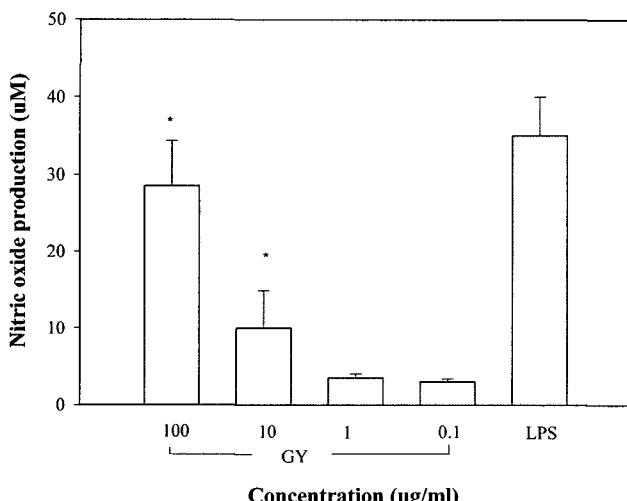


Fig. 3. GY induces TNF- α production. Macrophage cell line Raw 264.7 cells were treated with different concentration of GY and TNF- α production was measured. LPS: lipopolysaccharide (positive control).

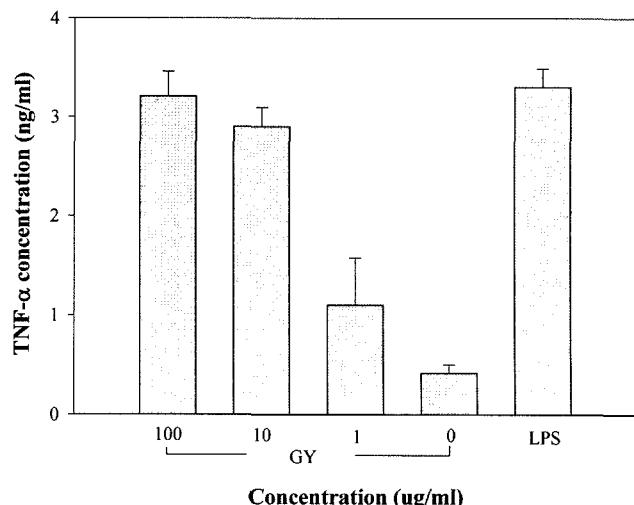


Fig. 4. GY stimulates Nitric oxide production. Macrophage cell line Raw 264.7 cells were treated with different concentration of GY and Nitric oxide production was measured. LPS: lipopolysaccharide (positive control).

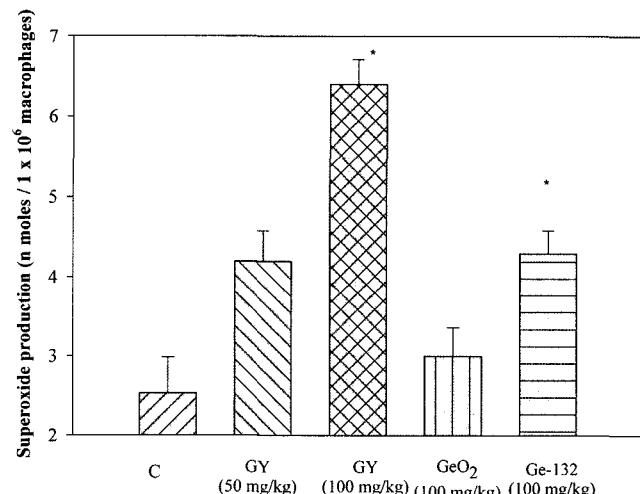


Fig. 5. GY increases the release of superoxide anions. The effect of GY on the release of superoxide anions by peritoneal macrophages was assessed and compared to other Ge compounds. Negative control (C): dehydrated powder of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904. Significantly different from control administered group, * $p < 0.01$.

