약학회지 제42권 제 3 호 302~306(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 3

영지버섯 생장점 단백다당체 GLB의 대식세포 활성화 효과

오정연 · 조경주 · 정수현 · 김진향 · H.S. Lillehoj* · 정경수#
충남대학교 약학대학 미생물약품화학교실, *미국 농무부 ARS, LPSI, 원충질환 연구실
(Received January 23, 1998)

Activation of Macrophages by GLB, a Protein-polysaccharide of the Growing Tips of *Ganoderma Lucidum*

Jung-Yeon Oh, Kyung-Joo Cho, Soo-Hyun Chung, Jin-Hyang Kim, Hyun S. Lillehoj*, and Kyeong-Soo Chung
Laboratory of Microbial Chemistry, College of Pharmacy, Chung-Nam National University, Taejon 305-764, Korea
**Protozoan Diseases Laboratory, Livestock and Poultry Sciences Institute, Agricultural Research Service, USDA, Beltsville MD 20705, USA*

Abstract—In the previous study we described the antitumor activity of GLB, a protein-polysaccharide fraction of the growing tips of *Ganoderma lucidum*, against sarcoma 180 solid tumor in ICR mice. In this study we investigated the stimulatory activity of GLB on macrophages. When analyzed using a flow cytometer, GLB (100 μg/ml) was found to increase the phagocytic activity of the BALB/c mouse peritoneal macrophages as well as chicken macrophage BM2CL cells against FITC-labeled *C. albicans* by 55.2% and 21.2%, respectively. GLB also increased the spreading and the expression of MHC class II molecules of BM2CL cells as well as the mouse peritoneal macrophages. From these results, it is clear that GLB is a strong stimulator to the macrophages.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, GLB, immunomodulator, macrophage, phagocytic activity, *Candida albicans*.

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 물론 표고버섯(*Lentinus edodes*), 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 치마버섯(*Schizophyllum commune*) 등 여러 가지 담자균류의 단백다당체들은 특별한 부작용 없이 숙주의 면역체계를 활성화시킴으로써 항암작용을 나타내기 때문에 암의 치료에 보조적인 수단으로 널리 이용될 수 있다. 이 중 영지버섯은 항암작용[1] 외에도 면역조절작용,[2] 항 allergy 및 항염증 작용, 간보호작용,[3] IL-2 생성 증가[4] 및 면역세포들의 생성 및 분화촉진 작용[5]이 보고되는 등 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 이러한 연구는 주로 성숙한 영지버섯을 대상으로 이루어졌으며 자실체 생성 초기 과정에만 나타나는 생장점에 대해서는 연구가 이루어지지 않았다. 영지버섯 생장점은 성숙된 자실체와는 달리 연한 갈색 내지 백색을 띠고 있으며 활발한 성장을 지속하고 강한 점성을 갖는 등의 특징을 지니고 있다. 따라서 그 함유 성분이나 단백다당체의 생리활성 등에도 현저한 차이가 있을 것으로 추정된다. 이러한 관점에서 본 연구자 등은 영지버섯 생장점으로부터 단백다당체 GLB를 분리하고 그 항암효과가 성숙된 영지버섯보다 우수함을 보고한 바 있다.[6] 본 연구에서는 GLB의 항암작용 기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 종양면역에서 중요한 역할을 담당하는 대식세포(macrophage)의 활성에

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5927 (팩스) 042-823-9630

미치는 GLB의 영향을 실험하여 신지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물 - 대한실험동물센타로부터 약 4주령의 BALB/c 및 ICR 계 생쥐 암수를 구입하여 충남대학교 약학대학 동물실험실에서 안정화시킨 후 사용하였다.

균주 및 세포주 - *Candida albicans* KCTC 1940 균주는 한국 과학기술연구원 생명공학연구소 유전자센타로부터 분양 받아 사용하였다. 닭 대식세포주인 BM 2CL은 United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service(ARS), Livestock and Poultry Sciences Institute(LPSI)에 보존중인 것을 사용하였다.

