

## B 세포의 항체 생산에 대한 게란티 바이오-게르마늄 효모의 영향

<sup>1</sup>중앙대학교 약학대학 면역학교실, <sup>2</sup>노스웨스턴대학교 의과대학 세포분자 신경연구소, <sup>3</sup>게란티제약(주)

주성수<sup>1</sup> · 원태준<sup>1</sup> · 이용진<sup>1</sup> · 김민정<sup>1</sup> · 박소영<sup>2</sup> · 이성희<sup>3</sup> · 황광우<sup>1</sup> · 이도익<sup>1</sup>

### Effect of Geranti Bio-Ge Yeast, a Dried Yeast Containing Biogermanium, on the Production of Antibodies by B Cells

Seong Soo Joo<sup>1</sup>, Tae Joon Won<sup>1</sup>, Yong Jin Lee<sup>1</sup>, Min Jung Kim<sup>1</sup>, So-Young Park<sup>2</sup>, Sung Hee Lee<sup>3</sup>, Kwang Woo Hwang<sup>1</sup> and Do Ik Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea, <sup>2</sup>Department of Cell and Molecular Biology, Feinberg School of Medicine and Institute of Neuroscience, Northwestern University, Chicago Illinois 60611. USA, <sup>3</sup>GerantiPharm LTD, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

**Background:** Germanium compounds are increased to use in nutrient foods and medicines in terms of antibiotics to microbes, anticancer, modulation of immune system and neutralizing heavy metal toxins. Geranti Bio-Ge Yeast, containing stable organic germanium and bound to the yeast protein was developed by Geranti Pharm. LTD. and the modulation effect in the immune system was examined in vivo and in vitro. **Methods:** The compound, Geranti Bio-Ge Yeast, was fed to female Balb/c mice (each group has 10 mice) for 4 weeks and the yeast powder and steamed red ginseng powder were used as control during the same feeding time points. During 4 weeks there was no symptom to be considered, and after 4 weeks feeding all mice were sacrificed to check the changes of related immune cells and subsidiary responses (i.e. cell counting, FACS, MTT, LDH, PFC assay). **Results:** In pre-post comparison, B cell population was increased in the group of Geranti Bio-Ge Yeast in a dose dependent manner (100 to 800 mg/kg). However, the population of T cell, dendritic cell and macrophage was not comparably changed in all doses. The ability of cytokine production and proliferation was almost same level as shown in control group. In contrast, PFC assay informed that the compound increase the antibody production ability when fed over 200 mg/kg implying that the increase of PFC number might be due to the increase of B cells. **Conclusion:** Over the entire study, we concluded that the compound, Geranti Bio-Ge Yeast has better potential in immune response in terms of B cell proliferation than that of positive control, red ginseng, and the compound can be one of the future candidates for a new supplementary source improving immune system activity. (**Immune Network** 2006;6(2):86-92)

**Key Words:** Biogermanium, yeast, plaque forming cells, proliferation

#### 서 론

게르마늄은 토양, 하수, 식물 및 동물의 체내에 존재하

책임저자 : 황광우, 중앙대학교 약학대학 면역학교실  
☎156-756, 서울시 동작구 흑석동 221번지  
Tel: 02-820-5597, Fax: 02-823-5597  
E-mail: khwang@cau.ac.kr

는 극미량 원소로 그 화합물은 항미생물, 항암, 면역 조절, 중금속 해독 등의 약물학적 효과를 가지며 고혈압, 당뇨병, 심장질환, 퇴행성 질환, 류마티스 관절염 등의 난치병 예방, 완화 및 치료에도 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(1,2). 따라서 최근 게르마늄 화합물에 대한 다양한 연구가 북미, 아시아 등지에서 활발히 진행되고 있고 이를 포함하는 식품 및 의약품이 점차 대중화되고 있는

추세이다.

생물학적 유용성을 갖는 게르마늄 화합물로는 spiro-germanium, germanium lactate citrate, carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132)와 같이 유기산과 결합된 형태의 유기 게르마늄이다. 이들의 약물학적 효과에도 불구하고 신장 독성, 빈혈, 근무력 등의 부작용을 이유로 고농도의 화합물을 장기간 사용하는 것은 제한되고 있는데, 이들 부작용은 화합물 중에 잔존하는 germanium dioxide (GeO<sub>2</sub>) 또는 germanium tetrachloride와 같은 무기 게르마늄의 독성이 그 원인으로 알려져 있다(3). 유기 게르마늄은 무기 게르마늄과 유기산으로부터 촉매 작용을 통해 화학적으로 합성하거나, 인삼, 알로에, 마늘, 영지와 같이 고농도의 게르마늄을 포함하는 약용 식물로부터 추출하여 얻어진다. 그러나 화학적 합성은 안정성이 아직 규명되지 않았고, 추출법은 너무 많은 비용이 요구되며, 이에 반하여 낮은 수율로 현재 대량 생산에 적합하지 못한 실정이다.

