

## 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체 유래 $\beta$ -glucan성 다당류의 생리활성

이준우 · 백성진\* · 방광웅 · 강신욱 · 강상모\*\* · 김병용\*\*\* · 하익수\*

경북전문대학 식품가공과, \*일양약품 중앙연구소 생물공학팀, \*\*전국대 미생물공학과, \*\*\*경희대 식품가공학과

### Biological Activities of Polysaccharide Extracted from the Fruit Body and Cultured Mycelia of *Phellinus linteus* IY001

June-Woo Lee, Sung-Jin Baek\*, Kwang-Woong Bang, Shin-Wook Kang, Sang-Mo Kang\*\*, Byung-Yong Kim\*\*\* and Ick-Su Ha\*

Department of Food Science & Technology, Kyungbuk College

\*Biotechnology Lab., Central Research Institute, Il Yang Pharm. Co Ltd.

\*\*Department of Microbiological Engineering, Konkuk University

\*\*\*Department of Food Science & Technology, Kyunghee University

#### Abstract

This study was conducted to investigate the biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. All fractions were extracted by hot water, in the next, Fr. I, Fr. II, Fr. III and Fr. IV were polysaccharide obtained by ethanol precipitation or ultrafiltration. The highest antitumor activity against sarcoma 180 in ICR mice was observed in Fr. III and Fr. IV at the level 85%, but the antitumor activity had no connection with their anticomplementary activity *in vitro*, it might probably be due to extraction of hot water. All fractions promoted the production of nitric oxide(35.9~37.6  $\mu$ M) and of the TNF- $\alpha$  production(8,696.2~9,420pg/ml). All fractions inhibited the lipid peroxidation induced by AsA/Fe<sup>2+</sup>, ADP/NADPH/Fe<sup>3+</sup> and CCl<sub>4</sub>/NADPH in rat liver microsomes, and Fr. III showed the electron donating ability stronger than tocopherol in assay system using DPPH. From these results, it is suggested that all fractions contain immunoregulatory components which may protect cellular materials from the oxidative damages by their radical scavenging activities.

Key words : biological activity, *Phellinus linteus*, polysaccharide

#### 서 론

버섯은 예로부터 특별한 음식으로 취급되어 왔는데 그것은 특유의 맛과 향을 가지고 있고, 당질, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소를 골고루 함유하고 있으며, 또한 항암활성, 면역증강 효과 및 항산화 효과 등의 약리 효과 때문에 최근에는 건강식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다. 담자균류의 약리활성에 대한 최초의 연구는 Lucas 등<sup>(1)</sup>이 그물버섯의 열수추출물이 sarcoma 180 고형암 억제효과 및 tumor에 대한

완화 작용이 있는 물질인 것으로 밝혀지면서부터 비롯되었다. 담자균류의 항암활성에 대한 본격적인 연구는 Chihara 등<sup>(2)</sup>이 일본 및 아시아에서 종양에 유효한 민간약인 한방약에 기초하여 *Phellinus linteus*, *Coriolus hirsutus*, *Ganoderma applanatum* 등의 열수 추출물이 항암활성이 있음을 보고하였으며, 이후 구름버섯에서 분리한 krestin<sup>(3)</sup>, 표고버섯으로부터 분리한 lentinan이 항암 및 항암보조제로 시판되고 있다<sup>(4)</sup>. 담자균 유래 다당류들은 숙주에 특별한 부작용이 거의 없어<sup>(5,6,7)</sup> 화학요법제의 부작용을 완화 또는 예방의 기능<sup>(8)</sup>을 갖는 것으로 알려져 항암 보조 치료제로서 개발되고 있다. 최근 면역 활성 다당류의 구조가 밝혀지고 있고, 항종양 활성과 감염 방어 효과<sup>(9)</sup>, 항보체 활성, 식세포 활성화 등 면역계에 대한 조절 활성, 소염활성, 혈당강하 활성 및 항산화 활성 등에 관한 많은 연구가 진행

Corresponding author : Lee, June-Woo, Dept. of Food Science & Technology, Kyungbuk College, 630, Hyucheon 2-Dong, Youngju-Si, Kyungbuk 750-712, Korea  
Tel : 82-572-630-5185  
Fax : 82-572-630-5180  
E-mail : jwlee@mail.kp-c.ac.kr

중이다.

