

## 韓國產 靈芝의 無機 成分 및 免疫 增強 作用에 관한 研究\*

申惠媛\*\* · 金河元 · 崔應七 · 都象學\*\* · 金炳珪

同德女子大學 大學院\*\* · 서울대학교 藥學大學

### Studies on Inorganic Composition and Immunopotentiating Activity of *Ganoderma lucidum* in Korea\*

Hea Won SHIN\*\*, Ha Won KIM, Eung Chil CHOI, Sang Hak TOH\*\* and Byong Kak KIM

Dong Duck Women's University,\*\* Seoul 132, and

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

**Abstract**—To determine contents of inorganic elements of *Ganoderma lucidum*, the horn-shaped carpophores and the pileus of *Ganoderma lucidum* were incinerated and analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry. The ash contents of the pileus and the horn-shaped carpophore were 1.48 % and 1.40 %, respectively. The pileus contained calcium, magnesium, sodium, manganese, iron, zinc and germanium in that order. The horn-shaped carpophore contained magnesium, calcium, zinc, manganese, iron, copper and germanium in that order. To examine the protein-bound polysaccharide from *Ganoderma lucidum* for immunopotentiating activity, its fruit bodies were extracted with hot water. Purification of the extract was carried out by acetone precipitation and dialysis. The fraction obtained during the purification procedure consisted of a polysaccharide moiety (51 %) and a protein moiety (5 %). When the compound was administered intraperitoneally to the mice at a dose of 50 mg/kg, it enhanced the accumulation of the peritoneal exudate cells, macrophage and polymorphonuclear leucocytes, thereby indicating immunopotentiating activity.

**Keywords**—*Ganoderma lucidum*·Polyporaceae·Basidiomycete·inorganic elements·peritoneal exudate cells·macrophage·polymorphonuclear leucocytes·immunopotentiating activity·inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry

靈芝는 一名 「不老草」 또는 「만년버섯」이라고 불리고, 多孔菌科(Polyporaceae)에 속하는 버섯으로 學名은 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten 이다. 靈芝로 推定되는 생약은 중국의 가장 오래된 藥物書인 「神農本草經」의 上品에 「赤芝, 黑芝, 黃芝, 紫芝, 白芝, 青芝」의 6種으로 分類되어있으며 利水, 補肝, 強壯, 精神安定作用 및 關

節炎, 咳嗽, 氣管支炎 등의 治療藥으로서 藥效가 이미 記載되어 있다. 한방에서는 滋補強壯, 解毒收斂, 消積, 血中脂質降下, 祛痰, 平喘 등의 藥理作用이 있어서 動脈硬化症, 高血壓症, 腦卒中, 狹心症, 各種 癌, 重症筋無力症, 頸暈, 不眠 등을 수반하는 神經衰弱, 위궤양, 소화불량 등의 慢性病, 慢性氣管支炎, 咳嗽, 氣喘, 急性病毒性肝炎 등에 다른 한방약과 배합하여 사용 해왔다.<sup>1)</sup> 靈芝는 갓과 줄기로 構成되어 있으며,

\* Part XLIII of Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea

갓은 콩팥형이고 드물게는 원형을 이루는 것도 있다. 갓의 側面 또는 中央部에 수직으로 줄기가 形成되어 있다. 갓의 크기는 일정하지 않지만 대개 지름이 5~13 cm이며, 두께는 1 cm 정도이다. 또한 그 表面에는 여러개의 선명한 띠가 있으며, 니스와 같은 分泌物이 生成되어 매우 光澤이 있다. 人工栽培時는 갓에 胞子が 덮여 褐色을 나타내는 경우도 있으나, 胞子를 물로 洗滌하면 光澤을 나타내게 된다. 靈芝는 赤褐色 내지 紫褐色을 나타내며 갓의 육질은 上下 2層으로 構成되어있고, 상층은 대개 白色이며 하층은 옅은 니켈색으로 코르크질을 이루고 있다. 갓의 아랫면은 成長時에 黃白色을 나타낸다. 胞子의 形態는 9~11×5.5~7 μm의 크기인 계란형이며 2층막으로 構成되어있다. 내막은 황갈색으로 가느다란 突起가 外膜의 내면에 부착되어있는데 이런 形態의 胞子는 *Ganoderma*속, *Elfvigia*속, 및 *Trachyderma*속에서만 觀察된다. 靈芝는 濼帶지방에 널리 분포되어 있으며, 활엽수 특히 *Quercus*속, *Castanea*속의 그루터기에 자생한다.<sup>2)</sup> 最近에는 人工栽培에 성공하여 한국·일본·중국 등지에서 활발히 재배하고 있다. 영지의 약효에 대해서 한방이나 기타 고전에 여러가지로 기재되어 있지만 이러한 약효는 그 시대의 경험적 결과를 근거로 한 것이므로 主觀的 意見이 섞여있다고 볼 수 있다. 靈芝에 대한 科學的 實驗結果는 1970년대에 들어와서 비로서 발표되기 시작하였다. 1977년에 Sugiura 등은 靈芝의 毒性에 관한 연구를 發表하였는데, 靈芝의 子實體를 물로 加熱 抽出한 polysaccharide 分劃에 대해 急性 및 慢性 毒성을 살펴본 결과, 급성 독성으로서 LD<sub>50</sub>은 경구 투여시 rat의 경우 16700 mg/kg 씩 30일 동안 連續 投與하여도 아무런 독성이 없음을 발표한 바 있다.<sup>3)</sup> 한국산 자생 영지에 관한 연구는 처음으로 Shim 등이 1978년에 靈芝의 sterol 성분을 確認하여 發表한 바 있다.<sup>4)</sup> 1979년에 有地 등은 靈芝의 熱水 抽出液의 高分子物質이 自然發生된 高血壓 rat에서 血압을 緩慢하게 降下시키는 確證하였다. 즉 靈芝의 갓 부분과 줄기 부분의 추출액에 대해 血압 강하 작용이 있었으며, 분자량에 따라 비교한 결과, 분자량 10만 이상이 가장 血압 강하 작용이 강하

