

## 마늘 첨가 복합배지에서 배양된 영지 균사체의 면역 증진 효과

문형철\* · 이현수\* · 박진홍\* · 김대호\* · 이신영\* · 성낙술\*\* · 방진기\*\* · 정해곤\*\* · 이현용\*†

\*강원대학교 바이오산업공학부, \*\*작물과학원

### Enhancement of Immune Activities of *Ganoderma lucidum* Mycelium Cultured with Garlic Enriched Medium

Hyoung Chul Mun\*, Hyun Soo Lee\*, Jin Hong Park\*, Dae Ho Kim\*, Shin Young Lee\*, Nak Sul Seong\*\*, Jin Ki Bang\*\*, Hae Gon Jung\*\*, and Hyeon Yong Lee\*†

\*School of Biotechnology & Bioengineering, Kangwon Natl. Univ., Chunchon 200-701, Korea.

\*\*National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea.

**ABSTRACT** : The immune activities of *Ganoderma lucidum* Mycelium added garlic extracts (GAM), *Ganoderma lucidum* Mycelium (GM), garlic extracts (GS) and standard ( $\beta$ -glucan) were compared. GAM enhanced the growth of human immune T cell up to 1.25~1.46 times, compared to control group. GAM showed relatively lower cytotoxicity in using normal human lung cell, while GAM showed the most potent inhibitory effect on the human lung carcinoma, compared to GM and GS. The selectivity of GAM was also higher than that of GM and GS. GAM increased the secretion of cytokines, IL-6 and TNF- from human B cell as well as the growth of human immune cells. It can imply that GAM has higher immune activity than GM or GS.

**Key words** : immune Activities, *Ganoderma lucidum* Mycelium, garlic, cytokines, microphysiometer

## 서 언

영지는 담자균류의 다공균과 Polyporaceae에 속하는 버섯으로 학명은 *Ganoderma lucidum* Karsten이며 중국 고대 약물서인 신농본초경과 본초강목에 수록된 약으로 신농본초의 상품약에 속하며 신비한 지용이 영묘한 약성을 가지므로 영지라고 칭하였다 (이, 1985). 영지버섯의 생리 활성을 검색한 연구는 주로 향암 (이 등, 1994a; 이 등, 1994b; 이 등, 1994c), 항균활성 (정과 정, 1992)을 중심으로 지질대사에 대한 영향 (정 등, 1990; 정, 1992; 김 등, 1992; 김 등, 1994)과 혈압강하 작용 (박 등, 1987) 등에 관하여 보고되고 있으며, 영지버섯 면역계에 미치는 영향에 관한 연구는 주로 임파구를 가지고 이루어져 왔다

(정, 1995).

마늘 (*Allium sativum* L.)은 향신료로서 전 세계적으로 널리 이용되어온 백합과 식물로 우리나라에서는 조미용 기호식품으로 대부분의 요리에 이용되고 있으며, 근래에 와서는 분말마늘, 마늘다재기, 마늘소스, 마늘통조림 등으로 가공되어 시판되는 등 그 이용도가 날로 증가되고 있다. 마늘은 약용으로도 이용되어 왔는데 주로 곡류와 육류의 소화촉진과 함께 해독작용이 있다고 알려져 강장, 강정 식품으로 널리 식용되어 왔고 그 효능도 인정되어 왔다. 밝혀진 마늘의 주요 약리효과로는 혈당 저하작용 및 동맥경화 개선작용 (Jain, 1975; Yamata & Azuma, 1977), 장내 운동의 촉진 및 구충, 항균작용, 혈압저하와 혈청 cholesterol 저하작용 (Kim, 1974) 등이 있으며, 최근에

† Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr  
Received October 1, 2003 / Accepted January 28, 2004

는 마늘의 항산화 성분이 DNA 손상을 억제한다고 보고되어졌다 (Kang *et al.*, 1988).