목질진흙버섯의 약리작용은 소화기 계통의 암인 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암의 절제 수술후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 항진시키는 것으로 알려졌다<sup>(10)</sup>. 또한 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장 및 위장 기능을 활성화시키고 해독작용을 한다<sup>(11)</sup>. Ikegawa 등<sup>(12)</sup>은 목질진흙버섯이 구름버섯(*Coriolus versicolor*)과 표고버섯(*Lentinus edodes*)보다 종양 저지율이 높고, Maeda 등<sup>(13)</sup>은 항암활성이 96.7%라고 보고하였다. 또한 정 등<sup>(14)</sup>은 균사체의 단백다당체가 sarcoma 180 복수암 및 고형암을 효과적으로 억제한다고 하였으며, 공 등<sup>(15)</sup>은 목질진흙버섯 균사체의 열수 추출물은 natural killer 세포기능에 작용하여 숙주의 비특이적 면역능을 증강시킴으로써 항암활성을 나타내며, 또한 mouse의 복강에 투여한 결과 LD<sub>50</sub>은 1,500 mg/kg 이상으로 안전성이 있다고 보고하였다. 담자균류의 항산화 효과에 대한 연구는 Hayashi<sup>(16)</sup>가 큰비단그물버섯의 아세톤 추출물중 에탄올 분획인 bolegrevilol, 정<sup>(17)</sup>은 영지버섯의 n-헥산 추출물과 메탄올 추출물, 느타리버섯의 자실체 및 균사체 추출물의 에탄올 분획에서 강한 항산화능을 보였다고 보고하였으며, 이 등<sup>(18)</sup>은 영지, 양송이, 표고버섯의 전자공여능을 측정한 결과 영지버섯의 디에틸에테르 및 부탄올 추출물에서 95.09% 및 97.75%로서 우수한 결과가 나타났다고 보고하였다. Kim 등<sup>(19)</sup>은 항종양 활성을 갖는 다당류를 분석한 결과 glucose가 주를 이루고 있으며 이 외에 galactose, mannose, arabinose 등으로 이루어졌다고 보고하였다. 이 등<sup>(20)</sup>은 목질진흙버섯 자실체와 균사체의 성분을 비교한 결과, 일반 성분의 특징적인 차이는 볼 수 없었다고 보고한바, 이들의 약리활성은 분자량의 차이에서 나타나는 구조적 중합도 및 주쇄의 결합 양식에 따라 상이하게 나타나는 것으로 추정된다. 이와 같이 목질진흙버섯이 항암활성 및 면역증강 효과가 우수하다고 보고된 이후 국내에서도 민방에서 항암치료를 위해 고가에 시판되고 있다. 그러나 자연산의 진정한 목질진흙버섯은 희귀하며 가격 또한 매우 고가이기 때문에 입수하기가 곤란한 것으로 알려져 있으며, 산지와 종균에 따라 약리효과도 차이가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 한국산 목질진흙버섯 자실체를 채집하여 분류 및 동정을 실시한 후, 자실체와 자실체로부터 순수 분리한 균사를 액체배양하여 얻은 물질의 약리활성 기전을 규명하기 위해, 항암활성 및 면역활성을 비교하고, 생체시료에서 독성물질 및 금속이온의 유리기 반응에 대한 항산화 효과를 검토하여, 경

제성이 있는 기능성 식품 및 의약품 개발에 적용할 수 있는 기초자료를 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 목질진흙버섯인 *Phellinus linteus* (Berk. et Curt) Aoshima는 자연산 자실체를 이용하였다. 균사체는 상기의 자실체로부터 무균적으로 분리한 균사(*Phellinus linteus* IY001)를 potato dextrose agar (PDA, Difco Co.)에서 27°C, 10일 동안 배양한 후, 순수 분리된 균사체를 액체배지의 종균으로 이용하였다. 균주 분리, 동정 및 종균 보관용 배지로는 potato dextrose broth 및 agar(Difco Co., USA)를 사용하였으며, 대량배양을 위한 액체배지는 yeast peptone dextrose(YPD) 배지<sup>(20)</sup>를 사용하였다. Mouse는 20~25 g의 ICR계 웅성, rat는 230~250 g의 SD계 웅성으로 삼육축산에서 구입하여 사용하였고, *in vivo* 항암실험은 육종인 sarcoma 180을 한국화학연구소, Raw 264.7 세포주는 원광대 의대로부터 분양 받아 사용하였다.

### 시약

지질 과산화 억제능 측정을 위한 2-thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP), pyridine, L-ascorbic acid, adenosine 5-diphosphate(ADP),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form(NADPH), ferrus sulfate, ferric chloride hexahydrate, dimethyl sulfoxide, carbon tetrachloride 및 pentobarbital은 Sigma Co.(USA), tocopherol은 Wako Co.(Japan)을 구입하여 사용하였다. 대식세포를 위한 배지로서는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 및 10% serum을 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 특급 시약들을 이용하였다.

### 시료제조

목질진흙버섯 자실체 열수 추출의 경우는 1×2 cm의 크기로 세절하여 20배(w/v, %)의 물을 가해 110°C에서 30분 동안 3회 반복 추출하고, 원심분리한 여액의 1/3 량은 동결건조하였으며(Fr. I), 그리고 2/3의 분량은 농축하여 3배량의 에탄올을 가하고, 24시간 동안 방치한 다음 3,200×g의 속도로 원심분리하여 얻어진 침전물은 증류수에 용해한 후 5일간 투석과정을 거친 후 동결건조하였다(Fr. II).

균사체 배양물 열수 추출의 경우는 총 배양물에 2배의 물을 가해 110°C에서 30분 동안 2회 반복 추출

하고, 원심분리한 여액의 1/2 량은 분자량이 10,000인 여과막을 사용한 한외여과장치(Sartocon-Mini system, Satorius Co.)로 한외여과하여 농축물(분자량 10kD 이상)을 얻어 동결건조하였다(Fr. III). 그리고 잔여 1/2의 량은 농축하여 3배량의 에탄올을 가하고, 24시간 동안 방치한 다음 원심분리하여 얻어진 침전물은 5일 동안 투석과정을 행하여 탈염처리한 후 동결건조하였다(Fr. IV).