는 것으로 확인되었다. 또한 Ge 화합물인 GeO₂와 Ge-132에서도 대조군에 비해 다소의 활성산소 생성이 확인되어 Ge가 대식세포의 활성화에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

체액성면역에 미치는 영향

체액성 면역기작에 대한 Ge의 영향을 조사하기 위해 마우스에 GY와 Ge 함유 게르마늄 화합물을 12일간 경구투여 한 후 이들의 체중, 비장중량, 비장세포의 증가치를 조사하였다. Table 2에서 나타낸 바와 같이 대조군에 비해 각종 Ge

Table 2. Effects of GY and other Ge compounds on the body and spleen weight

Group	Number of animal	Body weight (g)	Spleen (mg)	Total nucleated spleen cell (10^7)
GY (H)	5	18.9 ± 2.3	160 ± 17*	53.2
GY (L)	5	18.5 ± 1.9	157 ± 21	51.6
GeO ₂	5	19.1 ± 2.8	130 ± 31	32.4
Ge-132	5	18.6 ± 1.4	150 ± 29	32.8
Control	5	19.2 ± 1.3	120 ± 23	31.9

Mean ± S.D

*indicates significantly different from control administered group, $p < 0.05$.

함유 게르마늄 화합물의 투여군에서 체중 변화는 확인되지 않았다. 이외는 달리 비장세포의 중량에서는 저용량 및 고용량의 GY 투여군에서는 대조군에 비해 비장중량이 60% 이상 증가된 것으로 확인되어 GY가 직접적으로 면역계의 주요세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 확인되었다. B세포 활성화의 측정을 위한 PFC 활성을 측정한 결과 Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 대조군 및 Ge 화합물 투여군에 비해 고용량의 GY 투여군에서 PFC 활성이 크게 증가하였으며 상대적인 PFC 활성은 84 ± 5.0~60 ± 0.5%로 유의성 있게 증가되었다($p < 0.05$).

NK 세포 활성에 대한 GY의 영향

GY 및 Ge 함유 게르마늄 화합물의 NK세포의 활성화에 대한 효과는 *in vivo* 세포용혈활성(cytolytic activity)으로 측정하였다. 실험결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 GY 처리군의 경우 대조군에 비해 농도의존적으로 세포용혈활성이 증가되는 것으로 확인되었으며 대조군에 비해 최적 ratio에서 2배정도의 활성이 증대된 것으로 확인되었다.

복수암이식 마우스에 대한 GY의 항종양 효과

S-180 복수암 유발 마우스에 대한 GY와 Ge 함유 게르마늄 화합물 및 대조군의 항암 연명효과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 즉 생존일수증양치(MST)에서 GY고용량 투여군은 가장 높은 치를 나타내었으며 Ge-132, GY저용량, GeO₂ 순으로 효모투여 대조군은 가장 낮은 생존일수증양치를 나타내었다. 또한 연명율에 있어서는 동일한 경향을 나타내어 GY의 항종양 활성이 기타 Ge 화합물의 종양활성보다 높게 나타났다. 이외는 달리 음성대조군인 게르마늄 비강화 효모

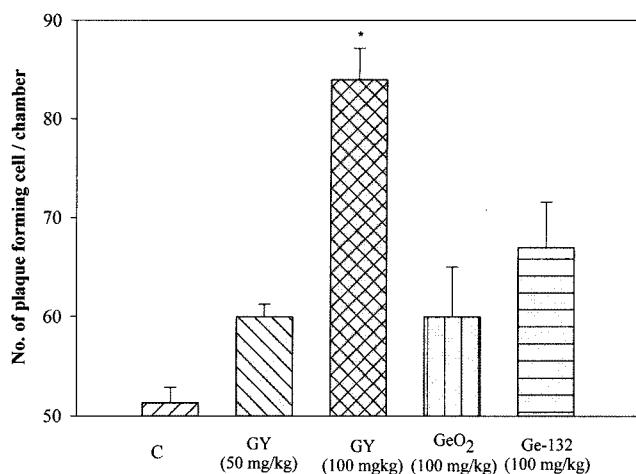


Fig. 6. GY increases the activity of hemolytic plaque forming cell (PFC) in ICR mice. Negative control (C); dehydrated powder of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904. Significantly different from control administered group, * $p < 0.05$.