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 인체에 무해한 미생물로 알려져 왔고 효모에서의 추출물은 다양한 용도로 사용되었다. 빵 효모를 중심으로 효모는 어느 미생물보다도 인류의 생활과 밀접하게 연결되어 왔고(4), 다양한 분야의 분자생물학, 분자유전학을 비롯한 포괄적 생물학 연구의 모델 시스템으로서 중요한 역할을 해왔다(5,6). 효모는 단백질, 비타민, 미네랄과 주요 효소들이 이상적으로 함유하고 있어 건강보조식품 등의 소재로 사용되고 있다(7). 또한 효모는 단백질, 핵산, 지질, 비타민의 원료로 사용되어 왔으며, 효모 추출물은 이러한 효모의 자가소화에 의해 생산되며, 미생물 발효 배지, 조미료, 건강 식품 등의 원료로서 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다. 이러한 효모를 이용한 기능성 제품의 연구는 효모 변이주를 이용하여 베타글루칸 면역 활성화능에 대한 연구, 효모로부터 B형 간염 백신 생산 및 효모 추출물을 이용한 월경전증후군(postmenstrual syndrome, PMS) 감소 효과에 관한 연구 등 많은 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다(8-11).

본 연구에서는 효모 균체 내에 게르마늄이 단백질과 결합하여 구조적으로 안정한 유기 게르마늄이 생합성된 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>를 사용하였다. 이 연구물질은 유기 게르마늄을 함유한 효모로서 gap junction 복원 효과, 면역계 자극을 통한 면역 증강 효과, 고형암 성장 억제를 통한 항암 효과 및 관절염 치료 효과 등이 예상되며, Rat 및 비설치류인 개를 이용한 실험에서 단회, 반복 안전성 및 유전독성 실험 결과 어떠한 부작용도 유발되지 않았다(12,13). 따라서, 본 연구에서는 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>의 *in vivo*, *in vitro* 면역 활성화능을 관찰하여 면역 증진 및 활성의 소재로서의 가능성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물.** 5~6주령의 암컷 Balb/c 생쥐를 Jackson Korea로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 24°C ±2, 습도 50~60%, 12시간의 명암주기에서 정도관리를 하며 계속적으로 사육하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 음성 대조군 2군(negative control 1; 비투여군, negative control 2; yeast 투여군, 400 mg/kg), 양성 대조군(Red-ginseng, R-Gin 400 mg/kg)과 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>, Ger-Y 100, 200, 400, 800 mg/kg를 경구용 주사기로 1일 1회 총 4주간 경구 투여하였으며, 군당 10마리의 생쥐를 사용하였다.

**세포 계수.** 각 군에 약물투여 종료 후 control군과 비교하여 약물처리군의 비장 크기변화를 측정하였고, 비장 세포 수의 변화를 관찰하여 약물에 의한 면역장기의 변화를 관찰하였다. 본 실험에서는 약물투여 후 급살 시킨 생쥐에서 비장을 적출하여 최장경 및 체중을 측정하였다. 이어 분리된 비장을 ACK용액에 넣고 주사기 플런저로 잘게 부순 후 mesh를 통과시켜 single suspension 비장 세포를 획득하였다. 전체부피를 10 ml로 만든 비장세포를 0.4% trypan blue에 10배 희석하고 부유시킨 후 hemacytometer에 넣어 현미경 하에서 계수하였으며 염색된 세포는 손상을 입은 것으로 판단하여 세포 수에서 제외하였다. 측정치×희석배수의 계산식에 의해 최종 세포 수를 얻었다.

**면역세포 분포.** 각 군에서 추출된 세포들을 각 tube당 1×10<sup>6</sup>개로 하여 FACS tubes에 넣고 FITC labeled antibody를 가하였다. T세포, B세포, 대식세포 및 수상돌기 세포를 관찰하기 위해 각각 Thy1.2.FITC, CD19.FITC, F4-80.FITC 및 CD11c를 사용하였다. 안정적인 연구를 위해 4°C에서 30분간 staining하고 FACS buffer로 1회 세척한 후 FACS buffer에 재부유시켰고, 각 샘플은 flow cytometry (FACS Caliber, BD, USA)에서 측정되었다.