#### 항암활성

Sarcoma 180 고형암 세포주에 대한 항암효과의 측정에는 0.1 mL( $5 \times 10^7$  cells/mL)의 sarcoma 180을 ICR계 mouse의 우측 서혜부에 피하 이식한 후, 72시간 후부터 20 mg/kg 농도의 시료를 1일 1회씩 10일간 연속 투여하였다. 암세포 이식 30일째 되는 날에 mouse로부터 고형암을 적출하여 중량을 측정하였다. 고형암의 증식 저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 증식 저지 백분율(inhibition ratio: I.R., %)로 계산하였다.

#### 항보체활성의 측정

항보체활성은 Yamada 등<sup>(21)</sup>의 방법으로 측정하였으며, 실험의 정확을 기하기 위하여, complement와 hemolysin에 대한 활성 역가를 측정하여 실험에 이용하였다. 항보체 활성은 대조군 대비 총보체 용혈율(50% of total complement hemolysis, TCH50, %)의 저지율(inhibition of TCH50, ITCH50 %)로 나타내었다.

#### Nitric oxide의 측정

대식세포로부터 생성되는 NO를 측정하기 위해서, 96 well에 대식세포를 분주하고, 2시간 동안 전 배양하여 비부착 세포를 제거하였다. 각 well에 시료 및 대조물질 10 µg/mL를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24 시간 동안 배양 한 후, Ding 등의 방법<sup>(22)</sup>에 따라 540 nm에서 ELISA(Bio-Tek Instrument, Inc. Ceres UV. HDi)를 이용하여 측정하였다. NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로부터 표준 곡선을 작성하여 측정하였다.

#### TNF- $\alpha$ 의 측정

대식세포 배양물내 TNF- $\alpha$ 의 정량은 multiple antibody sandwich 원리를 이용한 solid-phase ELISA 방법을 통하여 측정하였다<sup>(27)</sup>. 반응 정지후 실온에서 10분 동안 방치하고 30분 이내에 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료속의

mTNF- $\alpha$  양은 표준 mTNF- $\alpha$ 의 농도의 흡광도를 이용하여 얻어진 표준곡선으로부터 계산하였다.

#### 항산화 효과의 측정

Microsome은 Kiso<sup>(23)</sup>의 방법에 따라 분리하였고, 단백질의 농도가 20 mg/mL되게 조정하여 -70°C에 보존하면서 실험 목적에 따라 사용하였다. 지질 과산화의 유발은 Kiso 등<sup>(23)</sup>의 방법에 따라 ascorbic acid(AsA)와 Fe<sup>2+</sup>, ADP, NADPH와 Fe<sup>3+</sup> 그리고 CCl<sub>4</sub>와 NADPH를 이용하여 지질 과산화를 유도하였다. 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등<sup>(24)</sup>의 방법에 준하여 표준물질로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 이용하여 표준곡선을 작성하고 시료의 지질 과산화물(malondialdehyde, MDA) 양을 측정하였다. 또한 지질 과산화 억제정도도 다음의 계산식으로 표시하였다.

$$\text{Inhibition Ratio(\%)} = \frac{\text{MDA of control} - \text{MDA of sample}}{\text{MDA of control}} \times 100(\%)$$

#### Radical 소거작용

시료의 유리기 소거작용을 조사하기 위해 안정한 free radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자공여 효과로서 Fr. III와 대조군으로서 tocopherol을 이용하여 Uchiyama 등<sup>(25)</sup>의 방법을 이용하여 측정하였다. 간략하면, 10 mL 시험관에 0.1 M acetate buffer(pH 5.5) 2 mL, 시료(10~200 µg/mL)를 녹인 용매(에탄올) 2 mL 및 에탄올에 녹인 0.5 mM DPPH 1 mL을 가하여 10초간 혼합하고 실온에서 30 분 방치후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 유리기 소거능은 electron donating ability(EDA)로 계산하여 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 흡광도를 이용하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{Electron donating ability(\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100(\%)$$

## 결 과

#### *In vivo* 항암효과

목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체로부터 분리한 고분자 다당류들에 대한 sarcoma 180 종양세포를 이용한 항암활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 자실체의 열수추출 총 분획(Fr. I)과 열수추출 에탄올처리

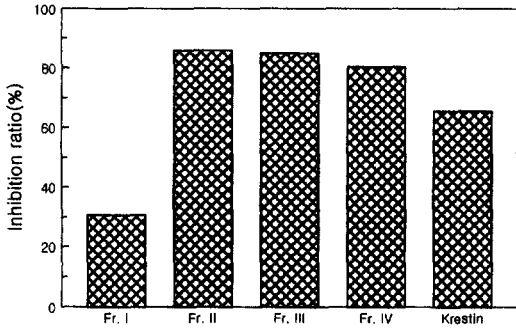


Fig. 1. Antitumor activity of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 in sarcoma 180 tumor bearing mouse.

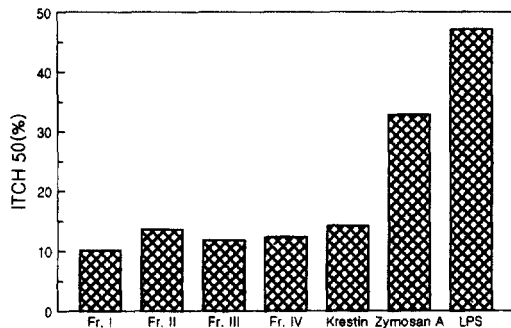


Fig. 2. Anticomplementary activity of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001.