본 연구에서는 영지 균사체 배양 시, 마늘 추출물을 첨가하여 이러한 마늘과 영지의 유용 생리활성의 상승효과를 기대하여, 다방면에서 다양하게 사용되고 있는 영지 자실체와 같이, 면역 활성, 항암 활성 등과 같은 유용 생리활성이 증진된 영지 균사체의 사용 범위를 확대하고자 하였으며, 또한 향신료와 같은 국한된 범위에서 사용되어지고 있는 마늘을 기능성식품으로 개발하거나 또는 새로운 약제로서의 가능성을 살펴보고자 하였으며, 본 연구 자료들이 식품에 관련된 분야에 바탕자료로서 가치를 지니게 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

세포 배양용 배지로 RPMI 1640는 GIBCO사 (USA)로부터 구입하였고, 혈청인 Fetal Bovine Serum (FBS) GIBCO사의 것을 사용하였으며, gentamycin sulfate, Heps buffer는 Sigma (USA)사의 것을 사용하였고, trysin-EDTA는 GIBCO사의 것을 사용했다. 염색제 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 sulforhodamine B (SRB)는 Sigma 사로부터 구입하여 실험에 사용하였고, Potassium phosphate buffer (PBS), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Trichloro-acetic acid (TCA)와 영지버섯의 기준물질로 사용한  $\beta$ -glucan은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

### 재료

영지버섯 균사체 (*Ganoderma lucidum* Mycelium, GM)는 강원대학교 바이오산업공학부 생물공학 전공 생물소재연구실에서 PDA (Potato-Dextrose Agar) 배지에 사면배양하여 보관 중인 것을 최적배지 (glucose 60 g/l, yeast extract 6 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/l,  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  5 g/l, pH 4)를 사용하여 배양하였다(Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998).

각종 마늘 (*Allium sativum* L. GS)은 고흥, 남해 및 의성 지방에서 생산된 것을 구입하여 4°C 저온으로 유지하였다. 생마늘 200 g을 retort pouch에 넣어 autoclave에서 가열한 후 이 가열 마늘에 마늘 무게의 50배가 되게 물을 첨가하여 (200 g/l) 40°C에서 추출한 것을 사용하였다.

마늘첨가균 (*Ganoderma lucidum* Mycelium enriched with garlic, GAM)은 30 l jar fermenter에서 최적배지를 사용하여 대량배양 하였으며, 조건은 온도 30°C에서 교반속도 200 rpm으로 통기속도 1 vvm으로 6일간 배양한

후, filtration한 마늘추출물을 배양액 : 마늘추출물을 70 : 30의 비율로 혼합하여 40°C에서 2일간 정치배양한 것을 사용하였다.

### 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat, ATCC, USA)과 B cell (Raji, ATCC, USA)을 이용하여 검증하였고, 항암활성은 인간 폐암 세포인 A549 (Lung carcinoma, human, ATCC, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상 세포로는 인간 폐 세포인 HEL299 (Embryo lung, human, ATCC, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포들은 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였다.

### 면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비 측정

간 면역 세포인 B cell과 T cell의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C에서 배양하였으며, 면역세포 생육 증진 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay (MTT) 방법 (Michael *et al.*, 1988)에 의하여 실험군의 면역세포 생육 증진 효과를 측정하였다. MTT assay 실험 방법은 대상 세포의 농도를  $4 \sim 5 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후, 24 well plate에 900  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )시킨 후 시료의 최종농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/로 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )하였다. 여기에 100  $\mu\text{l}$ 의 MTT (50 mg/ml) 용액을 첨가하여 4시간 동안 다시 배양 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 formazan을 다시 녹였다. 이후 각 well에서 100  $\mu\text{l}$ 씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

T 세포의 cell density는 24 well plate에 세포를  $2.0 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시켜 각 well의 cell 수를 hemacytometer를 이용하여 1일 간격으로 측정하였다.

Cytokine은 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 정량은 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- $\alpha$  정량 kit를 사용하여 측정하였다. 우선 세포의 농도를  $4 \sim 5 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )시킨 후 시료의 최종농도를 1.0 g/l로 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ )하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질

을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

**항암 활성 측정**

Sulforhodamine B (SRB) assay (Doll & Peto, 1981)는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포를  $4\sim 5 \times 10^4$  cell/ml의 농도로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ )한 후, 각각의 시료를 최종 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/l로 100  $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA 100  $\mu$ l를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤, 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100  $\mu$ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

위 SRB 측정법을 이용하여 정상 세포인 HEL299에 대한 각 시료 농도에서 세포독성을 측정하였다. 또한 SRB assay를 이용하여 각 암 세포주의 생육 억제 정도를 측정된 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산하였다 (Chung et al., 2001).