**세포분화.** 세포의 분화 확인을 위해 MTT assay를 사용하였다. 엷은 황색의 MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 탈수소 효소 작용에 의해 보라색의 크리스탈 형태로 환원되므로 이 크리스탈을 용해하여 흡광도를 측정함으로써 target cell의 분화 정도를 관찰할 수 있다. 약물투여 종료 후 각 군에서 추출된 개체에서 분리한 비장 세포를 1×10<sup>5</sup>개/well이 되도록 96 well plate에 분주하고 각 군별로 lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml, 10 µg/ml, concanavalin A 0.2 µg/ml, 2 µg/ml의 농도가 되도록 처리하였다. 48시간 후 각 well에 MTT 저장용액 10 µl를 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 최종적으로 10% SDS (in 0.01N HCl)를 100 µl씩 첨가하여 잘 섞어준 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**세포독성.** LDH (lactate dehydrogenase)는 세포 용해가 일

어날 때 방출되는 안정한 세포질 효소이다. 본 실험에 사용된 Cytotox 96<sup>®</sup> (Promega, WI, USA)은 분비된 LDH를 coupled enzyme assay에 의해 tetrazolium salt를 적색 formazan 산물로 바꾸어 주고, 이 때 측정되는 흡광도는 용해된 세포의 수와 비례하므로 약물에 의한 비장세포의 세포독성 여부의 판단이 가능하다. 특히 이 실험은 방사성물질을 사용하지 않는 색 변화 방법을 이용하므로 반응 후 신속히 LDH를 정량할 수 있는 장점을 가진다. 실험방법은 제조사에서 제공한 프로토콜에 의해 수행하였으며 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**플라크 형성 실험(PFC).** 본 실험은 T-의존성 항원인 면양적혈구(Sheep Red Blood Cells, SRBC)에 대한 항체생산세포의 항체(IgM) 생성능의 영향을 알아보는 실험이다(14). 즉, 항체생산세포에서 분비된 항체는 보체(complement)와 결합하여 적혈구를 용혈하므로 투명대인 플라크를 형성하는데 이러한 플라크 수를 측정하여 특정 물질에 대한 면역반응 정도를 평가하고자 하였다. 약물 투여 종료 후 각 군에서 무작위 추출된 개체에 SRBC로 4일간 감각시킨 후 비장을 분리하였다. 분리된 비장을 ACK용액에 넣고 주사기 플린저로 잘게 부순 후 mesh를 통과시켜 비장세포를 획득하였다. 획득된 비장세포를 1,350 rpm에서 10분간 원심분리 후 최종적으로 Non-HEPES EBSS 3 ml로 비장세포를 현탁하여 PFC실험에 사용하였다. 이 때 기니픽 보체를 해동하여 얼음에 보관한 후 350  $\mu$ l agar 용액을 항온수조기에 있는 glass tube에 넣은 다음 SRBC 25  $\mu$ l를 튜브에 가했다. 이어 비장세포 100  $\mu$ l을 SRBC와 agar가 들어있는 튜브에 가한 후 완전히 혼합되도록 강하게 흔들어 주고 이 용액을 페트리디쉬에 부은 후 기포가 생기지 않도록 주의하면서 커버글래스로 덮어주었다. 용액이 완전히 굳은 후 37°C CO<sub>2</sub> 5% 배양기에서 3시간 동안 배양한 후 해부현미경으로 플라크 수를 계수하였다. 이 때 계수된 플라크 형성 세포의 수는 0.1 ml의 비장세포에서 얻어졌으므로 PFC의 수  $\times$  희석배수의 계산식에 의해 얻어졌다.

**효소면역측정(ELISA).** 약물투여 종료 후 각 군에서 무작위 추출된 개체의 비장을 분리하였다. 분리된 비장을

ACK 용액에 넣고 주사기 플린저로 잘게 부순 후 mesh를 통과시켜 비장세포를 획득하였다. 획득된 비장세포를 10<sup>6</sup>개/well이 되도록 24 well plate에 분주하고 최종 농도가 5  $\mu$ g/ml가 되도록 concanavalin A를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 각 군에서 배지 40  $\mu$ l를 취하여 cytokine을 인식하는 항체가 코팅된 96 well plate로 옮긴 후 37°C에서 4시간 배양 후 세척하였다. 각 well에 biotin이 결합된 cytokine 인식 항체 47  $\mu$ l를 첨가하여 30분 동안 실온에서 배양 후 세척한 다음 avidin-alkaline phosphatase 50  $\mu$ l를 첨가하여 30분 동안 실온에서 배양하고 세척하였다. 각 well에 기질 50  $\mu$ l를 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후 1M NaOH 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 각 cytokine 표준액을 제조하여 같은 과정으로 흡광도를 측정한 표준 곡선을 작성하여 각 cytokine의 농도를 계산하였다.