다당류 분획(Fr. II)은 각각 30.7%와 85.9%의 항암활성을 나타내었으며, 배양 균사체의 경우는 UF처리 다당류(Fr. III)와 열수 추출 에탄올처리 다당류 분획(Fr. IV)의 경우는 각각 85.0%와 80.4%의 항암 활성을 나타내었다. 즉, 저분자인 Fr. I 분획보다 비교적 고분자인 Fr. II, Fr. III 및 Fr. IV 분획이 약 2.6배의 암세포 증식 억제율을 보임으로서 담자균류의 항종양 효과는 주로 고분자 다당류에 의해 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 균사체의 경우  $\beta$ -glucan의 함량이 상대적으로 높았던<sup>(20)</sup> UF 분획인 Fr. III에서 높게 나타나므로 다당류의 항종양 활성의 본태는  $\beta$ -glucan에 의해서 발현되는 것으로 추정된다.

항보체 활성

목질진흙버섯 자실체와 배양균사체 각 분획들의 항보체 활성화에 대한 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 즉, 자실체 열수추출 총 분획(Fr. I)의 항보체 활성은 10.1%, Fr. II 분획은 13.6%으로 나타났으며, 균사체에서는 자실체보다 낮게 나타나 에탄올 분획(Fr. IV)

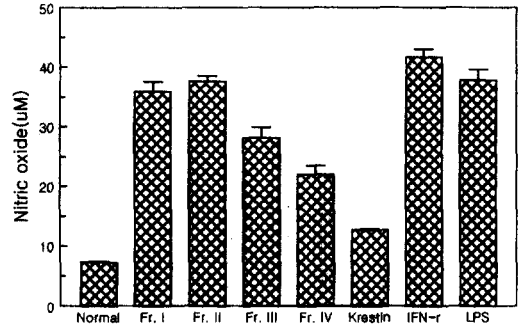


Fig. 3. Nitric oxide production of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 in Raw 264.7 cell.

Raw 264.7 cells ( $4 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 hrs in DMEM containing a each fraction(10  $\mu$ g/mL), IFN- $\gamma$  (10 U/mL), LPS(10 ng/mL) and stimuli(10  $\mu$ g/mL). The cultural supernatants were collected and assayed for NO production. Values are representative of three independent experiments done triplicate.

에서는 12.3%, UF 분획(Fr. III)은 11.8%로 나타났다. 그리고 보체제를 활성화시키는 것으로 알려진 zymosan A와 LPS는 각각 32.8%와 47.1%로 나타났다.

Okuda 등<sup>(26)</sup>은 항암활성 다당류와 보체계 활성화 간에는 밀접한 관계가 있음을 보고하였으며, Lee 등<sup>(27)</sup>은 담자균류 균사체를 알칼리 처리시 항암활성과 보체계 활성화 간에는 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 즉, 열수 추출시에는 주로  $\alpha$ -glucan이 추출되고 알칼리에 의한 격렬한 화학적 처리시에는  $\beta$ -glucan이 주종을 이루는 것으로 알려져 있으며, 또한 이들의 약리활성은 열수 추출보다 알칼리 추출시 높게 나타나는 것으로 보고되었다<sup>(26)</sup>. 본 연구에서는 항암활성(30.7%)이 낮았던 자실체 총 추출 분획(Fr. I)의 항보체 활성은 10.1%인데 반해서 항암활성이 85% 내외로 높았던 균사체 다당류인 Fr. III와 Fr. IV 분획의 경우는 각각 12.3%와 11.8%로 나타나므로서 온화한 추출방법인 열수 추출시에는 항암활성과 보체계 활성화 정도와는 상관성이 없음을 알 수 있었다.

NO 생성능

목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체에서 얻어진 각 분획들이 Raw 264.7 대식세포주에서 NO 생성능에 미치는 효과를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 다당류에 의한 항종양 활성 기작의 일부는 대식세포가 담당하고 있으며,  $\beta$ -glucan 다당류들에 의해 활성화된 대식세포는 다양한 cytokine을 분비하여 그들의 항종양 활성에 참여하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>(28)</sup>. 대식세포 활성 분비물 중의 하나인 NO는 표적 암세포의

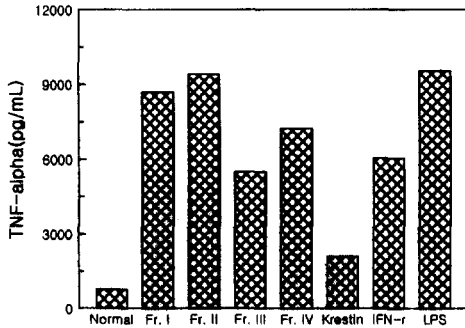


Fig. 4. TNF- $\alpha$  production of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 in Raw 264.7 cell.

Raw 264.7 cells ( $4 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 hrs in DMEM containing a each fraction (10  $\mu$ g/mL), IFN- $\gamma$  (10 U/mL), LPS (10 ng/mL) and stimuli (10  $\mu$ g/mL). The cultural supernatants were collected and assayed for TNF- $\alpha$  production. Values are representative of three independent experiments done triplicate.

대사기능을 상실케하거나 2차적인 cytokine 분비를 위한 messenger 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>(29)</sup>.