였으며, 그 다음은 5만에서 10만 사이의 分劃이 血압 강하 작용이 강했다. 이들 고분자물질의 구성은 당과 아미노산으로 구성되어 있음을 보고하였다. 또한 25명의 本態性 高血壓 患者에게 靈芝의 熱水 抽出物을 冷凍乾燥시켜 날마다 140~280 mg씩 投與하였던 바, 血압의 안정화 작용, 특히 최저 血압의 降下작용이 認定되었다.<sup>5,6)</sup> 1980년 역시 久保 등은 실험적 高脂血症 rat에게 영지의 熱水 抽出物을 하루에 100 mg/kg의 용량으로 투여하였던 바, 高脂血症의 改善作用이 있음을 밝혔다. 즉 血清 cholesterol, 中性脂肪, β-lipoprotein 등의 低下작용이 있었으며, 산지에 따라 약효가 다르게 나타났으므로 市販하는 靈芝를 取扱할 때나 輸入時에는 生理學的 活性面을 검토한 후 使用해야 한다고 主張하였다.<sup>7)</sup> 한편 Kim 등은 1980년에 한국산 야생 靈芝를 採集하여 抗癌實驗을 실시하였다. 즉 sarcoma 180 肉種을 이용하여 항암 실험을 진행한 결과 50 mg/kg의 용량으로 10일간 투여하였을 때 87.6%의 抑制率을 보여주었으며 5마리는 肉種이 완전히 退化하였다. 이 항암 성분은 다당류 27%와 단백질 72%로 구성되어 있음을 밝혔다.<sup>8)</sup> 야생 靈芝의 子實體는 採集하기가 힘들기 때문에 1981년 Kang 등은 영지의 子實體에서 分離한 菌絲를 液內培養하여 분리한 성분도 동일한 항암 효과가 있음을 확인하였다. 항암 효과는 菌사체에서 분리한 것이 자실체에서 분리한 것보다 조금 떨어지는 면이 있으나, 항암 성분의 대량 생산 가능성을 보여주었다. 영지의 항암 효과의 메커니즘을 밝히기 위해 hemolytic plaque-forming cell을 관찰해본 결과 항암 성분은 癌細胞를 직접 攻撃하는 것이 아니라 암세포에 대한 宿主의 免疫能力을 增加시켜 줌으로써 間接的으로 抑制作用이 나타난다는 것을 立證하였다.<sup>9)</sup> 같은 해 Miyazaki 등은 영지의 녹각지에서 분자량 약 4萬의 polysaccharide를 抽出한 후 20 mg/kg의 용량으로 10일간 ICR mouse에 복강 투여한 결과, sarcoma 180에 대하여 95~98%의 抑制率을 있음을 보고하였다.<sup>10)</sup> 한편 Kubo 등은 영지의 子實體를 물로 加熱 抽出하여 分子量 10만 이상의 물질로서 고 血압 治療劑를 분리하여 일본 特許를 申請하였다.<sup>11)</sup> 靈芝를 대상으로 生理活性을 연구해오다

가 1982년에 처음으로 영지의 苦味 成分의 구조가 밝혀졌다. Kubota 등은 靈芝 子實體를  $\text{CHCl}_3$ 로 추출하여 새로운 苦味成分인 triterpene 系統의 ganoderic acid A(분자량 516)와 ganoderic acid B(분자량 513)를 분리 확인하였다.<sup>12)</sup> 또한 Kubo 등은 1983년에 靈芝 子實體의 열수 추출물이 播種性 血管內 凝固에 미치는 작용을 연구하여 발표하였다. 여기서 播種性 血管內 凝固라 함은 血小板 응집, 트롬빈에 의한 fibrin 생성으로 血栓이 형성되어 血管腔이 좁아지거나 막혀서 心臟, 腦, 肺에 虛血性 病變이나 梗塞을 일으키고 이들 중요 장기의 기능 장애를 招來하는 疾病이다. 실험적으로 장<sup>11)</sup> 세균의 endotoxin을 쥐에 정맥주사하여 유발시킨 과중성 혈관내 응고에 대한 영지의 작용을 血小板의 수, fibrinogen양, prothrombin시간, 血中 fibrin분해 산물의 양을 指標로 하여 檢討한 결과, 靈芝의 열수 추출물이 播種性 血管內 凝固에 대해 억제 작용이 있음을 證明하였다. 뿐만 아니라 血中 脂質의上昇은 凝固系의 活性化, 線溶 기능의 저하, 즉 血栓이 일어나기 쉬운 상태로 만들기 때문에 高脂血症의 쥐에서 endotoxin에 의해 생긴 播種性 血管內 凝固에 대한 靈芝의 작용을 檢討하였던바, 肝 정맥 혈전의 형성을 억제함을 관찰하였다.<sup>13)</sup> 같은 해 일본의 木村 등은 靈芝가 당대사에 미치는 영향을 검토하였는데, 쥐의 血糖이 감소되었음을 관찰하였다. 그런데 靈芝가 포도당의 腸管吸收에는 아무런 영향이 없었으므로 단순한 흡수 억제로 인한 혈당의 저하라기 보다는 말초 조직에서의 당이용을 촉진시키는 것으로 볼 수 있다. 뿐만 아니라 영지 투여후 30분 후에 인슐린이 상승하는 것으로 보아 分泌促進 작용이 있는 것으로 推測된다.<sup>14)</sup> 木村 등은 영지를 대상으로 실험을 계속하여 1984년에 靈芝의 抽出物이 肥胖 細胞로부터 히스타민 유리에 미치는 영향을 실험하여 발표하였다. 현재 抗히스타민제가 여러 종류 나와있지만, 비만세포의 히스타민 분비 억제 작용을 가진 물질을 찾는 연구가 진행되고 있다. 靈芝의 성분이 과연 肥胖 細胞의 히스타민 분비를 억제할 수 있는지를 木村 등이 檢討한 결과, 영지의 아세톤溶出 分劃이 히스타민 분비를 강하게 抑制함을 관찰하였다.<sup>15)</sup> 또한 木村