세포 배양용 배지 및 배양조건 - 세포배양용 배지로는 RPMI 1640(Sigma) 배지 1 L 당 1 M HEPES buffer(Sigma) 10 m*l*, sodium bicarbonate(Sigma, cell culture용) 2 g, penicillin-streptomycin solution(Sigma) 10 m*l* 및 56°C에서 30분간 불활성화 시킨 fetal bovine serum(Hyclon)을 10% 첨가하여 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO_2로 유지되는 CO_2 incubator(Forma, USA)를 사용하였다.

영지버섯 생장점 단백다당체 GLB의 분리 - 이미 보고한 방법[6]에 준하여 제조하였다. 즉, 영지버섯 생장점을 분쇄한 후 2기압, 121°C에서 1시간씩 2회 열수 추출한 다음 여과하여 여액을 취한 후, 3배량의 95% 에탄올을 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하여 침전을 생성시켰다. 이 침전물을 원심분리하여 증류수에 재용해시킨 후 4°C에서 3일간 투석하고 이를 동결건조하여 단백다당체 시료 GLB("*Ganoderma lucidum*-bud", 갈색의 수용성 무정형 분말)를 얻었다.

***Candida albicans*의 FITC 표지**[7] - 37°C에서 Nutrient agar 평판배지 상에 배양한 *C. albicans*에 소량의 생리식염수를 가하고 Conradi 봉으로 문질러 회수한 후 3배량의 95% 에탄올로 고정시켰다. 고정된 세포 *C. albicans* 10^6개당 fluoroscein-isothiocyanate(FITC) 용액(FITC 0.05 mg/m*l* 0.5 M bicarbonate buffer, pH 9.5) 2 μ*l* 씩을 가하여 상온에서 40분 동안 반응시킨 후 PBS(pH 7.4)로 3회 세척하였다. 이를 2×10^8 cells 씩 분주하여 -70°C에 보관하며 사용하였다.

***Candida albicans*에 대한 항혈청 제조**[8] - 에탄올로 고정시킨 *C. albicans*를 ICR 계 생쥐의 복강에 2×10^6 cells/mouse 용량으로 5일마다 1회씩 3회 주사하여 면역화시켰다. 주사개시 15일 후 하지동맥을 절단하여 말초혈액을 채취하고 이를 실온에 1~2시간 방치 후 혈청을 분리하여 *C. albicans*에 대한 항혈청으로 사용하였다.

생쥐 복강 대식세포의 분리 - 에텔로 마취시킨 정상 BALB/c 계 생쥐의 복강에 50 IU heparine-saline 5 m*l*을 주사하고 2~3 분간 마사지한 후 대식세포를 포함하는 복강세척액을 회수하였다. 이를 세척한 후 생쥐 복강 대식세포로 사용하였다.

대식세포의 활성화 - 24-well culture plate에 생쥐 복강 대식세포(5×10^5 cells/well) 또는 닭 대식세포 BM2CL(2.5×10^5 cells/well)과 GLB(25~100 μg/m*l*)를 가하고 4시간 또는 24시간 배양하여 대식세포를 활성화시켰다.

***C. albicans*를 이용한 식균실험**[9] - 전항의 대식세포를 효과세포(E)로 하고 FITC 표지된 *C. albicans*를 표적세포(T)로 하되 E : T=1:5~20이 되도록 *C. albicans*를 가하고 1시간동안 배양하여 식균작용을 진행시켰다. 단 생쥐 복강 대식세포의 경우에는 여기에 1:10으로 희석된 anti-*C. albicans* 항혈청을 첨가하였다. 배양 후 식균되지 않은 *C. albicans*를 세척하여 제거하고 trypsin 용액(Sigma)으로 10분간 처리하여 복강 대식세포를 회수하였다. 이를 PBS로 2회 세척하고 0.5 m*l*에 현탁시킨 후 대식세포 표면에 부착되어 있는 *C. albicans*의 형광을 소거(quenching)하기 위하여 2% Trypan blue(pH 4.4 in PBS) 시약을 0.5 m*l* 첨가하여 아래항에 기술한 바에 따라 유세포분석을 하였다.

