

CCl₄로 독성을 유발시킨 초대배양 간세포를 이용한 고등균류로부터 간세포 보호물질의 검색

이준우 · 한만덕 · 이권행

일양약품(주) 중앙연구소 생물공학연구소실

Screening of Hepatoprotective Substances from Higher Fungi by Primary Cultured Rat Hepatocytes intoxicated with Carbon Tetrachloride

June-Woo Lee, Man-Deuk Han and Kweon-Haeng Lee

Biotechnology Lab., Il Yang Pharmaceutical Co., Ltd., Yongin, 449-900, Korea

ABSTRACT: Hepatoprotective effects of polysaccharides extracted from liquid cultured mycelia were screened by measuring the glutamic pyruvate transaminase activity of the primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbon tetrachloride. Sixty among 75 isolates of higher fungi showed to be hepatoprotective effect, and these were 13 of *Ganoderma lucidum*, 5 of *Lentinus edodes*, 1 of *Pleurotus ostereatus*, 4 of *Coriolus versicolor*, 2 of *Lyophyllum* spp., 7 of *Grifora frondosa*, 3 of *Agaricus* spp., 14 of *Schizophyllum commune* and 11 of *Cordyceps* spp.. Especially, 10 isolates, *Ganoderma lucidum* IY003 and IY009, *Lentinus edodes* IY103, *Lyophyllum* sp. IY402, *Agaricus* sp. IY701 and IY703, *Schizophyllum commune* IY804, IY810 and IY818, *Cordyceps* sp. IY902, were indicated below 80% of glutamic pyruvate transaminase activity.

KEYWORDS: Hepatoprotective effect, Polysaccharide, Higher fungi, Glutamic pyruvate transaminase, Primary cultured rat hepatocytes, Carbon tetrachloride.

간염은 바이러스에 의해 나타나는 간의 염증성 질환으로 전세계적으로 유행하며, 우리나라는 전체 국민의 약 10%인 400여만명 이상이 간염 바이러스 보유자로 알려져 있다(김 등, 1989). 간염의 대부분은 B형 바이러스성으로 대다수의 환자는 간염증세를 완전히 회복하나 일부환자는 만성으로 이행된 후 간경변증과 간암으로 진행된다(변 등, 1991).

최근 간염 백신의 개발로 인하여 간염에 대한 효과적인 예방은 실시되고 있으나, 간염 virus에 선택적으로 작용하는 간염치료제는 아직 개발되지 못한 상태이다. 현재 간염치료제로 이용되고 있는 약물의 대부분은 virus성 간염 동물모델에서 유효성을 밝힌 결과는 거의 없고, 간독성 물질에 대한 보호작용이 동물실험을 통해 나타난 것 중에서 임상적으로 유효성을 인정받고 있는 것이 대부분으로 이들은 손상된 간세포의 부활, 인체의 면역기능 또는

간 기능을 증진시켜 간접적으로 간염을 치료하는 효과를 나타낸다. 이들 중 생약으로부터 분리된 glycyrrhizin, shizandrin 및 silymarin 등은 만성간염 치료제로서 이용되고 있으며, 최근에는 미생물로부터 간염치료제의 개발에 관한 연구도 보고되고 있다(Yamiko 등, 1991).

미생물 중 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포막으로부터 얻은 glucan이 murine viral hepatitis에 효과가 있음이 보고되었고(William and DiLuzio, 1980), 담자균류인 *Coriolus versicolor*로부터 얻어진 다당류를 만성간염 환자에 투여한 결과, HBe항체의 출현과 HBs항원이 소실되는 효과가 있었으며(平澤燾, 1982), 실험동물에서도 간기능을 개선 시키는 효과가 있다(허 등, 1989; 허, 1990)고 보고하였다. 또한 *Ganoderma lucidum*의 열수추출물은 CCl₄로 유발된 rat의 실험적 간중독에 유효하며

(이 등, 1985), methotrexate에 의해 유발되는 간의 급성 병변을 억제하는 효과가 있다고 보고하여(이, 1990), 고등균류의 다당류가 간염을 포함한 간장질환 치료제로 개발될 가능성이 시사되고 있다.