본 연구에서는 자실체의 총추출 분획인 Fr. I은 35.9  $\mu$ M, 열수추출 에탄올처리 Fr. II 분획은 37.6  $\mu$ M로서 대식세포에서의 NO 생성능이 높게 나타났으며, 균사체에서는 에탄올 처리 분획인 Fr. IV (22.0  $\mu$ M)보다는 UF 처리한 Fr. III 분획의 경우가 28.1  $\mu$ M로서 높게 나타났다. 대식세포 활성화 유도물질로 알려진 IFN- $\gamma$ 와 LPS는 각각 41.6  $\mu$ M과 37.8  $\mu$ M의 NO 생성능을 나타내었다. NO는 TNF- $\alpha$ 에 의해 세포내의 정보전달 과정을 거쳐 triggering 된다고 알려져 있으며, 또한 2차적인 정보전달의 매개자로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>(28)</sup>. 이와 같이 목질진흠버섯 자실체와 균사체로부터 추출한 다당류에 의해 생성된 NO는 직접 항종양 활성에 참여하거나, 2차적인 cytokine 분비를 위한 자극물로 이용될 수 있을 것으로 추정된다.

#### TNF- $\alpha$ 생성능

목질진흠버섯 자실체와 배양균사체에서 얻어진 각 분획들이 Raw 264.7 대식세포로부터 cytokine 중의 하나인 TNF- $\alpha$  생성능에 미치는 효과를 측정된 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 대부분 분획은 NO의 생성능이 높았던 분획에서 TNF- $\alpha$ 의 생성능이 높게 나타났으며, 자실체 열수추출 에탄올 처리 분획(Fr. II)에서 가장 많은 9,420 pg/mL를 생성시켰으며, Fr. I은 8,696.2 pg/mL이었고, 균사체 열수추출 UF처리 분획(Fr. III)은 7,240.2 pg/mL로서 비교적 높은 결과를 나타내었

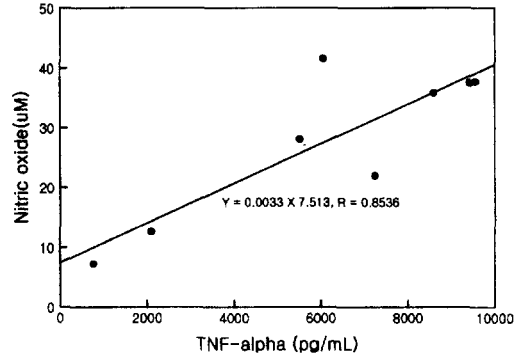
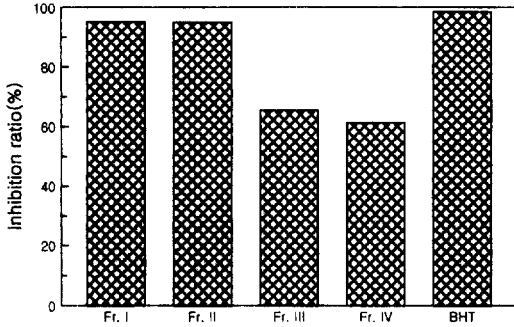


Fig. 5. Correlationship between the production of nitric oxide and TNF- $\alpha$ .

으며 Fr. IV 분획은 5,503.0 pg/mL를 생성하는 것으로 조사되었다. 또한 대조군으로 사용한 IFN- $\gamma$ 와 LPS는 6,038.0 pg/mL과 9557.6 pg/mL을 생성시켰다. TNF- $\alpha$ 는 생체내에서 표적 세포의 괴사, NK 세포의 활성화 및 항바이러스능을 가지며, 세포매개성 면역에 참여하는 것으로 알려져 있다<sup>(28)</sup>. 따라서 목질진흠버섯 자실체 및 균사체로부터 생성된 TNF- $\alpha$ 는 생체에서 다채로운 면역 반응을 유도시킬 것으로 추정된다. TNF- $\alpha$ 는 대식세포의 NO 생성을 위한 trigger로 작용한다고 알려져 있으므로<sup>(29)</sup> NO와 TNF- $\alpha$  생성의 상관성을 측정해 본 결과, 이들간에는 상관성( $r^2=0.8536$ )이 있는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이와 같이  $\beta$ -glucan성 다당류에 의해 활성화된 대식세포가 분비한 TNF- $\alpha$ 는 NO 생성을 위한 세포내의 정보전달의 기능을 수행할 것으로 여겨진다.

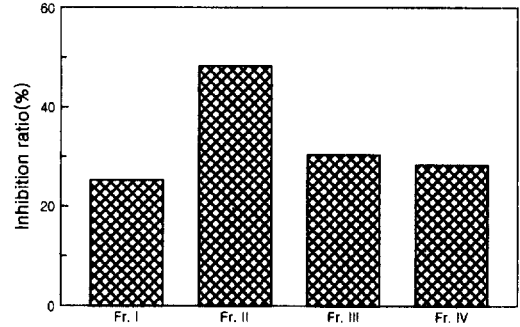
#### AsA-Fe<sup>2+</sup>로 유도된 지질 과산화에 대한 영향