## 결 과

**체중변화 모니터링.** 실험을 진행하면서 진행 도중에 발생할 수 있는 각 개체의 변화와 이 변화가 본 실험에 미칠 수 있는 문제점을 최소화하기 위해서 실험 시작 2주 전부터 실험 완료 시까지 각각의 시험군과 시험군 내의 개체의 몸무게 변화를 모니터링을 하였다. Table I에 나타난 바와 같이 실험 진행 중 특이한 변화, 즉 갑작스러운 체중 감소나 증가가 관찰되지 않았고, 타 유효성평가 변수와 연관성이 관찰되지 않아 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>는 경우투여에 따른 급격한 개체변화를 초래하지 않는 안전한 물질로 생각되었다.

**비장 총 세포 수 변화.** 이 실험의 각 결과는 비장의 총 세포 수를 의미하므로 이들의 비교로부터 비장의 크기 변화와의 연관성을 확인할 수 있었다. Control 군과 비교 시 Yeast, R-Gin 및 Ger-Y군에서 모두 높은 세포수가 확인되어 면역장기의 변화가 있음을 알 수 있었으며, 특히 음성대조군과 Ger-Y군에서 측정되는 세포 수에서 변화가 관찰되었고 Ger-Y400군에서 비장세포수가 현격히 증가하는 것으로 나타났다 (Table II). 또한 비장의 길이를 측정된 결과 Ger-Y100, Ger-Y200, Ger-Y400 군에서 농도

Table I. Comparison of body weight changing in each group during the feeding

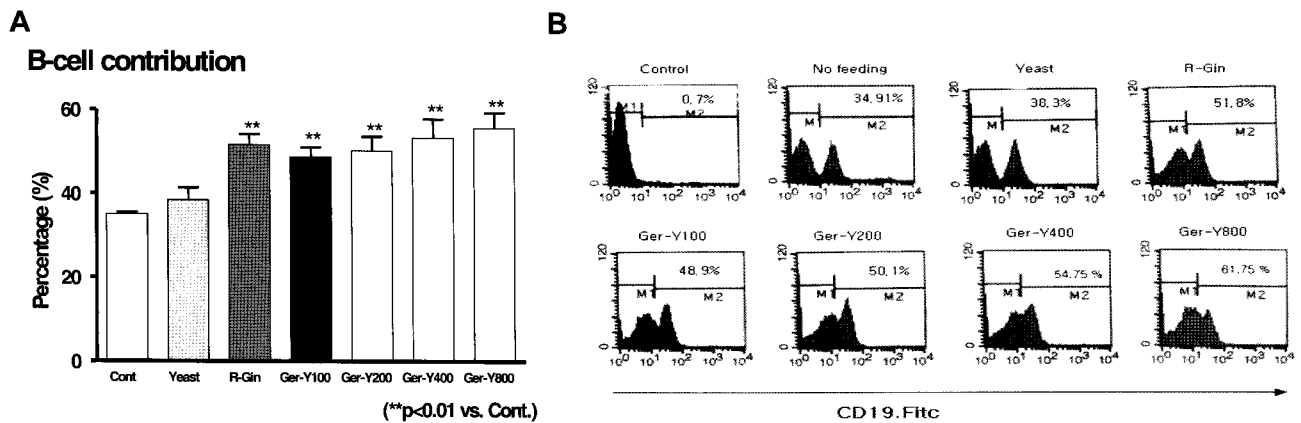
Group (no=10)	Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Control	20.0 $\pm$ 0.84	21.9 $\pm$ 0.58	22.5 $\pm$ 0.74	22.7 $\pm$ 1.01	21.8 $\pm$ 1.57
Yeast	19.8 $\pm$ 0.70	20.2 $\pm$ 0.64	21.5 $\pm$ 0.75	21.3 $\pm$ 0.90	21.5 $\pm$ 0.99
R-Gin	19.7 $\pm$ 1.05	20.0 $\pm$ 1.04	21.2 $\pm$ 1.29	21.2 $\pm$ 1.21	21.5 $\pm$ 1.28
Ger-Y100	20.2 $\pm$ 0.71	20.4 $\pm$ 0.67	22.0 $\pm$ 0.79	21.9 $\pm$ 0.76	22.2 $\pm$ 0.73
Ger-Y200	19.5 $\pm$ 0.48	20.1 $\pm$ 0.45	21.1 $\pm$ 0.93	21.0 $\pm$ 0.63	20.8 $\pm$ 0.75
Ger-Y400	20.0 $\pm$ 0.72	20.6 $\pm$ 0.80	21.2 $\pm$ 0.62	21.6 $\pm$ 0.68	21.3 $\pm$ 1.06
Ger-Y800	19.5 $\pm$ 0.88	20.0 $\pm$ 0.97	20.8 $\pm$ 1.30	20.4 $\pm$ 1.09	20.5 $\pm$ 1.16