본 실험에서는 국내에서 자생하고 있는 고등균류로부터 간염치료제를 개발하기 위해, 고등균류를 액체배양하여 얻은 다당류를 CCl_4 에 의해 독성이 유발된 초대배양 간세포에 가하여 간세포독성에 대한 다당류의 보호효과를 glutamic pyruvate transaminase(GPT)활성을 측정하여 검색한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약: Fetal calf serum과 William's E medium (WEM)은 Gibco사의 제품을, collagenase (type-iv), Hank's balanced salt solution(HBSS, Ca^{2+} , Mg^{2+} free), penicillin-streptomycin, insulin, dexamethasone, dimethylsulfoxide(DMSO) 및 CaCl_2 등은 Sigma사의 제품을, glycyrrhizin은 동경화성의 제품을, GPT활성 측정 kit는 아산제약의 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

사용균주: 본 실험에서 75균주의 고등균류는 국내에서 자생하는 자실체를 본 실험실에서 채집한 다음 자실체의 일부 절편을 potato dextrose agar (PDA) 평판배지의 중앙에 부착시킨 후 25°C 에서 7일 동안 배양하여, 생장이 왕성한 균사를 순수 분리하여 실험에 사용하였으며, 이들 균주에 대해서는 본 실험실에서 이미 분류를 마치고(이 등, 1991) 여러가지 약리활성 성분에 대한 연구를 수행한 바가 있다(이 등, 1990, 정 등, 1990, 이 등, 1990, 이 등, 1991, 이 등, 1992, 이 등, 1992).

균사체의 배양: 균사체의 액체배양에는 50g의 glucose, 20g의 peptone, 0.87g의 KH_2PO_4 , 0.5g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 과 20 ml의 basal medium을 가해 1리터로 조정된 합성배지(pH 4.5)를 사용하여 25°C 에서 5일 동안 진탕 배양하였다. Basal medium은 0.5% $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.36% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2% ZnCl_2 및 0.05% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 조성되었다.

조다당류의 분획 조제: 배양물을 $6,000 \times \text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 균사체와 배양여액을 분리하였다. 균사체에는 2.5N NaOH 용액을 가해 최종농도가

2N되게 조정하고 24시간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 acetic acid로 중화시켜 pH 7.0으로 조정하여 visking tube에 넣고 흐르는 물에 3일 동안 투석한 후 $6,000 \times \text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 물에 녹지 않는 침전물과 상등액을 얻었다. 여기서 얻어진 침전물은 동결건조하였고(AI분획) 상등액은 농축한 뒤 3배량의 ethanol을 가해 4°C 에서 24시간 방치한 다음 원심분리하여 얻어진 침전물을 소량의 증류수에 용해시킨 후 동결건조하여 시료(AS분획)로 사용하였다. 배양여액은 3일 동안 흐르는 물에 투석한 후 농축하여, 농축액 부피의 3배량의 ethanol로 처리하여 얻어진 침전물을 소량의 증류수에 녹여 동결건조(M분획)하였다. 또한 H분획은 배양물 자체를 121°C 에서 30분간 추출한 후 상기 AS분획 제조 방법에서와 같이 투석, 농축 및 ethanol 침전 과정을 거쳐 동결건조하여 얻었다.