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암 세포 생육 억제 활성}}{\text{정상 세포의 세포 독성}}$$

**동역학적 검증**

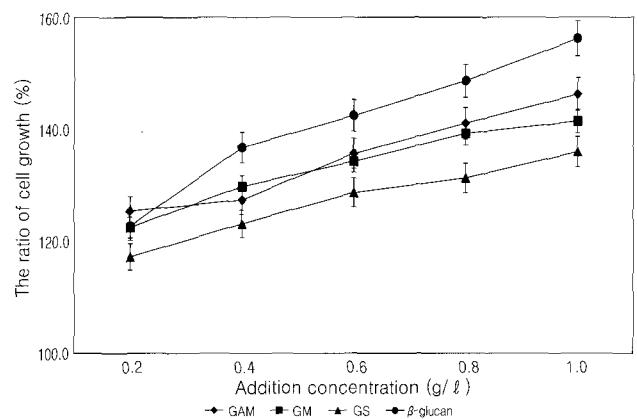
각 시료를 면역세포인 T cell에 투여한 후, 각 시료들에 의해 T cell의 대사 (산화) 활성도를 측정하기 위하여 Microphysiometer (Molecular Devices, USA)를 사용하였다. 측정조건은 다음과 같이 Pump cycle은 total cycle time이 2분으로 하여 최종 측정되는 시간 [start slope measurement (1 min. 28 sec.)  $\rightarrow$  Stop slope measurement (1 min. 58 sec.)]은 30초로 하였다. 그리고 측정된 수치의 표시는 약물투여 전에 running buffer만을 흘려보내면서 측정된 값이 일정하게 유지되어지는 임의의 선으로 baseline을 설정하였고, 이것을 100%로 하여 이 baseline값에 대한 %로 표현되었다. Non-adherent cell은 측정 시 세포가 고정되지 않아 agarouse로 고정을 시켜 측정하였다. Beaker속 20 ml D.W.를 70 $^{\circ}$ C 이상에서 hot plate를 이용하여 가열 (microwave, Heating block 등도 사용)하여 agarouse가 녹을 때까지 약 2분간

agarouse vial을 물속에 넣는다. Vial을 37 $^{\circ}$ C water bath나 incubator에 옮기고, 세포용액을 모아서 centrifugation을 하여 부유물을 제거하고 난 후에 세포를  $5 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 만든 다음 이 세포액과 agarouse를 3 : 1로 혼합하여 10  $\mu$ l 만 capsule cup에 넣고 굳힌 다음, 마른 capsule cup에 spacer와 insert를 넣어 측정할 때 plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정하였다. 본 실험에서 측정된 세포로는 인간 면역 세포 중 하나인 T 세포를 이용하였고, running buffer로 RPMI 1640배지를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**면역세포 생육 증진 효과**

Fig. 1은 인간 면역 세포 중 하나인 T 세포에 대한 각 시료의 생육 촉진 활성을 나타낸 것이다. 0.2~1.0 g/l 처리구 중  $\beta$ -glucan 처리구가 시료를 처리하지 않은 대조구에 비하여 약 1.22~1.56배의 T 세포의 생육을 촉진시켜 가장 좋은 활성을 나타내었으며, GAM 또한 대조구에 비하여 1.25~1.46배의 높은 생육 촉진 활성을 보였다. GM과 GS도 각각 1.22~1.41배, 1.17~1.35배의 T 세포의 생육 촉진 활성을 나타내었다. 또한 GAM과 GM은 0.6 g/l의 농도에서부터 1.3배 이상의 높은 T 세포의 생육을 촉진하였다. 인간의 면역체계는 외부의 항원에 대하여 항체를 생산하여 대응하는 기작을 가지고 있다. 이러한 면역체계가 활성화되면서 외부에서 항원이 침입하여 발생하는 암과 같은 질병 발생에 대하여, 활성화된 면역세포에 의하여 궁극적으로 항암활성이 나타날 것으로 사료되어지는 바이다.