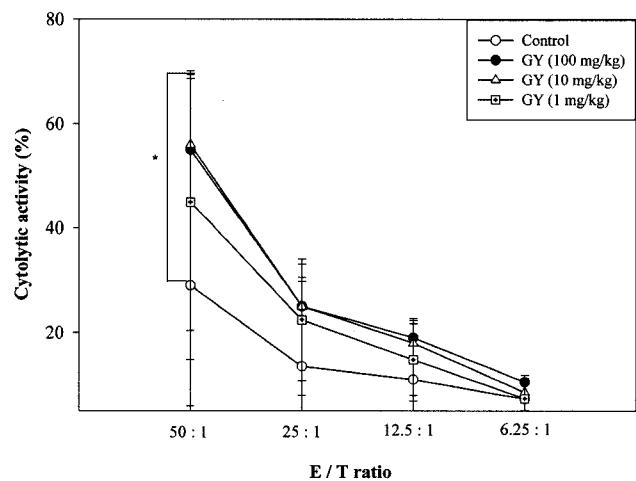


Fig. 7. GY increases the *in vitro* cytolytic activity of splenic natural killer (NK) cell in C57BL/6 mice. E/T: effector/target cell ratio. Significantly different from control administered group, * $p < 0.01$.

Table 3. Effect on GY and other Ge compounds on S-180 tumor bearing mice

Group	No. of surviving mice/group								MST	ILS (%)
	10	13	16	17	18	19	20	21		
GY (H)	13/13	13/13	13/13	8/13	6/13	3/13	3/13	2/13	0/13	17.6
GY (L)	13/13	13/13	11/13	7/13	5/13	2/13	2/13	1/13	0/13	16.9
GeO ₂	13/13	13/13	11/13	6/13	4/13	2/13	1/13	0/13	0/13	16.6
Ge-132	13/13	13/13	12/13	7/13	5/13	4/13	4/13	1/13	0/13	17.3
Control	13/13	11/13	7/13	4/13	1/13	0/13	0/13	0/13	0/13	14.9

GY (H): 2,000 mg/kg, GY (L): 200 mg/kg, GeO₂: 200 mg/kg, Ge-132: 200 mg/kg, MST: mean survival time, ILS: increase in MST.

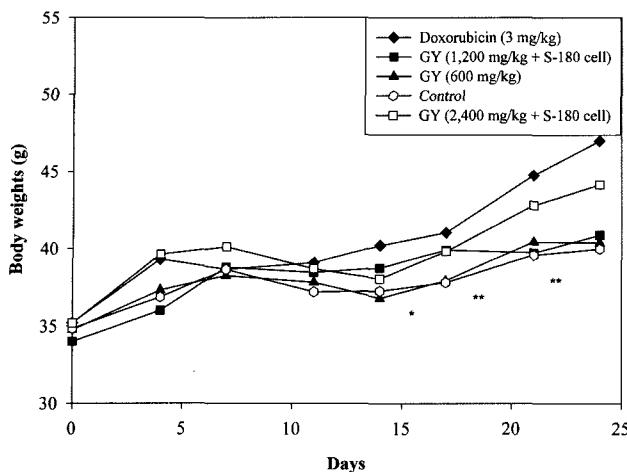


Fig. 8. Changes of body weights in S-180 solid tumor bearing mice. Mice were treated with doxorubicin (positive control, 3 mg/kg), GY 600-2,400 mg/kg, and then body weight changes were monitored. Significantly differences as compared with positive control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

투여군에서는 종양활성화에 따른 개체사멸로 연명을 확인이 불가하여 Ge가 마우스의 종양활성을 유의성있게 저해하는 것으로 확인되었다.

