

영지버섯 다당체의 마우스 대식세포 면역증강 효과

김성환[†] · 김을상*

중부대학교 식품영양학과

*단국대학교 식품영양학과

Studies on the Immunomodulating Effects of Polysaccharide Extracted from *Ganoderma lucidum* on Macrophage

Sung-Whan Kim[†] and Eul-Sang Kim*

Dept. of Food Science and Nutrition, Joongbu University, Choong-nam 312-940, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

Abstract

The immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*(PSG) on macrophage were evaluated using murine macrophage cell line ATCC TIB 71 cells or peritoneal exudate cells of BALB/c mice. The cell were incubated with various content of PSG for 24 hours at 0.5% CO₂ incubator under varying experimental conditions. PSG stimulated the non-specific activities of macrophage such as mitotic activity and expression of surface interleukin-2 receptors by dose-dependent pattern with statistic significance(p<0.001); however, PSG had little immunoregulatory effects on cytokines derived from peritoneal macrophages of BALB/c mice. There were no significant changes in the secretion of interleukin-1, interleukin-6, or tumor necrosis factors(TNF) of PSG treated cells compared to the control group. But PSG increased secretion of cytokines(IL-1 and TNF) when the cells were primed and trigged with BCG and IFN- γ .

Key words: *Ganoderma lucidum*, macrophage, immunomodulating effects, mitotic activity, interleukin-2, cytokines

서 론

식생활의 향상과 의학의 발달로 인간의 평균수명이 연장되고 문명의 발달에 따른 운동부족으로 성인병, 만성 퇴행성질환, 노인성질환 등이 증가되고 있다(1).

이에 대처하기 위한 최신 의학의 연구와 더불어 천연물질 중 암예방 성분이나 생리활성조절물질(BRM) 및 식품중 기능성 성분을 찾아내어 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(2-6).

수많은 천연 자원 중 버섯은 옛부터 향미 및 풍미성분이 풍부하고 텍스처, 영양성분 등이 우수하여 건강 및 기호식품으로 널리 이용되어 왔으며, 식용의 한계를 넘어 의약품으로 사용되어 왔다(3,7-9). 버섯 중의 영양성분 즉 당, 스테롤류, 단백질, 무기염류 등과 향미성분으로서 유기산, 지방산, 일부 스테롤류, 아미노산, 핵산 등

에 관한 연구와 생체의 생리 조절물질로서 지방산, 단백질, 핵산, 비타민, 효소류, 무기염류 등이 연구되고 있으며 최근에는 버섯중에 함유되어 있는 다당체들의 항암 및 면역조절작용 등과 관련한 연구가 활발하다(3-9).

본 연구에서는 일명 만년버섯으로 불리우는 영지버섯 *Ganoderma lucidum*(LEYSS. ex FR.) KARST.(8,9)로 부터 항암성 다당체를 분리하고 마우스 대식세포 등을 사용하여 면역증강효과를 실험하였다.

재료 및 방법

영지버섯 및 영지버섯 다당체

본 실험에서 사용한 영지버섯은 전남 해남 두륜산에서 자생하는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)을 채집하여 자실체로부터 분리한 균사를 종균으로 하여 potato

[†]To whom all correspondence should be addressed

dextrose agar 사면 배지와 glucose, peptone 등을 사용한 basal medium 합성배지를 사용하여 액체 배양한 균사체로서 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

영지버섯 다당체는 항암성분의 추출효율이 높은 알카리 추출방법을 응용도입하였으며 추출·중화하여 건조한 후 탈이온수(Deionized distilled water)에 용해시켜 원심분리한 상정액을 DEAE Cellulose(OH⁻ form)으로 충전시킨 컬럼(20mm×600mm)에 적용하여 탈이온수 및 NaCl를 사용하여 0~4N로 만든 용액으로 농도구배에 의해 분당 0.5ml의 유속으로 용출시켜 얻은 액을 흐르는 물에 3일간 투석하고 감압농축한 후 3배량의 95% 냉에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치한 후 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수에 녹인 후 여과한 여액을 동결건조하였다.

실험동물

실험에 사용한 BALB/c 마우스는 8~12주령의 것을 식품의약품안전본부 독성연구소(구 국립보건안전연구원) 실험동물자원실에서 분양받았다. 실험에 사용하기 전까지 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%로 유지되며 light dark cycle이 12시간 단위로 조절되는 실험동물실에서 마우스용 고품사료(신촌사료)와 물을 제한 없이 공급하였다.