담자균류 유래 일부 다당류는 지질 과산화를 억제시키는 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>(30)</sup>. 이들은 CCl<sub>4</sub> 또는 과산화 유발제를 이용한 생체내 실험에서 다당류가 지질 과산화 억제능과 간보호 활성과의 상관성에 대한 가능성을 제시하였다. 작용 기작은 CCl<sub>4</sub> 또는 과산화 유발제들의 중간 대사물에 의한 간세포막의 지질 과산화가 직접적인 원인으로 밝혀짐에 따라, 지질 과산화와 억제능에 대해 조사할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 목질진흠버섯 자실체와 배양균사체의 열수 추출 및 에탄올, UF처리 다당류 분획들의 지질과산화 억제활성을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 간 microsome에 시료를 가한 후, 비효소적인 방법으로 유도시켜 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 대조군은 mL당 49.6 nM의 MDA를 생성시켰으며, 자실체의 열수추출 총 분획(Fr. I), 열수 에탄올 처리 분획(Fr. II)들은 각각 95.2%, 95.0%의 지



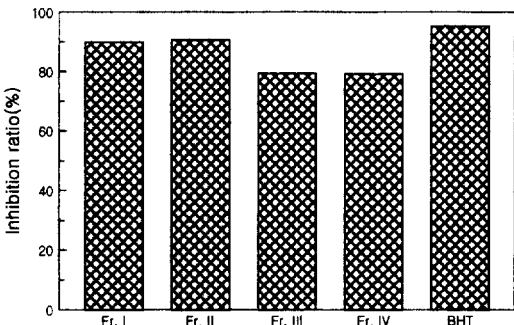
**Fig. 6.** Effect of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 on ascorbate-Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver microsome.

The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, 83.5 mM KCl, 37.2 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.2 mM ascorbate, 10 M FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, Microsomal suspension(protein, 2 mg). After incubation at 37°C for 20 min. with ascorbate/Fe<sup>2+</sup>, the lipid peroxide was measured by the method of Ohkawa et al. Results are expressed as the mean±S.D. of three experiments. \*Significantly different from the control, p<0.01.



**Fig. 8.** Effect of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 on CCl<sub>4</sub>-NADPH-induced lipid peroxidation in rat liver microsome.

The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, 83.5 mM KCl, 37.2 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 1 mM ADP, 10 M FeCl<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 mM NADPH, Microsomal suspension(protein, 2 mg). After incubation at 37°C for 20 minutes with CCl<sub>4</sub>/NADPH, the lipid peroxide was measured by the method of Ohkawa et al. Results are expressed as the mean±S.D. of three experiments.



**Fig. 7.** Effect of each fraction extracted from fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001 on ADP-NADPH-Fe<sup>3+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver microsome.

The incubation mixture consisting of 1.0 mL was composed of a sample in DW, 83.5 mM KCl, 37.2 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 1 mM ADP, 10 M FeCl<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 mM NADPH, Microsomal suspension(protein, 2 mg). After incubation at 37°C for 20 minutes with ADP/NADPH/Fe<sup>3+</sup>, the lipid peroxide was measured by the method of Ohkawa et al. Results are expressed as the mean±S.D. of three experiments. \*Significantly different from the control, p<0.05.

질 과산화 생성 억제율을 나타내었으며, 배양 균사체의 경우는 에탄올 침전 분획(Fr. IV)과 UF처리 분획(Fr. III)은 각각 61.3%와 65.5%로 나타났다. 즉 자실체 분획이 균사체 분획보다 지질 과산화 억제능이 높은 것으로 나타났다.

**ADP-NADPH-Fe<sup>3+</sup>로 유도된 지질 과산화에 대한 영향**

효소적 지질 과산화 유발에 대한 영향을 조사하기 위하여, 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체의 열수추출 및 에탄올, UF처리 다당류 분획들에 간 microsome을 가한 후, 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 무첨가 대조군에서는 mL당 57.2 nM의 MDA가 생성 되었으며, 자실체의 열수 추출 총 분획(Fr. I) 및 열수 에탄올 처리 분획(Fr. II) 첨가시에 각각 89.9%와 90.7%의 지질 과산화 생성억제율을 나타내었다. 배양 균사체 에탄올 처리 분획(Fr. IV)과 UF 처리 다당류(Fr. III)의 경우는 자실체 분획보다 낮은 79.3%와 79.2%로 나타났다.

**CCl<sub>4</sub>-NADPH로 유도된 지질 과산화에 대한 영향**

CCl<sub>4</sub>로 유도된 지질 과산화에 대한 영향을 조사하기 위하여, 목질진흙버섯 자실체와 배양균사체에서 얻어진 각 분획들에 간 microsome을 가한 후, 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. 무첨가 대조군에서는 mL당 17.7 nM의 MDA를 생성시켰으며, 자실체의 열수 추출 총 분획(Fr. I), 열수 에탄올 처리 분획(Fr. II)들은 각각 23.2%와 45.8%의 지질 과산화 생성 억제율을 나타내었다. 배양 균사체의 경우는 열수 에탄올 처리 분획(Fr. IV)과 UF 처리 분획(Fr. III)은 각각 20.3%와 25.4%의 지질 과산화 억제율을 나타내었다.