**Fig. 1.** Cell growth of T cell by adding *Ganoderma lucidum* Mycelium enriched with garlic (GAM), *Ganoderma lucidum* Mycelium (GM), garlic extracts (GS) and standard ( $\beta$ -glucan) as a function of adding concentration.

**Cytokines 분비 증진 효과**

Table 1은 인간 면역 세포인 B 세포에 대한 cell density와 cytokine인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 각 세포 당 분비량을 나타낸 것이다. 우선 B 세포의 cell density를 살펴보면 GAM과  $\beta$ -glucan의 경우 배양 5일째 최대치를 나타내는데 비하여 GM와 GS의 경우는 배양 4일째 최대치를 나타내었다. GAM과  $\beta$ -glucan의 경우는 배양 5일째 각각  $7.5 \times 10^4$  cells/ml과  $7.4 \times 10^4$  cells/ml로 GM의  $6.7 \times 10^4$  cells/ml과 GS의  $7.1 \times 10^4$  cells/ml에 비하여 비교적 높은 활성을 나타내었다. Cytokine 중 하나인 IL-6의 분비량을 살펴보면, 대부분의 시료에서 배양 6일째 각 세포 당 분비량

이 최대치를 나타내었다. GAM, GM 그리고 GS의 경우는 배양 6일째 각각 3.37 fg/cell, 3.72 fg/cell, 3.43 fg/cell의 양이 분비되었다.  $\beta$ -glucan의 경우는 배양 첫째 날 가장 많은 양의 IL-6를 분비하였는데 그 양은 3.46 fg/cell이다. 각 cell 당 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, GAM은 배양 2일째 8.65 fg/cell로 최대 분비량을 보이고 배양 4일째 5.22 fg/cell으로 줄어들었다가 다시 배양 6일째 6.38 fg/cell까지 점차적으로 분비량이 증가하였다. GM과 GS도 GAM과 같은 양상을 나타내었으며, 배양 2일째 각각 7.48 fg/cell과 8.09 fg/cell으로 최대분비량을 나타내었고, 배양 4일째 각각 3.98 fg/cell과 4.49 fg/cell까지 줄어들었다가 배양 6일째 각각 6.57 fg/cell과 5.71 fg/cell까지 분비량이 증가하였다. 반면,  $\beta$ -glucan은 배양 1일째부터 6일째까지 약 4.64 fg/cell의 거의 일정한 수치의 분비량을 나타내었다. 이상의 결과는 앞에서 실시한 면역세포의 생육 증진 활성을 뒷받침하는 자료로서, 면역세포의 생육 증진으로 인하여 면역 체계가 활성화 되면서 cytokine의 분비량도 증가하였다.

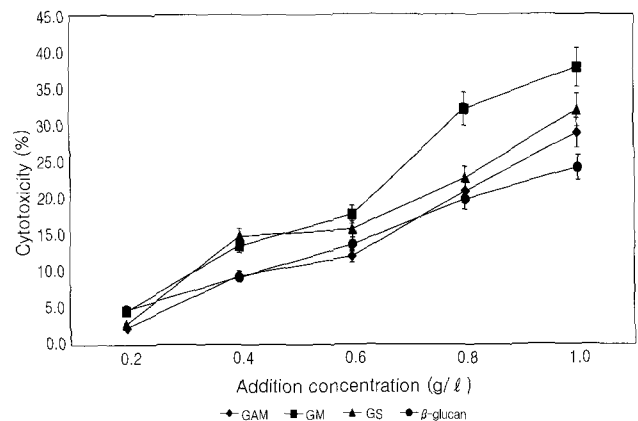
**Table 1. Measurement of human B cell growth and secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in adding various samples.**