간세포의 분리 및 배양: 간세포는 Seglen(1973)의 방법을 변형하여 다음과 같이 분리하였다. 삼육측산에서 구입한 Wistar rat(250g)에 pentobarbital(40 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 다음 70% ethanol로 소독한 후 쥐의 복부를 열고 미리 실로 매듭한 간 문맥에 catheter (18G \times 2")를 장착하였다. 이때 혈액이 나오는 것을 확인하고, 37°C 로 예열된 Ca^{2+} , Mg^{2+} free HBSS(pH 7.4)를 공급하여 주면서 pumping(30 ml/min)을 시작함과 동시에 하대정맥을 절단하여 혈액이 흘러 나오게 하였다. 그동안 상대정맥에 catheter를 장착하고, 하대동맥을 완전히 폐쇄한 후 1 mM의 CaCl_2 와 0.06%의 collagenase가 함유된 HBSS를 가하여 관류시켰다. 약 10분 정도 순환시키면 Glisson's capsule이 깨지면서 액이 흘러나오는데, 이때 관류를 중단시켰다. 관류가 끝난 후 간조직을 떼어 내어 HBSS로 씻어내고 적당량의 HBSS를 가하여 가위로 세절한 다음 나이론망(250 μm)에 여과하여 간세포를 분리하였다. 분리된 간세포를 WEM배지를 이용하여 4°C 에서 $50 \times \text{g}$ 로 2분간 3회 원심분리하여 수세하였다. 0.4%의 trypan blue용액으로 세포의 생존율을 측정하여 생존율이 85%이상일때 초기배양 간세포로 사용하였다. 간세포 현탁액에 10%의 fetal calf serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10^{-6} M dexamethasone 및 10^{-8} M insulin이 함유된 WEM을 가하여 4×10^5 cells/ml되게 조정한 후, 1 ml을 24

well tissue culture plate (Corning Co.)에 넣어 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 3시간 동안 전배양 하였다. 전배양 후 배지를 갈아주고 18시간 경과한 간세포를 실험에 사용하였다.

CCl₄에 의해 유발된 간세포 독성에 대한 다당류의 보호효과의 측정 : 간세포가 배양된 24 well culture plate(4×10⁵ cells/ml)에 DMSO로 용해된 시료 10 μl(최종농도: 1 mg/ml)를 가하고, ethanol에 녹인 CCl₄를 가해 최종농도가 10 mM되게 조정하여 5% CO₂, 37°C 하에서 60분간 배양한 후, 배양액 중의 GPT활성을 측정하였다.

Glutamic pyruvate transaminase(GPT) 활성의 측정 : 간세포 보호물질의 검색을 위한 지표로서 GPT를 Reitman-Frankel(1957)의 방법을 이용하여 측정하였다. 간세포 보호효과는 시료와 10 mM CCl₄를 처리한 GPT치를 10 mM의 CCl₄만을 처리한 GPT치로 나누어 백분율로서 나타내었다.

결과 및 고찰

고등균류 성분의 간세포 보호효과 : 현재까지 간 질환에 유효한 물질의 검색을 위해서는 실험동물을 이용하여 왔으나(Ohta 등, 1985), 이 방법은 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있다. 최근 초대배양 간세포가 본래의 간기능을 거의 그대로 보유하고 있어 간기능 연구에 적합한 것으로 알려져(Long 등, 1988; Holme 등, 1983; Forte 등, 1984), 실험동물 대신에 초대배양 간세포를 이용하여 간보호 효과를 가진 물질을 검색하려는 시도가 많이 진행되고 있으며, 이때 독성유발 약물로는 CCl₄(Kiso 등, 1983), galactosamine(Kiso 등, 1984) 등이 사용 되고있다.

고등균류로 부터 간질환 치료제의 개발을 위해, 국내에서 채집된 75종의 고등균류 자실체로 부터 분리된 균사를 액체배양한 다음, 균사체를 알카리 또는 열수로 추출한것과 배양액으로 부터 분자량이 10,000 dalton 이상인 조다당 분획을 각각 얻었다. 각 분획을 CCl₄에 의해 독성이 유발된 초대배양 간세포에 가하여 간세포 독성에 대한 다당류의 보호효과를 glutamic pyruvate transaminase (GPT) 활성을 측정하여 검색한 결과, Table 1과 같이 75종의 고등균류로 부터 얻어진 142개의 다당 분획중

91개 시료에서 CCl₄에 의해 증가된 간세포의 GPT 활성을 낮춰주는 효과가 있었다. 이와같은 다당시료에 의한 GPT활성의 저하는 손상된 간세포에 대한 보호작용으로, 간세포에 대한 보호작용은 균사체 성분 중에서 나타났으며, 배양액 성분인 M분획 에서는 거의 나타나지 않았다. 균사체의 추출성분 중에서도 열수 추출 성분인 H분획이나 알카리 추출 성분 중 불수용성인 AI분획 보다는 알카리 추출성분 중 수용성인 AS분획에서 간세포에 대한 보호효과가 대체로 우수하게 나타났다.