복강 대식세포의 분리·배양과 TIB 71 대식세포주 배양

생후 8~12주된 BALB/c 마우스 복강에 3개월 이상 숙성시킨 3% thioglycolate 배지 5ml를 복강주사하고 4일 후에 복강세척을 통하여 대식세포를 얻었다. 10ml의 Hank's balanced salt solution(HBSS) 배지를 복강

에 주사하고 잘 맛사지한 후 대식세포를 취하여 fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 첨가된 Dulbeco's modified eagle's medium(DMEM, Sigma)으로 두번 원심세척하였다. 복강대식세포는 1~2×10⁵ 세포수로 전보의 TIB 71 세포주와 동일조건으로 세포배양하면서 실험목적에 따라 사용하였다(6,10,11).

TIB 71 대식세포주 배양조건은 전보와 같다(6).

영지버섯 다당체의 처리 조건

PSG는 일반성분을 분석한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 필요한 농도로 현탁하여 멸균하였다. 배양액을 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 교환하고, 배양세포에의 PSG 처리는 투여 총용량이 100μl가 되게 각각의 농도실험군을 조정하였으며, 24시간 처리를 기본배양시간으로 하였다.

유사분열능 측정

영지버섯 다당체가 대식세포 TIB 71 세포의 유사분열능에 미치는 효과는 여러 농도의 PSG를 대식세포와 24시간 처리한 후 propidium iodide 염색용액(3% polyethylene glycol, PI 5μg/ml, RNase A 180 units/ml, 1% triton X-100, 0.1% FBS, sodium citrate buffer 3.6mM)과 유식 세포분석기를 이용하여 측정하였다(12). 즉 5×10⁵ TIB 71 세포를 채취하여 PBS로 원심세척 후에 2ml의 PI염색 용액을 부가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 PBS로 3회 원심세척 후에 유식 세포분석기를 이용하여 10⁴ 세포를 모아서 이들의 유사분열 정도를 세포 DNA의 이염색체(diploid)인 전합성기(G₀/G₁) channel을 기준하여, 전체 세포 중 합성기 및 후합성기의 세포수(G₂/M기)를 합하여 DNA-cell cycle analysis program의 histogram 상에서 백분율로 나타냈다(Fig. 1).

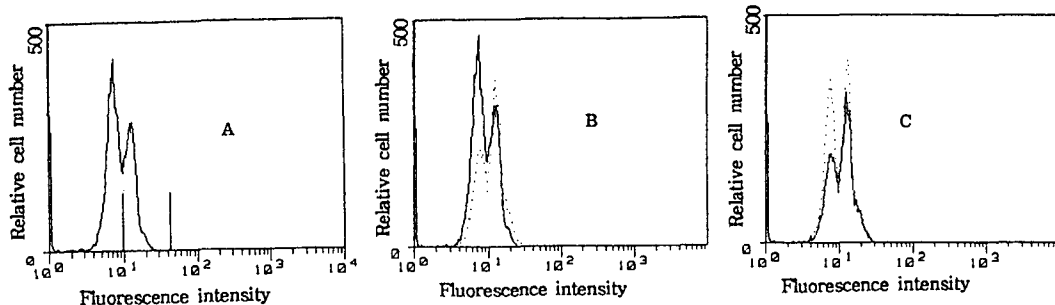


Fig. 1. DNA histogram of TIB 71 cells stained with propidium iodide.

Mitotic activity(synthetic+G₂/M phase) was determined by Consort 30 program-aided subtraction of DNA histogram from generated by G₀/G₁ cells and expressed as a percent

A: Control DNA-cell cycle analysis of TIB 71 cells

B: Overlapped histogram of control to TIB 71 cells treated with PSG 0.5mg(—: control,: PSG 0.5mg)

C: Overlapped histogram of control to TIB 71 cells treated with PSG 10.0mg

대식세포 표면의 interleukin-2 수용체 발현능 측정

마우스 복강대식세포의 IL-2수용체 발현은 anti-mouse IL-2 단클론항체(Genzyme)와 유식 세포분석기를 이용하여 측정하였다(12). 5×10^5 복강대식세포를 20 μ l의 anti-mouse IL-2-FITC 단클론항체(Genzyme)와 4°C에서 30분간 반응시켰다. PBS로 두번 원심세척 후에 1% paraformaldehyde로 고정 후 24시간 이내에 유식세포분석기로 측정하였다. 10^4 세포를 Consort 30 program에 저장 시켜서 이들 세포의 IL-2 수용체 발현 정도를 histogram상에서 전체 세포에 대한 백분율(%)로 나타냈다(Fig. 2).