Sample	Cultivation time (days)	Cell density ( $\times 10^3$ /ml)	Quantity of secretion of IL-6 (fg/cell)	Quantity of secretion of TNF- $\alpha$ (fg/cell)
GAM	1	10 $\pm$ 0.1 <sup>†</sup>	2.08 $\pm$ 0.05	1.97 $\pm$ 0.07
	2	31 $\pm$ 0.1	2.95 $\pm$ 0.07	8.65 $\pm$ 0.03
	3	56 $\pm$ 0.2	3.19 $\pm$ 0.04	5.38 $\pm$ 0.06
	4	71 $\pm$ 0.1	2.93 $\pm$ 0.05	5.22 $\pm$ 0.04
	5	65 $\pm$ 0.3	2.57 $\pm$ 0.04	5.64 $\pm$ 0.01
	6	39 $\pm$ 0.2	3.37 $\pm$ 0.08	6.38 $\pm$ 0.01
GM	1	10 $\pm$ 0.2	2.27 $\pm$ 0.07	2.10 $\pm$ 0.04
	2	20 $\pm$ 0.1	2.31 $\pm$ 0.05	7.48 $\pm$ 0.07
	3	53 $\pm$ 0.2	2.91 $\pm$ 0.06	4.79 $\pm$ 0.05
	4	68 $\pm$ 0.2	2.91 $\pm$ 0.06	3.98 $\pm$ 0.04
	5	57 $\pm$ 0.1	3.28 $\pm$ 0.04	4.59 $\pm$ 0.02
	6	38 $\pm$ 0.3	3.72 $\pm$ 0.08	6.57 $\pm$ 0.02
GS	1	10 $\pm$ 0.2	1.94 $\pm$ 0.09	1.86 $\pm$ 0.04
	2	27 $\pm$ 0.3	2.08 $\pm$ 0.07	8.09 $\pm$ 0.08
	3	66 $\pm$ 0.3	2.71 $\pm$ 0.06	5.57 $\pm$ 0.06
	4	79 $\pm$ 0.1	2.67 $\pm$ 0.04	4.49 $\pm$ 0.04
	5	56 $\pm$ 0.1	2.87 $\pm$ 0.06	4.94 $\pm$ 0.03
	6	43 $\pm$ 0.1	3.28 $\pm$ 0.05	5.71 $\pm$ 0.03
$\beta$ -glucan (standatd)	1	10 $\pm$ 0.2	3.46 $\pm$ 0.05	5.04 $\pm$ 0.05
	2	27 $\pm$ 0.1	2.82 $\pm$ 0.07	4.56 $\pm$ 0.08
	3	70 $\pm$ 0.1	2.71 $\pm$ 0.08	4.47 $\pm$ 0.08
	4	82 $\pm$ 0.3	2.67 $\pm$ 0.06	4.20 $\pm$ 0.04
	5	69 $\pm$ 0.2	2.87 $\pm$ 0.09	4.54 $\pm$ 0.05
	6	41 $\pm$ 0.2	3.28 $\pm$ 0.06	5.04 $\pm$ 0.03

<sup>†</sup> Means  $\pm$  S.D.

**항암 활성**

Fig. 2는 정상세포인 HEL299에 대한 각 시료의 세포 독성을 나타낸 것이다. 투여된 시료의 최고 농도인 1.0 g/ℓ의 농도에서 가장 세포 독성이 낮게 나타난 시료는 기준물질로 사용한  $\beta$ -glucan으로 시료를 투여하지 않은 대조구에 비하여 24.1%의 낮은 세포 독성을 나타내었다. 그리고 GAM 또한 28.8%로 비교적 낮은 세포 독성을 나타내었다. 반면에 GM은 37.7%로 높은 세포 독성을 나타내었다. GS도 31.9%의 비교적 높은 세포독성을 나타내었다. GM



**Fig. 2. Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* Mycelium enriched with garlic (GAM), *Ganoderma lucidum* Mycelium (GM), garlic extracts (GS) and standard ( $\beta$ -glucan) against normal human cell line, HEL299.**

과 GS의 GAM과  $\beta$ -glucan에 비하여 비교적 높은 세포 독성을 나타내었는데, 이는 암세포에 대한 선택적 사멸도에 있어서 GAM과  $\beta$ -glucan에 비하여 낮은 수치의 선택적 사멸도를 나타낼 것으로 사료되어진다. 그리고 모든 시료가 정상세포인 HEL299 세포에 대한 세포독성 측정 결과, 시료의 농도가 높아지면서 독성이 높아지는 농도 의존적인 경향을 나타내었다.