등은 1984년에 靈芝의 추출물이 rat의 過酸化脂質 형성에 대해 억제 작용이 있음을 발표하였다. 이 실험에서 靈芝의 抽出物중 水溶性 分劃 및 아세톤 溶出 分劃은 75%의 阻止率을 나타내었고 이것은 d,l- $\alpha$ -tocopherol  $10^{-4}\text{M}$  농도에 의한 肝 microsome의 過酸化脂質 생성의 억제 작용보다 더 강한 것이었다. 또한 ADP와 ascorbic acid에 의한 肝 mitochondria의 過酸化脂質 생성을 靈芝의 水溶性 分劃과 아세톤 溶出 分劃이 1 mg/ml의 농도에서 각각 57% 및 90%의 저지 작용을 나타내었다. 이 저지 작용은  $\alpha$ -tocopherol  $10^{-4}\text{M}$  농도에 의한 肝 mitochondria의 과산화지질 생성의 저지 작용과 거의 동일하거나 더 강한 효과였다.<sup>16)</sup> 1984년 Kim 및 Nam은 靈芝의 核酸과 그 구성성분인 mononucleotide의 分布를 연구하여 報告하였다. 즉 靈芝의 子實體 형성 전과 후의 RNA를 추출하여 정량한 결과 RNA의 총량이 형성전에 더욱 많았다. 이 RNA를 加水分解하여 그 구성 mononucleotide를 분석하였던 바, XMP와 GMP가 확인되었고 CMP로 추정되는 성분이 검출되었음을 발표하였다.<sup>17)</sup> 1984년 中村 등은 靈芝의 品質管理를 할 목적으로 영지를 50% methanol로 추출한 것을 HPLC로 분석하여 10개의 peak를 얻었다. 이것을 silica gel, LH-20 등을 이용하여 ganoderic acid 誘導體 3개를 더 추가로 구조를 밝혔다.<sup>18)</sup>

한편 微量 금속의 생체내 기능 및 중요성에 대하여 많은 연구가 되어있으며, 특히 Germanium(以下 Ge로 略함)의 生理 活性과 藥效에의 영향은 관심의 대상이 되어<sup>19,20)</sup> 藥水, 天然水중의 Ge 및 一般 金屬의 含量 調査가 많이 施行되어있다. 천연에 미량 존재하는 원자번호 32의 Ge은 1886년 Winkler에 의해 처음 발견되었다. 일본의 淺井은 人蔘, 紫根 등의 생약과 버섯류, 약수 등에서의 정량 Ge 및 약리 실험을 하였으며, Ge의 抗腫瘍性 作用등을 究明하였다.<sup>21)</sup> 우리나라의 경우 Ge의 분석 분야에서는 1978년 Paik 등이 原子吸光法을 이용하여 서울지역 약수중의 Ge 및 일반 금속을 정량한 바가 있으며,<sup>22)</sup> 또한 1979년에 Paik 등은 黑鉛爐 原子吸光分析法을 이용하여 생약중의 Ge함량을 측정한 바 있다.<sup>23)</sup> 1984년에 Moon은 differential pulse strip

ping voltammetry에 의하여 Ge 및 selenium의 분석을 시도하였다.<sup>24)</sup>

이에 저자는 靈芝 子實體의 無機 成分에 관한 보고가 없으며, 한국산 靈芝의 抗癌 作用을 가진 protein-bound polysaccharide의 면역 세포의 변동에 미치는 영향에 대하여 연구된 바가 없으므로 무기 성분 분석과 마우스의 복강내 면역 세포 변동에 미치는 영향에 관하여 새로운 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

實驗 材料 및 方法

實驗 材料

본 실험에서 사용한 靈芝 *Ganoderma lucidum* (*Polyporaceae*, 多孔菌科)는 한국에서 재배된 赤芝와 녹각지를 사용하였다. 갓과 녹각지는 각각 다른 회사의 제품이었다.

無機 成分의 分析

1) 使用 機器

Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer(Model No. 710, Labtam Co., Australia)와 灰化器로서 Furnace (Model 51894, a unit of General Signal Co., Lindberg, U.S.A.)를 사용하였다.

2) 標準液의 調製

Ge 표준액은 Germanium standard solution (1000 ppm Ge, 林純藥工業株式會社製)을 사용하고, Zn, Fe, Cu, Ca, Na, Mn, 표준액은 Reference solution(1000 ppm±1%, Fisher Scientific Co., U.S.A.)을 사용하여 조제하였다.