세포간물질 측정

복강대식세포가 분비하는 세포간물질인 IL-1, IL-6 및 TNF는 단클론항체와 ELISA법을 이용하여 측정하였다(13-16). 5×10^5 복강대식세포에 BCG(0.1 μ g/ml)을 처리하여 24시간 배양 후 배양상층액 100 μ l을 채취하여 poly-L-lysine(10 μ g/ml PBS, Sigma)와 상온에서 1시간 이상 반응시키고, 건조 후에 각각 0.5% glutaraldehyde가 첨가된 PBS 30 μ l를 부가하여 고정하였다. 상온에서 15분 이상 방치시킨 후 2번 세척하고 0.1% BSA와 100mM glycine이 첨가된 DMEM 50 μ l를 부가하여 반응시킨 후 PBS로 두번 세척한 후에 rat anti mouse IL-1 단클론항체(Genzyme), rat anti mouse IL-6 단클론항체(Immunotech) 및 hamster anti mouse TNF 단클론항체(Immunotech)를 각각 20 μ l씩 부가하였다. 37°C에서 1시간 반응시키고, 세척 후에 50 μ l의 peroxidase-conjugated anti-rat 항체(1 : 1,000희석액, Sigma) 및 peroxidase-conjugated anti-hamster 항체(1 : 1000희석액, Cappel)와 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 50 μ l

의 기질용액(o-phenylenediamine 4mg, 30% H₂O₂ 20 μ l, phosphocitrate buffer 10ml)을 부가시켜 반응시키고, 세척한 다음에 50 μ l의 2M H₂SO₄로 반응을 정지시켜 ELISA reader로 492nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 표시하였으며 실험에 사용한 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test를 실시하였으며 상관계수를 이용하여 유의도를 판정하였다(17).

결과 및 고찰

유사분열능

영지버섯 다당체가 대식세포 활성화에 미치는 효과를 측정하기 위하여 여러 농도의 PSG를 24시간 처리한 후 측정된 유사분열능은 Fig. 3에서와 같이 가장 저농도인 0.05mg 처리군에서도 38%로 대조군의 32% 보다 높은 경향을 보이며 0.5mg 이상 처리군의 경우 실험군 모두 유의한 증가(p<0.001)를 보였다. 따라서 PSG가 유사시 림파구를 비특이적으로 활성화하여, DNA 합성과 세포증식을 일으키는 분열촉진 인자로 작용함을 알 수 있었다.

이러한 결과는 Kino 등(18)이 영지버섯로부터 분리한 LZ-8이 *in vitro*에서 유사분열능을 갖는다는 보고와 일치하며 Lieu 등(19)이 영지버섯의 열수 추출물을 첨가하여 배양한 배지에 단핵 백혈구주를 처리하면 단핵 백혈구에 의해 분화유도 세포간물질의 생성을 자극하여 성숙한 단핵구 및 대식세포로의 분화를 유도한다는 보고와도 일치한다.

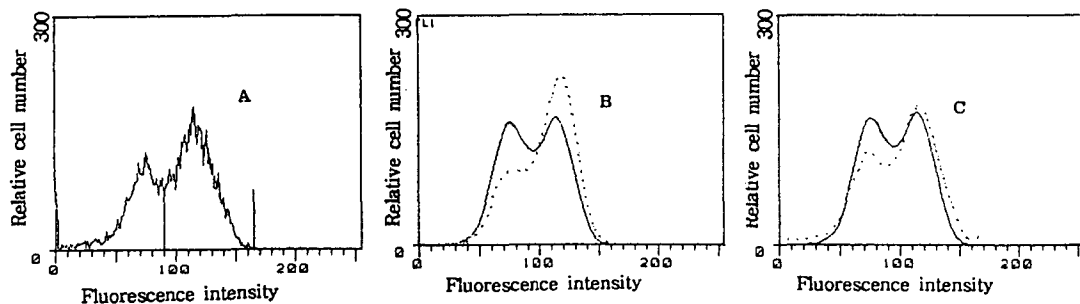


Fig. 2. Expression of interleukin-2 receptor on the surface of peritoneal exudate cells. 2×10^5 peritoneal macrophages were stained with anti-mouse IL-2 receptor antibody after incubation with or without PSG. 10^4 cells were analyzed for their expression of IL-2 receptor using Flow Cytometer. Datas were shown by percentage of restricted area from total analyzed cells
 A: Control
 B: Overlapped histogram of control to TIB 71 cells treated with PSG 0.5mg(—: control,: PSG 0.5mg)
 C: Overlapped histogram of control to TIB 71 cells treated with PSG 10.0mg