Fig. 3은 폐암 세포인 A549에 대한 각 시료의 생육 억제 활성과 선택적 사멸도를 나타낸 것으로, 최고 농도인 1.0 g/l의 농도에서 암세포에 대한 생육 억제 활성이 가장 좋게 나타낸 시료는 GM으로 91.9%의 아주 높은 억제 활성을 나타내었다. 그리고 GAM과  $\beta$ -glucan은 각각 85.2%와 88.3%의 비교적 높은 생육 억제 효과를 나타내었다. GS의 경우는 0.1 g/l의 농도에서 82.6%의 억제 효과를 나타낸 반면 0.6 g/l와 0.8 g/l의 농도에서 85.9%와 90.4%의 억제 효과를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 또한 가장 낮은 농도인 0.2 g/l의 농도에서부터 모든 시료에서 70%가 넘는 높은 생육 억제 효과를 나타내었다.

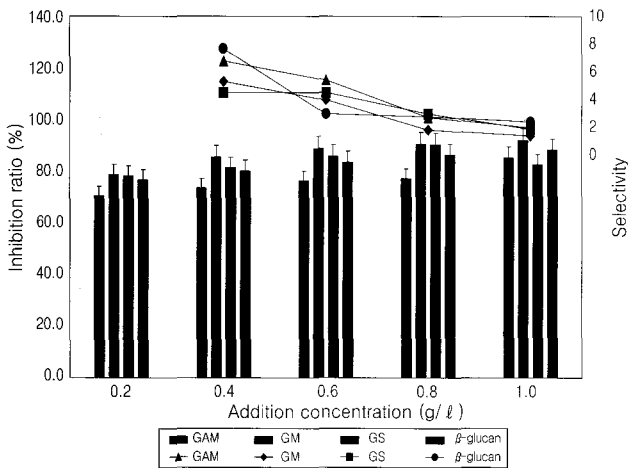


Fig. 3. The inhibition ratio of the growth (bar chart) of human lung carcinoma (A549) and its selectivity (line) in adding *Ganoderma lucidum* Mycelium enriched with garlic (GAM), *Ganoderma lucidum* Mycelium (GM), garlic extracts(GS) and a standard ( $\beta$ -glucan).

암세포의 생육 억제율에 대한 정상세포의 독성의 비로 나타내는 선택적 사멸도는 보통 1.5 이상일 경우, 암세포를 선택적으로 사멸시킨다. 각 시료의 1.0 g/l의 농도에서  $\beta$ -glucan이 2.4의 수치로 가장 좋은 활성을 나타내었고, GAM과 GS가 각각 2.0과 1.9의 높은 활성을 나타내었다. 반면 GM의 경우는 생육 억제 효과는 가장 높은 활성을 나타내었지만 세포 독성 또한 높아서 선택적 사멸도에서

는 1.4의 비교적 낮은 수치를 보였다. 이는 앞에서 실시한 면역 활성 결과를 통해 활성화된 면역체계에 의해 항암활성이 증가한 것으로 사료되어지는 바이다.

### 동역학적 검증

Fig. 4는 microphysiometer를 이용하여 동역학적으로 면역 세포 중 하나인 T 세포에 대하여 각 시료를 투여한 후, T 세포의 면역 활성 증진 효과를 나타낸 것이다. 각 시료에 대한 세포의 영향을 측정하는 일반적 방법인 MTT assay나 SRB assay는 측정에 소요되는 시간이 3일이 걸리나 Microphysiometer로 측정하면 약물투여 후 세포의 변화를 초 (sec.) 혹은 분 (min.) 단위로 곧바로 나타내기 때문에 시간절약 면에서 효율적이며, 3일 동안 일어날 수 있는 세포오염이나 세포 염색을 하기 전 상등액 제거 시에 세포의 유실에서 오는 실험오차도 극복할 수 있어서 보다 정확한 실험결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 실험값의 분석면에서도 대조구에 대한 실험구의 비교 값이 컴퓨터 화면에서 바로 나타나므로 다시 계산할 필요가 없으며, 이러한 측정은 MTT assay나 SRB assay를 측정할 때 비교 값으로 필요하다.