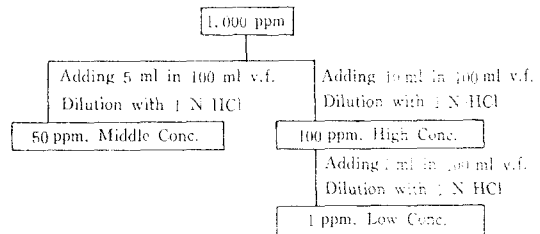
그 방법은 上記 표준 용액을 각각 10 ml씩 取하고 1 N-HCl을 加하여 100 ml로 각각 만들었다 (100 ppm, high concentration). 또 이 100 ppm 용액 1 ml를 취하여 1 N-HCl을 加하여 100 ml로 각각 만들었다(1 ppm, low concentration). 그리고 1000 ppm 표준용액 5 ml를 취하여 1 N-HCl을 加하여 100 ml로 만들었다(50 ppm, middle concentration) (Scheme I).

3) 實驗 材料의 處理

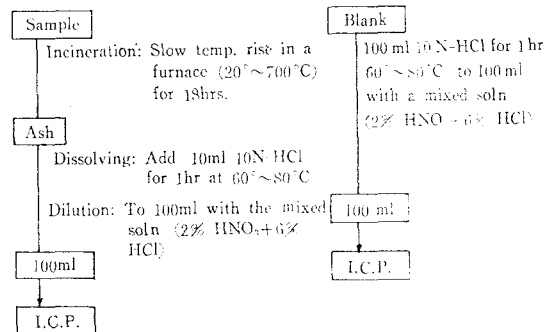
誤差를 막기위해 도가니는 6 N-HCl에 하루밤 방치한 후 腕이온수로 洗滌하였다. 그리고 oven에서 건조시킨 후, 다시 heated vacuum desiccator

에서 건조시킨 후에 秤量하였다. 靈芝의 갓과 녹각지는 각각 細切하여 2차 증류수로 4~5회 滌균 후에 oven(150°C)에서 恒量이 될 때까지 건조시켰다. 이것을 칭량한 다음 각각의 정해진 도가니에 넣고 hot plate上에서 20°C에서부터 온도를 서서히 上昇시켜서 炭化시켰다. 炭化된 것을 灰化用 화로에서 500°C로 유지하고 16시간동안 灰化시킨 후, 최종적으로 700°C에서 2시간 동안 灰化시켰다. 각각의 회분에 10 N-HCl 10 ml를 加하여 hot plate(60°~80°C)上에서 1시간 동안 溶해시켰다. 그 후에 混酸을 加하여 100 ml로 한 후 시료의 시험액으로 하였다(Scheme II).

4) 無機 成分의 測定 및 定量



Scheme I. Preparation of standard solution.



Scheme II. Analytical procedure of inorganic constituents in *Ganoderma lucidum*.

Table I. The condition of I.C.P.A.E.S.\* for determination of inorganic constituents in *Ganoderma lucidum*

Slit width	:	15 μ
Ar gas pressure	:	
Line	:	425 Kpa*
Sample	:	300 Kpa
Coolant	:	200 Kpa
Atomizer	:	10, 000° K

\* I.C.P.A.E.S. = Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer

\* 500 Kpa=75 psi

Ge 및 각종 無機 成分의 定量에는 Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer를 사용하였으며, 이 때의 측정조건은 Table I과 같았다. 測定은 매번 空試驗을 行한 後 3회 반복하였으며, 그 平均值를 取하였다.

1) 靈芝의 蛋白性 多糖類가 마우스의 腹腔 細胞群에 미치는 影響

1) 實驗 動物

서울대학교 동물사육장에서 구입한 ICR 마우스(숫컷)중에서 체중이 20~25g에 해당하는 것을 사용하였다. 사료는 삼양유지 사료사의 삼양 실험동물 사료(항생물질 무첨가 마우스용)를 사용하였고 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였다. 사육실은 15~20°C 였으며 通風이 잘 되는 곳이었다.

2) 蛋白性 多糖類의 抽出 및 分離

영지(87g)을 잘게 잘라서 methanol로 抽出한 殘渣를 oven에서 乾燥시키고 1l의 증류수로 水浴上에서 4시간동안 熱湯 抽出하였다. 추출액을 減壓여과하고, 간사를 다시 증류수로 재차 4시간열탕 추출했다. 2회의 추출액을 합하여 감압 농축하고, 濃縮液에 3배량의 氷냉 acetone을 가하고 교반하여 침전을 형성시켰다. 침전을 완결시키기 위하여 4°C에서 1일간 방치하였다. 형성된 침전물을 감압 여과하여 분리하고, 그 침전물을 50ml의 증류수로 용해한 후, 그 용액을 중탕한 Visking tube에 넣어서 4°C에서 일주일간 투석시켜 저분자 물질을 제거하였다. 투석이 끝난 후, 투석막내의 고분자 물질이 함유된 용액을 비이커에 담아 -60°C로 동결시킨 후, 冷凍 건조를 실시하여 상아색의 단백성 다당류를 얻었다(Scheme III).

3) 試 藥

① Phosphate Buffered Saline(PBS)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.232g과 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.955g을 40ml의 2차 증류수에 용해시킨 후 pH를 7.3으로 맞추었다. 여기에 NaCl 7.013g을 가한 후 總 용량을 80ml로 하였다. 使用時에는 10배 稀釋하였다.

② Balanced Salt Solution(BSS)

Stock solution No. 1: Dextrose 10.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.58g, 0.5% phenol red

solution 20.0ml를 2차 증류수에 녹여서 總 용량을 1l가 되도록했고, 4°C에서 保存하며 사용했다.

Stock solution No. 2: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.86g, KCl 4.0g, NaCl 80.0g, MgCl<sub>2</sub> 1.04g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0g을 2차 증류수에 녹여서 總 용량이 1l가 되도록하였고 4°C에서 보존하며 사용하였다.

사용時에는 Stock solution No. 1 100ml와 Stock solution No. 2 100ml를 섞어서 2차 증류수 800ml를 가한 후 pH를 7.3으로 맞추었다.