**Table II.** The effect of Geranti Bio-Ge Yeast feeding on spleen's length, weight, and cell number

Group	Spleen			Dunnet's comparable tests (vs. control)
	Cells	Weight	Length	
Control	$7.79 \times 10^7$	$0.18 \pm 0.06$	$17.90 \pm 0.99$	No significant in cells ( $p > 0.05$ ) and correlation was not recognized between cells and weight/length
Yeast	$8.49 \times 10^7$	$0.18 \pm 0.06$	$18.70 \pm 1.33$	
R-Gin	$8.28 \times 10^7$	$0.13 \pm 0.07$	$18.11 \pm 1.26$	
Ger-Y100	$8.86 \times 10^7$	$0.17 \pm 0.06$	$17.78 \pm 0.83$	
Ger-Y200	$1.01 \times 10^8$	$0.14 \pm 0.05$	$18.11 \pm 1.36$	
Ger-Y400	$1.05 \times 10^8$	$0.18 \pm 0.07$	$18.40 \pm 0.96$	
Ger-Y800	$9.68 \times 10^7$	$0.15 \pm 0.05$	$17.90 \pm 1.59$	

**Table III.** The effect of Geranti Bio-Ge Yeast feeding on the immune cell subset composition on each group

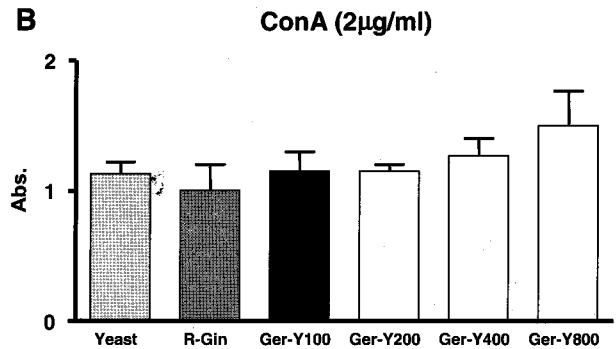
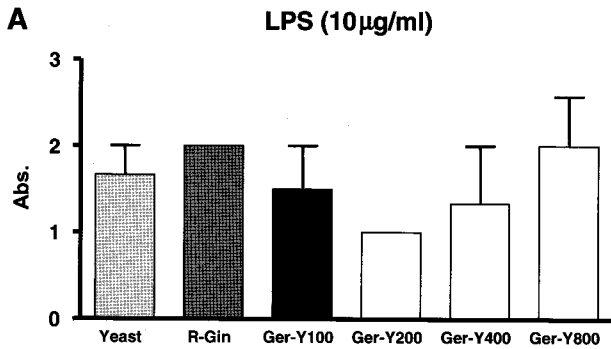
Group	Total cells	T cells	B cells (%)	Dendritic cells	Macrophages
Control	$7.79 \times 10^7$	$3.34 \times 10^7$	$2.72 \times 10^7$ (35)	$2.05 \times 10^6$	$1.08 \times 10^6$
Yeast	$8.49 \times 10^7$	$3.65 \times 10^7$	$3.26 \times 10^7$ (38)	$2.19 \times 10^6$	$1.23 \times 10^6$
R-Gin	$8.28 \times 10^7$	$3.56 \times 10^7$	$4.27 \times 10^7$ (52)	$1.56 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
Ger-Y100	$8.86 \times 10^7$	$3.80 \times 10^7$	$4.33 \times 10^7$ (49)	$1.67 \times 10^6$	$5.93 \times 10^5$
Ger-Y200	$1.01 \times 10^8$	$4.34 \times 10^7$	$5.06 \times 10^7$ (50)	$2.09 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
Ger-Y400	$1.05 \times 10^8$	$4.51 \times 10^7$	$5.59 \times 10^7$ (53)	$2.59 \times 10^6$	$1.01 \times 10^6$
Ger-Y800	$9.68 \times 10^7$	$4.16 \times 10^7$	$5.38 \times 10^7$ (56)	$2.04 \times 10^6$	$1.01 \times 10^6$