Spreading 실험[10] - BM2CL 및 생쥐 대식세포(5×10^4 cells/well)와 GLB(50~200 μg/m*l*)를 flat bottomed microtiter plate에 가하고 2시간 동안 배양하였다. 위상차 현미경을 이용하여 사진을 촬영한 후 사진상에서 spreading 정도를 판정하였다.

MHC class II 분자의 면역형광 염색[11] - 24-well culture plate에 BM2CL 세포(2.5×10^5 cells/well) 및 GLB(25~100 μg/well) 또는 LPS(10 μg/well)를 가한 후 24시간 또는 48시간동안 배양하였다. Trypsin을 이용하여 부착된 BM2CL 세포를 회수하고 anti-chicken MHC class II mAb인 P2M11(100 μ*l*)로 1차 표지한 후 이어서 FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 가하여 간접 면역형광염색을 실시하였다.

유세포 분석 – Becton Dickinson사의 FACScalibur를 flow cytometer로, Cell Quest™를 응용 프로그램으로 이용하였다. FSC 및 SSC는 linear mode로, FL1은 log mode로 설정하여 data를 취합하되 식균작용 분석의 경우에는 FSC/SSC dual parameter dot plot에서 *C. albicans* 영역(R2)과 대식세포 영역(R1)을 구별한 후 분석대상인 대식세포 5,000~10,000개에 대한 자료를 취합하였다. 취합된 자료를 FL1 histogram 상에 나타내고 *C. albicans*를 식균하여 강한 형광을 나타내는 대식세포 부분의 형광강도를 분석하였다(Fig. 1). 한편 MHC class II 분자발현 분석에서는 FSC/SSC dual parameter dot plot 상에서 BM2CL 세포 영역을 구별하여 자료를 취합하고 FL1 hitogram 상에서 분석대상세포 전체의 평균형광강도를 분석하였다.

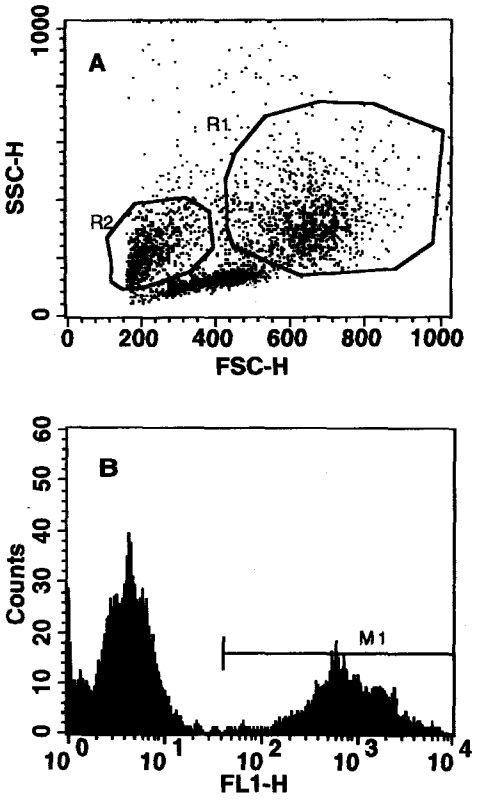

Fig. 1 — Flow cytometric analysis of phagocytic activity of the peritoneal macrophages stimulated by GLB. *Panel* A: A FSC/SSC dual parameter dot plot showing peritoneal macrophages (R1) and non-phagocytosed *Candida albicans* cells (R2). *Panel* B: FL1 histogram of the cells in the region R1.