고형암이식 마우스에 대한 GY의 항종양 효과

GY의 마우스 투여에 대한 각종 면역세포의 영향 조사결과 대식세포 활성효과(Fig. 1-3, Table 1), TNF- α 생성효과(Fig. 4), 활성산소 증강효과(Fig. 5) 및 세포독성효과(Fig. 9)가 현저히 증가된 것으로 확인 되어 이를 근거로 GY가 강력한 면역계의 조절작용 물질로 작용가능한지에 대한 암억제 효과를 확인하였다. 실험군 투여에 대한 효과를 측정한 결과 GY 투여군에서 3주 후 평균체중이 15 g 증가된 것으로 확인되었으나 게르마늄 비강화 효모군인 음성대조군(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904) 투여에서는 종양활성 증대에 의한 시험군 사멸로 인해 측정이 불가하였다(Fig. 8). GY 투여에 의한 MST와 ILS에서는 대조군에 비해 평균 3일 증가하였다. 세부 결과는 MST와 ILS(%)에서 고용량 투여군(H, 2,000 mg/kg)과 저용량 투여군(L, 200 mg/kg) 및 Ge 함유 게르마늄 군에서; GY(H) 및 (L)에서 MST가 17.6, 16.9; GY(H) 및 (L)에서 ILS가 18.2, 13.4; GeO₂에서 MST 및 ILS가 16.6, 11.4; Ge-132에서 MST 및 ILS가 17.3, 16.1으로 각각 측정되었으나 음성대조군의 ILS 측정치는 개체사멸로 측정이 불가하였다(Table 3).

시료투여에 의한 암세포의 변화에서는 GY 처리군에서 종양세포 중량이 현저히 감소하였으나 음성대조군의 경우는 9.986 ± 3.96 g, 양성대조군인 3 mg/kgdoxorubicin 투여군에서는 5.82 ± 3.38 g로 저해효과가 확인되어 GY의 항종양 효과가 확인되었다. 종양세포 저해율(IR, %)에서는 양성대조군에서 51.55%로 측정되었으나 GY 투여농도별 저해율에서

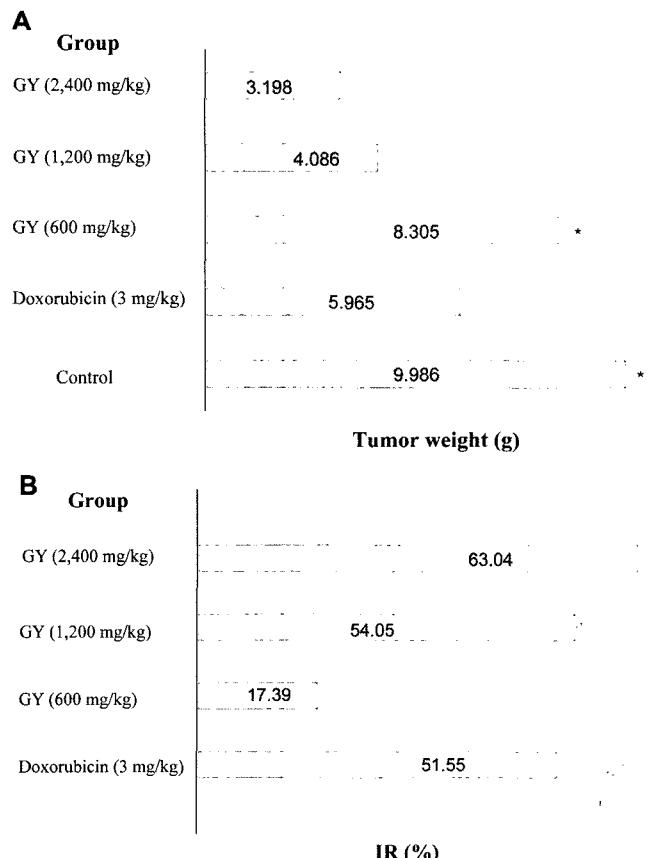


Fig. 9. GY suppresses tumor progression. A). Comparative numerical value of mean tumor weight in mice bearing S-180 solid tumor. Significantly different from control administered group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. B) Comparative numerical value of inhibition rate (IR, %) in S-180 solid tumor bearing mice.