지질 과산화 유발 물질들에 의해 생성된 다양한

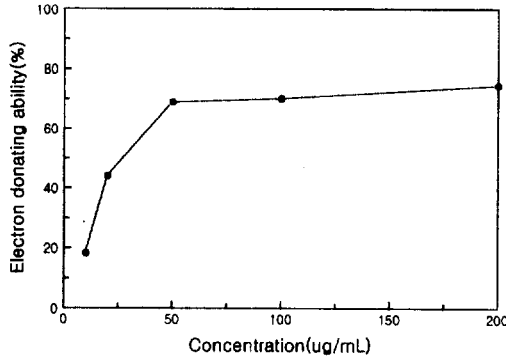


Fig. 9. Electron donating ability of the fraction(Fr. III) extracted from cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001.

radical들은 생체내에서 세포의 단백질 또는 지질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 간세포 등의 세포막에 불포화지방산과 반응하여 지질 과산화 및 괴사를 야기시켜, 세포내의 효소가 방출되어 혈중의 GOT 및 GPT의 활성이 높아진다<sup>(31,32)</sup>. 따라서 목질진흠버섯의 자실체와 배양 균사체로부터 분리한 다당류는 효소적 및 비효소적 지질 과산화 유발에 의한 지질과산화를 억제시키는 것으로 나타나므로서 간 보호와 관련된 역할을 수행하는 데 참여할 것으로 추정된다.

### Free radical 소거 작용

전자공여능에 의한 항산화 활성은 안정한 free radical인 DPPH를 이용하여 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 배양 균사체의 UF처리 다당류(Fr. III)와 대조물질인 tocopherol은 농도 증가에 따라 자유기 소거능이 증가됨을 알 수 있었으며, 또한 Fr. III 분획의 전자공여능은 tocopherol보다 약 2배 정도 높은 것으로 조사되었다. 그리고 free radical인 DPPH 농도가 50%로 감소되는데 필요한 시료의 농도(SC<sub>50</sub>)는 Fr. III 분획이 32.0 µg/mL로 조사되었다.

## 고 찰

β-Glucan성 다당류는 항암활성능, 면역증강능, 항산화능, 혈당강하능 및 간보호능 등에 대한 많은 보고가 이루어지고 있다. 특히 담자균류 유래 다당류는 그 특이적 구조에 의해 항암활성 등과 같은 다양한 약리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>(33)</sup>. 일반적으로 담자균류의 자실체는 β(1→3), β(1→4) 및 β(1→6) 결합이 복잡한 구조를 이루고 있으며, 배양균사체의 경우도 균사체 구조적으로 β-glucan을 함유하거나 배지내

로 분비하며, 이들은 공히 β-1,3-glucan을 주쇄로 하여 β-1,6-glucan이 함유된 다당류가 풍부하게 존재하는 것으로 보고되었다<sup>(33)</sup>. 다당류는 이들간 분자의 중합도와 약리활성간에 상관성이 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 분자의 크기, chain packing 및 분지도의 차이에 의한 용해성에 있어서도 상이한 것으로 알려져 있다<sup>(34)</sup>. 담자균류 유래의 다당류는 solid tumor에 대한 증식억제 효과가 높은 것으로 알려졌다<sup>(35)</sup>. 이러한 효과를 발휘하기 위해서는 β-glucan성 다당류가 특이적 및 비특이적 면역반응에 관여하는 다양한 cytokine들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 비특이적 반응에 의해 초기 면역을 담당하고 있는 대식세포는 LPS나 IFN-γ와 같은 물질에 의해 유도되며, 이들은 많은 암세포에 대하여 cytotoxicity 및 cytostasis의 기능을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>(36)</sup>. 대식세포는 β-glucan과 mannose 등의 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있으며<sup>(37)</sup>, 이들을 함유하고 있는 다당류들은 대식세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이들 처리에 의해 활성화된 대식세포는 항미생물 및 항종양 활성을 나타내는 reactive oxygen intermediates(ROI) 및 reactive nitrogen intermediates(RNI) 등을 분비시키는 것으로 알려져 있다<sup>(38)</sup>. 이들 중 NO는 항종양 작용 등의 기능을 수행하는 것으로 알려지고 있으므로<sup>(28)</sup> 이들을 측정할 필요가 있다. 본 연구에서 항암활성이 85.9%(Fr. II)와 85%로(Fr. III)로 높게 나타난 분획에서 NO의 분비량이 37.6 µM과 28.1 µM로 높았으나, 항암활성이 30.7%였던 Fr. I 분획에도 35.9 µM의 NO가 분비되는 것으로 보아 다당류의 항암활성 발현을 위해서는 이들 이외에 또다른 인자의 작용이 요구되는 것으로 여겨진다. 또한 대식세포는 LPS와 IFN-γ 자극에 의해 TNF-α를 분비시키며, 이것은 암세포와 바이러스에 감염된 세포를 인지하여 살해시키는 cytokine 이며<sup>(39)</sup>, 호산구 K세포, NK세포, MHC class I, II 유도 등 생체내 면역계에서 중요한 위치를 차지하고 있다<sup>(40)</sup>. 본 연구에서 NO와 TNF-α 분비능에 대한 상관성을 조사한 결과, NO의 분비능이 높았던 Fr. II, I 및 III 분획에서 각각 9,420.0 pg/mL, 8,696.2 pg/mL 및 7,240.2 pg/mL을 분비하는 것으로 조사되었다.