*Ganoderma lucidum*의 경우, 15균주 중 대부분이 AS분획에서 GPT활성을 낮춰주는 효과가 나타났으나, IY012, IY013 및 IY014등의 AS분획에서는 효과가 나타나지 않았으며, IY010 및 IY012균주는 H분획이 AS분획보다 간세포 보호효과가 좋은 것으로 나타났다. *Ganoderma lucidum* 중 간세포 보호효과가 가장 우수한 것은 IY009의 AS분획으로 GPT활성은 75.5%로 나타났으며, 그외 IY003의 AS분획, IY007의 AS분획, IY010의 H분획, IY011의 AS분획, IY001의 AS분획 및 IY005의 AS분획등의 순으로 간세포 보호효과가 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 80.0%, 80.9%, 80.9%, 83.3%, 85.5% 및 88.2%였다.

*Lentinus edodes*의 경우는 7균주 중 5균주에서 간세포 보호 효과를 나타냈으며, 간세포 보호효과는 IY103의 AS분획, IY106의 AS분획, IY105의 H분획, IY101의 AS분획 및 IY104의 AS분획 등의 순으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 78.2%, 83.3%, 87.2%, 87.3% 및 96.8%였다. 또한 *Pleurotus ostreatus* IY206의 AS분획은 87.3%의 GPT활성을 보여 약간의 간세포 보호효과를 나타내었다.

*Coriolus versicolor*는 6균주 중 4균주에서 간세포 보호 효과를 나타냈으며, 간세포 보호효과는 IY301의 AS분획, IY306의 AS분획, IY302의 AS분획 및 IY303의 AS분획 등의 순으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 84.8%, 87.1%, 91.0% 및 93.9%였다.

Lyophyllum spp.에서는 IY401-AS와 IY402-AS에서 87.2% 와 75.2%의 GPT활성을 나타내었다. *Gri-fora frondosa*는 7균주 중 6균주의 AS분획에서 간세포 보호 효과를 나타냈으나, IY506균주는 배양액 성분인 M분획에서 간세포 보호효과를 나타내었으

Table 1. Effects of polysaccharide fractions extracted from liquid cultured fungal species on the GPT activities of primary cultured rat hepatocytes intoxicated with carbon tetrachloride.

Fungal species	Isolate-fraction*	GPT(%)	Fungal species	Isolate-fraction	GPT(%)	
<i>Ganoderma lucidum</i>	IY001-AS	85.5± 3.4	<i>Lentinus edodes</i>	IY101-AS	87.3± 5.4	
	H	91.7± 0.5		M	96.5± 9.9	
	M	105.5± 2.8		IY102-AS	103.6± 3.7	
	AI	102.3± 11.0		M	116.5± 3.0	
	IY002-AS	94.4± 2.4		IY103-AS	78.2± 4.6	
	H	105.7± 2.5		IY104-AS	96.8± 3.7	
	M	113.5± 5.8		M	115.± 8.5	
	AI	130.6± 13.2		IY105-AS	87.2± 1.5	
	IY003-AS	80.0± 1.8		M	103.6± 4.5	
	IY004-AS	96.5± 8.5		IY106-AS	83.3± 6.4	
	H	105.4± 3.6		IY107-AS	105.1± 3.2	
	M	118.4± 9.6		<i>Pleurotus ostreatus</i>	IY206-AS	87.3± 7.4
	IY005-AS	88.2± 2.4			M	121.3± 2.3
	H	114.8± 2.0			<i>Coriolus versicolor</i>	IY301-AS
	M	119.1± 2.0		H		90.0± 5.3
	IY007-AS	80.9± 5.4		M		108.0± 10.4
H	114.8± 3.5	AI	104.4± 1.6			
M	119.3± 5.8	IY302-AS	91.0± 5.8			
AI	94.3± 8.2	H	92.0± 4.9			
IY008-AS	89.5± 4.6	M	113.0± 10.4			
H	104.4± 16.2	IY303-AS	93.9± 14.0			
M	99.2± 8.3	H	102.7± 9.0			
AI	106.2± 14.4	M	109.5± 16.7			
IY009-AS	75.5± 8.7	IY304-AS	114.7± 6.4			
H	87.9± 2.6	IY305-AS	100.0± 8.9			
M	101.3± 1.8	IY306-AS	87.1± 6.1			
AI	111.2± 2.2	<i>Lyophyllum</i> spp.	IY401-AS	87.2± 4.4		
IY010-AS	83.3± 2.6		M	90.2± 3.7		
H	80.9± 6.6		IY402-AS	75.2± 13.0		
IY011-AS	83.3± 8.2	M	118.6± 4.3			
IY012-AS	108.8± 5.2	<i>Grifora frondosa</i>	IY501-AS	80.5± 6.4		
H	94.4± 7.5		M	124.5± 12.3		
IY013-AS	110.0± 7.3					
IY014-AS	112.5± 3.6					
IY015-AS	93.3± 0.7					
IY016-AS	99.3± 0.5					