③ Giemsa Staining Solution

Stock solution: Giemsa powder (BDH Chemical Co., England) 0.5g을 glycerine 33.0g에 60°C 수욕상에서 완전히 용해시킨 후 absolute methanol 33.0ml를 가하고 용해하여 여과한 후 사용하였다.

Working solution: 4ml의 stock solution에 증류수를 가하여 40ml로하여 사용하였다.

④ NSE(Non-Specific Esterase) Staining Solution

Stock solution: α-naphthylacetate 1g을 acetone 50ml와 증류수 50ml에 녹여서 4°C에서 보존하며 사용하였다.

Working solution: Stock solution 2.0ml와 0.1M phosphate buffer(pH 7.3) 15ml, 증류수 15ml, fast red TR salt (4-chloro-o-toluidine diazotate, Polyscience사) 20mg을 사용時에 氷冷下에서 순서대로 混合, 振盪 여과하여 사용하였다.

4) 方 法

① 高分子 物質의 投與

각 群의 실험 동물 수는 5마리로 하여 모두 15마리에 1mg/ml의 濃度로 PBS에 용해시킨 후 高壓 滅菌하여 1ml씩 마우스의 복강內에 주사하여 시험군으로 하였다. 대조군 5마리에는 滅菌한 생리식염수를 각각 1ml씩 주사하였다.

② 腹腔 滲出 細胞의 준비

약물 투여 후 1日, 3日, 5日만에 실험 동물을 致死시키고 즉시 해부하여 腹腔을 氷냉 BSS로 세척하여 시험관에 복강 세포를 모았다. 復강 세척액 전체가 10ml가 되도록 한 다음 hemacytometer로 總 復강 세포(PEC)를 세었다. 그후 復강 세척액을 4°C에서 400×g로 10분간 원심분

리하여 세포침전물을 얻어 1 ml의 상등액과 잘 희석시켜서 마우스 1마리당 4매의 slide glass를 준비하여, slide glass 1매당 2군데씩 도말하여 모두 8군데에 균등하게 도말하였다.

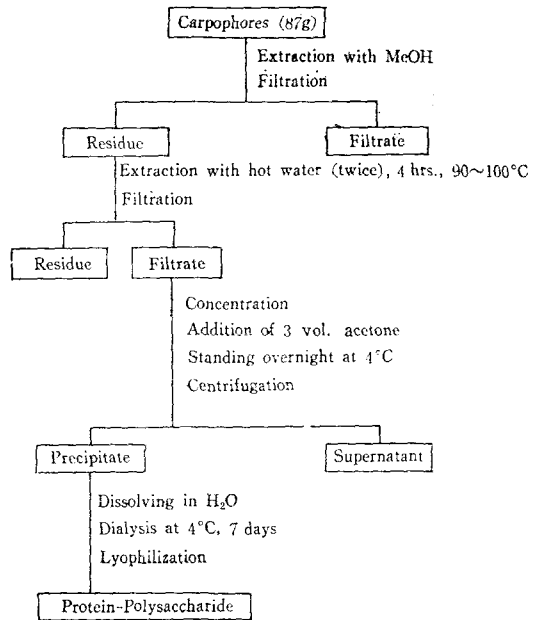
③ Lymphocyte와 PMN(polymorphonuclear leukocytes)의 관찰

도말한 slide glass를 자연 건조시킨 후, 2매는 absolute methanol로 5분간 고정시킨 후 Giemsa staining solution을 加하고 30분간 염색하였다. 과잉의 염색액을 95% ethanol로 세척하고, 건조시킨 후 cedar oil을 mounting solution으로 하여 1000배로 관찰하였다. 이때 세포의 모양이 둥글고 전체가 진하게 염색된 말발굽 모양의 핵을 지닌 세포를 lymphocyte로 보고, 세포질내에 염색된 핵이 여러개 있거나 도너츠 모양의 핵을 지닌 세포를 PMN으로 보았다.