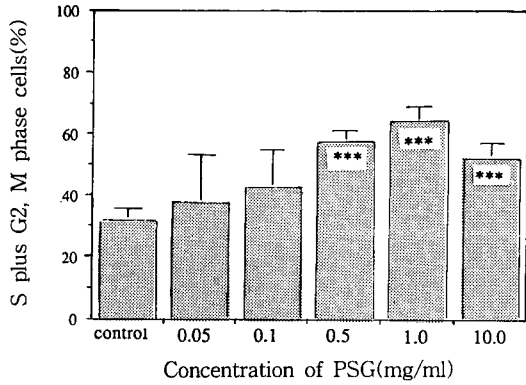


Fig. 3. Mitotic activity of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on TIB 71 cells.

The cells(5×10^5) were incubated with various concentrations of PSG for 24 hrs at 5% CO₂ incubator. Mitotic activity was determined by histogrammic subtraction of S plus G₂, M phases from G₂/M cells in DNA-cell cycle analysis of Consort 30 (FACSTAR).

Each value is mean \pm S.D. of pentaplicates.

***is significantly different from control at 0.001% level.

한편 본 연구에서 사용한 PI 염색용액과 유식세포 분석기를 이용한 실험방법은 tritiated thymidine 같은 방사선 동위원소의 위험없이 간단하게 유사분열능을 측정할 수 있었다.

대식세포 표면의 interleukin-2 수용체 발현능

PSG가 대식세포 표면의 IL-2 수용체 발현능에 미치는 영향은 Fig. 4에서와 같이 PSG 0.05mg 처리군을 제외한 전처리 군에서 대조군 37.6% 보다 현저한 발현의 증가($p < 0.001$)를 보였으며 PSG 0.1mg 처리군까지는 수용체가 증가하나 그 이상 처리군 사이에서는 IL-2 수용체 발현능에 있어 유의한 차이는 없었다.

대식세포의 활성화 표식인자로는 IL-2 수용체 외에도 transferrin 수용체 등이 알려져 있으나 본 연구에서는 림파구와 관련하여 면역조절인자 중 중요한 인자의 하나로 알려진 대식세포 표면의 IL-2 수용체 발현능에 대해 실험하였다.

IL-2 수용체는 대식세포가 활성화되면 세포표면에 나타나는 활성화표식인자의 하나로서 그 분자량은 20KD 이다(15,20). IL-2 수용체는 항원과 반응한 helper T 세포가 분비하는 IL-2의 신호를 수용하여 대식세포에 전달하는 기능을 갖고 있으며 IL-1, 인터페론 등 생체내의 많은 세포간물질 및 T세포 등 면역세포의 활성화와 밀접한 관계가 있다.

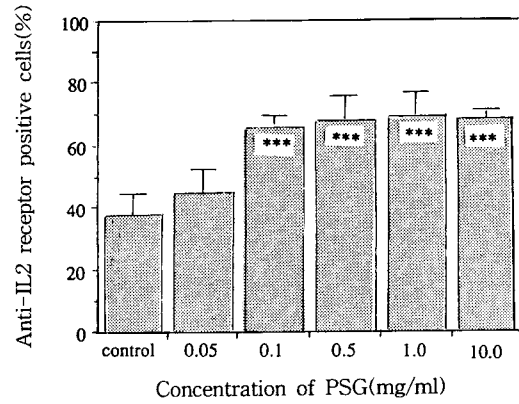


Fig. 4. Effect of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on the expression of interleukin-2 receptors on peritoneal macrophage of mice.

The cells were incubated with various concentrations of PSG for 24hrs at 5% CO₂ incubator. After incubation, 5×10^5 cells were stained with 20 μ l of anti-mouse IL-2 receptor and determined their positive fluorescences by computer-aided subtraction of stained cells.

Each value is mean \pm S.D. of pentaplicates.