실험결과 및 고찰

식균 능력 증강 효과 – Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 BALB/c 계 생쥐 복강 대식세포를 GLB와 24시간동안 배양하고 항혈청 존재하에 *C. albicans*에 대한 식균능력을 실험한 결과 E : T=1:5 일때 GLB는 생쥐 복강 대식세포의 식균능력을 25 μg/m*l*에서 25.7%, 100 μg/m*l*에서 55.2% 농도의존적으로 증가시켰다. 또한 E : T=1:10 및 1:20에서도 유사한 양상으로 증가시켰다. 그러나 항혈청을 첨가하지 않은 경우에는 식균능력이 증가되지 않았다(결과 제시하지 않음). 이러한 결과는 GLB가 생쥐 대식세포에 대해 항체의존적 식균작용을 증가시킴을 의미한다.

한편 Fig. 2B에 나타낸 바와 같이 닭 대식세포 BM2CL에 대해서는 GLB가 항혈청을 첨가하지 않았음에도 불구하고 농도의존적으로 그 식균능력을 증강시킴을 알 수 있다. 즉 E : T=1:5의 경우 GLB는 25 μg/m*l*에서 14.6%, 100 μg/m*l*에서 21.7% 식균능력을 증가시켰다. 이러한 경향은 수회 반복실험에서도 확인되었다. 한편 대식세포는 활성화될 경우 세포내 기생성 세균 및 암세포까지도 죽이는 능력을 가지므로, 이들을 활성화시키는 GLB의 작용은 항암면역에서 매우 중요한 역할을 하리라 사료된다. 그러나 생쥐와 닭의 대식세포에 대하여 상이한 결과가 얻어진 것은 GLB가 종에 따라, 특히 포유류인 생쥐와 조류인 닭 사이에서 상이한 기전으로 대식세포의 식작용에 관여하기 때문으로 추정된다. 그 정확한 차이점에 대해서는 후속연구가 이루어져야할 것이다.

Spreading 증가 효과 – 활성화된 대식세포는 배양용기에 활발하게 들러붙고 넓게 퍼지는 현상 즉 spreading을 보인다. Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 GLB는 100 μg/m*l* 농도에서 닭 대식세포 BM2CL의 spreading을 대조군의 2배 이상으로 현저히 증가시켰다. 반면에 비교 시료로 사용한 성숙된 영지버섯의 단백다당체인 GLA는 동일 농도에서 17.2%의 증가를 보인데 불과하였다. GLB는 100 μg/m*l* 농도에서 BALB/c 및 ICR 계 생쥐 대식세포에 대해서도 spreading을 5.5배 및 3.1배로 현저히 증가시켰으나 GLA는 동일농도에서 1.5배 및 1.9배 증가에 그쳤다(Fig. 3B). 따라서 닭 대식세포 및 생쥐 대식세포 모두에서 GLB가 GLA보다 대식세포의 spreading을 더욱 촉진하였다.

MHC class II 분자 발현 증가 효과 – 면역체계에서 대식세포, B cell, dendritic cell 등의 antigen present-