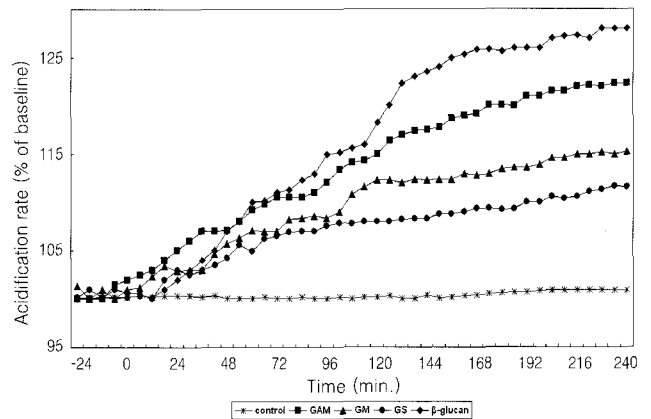


Fig. 4. Stimulatory effects on T cell metabolism of *Ganoderma lucidum* Mycelium enriched with garlic(GAM), *Ganoderma lucidum* Mycelium (GM), garlic extracts(GS) and standard substance( $\beta$ -glucan) for 4 hours, measured with a microphysiometer.

가장 활성이 높은 시료는 표준물질로 사용한  $\beta$ -glucan으로 시료를 투여하고 20분이 지나면서 대사활성도가 급격히 증가하기 시작하여 170분까지 증가하였다. 180분이 지나면 거의 일정하게 유지되었고, 최종 128%까지 대사활성도가 증가하였다. GAM은 시료를 투여하면서부터 대사활성도가 증가하기 시작하여 240분이 지날 때까지

꾸준히 활성이 증가하여 최종 122% 대사활성도 증가를 나타내었다. GM의 경우는 시료를 투여하고 120분까지는 대사활성도가 급격히 증가하다가 120분이 지나면서 170분까지는 대사활성도가 거의 일정한 수치를 유지하였고, 최종 240분에서 115% 증진된 대사활성도를 나타내었다. GS는 시료를 투여하고 약 20분이 지나면서 대사활성도가 증가하기 시작하여 100분이 지날 때까지 그다지 크게 대사활성도가 증가하지는 않았지만 꾸준히 증가하였다. 120분이 지나면서는 점차적으로 거의 일정한 수치를 유지하면서 최종 111%의 대사활성도를 나타내었다. 이러한 결과는 end point만을 측정된 면역세포의 생육 촉진 활성과 거의 일치하는 것이다.

이상의 결과를 살펴보면 GAM의 경우는 모든 면역 증진 실험에서 기준물질로 사용한  $\beta$ -glucan에 비하여서는 비교적 낮은 수치의 활성을 나타내었지만, GM, GS와 비교하여 보면 모든 면에서 활성이 상승된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 마늘 추출물을 첨가하여 영지 균사체를 배양하므로 인하여, 마늘과 영지 균사체의 유용 생리활성이 상승되어 나타난 결과로 사료되어진다. 이로 인하여 면역기능의 향상과 나아가 항암 활성의 증진 등의 목적으로 하는 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 사료되어지고, 앞으로 보다 폭넓은 연구가 행하여져 보다 다양한 생리 활성의 검증이 필요할 것으로 생각되어지는 바이다.

## 적 요

1. 인간 면역 세포 중 하나인 T 세포에 대한 각 시료의 생육 촉진 활성은 시료의 1.0 g/l 에서 기준물질로 사용한  $\beta$ -glucan이 T 세포의 생육촉진 활성 측정에서 가장 좋은 활성을 나타내었으며, GAM은 GM보다 높은 생육 촉진 활성을 보였다.
2. B 세포의 각 cell 당 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면 GAM, GM, GS는 배양 2일째 최대분비량을 나타내었고, 표준물질로 사용한  $\beta$ -glucan은 배양 1일째부터 6일째까지 일정한 수치의 분비량을 나타내었다. IL-6의 경우는 모든 시료들이 비교적 높은 활성을 나타내었다.
3. 정상 폐 세포인 HEL299에 대한 세포 독성 실험에서는 표준물질로 사용한  $\beta$ -glucan과 GAM이 시료 투여 최고 농도인 1.0 g/l 의 농도에서 30% 미만의 비교적 낮은 세포 독성을 나타내었으며, 반면에 GM과 GS는 30% 이상의 비교적 높은 세포 독성을 나타내었다.
4. 폐암 세포인 A549에 대한 각 시료의 생육 억제 활성과 선택적 사멸도를 살펴보면, 암세포에 대한 생육 억제 활성이 가장 좋게 나타낸 시료는 GM으로 90% 이상의 아주 높은 억제 활성을 나타내었지만 선택적 사멸도에서는