는 600 mg/kg 그룹에서 17.39%, 1,200 mg/kg 그룹에서 54.05%, 2,400 mg/kg 그룹에서 63.04%의 저해율을 나타내었다. S-180 종양 마우스의 종양중량은 GY 농도에 반비례하게 감소하였으며 저해율(IR)은 농도의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다. 최종 분석결과 GY는 음성대조군인 게르마늄 비강화 효모에 비해 종양저해 활성을 50% 이상 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 9A, 9B).

고 찰

Ge는 동식물의 필수영양소에는 포함되지 않지만 현재까지 다양한 연구를 통해 질병예방 및 치료 효과가 광범위하게 확인되고 있다. Ge에 대한 효과와 존재는 Carrel에 의해 프랑스 Lourdes 온천수를 통해 그 효과가 1922년 확인되어 보고되었으며[9] 유기 게르마늄의 효과는 Goodman[9]에 의해 Ge가 모든 동·캣캡셀° 미량으로 존재하며, Ge가 면역증강, 세포의 산소공급, 자유라디칼의 제거, 통증완화 및 증금속 해독에 영향을 미친다고 보고하였다[9]. 이러한 Ge의 적용으로는 다양한 질병(난치병, 암, 관절염) 등의 치료를 위

해 시도 되었으며[1, 2, 7, 9] 특히 바이러스성 질병 감염과 인터페론 유도, 대식세포활성 및 NK 세포의 활성화 면역증강에 대한 치료제로서의 가능성이 확인되었다[9].

유기게르마늄에 대한 효과로는 상업적으로 잘 알려진 Ge-132를 통해 표적세포와 공동 배양했을 때 항암 및 대색세포의 활성화가 *in vitro* 연구를 통해 확인되었다[1, 25]. Ge-132는 trihalogenogermane에 acrylic acid와 alkyl ester을 가해 얻은 trihalogenopropionic acid 유도체를 가수분해해 합성하며 다양한 인체독성의 원인은 원자흡광광도계(AA)를 통한 분석 결과 Ge-132와 유사한 합성물 및 미반응물에 의한 오염에 의한 작용으로 알려지고 있다[22]. 또한 이 물질의 독성에 대한 보고로는 신경독성과 급성 신장독성 등이 인체 및 동물을 통해 확인되었으며[4, 19, 28] Schauss는 이들 독성이 Ge-132에 존재하는 미량의 잔여 GeO₂와 오염에 의한 것으로 주장하였으며[22] GeO₂를 원료물질로 하는 Ge-132의 경우 이들이 미량으로 오염되어 동·식물에서 그 독성이 나타나는 것으로 주장하였다[28].

이러한 무기게르마늄의 부작용을 제거하기 위해 본 연구에서는 효모의 탈효과과정을 통해 생리적으로 안전한 유기게르마늄 GY를 생합성 하였으며[10-16] *ex vivo* 연구를 통해 면역활성 조절제로서의 효과를 확인하고자 하였다.

실험군에 대한 효능확인은 Ge 강화효모인 GY를 대상으로 하였으며 실험동물을 대상으로 한 경구투여에 의해 대식세포활성 유도능과 대식세포활성화 기작 및 NK 세포, B 세포의 활성에 따른 항원-항체반응에 의한 세포용혈활성에 의한 PFC 형성을 측정하였다.