*AS designates alkali extracted, ethanol precipitated water soluble fraction of mycelia, AI designates alkali extracted, ethanol precipitated water insoluble fraction of mycelia, M designates ethanol precipitated fraction of culture broth removed mycelia and H designates heat extracted, ethanol precipitated fraction of culture broth containing mycelia of liquid cultured fungal species.

Table 1. Continued

Fungal species	Isolate-fraction*	GPT(%)	Fungal species	Isolate-fraction	GPT(%)
<i>Grifora frondosa</i>	IY502-AS	89.1± 12.0	<i>Schizophyllum commune</i>	IY811-AS	97.2± 0.9
	M	93.2± 5.7		IY812-AS	95.8± 2.8
	IY503-AS	83.6± 5.4		IY813-AS	105.1± 4.4
	M	86.4± 3.4		IY814-AS	81.0± 8.2
	IY504-AS	93.8± 2.1		IY815-AS	97.2± 5.4
	M	120.4± 0.4		IY816-AS	89.4± 4.2
	IY505-AS	92.6± 2.6		IY817-AS	113.9± 7.8
	M	95.6± 5.3		IY818-AS	77.5± 6.1
	IY506-AS	116.2± 3.6		H	85.9± 2.3
	M	86.4± 3.4			
<i>Agaricus spp.</i>	IY507-AS	85.9± 6.4	<i>Cordyceps spp.</i>	IY901-AS	87.3± 5.2
	IY701-AS	73.6± 4.4		H	106.7± 2.3
	H	86.4± 5.4		M	113.4± 4.1
	M	74.5± 2.8		IY902-AS	78.4± 3.4
	IY702-AS	89.4± 5.4		H	99.5± 0.8
	H	86.4± 4.6		M	110.6± 7.9
	M	93.3± 2.3		IY903-AS	80.9± 2.1
	IY703-AS	88.2± 1.8		IY904-AS	82.4± 2.6
	H	75.0± 8.9		IY905-AS	81.8± 3.3
	M	120.4± 11.2		IY906-AS	113.6± 9.3
<i>Schizophyllum commune</i>				M	89.9± 3.7
				IY907-AS	85.9± 8.6
	IY801-AS	81.4± 4.1		H	87.1± 3.6
	H	97.6± 20.3		M	95.0± 10.2
	M	108.9± 15.3		IY908-AS	90.5± 15.5
	IY802-AS	83.3± 0.5		M	88.2± 9.2
	M	100.0± 1.3		IY909-AS	86.3± 3.5
	IY803-AS	84.7± 1.8		H	92.9± 2.4
	M	107.4± 3.8		IY910-AS	84.3± 3.6
	IY804-AS	75.1± 6.9		IY911-AS	104.2± 1.2
	IY806-AS	80.0± 1.8		IY913-AS	120.5± 9.4
	IY807-AS	80.6± 12.0		IY914-AS	106.1± 3.6
	H	95.5± 1.3		IY915-AS	86.7± 7.2
	M	95.8± 3.3		IY916-AS	106.1± 2.1
	IY809-AS	80.9± 2.7		IY917-AS	108.8± 3.4
	M	86.4± 2.2		IY918-AS	109.4± 3.9
	IY810-AS	77.7± 4.2		IY919-AS	112.5± 4.2