정상세포에 대한 세포 독성이 높아 비교적 낮은 수치를 나타내었다. 그리고 GAM과  $\beta$ -glucan은 GM에 비하여 비교적 낮은 생육 억제 효과를 나타내었지만 세포 독성이 낮아 선택적 사멸도에서는 GM에 비하여 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

5. 인간 면역 세포 중 하나인 T 세포를 microphysiometer를 이용하여 동역학적 면역 활성 증진도를 살펴보면 표준물질로 사용한  $\beta$ -glucan을 투여하고 20분부터 170여분까지 대사활성도가 급격히 증가하였으며, GAM의 경우는 시료를 투여하고 240분이 지날 때까지 꾸준히 대사활성도가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 앞서 실험한 end point 만을 측정한 세포생육도와 유사한 결과를 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업에 의해 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표하는 바입니다.

## LITERATURE CITED

- Chung WT, Lee SH, Cha MS, Sung N., Hwang B, Lee HY (2001) Biological activities in roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Korean J. Medicinal Crop Sci, 9(1):45-54.
- Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst, 66(6):1192.
- Jain RC (1975) Garlic in alloxan-induced diabetic rabbits. J. Clin. Nutr, 28:684.
- Kang JH, Ahn BW, Lee DH, Byun HS, Kim SB, Park YH (1988) Inhibitory effects of ginger and garlic extracts on the DNA damage. Korean J. Food Sci. Technol, 20(3):287.
- Kim ES (1974) The effect of serum cholesterol levels of experimental rats fed by Vit. E, garlic and the different levels of proteins in their diet. J. Korean Soc. Food Nutr, 7(1):45.
- Michael CA, Domnic AS, Ahne M (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Research 48:589-601.
- Yamata & Azuma (1977) Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin. Antivicrob. Agents chemother, 11:743.
- 김군자, 김한수, 김성희, 김희숙, 최운정, 정승용 (1994) 식용버섯과 식물성 유지의 혼합 급여가 흰쥐 간장의 지질성분 및 지방산 조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 23:736-742.
- 김군자, 김한수, 정승용 (1992) 고콜레스테롤혈증 유발 흰쥐에 있어서 버섯류가 지질성분에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 21:131-135.
- 박준희, 김하원, 김영중, 최용칠, 김병각 (1994) 한국산 영지의 혈압강하성분에 관한 연구. 식품위생학회지 2:57-65.
- 이권행, 이준우, 한만덕, 정 훈, 김영일, 오두환 (1994a) *Ganoderma lucidum* IY 009 조다당 분획들의 항암활성과 항보체활성간의

- 상관관계. 산업미생물학회지 22:44-51.
- 이권행, 이정옥, 이준우, 한만덕, 정 훈, 김영일, 오두환 (1994b) *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 약리 및 독성. 산업미생물학회지 22:182-189.
- 이권행, 정 훈, 이준우, 한만덕, 최경숙, 오두환 (1994c) *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 정제 및 구조분석. 산업미생물학회지 22:190-196.
- 이시진 (1985) 본초강목. 고문사
- 정경수 (1995) 버섯류의 생리활성 성분. 식품과학과 산업. 28:29.
- 정동욱, 정지훈 (1992) 영지의 항균성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지 24:552-557.
- 정승용, 김성애, 김성희, 김한수, 김군자, 김희숙, 정효숙 (1990) 영지 열수추출액이식이성 고콜레스테롤혈증 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 19:180-186.