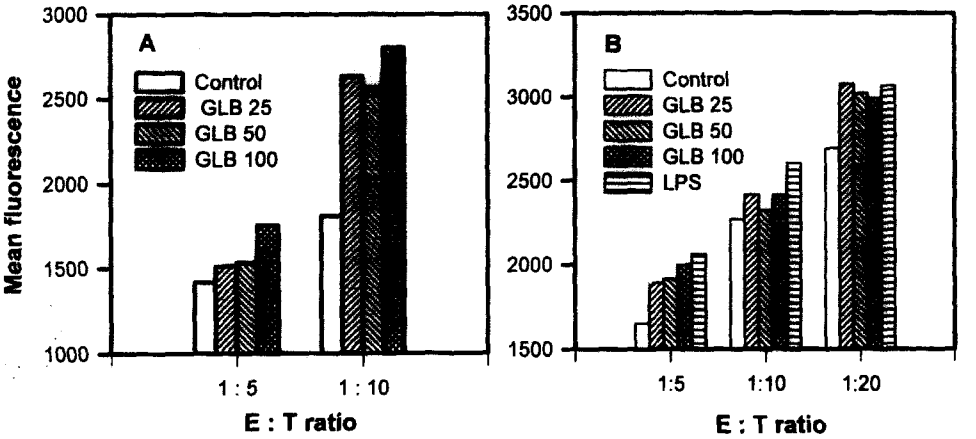

Fig. 2 — Stimulatory effect of GLB on the phagocytic activity of the peritoneal macrophage of the BALB/c mouse and the chicken macrophage cell line, BM2CL cells. The macrophages were stimulated with GLB (25~100 μg/m*l*) or LPS (10 μg/m*l*) for 24 hr and then incubated with FITC-labeled *Candida albicans* at 37°C for 60 min. The macrophages with phagocytosed *C. albicans* cells were flow cytometrically analyzed as described in the text. E =Effect cells (the peritoneal macrophages or BM2CL). T=Target cells (FITC-labeled *C. albicans* cells). *Panel* A: The macrophages of BALB/c mouse in the presence of anti-*C. albicans* antiserum. *Panel* B: The chicken macrophage cell line, BM2CL cells.

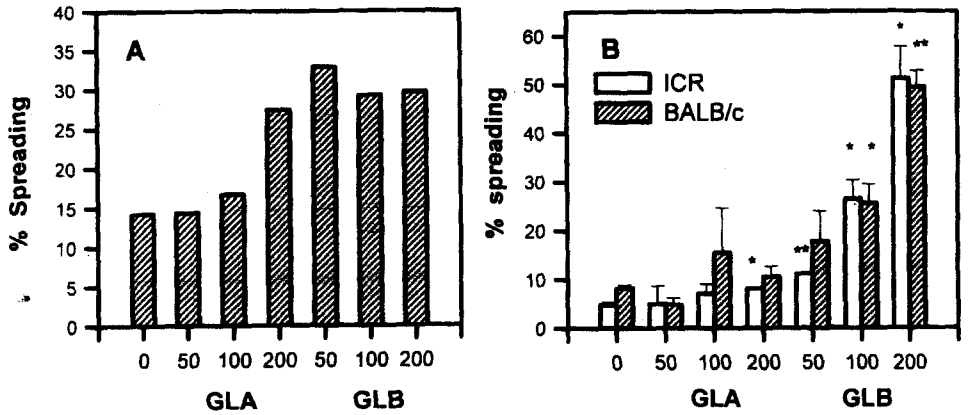

Fig. 3 — Stimulatory effect of GLB on the spreading of BM2CL cells (*Panel* A) and the peritoneal macrophages of the ICR and the BLAB/c mouse (*Panel* B). The cells (5×10^4 cells/well) were incubated at 37°C in a flat bottomed microtiter plate for 2 hr, washed twice with prewarmed RPMI 1640 medium, and then stimulated with 50~200 μg/m*l* of GLA or GLB for 1 hr. After the incubation, photomicrographs were taken and analyzed for % spreading. GLA: a protein-polysaccharide fraction separated from the fully grown carpophores of *Ganoderma lucidum*. *significant at $p<0.05$, **significant at $p<0.01$

ing cell(APC)들이 발현하는 MHC class II 분자는 helper T cell에 정보를 전달하여 면역을 활성화시키는데 필수적이므로 이의 증가는 중요한 의미를 갖는다.[13] BM2CL의 MHC class II 분자 발현 정도를 분석하였을 때, GLB 25 μg/m*l*에서 12.3%, 100 μg/m*l*에서 23.6% 농도 의존적인 증가를 보였다(Fig. 4). 이는 GLB가 APC들을 활성화시켰음을 의미한다. 한편 48 시간동안 배양한 경우에는 그 증가 효과가 더욱 두드러졌다. 한편 본 연구자들은 GLB가 생쥐 대식세포의 경우에서도 유사한 효과를 나타낼 뿐만 아니라 비장 림프구의 lymphoblast 비율 및 CD4/CD8 비율을 증가시키며, CD25(IL-2 receptor)의 발현을 증가시키는 등 특이적 면역계에 대해서도 면역활성을 발휘함을 관찰한 바 있다(투고 준비 중). 이러한 결과들을 종합해 볼 때, GLB는 특이적 면역계는 물론, 비특이적 방어기전과 특이적 면역계의 중간 연결고리 역할을 담당하는 대식세포를 활성화