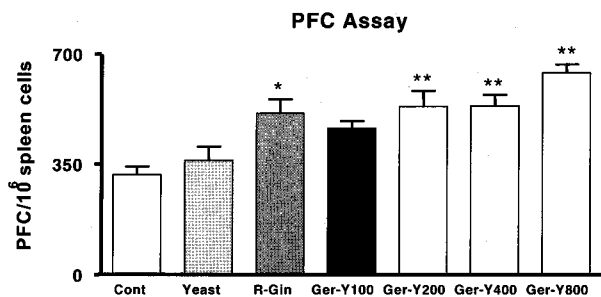
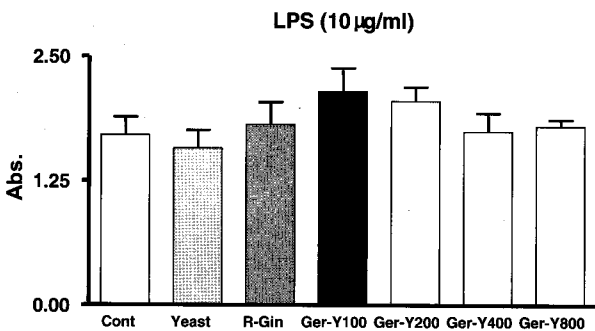
**Figure 1.** The increase of B cell composition in spleen in Geranti Bio-Ge Yeast dose dependent manner. The spleen cells of each group were counted and  $1 \times 10^6$  spleen cell were stained by CD19.FITC to measure B cell composition by flow cytometer. (A) Among spleen cells, B cell number was calculated by CD19 positive cell percentage and total spleen cells. (B) B cell composition was measured by flow cytometer after CD19.FITC staining.

의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 대조군과 비교 시 통계학적 유의성( $p < 0.05$ )은 인정되지 않았다. **게란티-게르마늄효모®**의 면역세포 조절효과. 2차 림프기관 중의 하나인 비장에는 여러 종류의 림프구들이 존재하기 때문에 면역 활성화 및 억제에 따라서 그 구성 비율과 수가 변화하므로 약물에 의한 면역 활성화 및 억제 확인을 위해 이를 확인하는 것은 필수적이다. 각 세포들

을 표시하는 대표적인 marker에 대한 항체를 붙인 후 flow cytometer를 이용하여 세포의 분포를 확인한 결과 T 세포, 대식세포 그리고 수상돌기 세포의 수에서 농도 의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 반면 B 림프구 구성의 변화는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 대조군에 비해 게란티-게르마늄효모® Ger-Y100~Ger-Y800 mg/kg



**Figure 2.** Proliferation of splenocyte by MTT assay. Splenocytes were activated by LPS (for B cells) and concanavalin A (for T cells). Ge-Y800 group has more proliferated in both LPS and concanavalin A treatment, however there is no significant increased proliferation in each activation method on each group. p values were not indicated due to the large range of S.D. in each groups.



**Figure 3.** LDH (lactate dehydrogenase) activity was measured after activation of splenocyte by LPS and concanavalin A. In LPS treatment, LDH activity in Ge-Y800 group was almost same as control group even though B cell proliferation in Ge-Y800 was highly increased and in concanavalin A treatment, Ge-Y800 groups shows that there is cell lysis protection effect on compound of yeast control group. p values were not recognizable between the control and active groups.

**Figure 4.** The significant increasing of PFC form by dose dependent manner of Geranti Bio-Ge Yeast. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

투여군 모두 p < 0.01 수준에서 유의적인 차이가 나타나 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며, B 림프구의 증식은 게란티-게르마늄효모® 200 mg/kg을 투여시, 홍삼 400 mg/kg을 투여했을 때와 유사한 B 림프구의 증식을 보였다. 특히 게란티-게르마늄효모® 400 mg/kg 이상을 투여 시에는 보다 높은 증가를 보였다 (Table III). B 림프구 수 증식의 유효성을 Fig. 1A 에 나타내었고 그 변화 정도는 FACS 분석 중 histogram을 사용하여 나타내었다(Fig. 1B).

각 군 간의 B cells %를 보면 대조군, 게르마늄을 첨가하지 않는 효모 400 mg/kg, 홍삼 400 mg/kg, 게란티-게르마늄효모® 100 mg/kg 투여군, 200 mg/kg 투여군, 400 mg/kg 투여군 및 800 mg/kg 투여군의 경우 각각 34.9%, 38.3%, 51.8%, 48.9%, 50.1%, 53.2% 및 55.6%로 나타나 농도 의존적으로 증가한 것을 알 수 있었다.

**게란티-게르마늄효모®의 세포보호 효과.** 체액성 면역

반응과 관련된 B-cell의 분화 인자인 LPS 10 µg/ml를 비장세포에 처리한 결과는 Fig. 2A와 같이 나타나, 활성화된 Ger-Y100군에서는 Yeast군과 유사한 MTT assay 결과를 나타내었고, Ger-Y200, Ger-Y400, Ger-Y800군에서 농도 의존적인 증가 경향을 보였으나 Yeast군과 비교하여 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았다. 또한 세포성 면역반응과 관련된 T cell의 분화 인자인 concanavalin A 2 µg/ml를 비장세포에 처리한 결과(Fig. 2B), B-cell 분화 결과와 유사하게 Ger-Y800군에서 비교적 높은 활성이 있는 것으로 판단되었다. 위의 결과에서와 같이 활성 물질인 게란티-게르마늄 효모®는 면역반응세포에 용량 의존적으로 영향을 주는 것으로 생각되나 대조군에 비하여 통계학적 유의성은 인정되지 않았다.