며, 간세포 보호효과는 IY501의 AS분획, IY503의 AS분획, IY507의 AS분획, IY506의 M분획 및 IY505의 AS분획등의 순으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 80.5%, 83.6%, 85.9%, 86.4% 및 89.1%였다. *Agaricus* spp. IY701균주에서는 AS분획에서 간세포 보호효과가 우수하였으나, IY702균주와 IY703균주에서는 열수추출 성분인 H분획에서 간세포 보호효과를 우수한 것으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 73.6%, 86.4% 및 75.0%였다. *Schizophyllum commune*은 16균주 중 14균주에서 간세포 보호효과를 나타냈으며, 가장 우수한 간세포 보호효과를 나타낸 균주는 IY804로 GPT활성치는 75.1%였다. 그외의 균주들의 간세포 보호효과는 IY818의 AS분획, IY810의 AS분획, IY806의 AS분획, IY807의 AS분획 및 IY809의 AS분획등의 순으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 77.5%, 77.7%, 80.0%, 80.6% 및 80.9%였다.

Cordyceps spp.는 18균주 중 11균주에서 간세포 보호효과를 나타냈으며, IY906균주 및 IY908균주에서는 M분획에서 효과가 우수하였으나, 그외의 균주들에서는 AS분획에서 효과가 우수한 것으로 나타났다. 가장 우수한 간세포 보호효과를 나타낸 균주는 IY902로 GPT활성치는 78.4%였고, 그외의 균주들의 간세포 보호효과는 IY903의 AS분획, IY905의 AS분획, IY904의 AS분획, IY910의 AS분획 및 IY907의 AS분획등의 순으로 나타났으며, 이들의 GPT활성은 각각 80.9%, 81.8%, 82.4%, 84.3% 및 85.9%였다.

상기 고등균류 중 GPT활성이 80%이하로 나타나 비교적 간세포 보호효과가 우수한 *Ganoderma lucidum* IY003 및 IY009, *Lentinus edodes* IY103, *Lyophyllum* sp. IY402, *Agaricus* sp. IY701 및 IY703, *Schizophyllum commune* IY804, IY810 및 IY818, *Cordyceps* sp. IY902등 10균주에 대해서는 간염치료제의 개발을 위해 앞으로 다양한 *in vivo* 시험 등을 통한 약효를 확인 해야할 것으로 생각된다.

적 요

국내에서 자생하고 있는 75균주의 고등균류를 액체배양하여 얻은 다당류를 CCl₄에 의해 독성이 유발된 초대배양 간세포에 가하여 간세포 독성에

대한 다당류의 보호효과를 glutamic pyruvate transaminase(GPT)활성을 측정하여 검색한 결과는 다음과 같다. 75균주의 고등균류 중 간세포 보호효과를 나타낸 것은 60균주로 *Ganoderma lucidum* 15균주 중 13균주, *Lentinus edodes* 7균주 중 5균주, *Pleurotus ostereatus* 1균주, *Coriolus versicolor* 5균주 중 4균주, *Lyophyllum* spp. 2균주, *Grifora frondosa* 7균주, *Agaicus* spp. 3균주, *Schizophyllum commune* 16균주 중 14균주, *Cordyceps* spp. 18균주 중 11균주등이었다. 상기 고등균류 중 GPT활성이 80%이하로 나타나, 비교적 간세포 보호효과가 우수한 것은 *Ganoderma lucidum* IY003 및 IY009, *Lentinus edodes* IY103, *Lyophyllum* sp. IY402, *Agaicus* sp. IY701 및 IY703, *Schizophyllum commune* IY804, IY810 및 IY818, *Cordyceps* sp. IY902등 10균주였으며, 이들의 GPT활성은 각각 80.0%, 75.5%, 78.2%, 75.2%, 73.6%, 75.0%, 75.1%, 77.7%, 77.5% 및 78.4%로 나타났다.