동일한 시료를 이용한 이전 연구에서 GY는 neutral proteinases인 elastase의 생성 촉진과 hexose monophosphate shunt 경로를 통한 glucose 산화를 촉진시키는 것 외에 세균세포의 항상성과 미생물 식세포활성 및 IgG에 의한 식세포활성에 대한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다[27]. 이런 결과를 토대로 본 연구에서는 면역세포의 활성에 대한 GY의 영향을 조사하였으며 복강침출세포로부터 대식세포의 증가와 IgG coated SRBC를 이용한 Fc receptor 매개성 복강대식세포의 식세포활성이 음성대조군에 비해 최대 2~4배 이상 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 비장세포에 의한 단핵구의 주화성과 부착활성에서도 GY 및 Ge 함유 게르마늄 화합물에서 유의성 있게 증가하는 것으로 확인되었다(Table 1). 활성산소 생성능에 대한 효과에서는 고용량인 GY(100 mg/kg) 투여군에서 비교적 높은 활성산소 생성능이 확인되었으며 기타 동량의 Ge 함유 게르마늄 화합물에서도 농도의존적으로 활성산소 생성이 증가하는 것으로 확인되었다. 이러한 유사연구는 Ge 강화 게르마늄효모인 GY를 이용한 이전 연구에서 확인되었으며 유사한 대식세포활성 효능이 확인되었다[10, 11, 15, 16]. 이상의 결과에 비추어 GY는 면역계 대식세포의 활성화를 통한 다양한 면역기능 증대 현상이 확인되었으며, 이는 유기게르마늄으로 알려진 Ge-

132의 활성산소 생성에 대한 작용기작과 동일한 경향을 나타내어[2, 7, 17, 24, 26], GY가 실질적인 면역계 세포의 활성화 뿐만 아니라 활성산소 생성능 확대를 통해 외부환경 인자들에 대한 면역계 기능유지 및 면역조절기능을 나타내는 것으로 확인되었다.

B 세포 활성에 따른 체액성 면역반응의 향상에 대한 효과를 확인하기 위해 면양적혈구 항체를 이용한 세포용혈반형성시험(PFC)를 수행한[5] 결과, GY 투여군에서 농도의존적으로 B 세포의 수적증가에 대한 항체반응이 증대되었으며 PFC 수치도 비례하여 증가하는 것이 확인되었다. PFC의 상대수치는 음성대조군에 비해 Ge 함유 게르마늄 화합물 등에서 약 20~40% 증가하는 것으로 확인되어 Ge 원소 자체가 B 세포 활성효능이 있는 것으로 확인되었다[10].

GY 투여에 의한 C57BL/6 마우스의 NK 세포에 대한 영향조사를 수행한 결과 Fig. 9에 나타난 바와 같이 음성대조군에 비해 GY 농도의존적으로 NK 세포 매개성 세포용혈활성(cytolytic activity)이 증가하는 것으로 확인되었으며 항종양활성도 증가하는 것으로 확인되었다. 구체적인 결과로 GY 투여군을 대상으로 한 항암효과 확인에서 sarcoma-180-bearing C57BL/6 마우스에서 체중의 변화는 확인되지 않았으나 고령암의 성장은 억제되는 것으로 확인되었다. 이외는 반대로 항암제로서 이용되고 있는 양성대조군인 doxorubicin 투여군에서는 대상동물에서 세포용혈활성의 증가 외에 체중감소의 부작용이 현저하게 나타났다. 또한 GY의 항염증작용에 관한 연구가 이 등[11]에 의해 확인됨으로써 GY의 다양한 면역조절기능이 확인되었으며 GY에 의한 arachidonic acid, prostaglandin E₂(PGE₂), histamine, 세포내 H₂O₂ 및 RBL 2H3 세포에서의 H₂O₂ 발생기작에 대한 연구를 통해서도 GY가 arachidonic acid 와 PGE₂의 생성을 억제함으로써 항염증효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

이러한 실험동물을 대상으로 한 면역기능 조절에 대한 효능을 종합하여 볼 때, GY는 면역계의 주요 세포들의 기능증진을 통한 항상성 유지 뿐만 아니라 고등동물의 유효 면역조절제로서의 가능성이 한층 강화되었다.