**게란티-게르마늄효모®의 세포보호 효과.** LDH는 세포 lysis가 일어날 때 나오는 안정한 세포질효소이며 분비되어 나온 LDH는 coupled enzyme assay에 의해 tetrazolium salt (INT)를 적색 formazan 산물로 바꾸게 되고 측정되는 색의 양적 측정은 lysed 세포의 수와 비례하므로 약물에 의한 세포보호효과를 간접적으로 평가할 수 있다. 본 실험에서 LPS 10 µg/ml를 비장세포에 처리하였을 때 Fig. 3과 같은 결과가 관찰되었다. 즉, Ger-Y100과 Ger-Y200군에서는 Yeast군에 비해 모두 LDH 증가를 보였고,

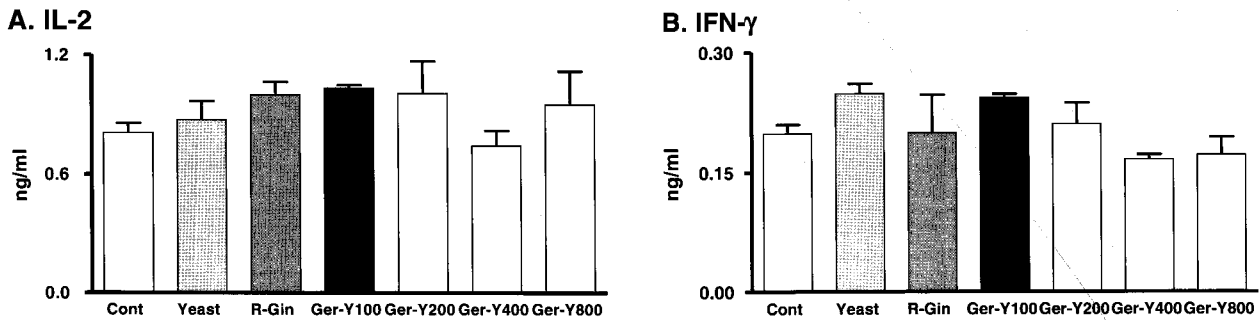


Figure 5. Interleukin-2 and interferon- $\gamma$  levels (mean  $\pm$  SD) in the supernatants of stimulated splenocytes cultures (ConA 5  $\mu$ g/ml) obtained from all study groups after 18 hour incubation as indicated in the study methods.

Ger-Y100, Ger-Y200, Ger-Y400 군에서는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

**게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>의 항체 생산 조절 효과.** 효능검색 대상군인 Ger-Y100, Ger-Y200, Ger-Y400 및 Ger-Y800 군에서 농도 의존적인 PFC 생성이 관찰되었다(Fig. 4). 이는 control군과 비교 시 Ger-Y200군에서 유의한 차이가 나타나 약물투여 이후 개체 내 면역학적 반응이 나타남을 암시하는 것으로 판단되었다. 또한 양성대조군인 R-Gin 군에서 control과 대조한 경우  $p < 0.05$  수준에서 면역 증진 효과 결과를 보여 약물의 효능이 관찰되었으며, 활성군인 Ger-Y200군 및 Ger-Y400군의 경우  $p < 0.01$  수준에서 양성 대조군과 유사하거나 보다 높은 효능이 인정되었고 Ger-Y800에서 보다 높은 효능( $p < 0.01$ )이 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 외부로부터의 침입 인자(바이러스, 병원균 등)로부터 방어하는 항체 형성이 일어남을 의미하며, 따라서 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>는 200 mg/kg 이상에 면역 증진 효과가 있는 것으로 판단되었다.

## 고 찰

활성물질인 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup> 200 mg/kg을 경구 투여한 군인 Ger-Y200군에서 면역강화제로 알려진 홍삼 400 mg/kg 투여군(R-Gin)과 유사한 면역 증진 효과를 나타내는 것으로 보이며 용량 증가 시 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>가 홍삼보다 높은 항체 형성 능력을 가지는 것으로 생각된다. 또한 B 림프구 증식 실험 결과 역시 투여 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보여, 대조군과 비교 시 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup> 100, 200, 400, 800 mg/kg 투여한 군 모두 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 B 림프구 증식을 통해 플라크 형성이 증가한 것으로 판단되며, 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup> 200 mg/kg 이상의 농도에서 높은 면역 증진 효과가 있음을 암시하는 것이다. 즉, 항체는 주로 plasma cell, B 림프구에서 생성이 되기 때문에 증식된 B 림프구에 의해서 플라크 형성이 증가한 것으로 보인다. 또한 이러한 결과는 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup> 투여 시 신속한 면역반응이 일어나고 있음을 반영하는