참고문헌

- Forte, T. M. 1984. Primary hepatocytes in monolayer culture: A model for studies on lipoprotein metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* **46**: 403-415.
- Holme J. A., E. Soderlund and Dybing. E. 1983. Drug metabolism activities of isolated rat hepatocytes in monolayer culture. *Acta pharmacol. et toxicol.* **52**: 348-356.
- Kiso, Y., M. Tohkin and Hikino, H. 1983. Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**: 222-225.
- Kiso, Y., S. Ogasawara, K. Hirota, N. Watanabe, Y. Oshima, C. Konno and Hikino, H. 1984. Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* Buds. *Planta Med.* **50**: 81-85.
- Long, R. M. and Moore, L. 1988. Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity. Comparative studies *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**: 295-306.
- Ohta, S., M. Kumasaka and Shinoda, M. 1985. Effect of cysteamine on carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *YAKUGAKU ZASSHI* **105**: 866-873.
- Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric me-

- thod for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 56-63.
- Seglen, P. O. 1973. Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Experimental Cell Res.*, **82**: 391-398.
- Williams, D. L. and DiLuzio, N. R. 1980. Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. *Science* **208**: 67-69.
- Yamiko, I., S. Shimura, I. Mayumi, W. Naoharu, Y. Michiro, T. Masaharu and Kazumori, H. 1991. A novel hepatoprotective -Lactone, MH-031. I. Discovery, isolation, physico-chemical properties and structural elucidation. *J. Antibiot.*, **44**: 832-837.
- 김영식, 허봉열, 안옥균. 1989. B형 간염백신 접종후 50개월 이상 경과 시점에서의 항체 보유에 관한 조사 연구. 대한의학협회지 **32**: 1084-1090.
- 변관수, 서동진. 1991. 한국인의 급성 및 만성 간질환에서 C형 간염 바이러스 항체 (anti-HCV)의 발현상. 대한내과학회잡지 **40**: 484.
- 이권행, 이정옥, 정훈, 이준우, 정준호, 오두환. 1992. *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 약리 및 독성에 관한 연구. 한국산업미생물학회 춘계학술대회 발표초록: 348.
- 이권행, 정 훈, 김영일, 김병각. 1991. 산업폐자원을 이용한 영지의 항고혈압 성분의 생산. 한국균학회지 **19**: 79-84.
- 이권행, 정훈, 이준우, 한만덕, 오두환. 1992. *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 정제 및 구조분석. 한국산업미생물학회 춘계학술대회 발표초록: 347.
- 이문주, 정명현. 1985. 영지 엑기스가 rats의 실험적 간장중독 및 고지혈증에 미치는 영향. 제 34회 대한약학회 학술발표초록: 116.
- 이상찬. 1990. Methotrexate의 단독 및 영지(*Ganoderma lucidum*)병용 투여가 백서간에 미치는 영향에 관한 연구. 부산대학교 박사학위 논문.
- 이준우, 이권행. 1991. Isozyme patterns 차이에 의한 영지, 치마버섯 및 동충하초의 계통분류. 한국균학회지 **19**: 101-108.
- 이준우, 정천희, 정훈, 이권행. 1990. *Lentinus edodes* IY105 알칼리추출물이 보체 계활성 및 항종양효과, 한국산업미생물학회지 **18**: 571-577.
- 이준우, 정 훈, 정천희, 이권행. 1990. 영지균사체의 알칼리 추출물이 보체계와 망내 계에 미치는 영향. 한국균학회지 **18**: 137-144.
- 정훈, 이준우, 이권행. 1990. 한국산 고등균류의 항보체활성 효과에 관한 연구. 한국균학회지 **18**: 145-148.
- 허재두, 이또 히로시. 1989. 간 기능 개선제의 제조방법. 대한민국 특허공보. 공고번호 89-1290.
- 허재두. 1990. 군주 배양에 의한 단백다당체의 제조방법. 대한민국 특허공보. 공고번호 90-5859.
- 平澤燦. 1982. 慢性肝炎におけるHBe 抗原の seroconversion(藥劑による 影響). 肝臓 **23**: 699.

Accepted for Publication on December 15, 1992