요약

본 연구는 마우스를 대상으로 유기게르마늄 강화효모 경구투여에 의한 면역조절작용 효과를 확인하고자 하였다. 마우스를 대상으로 9일간 경구투여한 결과 대조군인 게르마늄비강화 효모 투여군에 비해 복강대식세포, B세포, NK 세포의 활성이 현저히 증가한 것으로 확인되었으며, 최종 실험결과 대식세포는 게르마늄 강화효모 투여 후 식세포활성, 주화성, 부착성, rosette 형성능 현저히 증가하였다. Superoxide anion(O₂⁻) 생성능은 대조군에 비해 유기게르마늄 강화군 투여군에서 3배 활성이 증가하였으며, NO 생성능과 TNF- α 생성능도 농도의존적으로 증가하였다. B-세포 활성화에 의

한 cytolytic activity 증가에 의한 PFC형성능도 게르마늄 비강화 효모에 비해 현저히 증가하였으며 상업화 유기게르마늄으로 알려지고 있는 Ge-132에 비해 2배 이상 높은 활성이 확인되었다. Cytotoxic activity에 의한 항 종양활성에서 는 양성대조군인 Doxorubicin 투여군에서와 유사한 저해활성을 나타내었으며 고용량 유기게르마늄 효모(2,400 mg/kg) 투여시 60%의 종양활성 억제효과가 확인되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 유기게르마늄 강화효모가 실험동물 뿐만 아니라 인체의 유용한 면역조절제로서의 이용성이 기대된다.