것으로서 기능성식품의 단점이라 할 수 있는 장기투여의 한계를 극복할 수 있는 긍정적인 결과이다. 본 연구에서 측정된 PFC는 항체생산 림프구에서 분비된 항체가 보체와 결합하여 적혈구를 용혈함으로써 형성되는 투명대인 플라크를 반영하는 것으로 PFC의 결과가 곧 약물의 면역반응 수준을 반영하는 것이므로 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>에 의한 체액성 면역활성이 있음을 알 수 있다. 보조적 결과로서 관찰된 T 세포 증식이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 관찰하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았고 T 세포 기인성 사이토카인인 IL-2나 IFN- $\gamma$  생성의 변화도 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 5). 따라서 세포매개성 면역반응을 관찰하기 위한 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>의 시간제한 장기투여 실험이 요구되며, 아울러 이를 통해 보다 우수한 면역 조절 능력 여부를 가늠할 수 있을 것이다.

결론적으로 단기간 투여로 목적을 달성하는 약물치료제와는 달리 일반적인 기능성 식품은 장기간 투여를 통해 해당하는 효과를 기대하므로 본 연구에서 입증된 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>의 면역학적 특성을 적용할 때 장기투여 시에도 효과적으로 면역반응을 유도할 것으로 생각된다. 특히 단기간의 투여실험으로도 홍삼이 지니는 면역 증진 효과를 증가하는 효과가 인정되므로 게란티-게르마늄효모<sup>®</sup>는 향후 면역 증강 기능을 지니는 새로운 기능성 소재로서의 적극적 활용이 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Goodman S: Therapeutic effect of organic germanium. *Med Hypothesis* 26;207-215, 1988
2. Tsutsumi Y, Tanaka J, Kanamori H, Musashi M, Minami H, Fukushima A, Yamato H, Ehira N, Kawamura T, Obara S, Ogura N, Asaka M, Imamura M, Masauzi N: Effectiveness of propagermanium treatment in multiple myeloma patients. *Eur J Haematol* 73;397-401, 2004
3. Krystek P, Ritsema R: Analytical product study of germanium-containing medicine by different ICP-MS application. *J Trace Med Biol* 18;9-16, 2004
4. Cavalieri D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M: Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine.

- J Mol Evol 57;226-232, 2003
5. Tuite MF: Strategies for the genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*. Crit Rev Biotechnol 12;157-188, 1992
  6. Vera J, Parissi V, Garcia A, Zuniga R, Andreola ML, Caumont-Sarcos A, Tarrago-Litvak L, Leon O: Yeast system as a model to study mononcy murine leukemia virus integrase: expression, mutagenesis and scratch for eukaryotic partners. J Gen Virol 86;2481-2488, 2005
  7. Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K: Screening of diary yeast strains for probiotic applications. J Dairy Sci 87;4050-4056, 2004
  8. Xing LJ, Li D, Wang X, Zhao L, Lv S, Huang D: Effects of beta-glucal extracted from *saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned piglets. Arch Anim Nutr 59;303-312, 2005
  9. Peng M, Chen M, Ling N, Xu H, Qing Y, Ren H: Novel vaccines for the treatment of chronic HBV infection based on mycobacterial heat shock protein 70. Vaccine 24;887-896, 2006
  10. Facchinetti F, Nappi RE, Sances MG, Neri I, Grandinetti G, Genazzani A: Effects of a yeast-dietary supplementation on premenstrual syndrome. A double-blind placebo-controlled study. Gynecol Obstet Invest 43;120-124, 1997
  11. Hirayama C, Suzuki, IM, Okumura M, Oda T: Propagermanium: a nonspecific immune modulator for chronic hepatitis B. J Gastroenterol 38;525-532, 2003
  12. Lee JS, Park JI, Kim Sh, Park SH, Kang SK, Park CB, Sohn TU, Jang JY, Kang JK, Kim YB: Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeast, in rats. J Toxicol Sci 29; 541-553, 2004
  13. Lee JS, Park JI, Kim SH, Lee HY, Hwang ZZ, Park CB, Sohn TU, Shin S, Kang JK, Kim YB: Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeast, in dogs. J Toxicol Sci 29;555-569, 2004
  14. Wilson SD, Munson AE, Meade BJ: Assessment of the functional integrity of the humoral immune response: the plaque-forming cell assay and the enzyme-linked immunosorbent assay. Methods 19;3-7, 1999
-