***is significantly different from control at 0.001% level.

즉 T세포는 IL-2를 포함한 정보에 의해서 cytotoxic T cell로 분화되어 바이러스 등 이물질을 파괴 제거하고 활성화된 T 세포는 자기자신이나 다른 반응세포에 작용하여 더 많은 IL-2의 유리를 촉진한다(15,20,21).

세포간물질 분비능

PSG가 대식세포의 세포간물질 분비를 통한 면역조절기능에 미치는 효과는 세포간물질인 IL-1, IL-6 및 TNF를 측정할 결과 Table 1에서와 같이 PSG 단독처리군은 대조군인 10^6 TIB 71 세포만으론 실험군과 유사하여 cut-off 값 이상의 세포간물질의 분비를 측정할 수 없었다. 그러나 PSG와 BCG 또는 PSG와 IFN- γ 를 각각 처리했을 때 BCG 군과 IFN- γ 군은 각각 흡광도값 0.027, 0.423의 IL-1과 0.013, 0.094의 IL-6를 그리고 0.014, 0.021의 TNF 수치값을 각각 나타냈다. 또한 PSG와 BCG 및 IFN- γ 를 함께 병용 처리시에는 IL-6을 제외한 IL-1과 TNF의 현저한 분비증가가 있었지만, PSG를 제외한 BCG 단독 혹은 IFN- γ 단독처리군에서는 IFN- γ 단독처리시 IL-1의 분비증가 이외에는 유의한 분비량의 차이가 나타나지 않았다.

이러한 결과는 PSG가 대식세포 등에서 유래하는 세포간물질 IL-1, IL-6 및 TNF 생성에는 유의성있게 관여하지 못하는 것으로 생각되나 부분적으로 PSG는

Table 1. Production of IL-1, IL-6 and TNF from peritoneal macrophage of mice by protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*

Experimental groups	Cytokines(absorbance at 492nm)		
	IL-1	IL-6	TNF
Control	—	—	—
PSG	—	—	—
BCG	0.013±0.005	0.014±0.006	0.012±0.003
IFN- γ	0.297±0.048	0.072±0.021	0.019±0.006
PSG+BCG	0.027±0.006	0.013±0.004	0.014±0.004
PSG+IFN- γ	0.423±0.036	0.094±0.013	0.021±0.008
BCG+IFN- γ	0.472±0.051	0.021±0.005	0.649±0.073
PSG+BCG+IFN- γ	0.631±0.063	0.024±0.009	0.824±0.043

Peritoneal macrophages(10^6) were incubated with 0.5mg of PSG for 24 hours at 5% CO₂ incubator. Also, BCG(100 μ g) or/and IFN- γ (1,000 unit) was added to the PSG treated samples. 100 μ l of supernatant was harvested and coated to ELISA titerplate. And peroxidase-conjugated anti-mouse IL-1, IL-6 or TNF antibodies were treated, and after primary antibody conjugation, peroxidase-conjugated secondary antibodies were mixed and washed. Their absorbances were determined using H₂O₂ as a substrate at 492nm. Data expressed as a mean \pm S.D. of hexaplicates

BCG와 IFN- γ 를 함께 병용 투여함으로써 각각 BCG 또는 IFN- γ 와 함께 투여하는 경우에 비하여 IL-1의 분비증가를 보였으며 TNF의 분비 역시 현저한 증가를 보여 PSG가 초기 감염시 숙주의 1차 방어기능에 관여함을 알 수 있었다.

이상의 결과에 의하면 PSG는 대식세포의 활성을 촉진시키므로써 대식세포의 항종양 면역기능의 항진 효과가 있으며 대식세포 기원의 세포간물질인 IL-1, IL-6 및 TNF를 통해 면역조절에 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 앞으로 이들 세포간물질의 생산을 조절하는 mRNA와 cDNA 등과 관련하여 유전자 수준에서 이들의 합성 유전자 발현현상을 측정하는 연구가 더욱 많이 수행되어 좀더 구체적으로 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 전보의 영지버섯으로부터 분리 배양한 균 사체를 알카리추출하여 얻은 다당체의 일반성분과 당 분석 및 항암작용에 관한 연구에 이어, 이들과 ATCC의 마우스 유래 탐식 세포주 TIB 71 및 BALB/c 마우스의 복강내 대식세포를 이용하여 영지버섯 다당체가 면역계 전체의 기능을 조정하는 대식세포의 면역기능에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 1. 대식세포의 활성에 영향을 미치는 영지버섯 다당체의 효과를 알아보기 위하여 세포의 유사분열능을 측정한 결과, 다당체의 처리 농도가 0.5mg 실험군에서부터 유의한 증가를 나타내었다($p < 0.001$). 2. 영지버섯 다당체가 대식세포 활성에 미치는 효과를 알아보기 위해 대식세포의 표면에 존재하는 IL-2 수용체