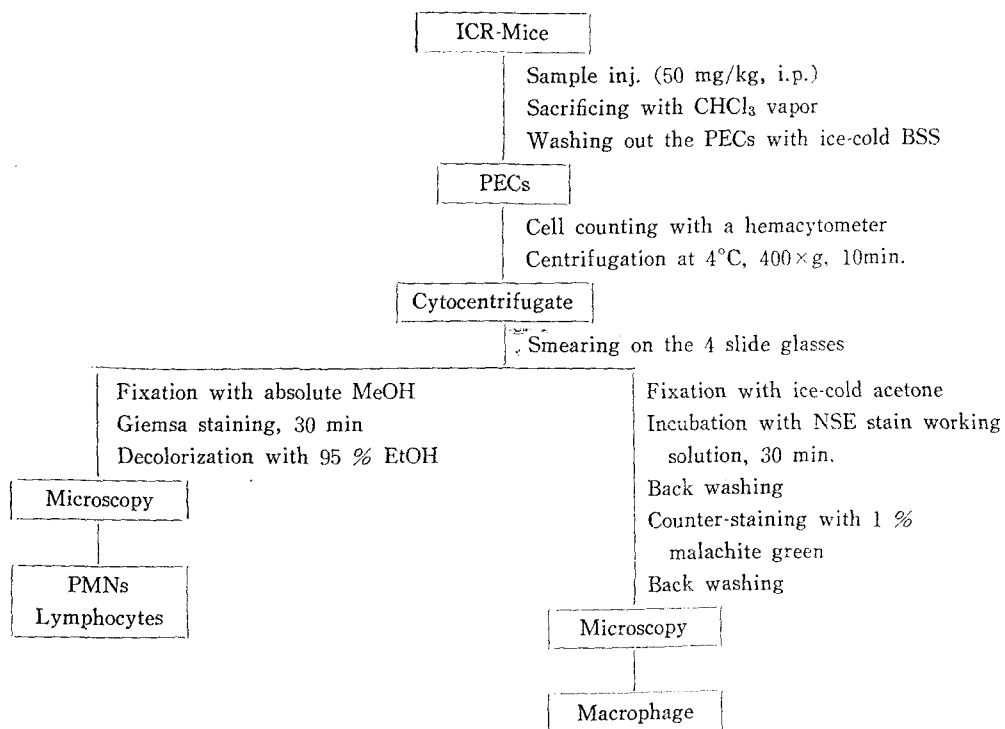
④ Macrophage의 관찰

자연 건조시킨 다른 2매의 도말 표본을 병냉의 아세톤으로 5분간 고정시킨 후 saline으로 세척한 다음 NSE staining solution에 넣어서 37°C의 incubator에서 30분간 방치하여 염색하였다.<sup>25)</sup> 수

듯물로 back washing한 후에 1% malachite green 용액으로 15초 동안 대조 염색을 하고 다시 수



Scheme III. Extraction of protein-polysaccharide fraction from *Ganoderma lucidum*.



Scheme IV. Procedure for macrophage, PMNs and lymphocytes accumulation test.

dot으로 back washing하여 건조시켰다. glycerine 을 mounting solution으로 하여 1000배로 관찰 하였다. 이때 세포질내에 NSE stain에 의해 적 색의 입자를 지닌 세포를 macrophage로 보았다 (Scheme IV).

### 高分子物質의 化學分析

#### 1) 總多糖類의 含量測定

총 다당류의 함량은 Anthrone test를 실시하여 측정하였다. glucose를 표준액으로하여 Anthrone 시약과 반응시켜 나타나는 發色度를 625 nm에서 吸光度를 측정하여 檢量 曲線에 의거하여 정량 하였다.<sup>26)</sup>

#### (1) 試藥

Glucose(standard): 100  $\mu$ g/ml용액

75 %  $H_2SO_4$

Anthrone reagent: Anthrone 200 mg을 absolute ethyl alcohol 5 ml에 용해한 후 75 %  $H_2SO_4$  를 加하여 100 ml로 한 용액.

Sample: 100  $\mu$ g/ml 용액과 200  $\mu$ g/ml 용액.

#### (2) 實驗方法

Glucose(standard)용액을 0, 0.1, 0.2, ...1.0 ml되게 시험관에 채운 후 증류수로 모두 1.0 ml 되게 채웠다. 이때 모든 시험관은 ice-bath에 설치하였다. 각 시험관에 cold Anthrone 시약을 5.0 ml 첨가하여 즉시 voltex mixer기로 진탕한 후 다시 ice-bath에서 5분간 방치하였다. 5분 경과 후 각 시험관을 boiling bath로 옮겨 10분간 방치한 후 다시 ice-bath에 옮겼다. sample 두 용액도 동일한 조작을 거쳐 625 nm에서 흡광도를 측정하여 檢量 曲線을 작성하여 sample中の 總多糖類를 정량하였다.

#### 2) 總蛋白質의 含量測定

총 단백질의 함량은 Lowry-Folin method를 사용하여 구하였다. 시료에 대해 각각 Lowry-Folin 반응을 실시한 후 540 nm에서 吸光度를 측정하여 작성한 檢量 곡선으로 단백질 함량을 구하였다.<sup>27)</sup>

#### (1) 試藥

Bovine Serum Albumine (BSA Standard): 0.3 mg/ml용액

Reagent A: 0.5 N NaOH 용액에  $Na_2CO_3$  100 g 을 첨가하여 총 1 l가 되게했다.

Reagent B: 증류수 100 ml에  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1 g

을 용해시킨 용액

Reagent C: 증류수 100 ml에 potassium tartrate 2 g을 용해시킨 용액.

Reagent D: Reagent A 15 ml, Reagent B 0.75 ml, Reagent C 0.75 ml를 모두 섞은 용액.

Reagent E: 2 N-Folin phenol 용액 5 ml에 증류수 50 ml를 섞은 용액.

Sample: 0.3 mg/ml 용액과 0.6 mg/ml 용액.

#### (2) 實驗方法

시험관에 BSA 용액(standard)을 0, 0.1, 0.2, ...1.0 ml를 채운 후에 증류수로 모두 1.0 ml되게 채웠다. 그리고 각 시험관에 Reagent D를 1 ml씩 첨가한 후 voltex mixer기로 진탕시킨 후 실온에서 15분간 방치했다. 방치하는 동안 2 N-Folin phenol용액 5.0 ml와 50 ml 증류수를 섞어 Reagent E를 조제했다. 15분 경과후 각 시험관에 Reagent E를 3 ml씩 추가하여 즉시 voltex mixer기로 진탕시켜 다시 실온에서 45분 방치하였다. sample도 동시에 동일 조작을 실시하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 檢量곡선을 작성하여 sample중의 총 단백질량을 정량하였다.

#### 赤外線吸光分析

Protein-bound polysaccharide 분획을 KBr disc method를 사용하여 분석하였다.

## 實驗結果

### 無機成分의 分析結果

#### 1) 灰分의 含量

한국에서 人工栽培한 영지의 갓과 녹각지를 灰化하여 灰分을 측정한 결과 갓 부분은 1.48 %, 그리고 녹각지는 1.40 %를 차지하였다.

#### 2) Ge 및 무기 성분

Ge과 일반적인 무기 성분을 정량한 결과를 Table II에 표시하였다.