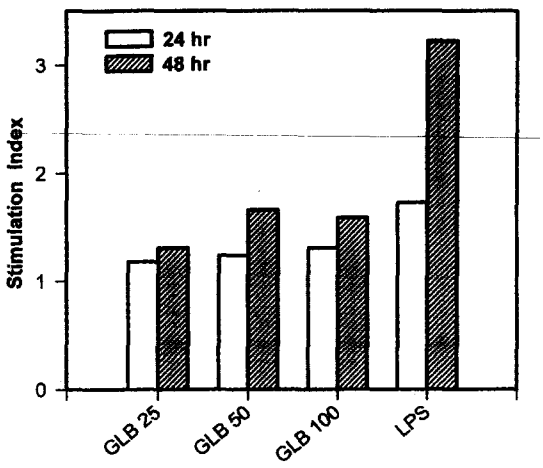

Fig. 4 — Stimulatory effect of GLB on the expression of MHC class II molecules of the chicken macrophage cell line, BM2CL cells. The cells were stimulated with GLB (25~100 μg/ml) or LPS (10 μg/ml) for 24 or 48 hr. The stimulated cells were indirectly immunofluorescence-stained with anti-chicken MHC class II mAb, P2M11, followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG and then flow cytometrically analyzed. SI (stimulation index)=T/C, where T and C, respectively, is the mean fluorescence of the GLB-treated and the control cells.

시킴으로써 항암효과를 나타내는 것으로 사료된다.

결 론

영지버섯 생장점에서 분리한 단백다당체인 GLB는 생쥐의 복강 대식세포 및 닭 대식세포 BM2CL을 활성화시켜 *C. albicans*에 대한 식균작용, spreading 및 MHC class II 분자 발현을 증가시키는 등 대식세포 활성화 효과가 입증되었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 충남대학교 의약품개발연구소의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C. and Ikekawa, T. : Antitumor activity of *Sarcodon aspratus (Berk.)* and *Ganoderma lucidum*. *J. Phamacobiodyn.*, **12**, 118 (1989).

2) van der Hem, L. G., van der Vliet, J. A., Bocken, C. F., Kino, K., Hoitsma, A. J. and Tax, W. J. : Ling Zhi-8: Studies of a new immunomodulating agent. *Transplatation*, **60**, 438 (1995).

3) Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J. and Lee, S. G. : Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus, Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Am-J-Chin-Med*, **21**, 59 (1993).

4) Zhang, L. X., Mong, H. and Zhou, X. B. : Effect of Japanese *Ganoderma lucidum* on production of IL-2 from murine splenocytes. *Chung-Kuo-Chung-Hsi-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih*, **13**, 613 (1993).

5) Lieu, C. W., Lee, S. S. and Wang, S. Y. : The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Res.*, **12**, 1211 (1992).

6) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysacchrides of the tips of the carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **41**, 105 (1997).

7) Robinson, J. P. (Ed.) : *Handbook of Flow Cytometry Methods*. Cytometry Laboratories, Breckenridge, p. 129 (1990).

8) Soll, D. R. : Cytoplasmic localization of the white phase-specific WH11 gene product of *Candida albicans*. *Microbiology*, **142**, 2245 (1996).

9) Sabato, G. D. and Everse, J. (Eds.) : *Methods in Enzymology*. Vol. 132 Academic Press, New York, p. 198 (1986).

10) Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai. S., Ikeda, M. and Kurimoto, M. : Isolation and identification of compounds from *Brazilian propolis* which enhance macrophage spreading and motility. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 966 (1996).

11) Kaspers, B., Lillehoj, H. S. and Lillehoj, E. P. : Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **36**, 333 (1993).

12) Nair, S., Buiting, A. M. J., Rouse, R. J. D., Rooijen, N. V., Huang, L. and Rouse, B. T. : Role of macrophages and dendritic cells in primary cytotoxic T lymphocyte responses. *International Immunology*, **7**, 679 (1995).