를 anti-mouse IL-2-FITC 단클론항체를 이용하여 측정 한 결과는 PSG 0.05mg 실험군을 제외한 실험군 모두에서 대조군 37.6% 보다 현저한 발현증가($p < 0.001$)를 보였으며 PSG 0.1mg 실험군까지는 수용체가 증가 하나 그 이상 처리군 사이에서는 상호간 유의한 차이는 없었다. 3. 영지버섯 다당체는 대식세포에서 유래하는 세포간물질 즉 IL-1, IL-6 및 TNF의 생성에 유의성 있는 관여는 하지 않는 것으로 생각되나 부분적으로 영지버섯 다당체와 BCG 및 IFN- γ 를 모두 함께 병용 투여함으로써 각각 영지버섯 다당체와 BCG 또는 영지버섯 다당체와 IFN- γ 를 투여하는 경우에 비하여 IL-1의 분비증가를 보였으며 TNF의 분비 역시 현저한 증가를 보여 영지버섯 다당체가 초기 감염시 숙주의 1차 방어기능에 관여함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 중부대학교 교내 학술 연구비 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. 문수재 : 영양과 건강. 신광출판사, 서울, p.191(1995)
2. 최동성, 고가영역 : 식품기능화학. 지구문화사, 서울(1995)
3. 毛利威徳 :キノコ類の呈味作用と藥理的效果. 缶詰時報, 55, 26(1976)
4. Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C. and Ikekawa, T. : Antitumor activity of *Sarcodon aspratus*(BERK.)S. Ito and *Ganoderma lucidum*(FR.) KARST. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12, 118(1989)
5. 水野卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子 : マンネンタケ(靈芝)の水溶性多糖類の分畫, 構造, 抗腫瘍活性について. 日本農藝化學會誌, 58, 871(1984)

6. 김성환, 김을상 : 영지버섯에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구. 한국영양식량학회지, **24**, 147(1995)
7. 문범수, 이갑상 : 식품재료학. 수학사, 서울, p.126(1979)
8. 小學館 : 中藥大辭典(第4卷). 上海科學技術出版社, 上海, p.2731(1985)
9. 안덕균 : 한국산 약용균류. 한국균학회지, **20**, 154(1992)
10. Kwon, N. S., Stuehr, D. S. and Nathan, C. F. : Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **174**, 761(1991)
11. 권년수 : 거식세포의 활성화 증진제 검색방법, 전통약물로부터 신약개발연구법. 서울대 천연물 과학연구소, 서울, p.110(1992)
12. 김철우 : 유세포 계측검색의 임상적 응용 I. *Medical post-graduates*, **19**, 141(1991)
13. Takahashi, K., Yamazaki, M. and Abe, S. : Local induction of a tumor necrosis factor(TNF)-like cytotoxic factor in murine tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systemic administration of antitumor polysaccharides. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **11**, 472(1988)
14. Nakane, A., Numata, A. and Minagawa, T. : Endogenous tumor necrosis factor, Interleukin-6 and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infection and Immunity*, **60**, 523(1992)
15. Stites, D. P. and Terr, A. I. : Cytokines, Basic and clinical immunology. Seventh Edition, Prentice-Hall International Inc., p.78(1992)
16. Titus, R. G., Sherry, B. and Cerami, A. : The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites Nonspecific defence. Elsevier Science, p.A17(1991)
17. 체서일, 김범중 : SPSS/PC⁺를 이용한 통계분석. 범문사, 서울, p.61(1989)
18. Kino, K., Sone, T., Watanabe, J., Yamashita, A., Tsuboi, H., Miyajima, H. and Tsunoo, H. : Immunomodulator, LZ-8 : Prevents antibody production in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, **13**, 1109(1991)
19. Lieu, C. W., Lee, S. S. and Wang, S. Y. : The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in Leukemic U937 cells. *Anticancer Research*, **12**, 1211(1992)
20. Segal, A. W. : The respiratory burst in monocytes and macrophages and granulocytes. Academic press, New York, p.89(1987)
21. 이연태역 : 최신면역학. 집문당, 서울, p.71(1985)

(1996년 8월 22일 접수)