### 高分子物質의 免疫能 增進 效果

靈芝의 子實體로부터 얻은 단백질성 다당류를 腹腔內에 주사한 후 복강내 세포들의 증감여부를 관찰하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 표시하였다. 복강내 총 세포수는 고분자 물질을 투여한 후 급속히 증가하기 시작하였는데, 1일 후와 3일 후에 거의 비슷하게 최고값을 나타냈고, 5일 후에

Table II. Analytical results of inorganic constituents in *Ganoderma lucidum*

Elements	Detection wavelength (Å)	PMT* volts	Pileus of carpophore(ppm)	Horn-shaped carpophore(ppm)
Ca	3,179.64	5	118.22±11.04	53.83± 7.30
Mg	2,851.31	5	56.41±11.51	55.41± 8.14
Na	5,890.35	5	25.06±10.32	27.40±12.76
Mn	2,572.57	6	3.74± 1.41	0.91± 0.13
Fe	2,381.85	7	2.52± 1.15	0.16± 0.11
Zn	2,138.44	8	1.91± 0.33	1.21± 0.13
Cu	3,247.70	8	1.08± 0.07	0.36± 0.04
Ge	2,651.15	8	0.15± 0.03	0.09± 0.02

\* PMT=photomultiplier tubes.

는 정상인 마우스의 총 백혈 세포수와 거의 비슷한 값으로 회복되었다. PMN은 증가하기 시작하여 1일만에 최고치를 나타내었으며, 3일 후에도 비슷하였으나 그 이후부터 급속히 감소하여 정상치로 회복되었다. macrophage는 주사한 후 급속히 증가하여 하루만에 최고치를 나타내었으며, 그 이후부터는 서서히 감소하였으나 control 보다는 높은 농도를 유지하였다. lymphocyte도 control보다 높은 값을 나타내었다.

단백성 다당류의 화학 분석 결과

靈芝를 증류수로 추출하여 농축한 후, acetone으로 침전시켜 투석한 후 얻은 고분자 물질의 총 다당체의 함량과 총 단백질 함량을 측정할 결과

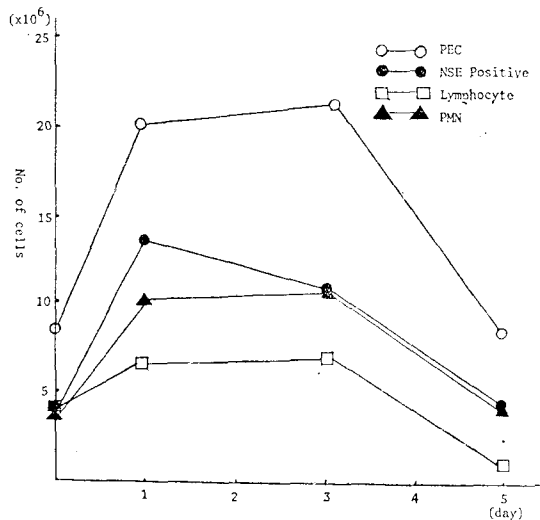


Fig. 1. Effects of the protein-bound polysaccharide of *Ganoderma lucidum* on the peritoneal cell population of ICR mice.

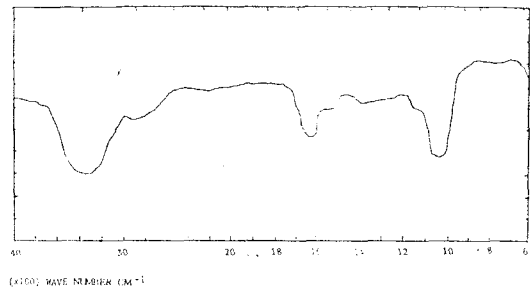


Fig. 2. IR spectrum of the protein-bound polysaccharide fraction of *Ganoderma lucidum*.

각각 51%와 5%가 나왔다.

IR spectrum을 보면 3,300 cm<sup>-1</sup> 부근의 O-H 신축 진동, 1,650 cm<sup>-1</sup> 부근의 C=O 신축 진동, 1120~1000 cm<sup>-1</sup> 부근의 C-O 신축 진동을 관찰할 수 있었다.

考 察

靈芝의 子實體중의 무기 성분을 분석한 결과, 저자 등이 정량한 것 중에서는 Ca, Mg이 가장 많았고, 그 다음으로 많은 것은 Na으로 이들 3종의 성분이 대부분을 차지하고 있었고, 나머지 Mn, Zn, Fe, Cu, Ge 등은 미량이었다. 무기 성분의 함량은 일반적으로 녹각지보다 갓에 더 많았다. 특히 Ca양은 갓부분에 있어서 118,217 ppm으로 녹각지의 53,831 ppm에 비하여 2배 이상의 함량이었다. Mn과 Fe의 양은 갓부분이 녹각지의 2배 이상을 차지하였다. 日本의 淺井은 Ge의 抗腫瘍性 作用등을 究明하였으며<sup>21)</sup> 특히



영지중의 Ge이 약효에 미치는 영향이 크다고 하였으나 저자들이 靈芝 성분중의 Ge양을 측정할 결과 깃부분의 경우, 0.5 ppm으로 극히 미소하였으므로, 靈芝의 약효를 나타내는 주성분으로 볼 수 없다.