REFERENCES

- 1 Arimori, S., K. Watanabe, M. Yoshida, and T. Nagato. 1981. Effect of Ge-132 products and related synthetic compounds (Yamamura Y, S. Kotai, I. Azuma, A. Koda and T. Shiba, eds). *Amsterdam ISBN Elsevier Science* pp. 536-539.
- 2 Aso, H., F. Suzuki, T. Yamaguchi, Y. Hayashi, T. Ebina, and N. Ishida. 1985. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* **29**: 65-74.
- 3 Badawi, A. M. and A. A. Hafiz. 2007. Synthesis and immunomodulatory activity of some novel amino acid germinates. *J. Iran. Chem. Soc.* **4**: 107-113.
- 4 Bigitta, E. L., H. Mann, H. Melzer, L. Dunemann, and J. Begerow. 1999. Renal and other organ failure caused by germanium intoxication. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 2464-2468.
- 5 Faubert, G. M. 1976. Depression of the plaque-forming cells to sheep red blood cells by the new-born larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology* **30**: 485-489.
- 6 Fuggetta, M. P., C. D'Onofrio, and E. Bonmassar. 1990. Role of biological response modifiers in immunochemotherapy of solid tumors and retroviral-induced leukemia. *Ann Ist Super Sanita*. **26**: 385-395.
- 7 Fukazawa, H., Y. Ohashi, S. Sekiyama, H. Hoshi, M. Abe, M. Takahashi, and T. Sato. 1994. Multidisciplinary treatment of head and neck cancer using BCG, OK-432, and GE-132 as biologic response modifiers. *Head Neck*. **16**: 30-38.
- 8 Gadd, G. M. 1993. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. **11**: 297-316.
- 9 Goodman, S. 1988. Medical Hypothesis; Therapeutic effects of organic germanium. *26*: 207-215.
- 10 Joo, S. S., T. J. Won, Y. J. Lee, M. J. Kim, S. Y. Park, S. H. Lee, K. W. Hwang, and D. I. Lee. 2006. Effect of Geranti Bio-Ge yeast, a dried yeast containing biogermanium, on the production of antibodies by B cells. *Immune Network* **6**: 86-92.
- 11 Lee, J. H., K. W. Kim, M. Y. Yoon, J. Y. Lee, C. J. Kim, and S. S. Sim. 2005. Anti-inflammatory effect of germanium-concentrated yeast against paw oedema is related to the inhibition of arachidonic acid release and prostaglandin E2 production in RBL 2H3 cells. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* **25**: 129-134.
- 12 Lee, J. S., J. I. Park, S. H. Kim, S. H. Park, S. K. Kang, C. B. Park, T. U. Sohn, J. Y. Jang, J. K. Kang, and Y. B. Kim. 2004. Oral single-and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in rats. *J. Toxicol. Sci.* **29**: 541-553.
- 13 Lee, J. S., J. I. Park, S. H. Kim, H. Y. Kee, Z. Z. Hwang, C. B. Park, T. U. Sohn, S. H. Shin, J. K. Kang, and Y. B. Kim. 2004. Oral single-and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in dogs. *J. Toxicol. Sci.* **29**: 555-569.
- 14 Lee, S. H., K. N. Oh, S. N. Rho, B. H. Lee, and H. J. Lee. 2006. Oral repeated-dose toxicity studies especially in the liver and kidney of rats administered with organic germanium-fortified yeasts. *J. Food. Sci. Nutr.* **11**: 115-119.
- 15 Lee, S. H., S. N. Rho, and T. U. Sohn. 2005. Efficacy study of activation on macrophage in germanium-fortified yeast. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 246-251.
- 16 Lee, S. H., S. W. Oh, S. N. Rho, B. H. Lee, H. J. Lee and D. K. Jin. 2006. Effects of germanium-fortified yeast on the serum lipids and immune cell subset. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 1-7.
- 17 Munakata, T., S. Arai, K. Kuwano, M. Furukawa and Y. Tomita. 1987. Induction of interferon production by NK cells by organogermanium compound, Ge-132. *J. Interferon Research* **7**: 69-76.
- 18 Nobohiro, W., I. Osamu, K. Takuro, and Y. Koichi. 1980. New approaches to using spent brewer's yeast. *ASBC J.* **38**: 5-8.
- 19 Okada, K., K. Okagawa, K. Kawakami, Y. Kuroda, K. Morizumi, H. Sato, H. Morita, S. Shimomura, and S. Saito. 1989. Renal failure caused by long-term use of a germanium preparation as an elixir. *Clinical Nephrology* **31**: 219-224.
- 20 Pennline, K. A. and H. B. Herscowitz. 1981. Dual role for alveolar macrophages in humoral and cell-mediated immune response: evidence for suppressor and enhancing functions. *J. Reticuloendothel. Soc.* **30**: 205-217.
- 21 Rachanee, U., H. K. Webster, K. Pattanapanxyasa, S. Pitchayangkul, and S. Thaithong. 1992. Cytoadherence characteristics of rosette-forming *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity* **60**: 4483-4490.
- 22 Schauss, A. G. 1991. Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. *Biological Trace Element Research* **29**: 267-280.
- 23 Sohn, T. U., W. J. Song, S. C. Lee, and T. K. Oh. Process for preparing *S. cerevisiae* containing organically bound germanium. US Pat No. 5,792,646.
- 24 Suzuki, F. 1985. Suppression of tumor growth by isolated peritoneal macrophages from mice treated with carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Japan J. Cancer Chemother.* **12**: 2122-2128.
- 25 Suzuki, F., R. R. Brutkiewicz, and R. B. Pollard. 1985. Importance of T-cells and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132).

- Anticancer Res.* **5**: 479-483.
- 26 Suzuki, F., R. R. Brutkiewicz, and R. B. Pollard. 1986. Cooperation of lymphokines and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Anticancer Research* **6**: 177-182.
- 27 Swenson, F. J. and T. R. Kozel. 1978. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by normal and thioglycolate-activated macrophages. *Infection and immunity* **21**: 714-720.
- 28 Tao, S. H. and P. M. Bolger. 1997. Hazard assessment of germanium supplements. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **25**: 211-219.
- 29 Vachier, I., M. Damon, C. LeDoucen, A. C. dePaulet, P. Chanez, F. B. Michel and P. Godard. 1992. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 1161-1166.
- 30 Wright, S. D. and S. C. Silverstein. 1982. Tumor promoting phorbol ester stimulated C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes, *J. Exp. Med.* **156**: 1149-1162.

(Received Apr. 3, 2007/Accepted May 2, 2007)