靈芝의 子實體를 熱水로 抽出하고 acetone으로 침전시킨 후, 투석하고 동결건조하여 얻은 물질은 다당류 51%, 단백질 5%의 protein-bound polysaccharide였다. 이 물질을 마우스의 복강내에 주사한 결과 복강 총 세포수의 급격한 증가와 macrophage의 현저한 증가가 있었다. 1980년 Kim 등은 한국산 야생 靈芝의 항암 실험을 실시하여 sarcoma 180 肉腫에 대하여 87.6%의 억제 효과가 있었음을 발표하였으며,<sup>8)</sup> 1981년 Kang 등은 靈芝의 子實體에서 분리한 균사를 액내 배양하여 분리한 성분도 동일한 효과가 있음을 확인하였다. 또한 그 항암 성분이 체내 면역 반응에 관여하는 각종 세포중 humoral immunity에 관여하는 effector B-cell의 수를 현저히 증가시켰음을 보고하였다.<sup>9)</sup> 저자들이 실험한 결과 macrophage 수가 현저히 증가하였고, 또한 lymphocyte의 수도 다소 증가했음을 볼때, 靈芝의 항암 효과는 다른 화학요법제가 암세포에 직접적으로 작용하는 것과는 달리 암세포에 대한 숙주의 면역 능력을 증가시키는 작용에 의한 것으로 사료된다.

## 結 論

1. 靈芝의 子實體를 灰化시킨 후 얻은 灰分의 含量은 것이 1.48%, 녹각지가 1.40%를 차지하였다. 무기 성분의 함량을 분석한 결과 깃부분에서는 Ca이 가장 많이 함유되어 있었으며, 그 다음은 Mg, Na, Mn, Fe, Zn, Cu, Ge의 순서로 함유되어 있었다. 녹각지에서는 Mg이 가장 많이 함유되어 있었으며 그 다음은 Ca, Na, Zn, Mn, Fe, Cu, Ge의 순서로 함유되어 있었다. Ge은 극히 미량 포함되어 있었으므로 이 극미량의 원소가 약효를 나타내리라 기대할 수 없다.

2. 靈芝의 단백질 다당류는 마우스의 복강내에 있는 PEC, macrophage 및 PMN의 수를 현저히 증가시켰으므로 면역 증강 작용이 있었다. 이

물질은 51%의 다당류와 5%의 단백질로 되어 있었다.

감사의 말씀: 이 연구에 소요된 경비의 일부는 1984년도 산학재단 연구비로 충당되었으며 이에 대하여 감사하는 바입니다.

(1985년 6월 20일 접수; 7월 15일 수리)

## 文 獻

1. 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, (1978).
2. Imazeki, R., Hongo, T.: *Coloured Illustrations of Fungi of Japan* p.142, Hoikusha Publishing Co., Ltd, Osaka (1969).
3. Sugiura, M. and Ito, H.: *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* 27, 722 (1977).
4. Shim, M.J., Lee, S.I. and Kim, B.K.: *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 3, 65 (1978).
5. 有地 滋, 谿 忠人, 久保道徳, 松田秀秋, 吉村茂年, 桐ヶ 谷紀昌: *基礎와 臨床* 13, 4239 (1979).
6. 有地 滋, 上原清史, 上野 隆, 河井 洋, 谷 薫, 長谷初恵, 仕垣勝治, 谿忠人, 久保道徳, 桐ヶ 谷紀昌: *基礎와 臨床* 13, 4245 (1979).
7. 久保道徳, 松田秀秋, 田中基晴, 木村善行, 谿 忠人, 有地 滋, 奥田拓道, 桐ヶ 谷紀昌: *基礎와 臨床* 14, 2455-2460 (1980).
8. Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S. and Yang, M.S.: *Kor. J. Mycol.* 8, 107 (1980).
9. Kang, C.Y., Shim, M.J., Choi, E.C., Lee, Y.N. and Kim, B.K.: *Korean Biochem. J.* 14, 101 (1981).
10. Miyazaki, T. and Nishijima, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 29, 3611 (1981).
11. Kubo, M. and Arichi, S.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 81, 57801 (1981).
12. Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I. and Mori, H.: *Helv. Chim. Acta* 65, 611 (1982).
13. Kubo, M., Matsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T.: *Yakugaku Zasshi* 103, 871 (1983).
14. 木村善行, 奥田拓道, 有地 滋: *基礎와 臨床* 18, 833 (1984).
15. 木村善行, 奥田拓道, 有地 滋, 高橋 猛: *基礎와 臨床* 17, 2127 (1983).
16. 木村善行, 奥田拓道, 有地 滋, 高橋 猛: *基礎와*

- 臨床 18, 2071 (1984).
17. Kim, J.H. and Nam, J.S.: *Kor. J. Mycol.* **12**, 111 (1984).
18. 中村英雄, 石原茂正, 内田勝, 菟田泰天: 日本藥學會 第104回 總會 要旨集, No. 28C<sub>4-1</sub>, 仙台(1984).
19. Sankhla, N., and Sankhla, D.: *Naturwissenschaften* **54**, 621 (1967).
20. Schroeder, H.A., Kanisawa, M., Frost, D.V. and Mitchener, M.: *J. Nutr.* **96**, 37 (1968).
21. 淺井一彦: Germanium과 나, 玄同社, 東京(1977).
22. Paik, N.H., Park, M.K. and Cho, Y.H.: *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **3**, 23 (1978).
23. Paik, N.H., Lee, W.K., Park, M.K. and Park, J.I.: *Yakhak Hoeji* **23**, 141 (1979).
24. Moon, D.C.: Trace Determination of Germanium by Differential Pulse Stripping Voltammetry. 121 pp., Ph.D. thesis, Graduate School, Seoul National University (1984).
25. Herscowitz, H.B., Holden, H.T., Bellanti, J.A. and Ghaffar, A.: *Manual of Macrophage Methodology*, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1981).
26. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B.: *Manual of Methods for General Bacteriology*, p.333, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1981).
27. Cooper, T.G.: *The Tools of Biochemistry*, p.53. A Wiley-Interscience Publication, N.Y. (1977).