생체내에서 생성된 지질 과산화물은 간장질환, 혈전증, 심장병, 미숙아 망막증의 질병과 노화 및 암 등의 원인 물질로 규명됨에 따라 많은 관심을 받고 있다<sup>(40)</sup>. 지질 과산화 유발물질들에 의해 생성된 다양한 세포내의 단백질 또는 지질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 세포를 괴사시키며, 간장과 관련하여 간세포의 괴사를 야기시켜<sup>(41)</sup>, 세포내의 효소가 방출되어 혈중의

GOT 및 GPT의 활성이 높아진다<sup>(42)</sup>. 또한  $CCl_4$ 는 간장 내에서 cytochrome P-450에 의해 대사되어 활성이 강한  $\cdot CCl_3$  및  $\cdot OCl_3$  등으로 전환되고, 이들은 polyunsaturated fatty acid(PUFA) 및 세포내 단백질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 간 세포막에 지질 과산화를 유발하거나 간세포의 괴사를 야기시키며<sup>(41)</sup>, 파괴된 간세포막을 통하여 GOT, GPT, alkaline phosphatase(ALP) 및 LDH(lactic dehydrogenase) 등과 같은 효소를 혈중으로 유리시키는 것으로 알려져 간장질환과 지질 과산화의 상관성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>(42)</sup>. 호기성 생물들은 지질 과산화를 막고 산화적 손상에 대한 복구 및 보호 기구를 갖고 있으나, 특정 질병이나 독성물질의 과다한 노출에 의해 균형이 깨지면 생체내의 산화적 손상이 유발된다고 알려져 있다. 그러므로 목질진흙버섯의 항산화 활성에 대한 상대적인 효과를 알아보기 위해서는 지질 과산화 억제능을 측정해 볼 필요가 있다. 세포 소기관에서의 지질 과산화 억제능을 측정하기 위하여 정상 흰쥐의 간으로부터 분리한 microsome에서의 지질 과산화 억제능을 측정한 결과, ascorbate와  $Fe^{2+}$ 로 지질 과산화를 유발시킨 경우 자실체로부터 추출한 Fr. I과 II에서 각각 95.2%와 95.0%의 높은 저해율을 나타내었다. ADP,  $Fe^{3+}$  및 NADPH로 지질 과산화 유발시킨 경우에는 Fr. I과 II 1.0 mg/mL의 첨가 농도에서 각각 89.9%와 90.7%의 저해율을 나타내었다. 급성간염 유발 물질인  $CCl_4$ 와 NADPH로 지질 과산화를 유발시킨 경우는 25.3~48.2% 내외의 저해율을 나타내었다. 이와 같이 목질진흙버섯 자실체 및 균사체로부터 추출된 물질들이 나타내는 지질 과산화 억제효과는 외부의 자극이나 독성 물질의 생체내 대사과정중에 생성된 활성화 산소 유리기들에 의해 야기되는 DNA, RNA, 단백질 및 세포손상 등을 보호 또는 치유하는 기능을 수행 할 것으로 생각된다. Free radical인 DPPH를 이용한 유리기 소거능을 측정한 결과, 처리농도에 의존적으로 증가하는 경향을 관찰할 수 있었으며, DPPH가 50%로 감소하는데 필요한 시료의 농도( $SC_{50}$ )은 Fr. III는 32.0  $\mu$ g/mL로 조사되었다. Lee 등<sup>(43)</sup>은 영지 균사체 유래 다당류(G009)가  $CCl_4$ 에 의해 야기되는 지질과산화를 억제 시킴으로서 간보호 기능을 수행한다고 보고하였으며, Sawaki 등<sup>(42)</sup>은 간염, 지방간 및 간경화증 환자들은 지질 과산화의 지표인 혈중내 MDA치가 상승하는 것을 보고함으로써, 목질진흙버섯 자실체와 균사체 추출물에서 나타나는 지질 과산화 억제능은 산화적 손상에 대한 보호효과 및 간보호 효과를 나타내는데 어떠한 역할을 하는 것으로 사료된다.

이상의 결과들로부터 목질진흙버섯 자실체와 균사체로부터 추출한 물질들은 항암활성, 면역증강효과 및 지질 과산화 억제능이 있음이 확인되었으며, 향후 이들에 대한 약리활성 기전을 규명하기 위해서는 항암활성과 관련이 있는 cytokine들의 발현과 지질 과산화 억제능과 관련 있는 cytochrome P-450 계 효소들의 활성 변화 및 항산화 관련 효소들의 농도 변화 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체의 열수추출 및 열수 추출물의 에탄올, UF처리 분획들에 대한 약리 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Sarcoma 180 암세포 증식 저지율은 자실체 열수 총 분획(Fr. I) 보다 비교적 고분자인 다당류 분획(Fr. II, Fr. III, Fr. IV)에서 80.4~85.9%로 높게 나타났다. 면역계에 미치는 영향으로 보체계 활성화는 10.1~13.6%, 대식세포의 NO 생성능은 자실체 및 균사체 모든 분획에서 생성되었으며, TNF- $\alpha$ 생성능은 NO 생성능이 높았던 분획들에서 높은 생성능을 나타내었다. 효소적 및 비효소적 지질과산화 유발에 대한 영향은 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체의 모든 분획에서 지질 과산화 억제능을 나타내었고, 유리기 제거능에 있어서는 농도의 존적으로 효과가 있는 것으로 나타났으며, DPPH에 대한 Fr. III의  $SC_{50}$ 은 32.0  $\mu$ g/mL로 조사되었다. 상기와 같은 결과들로부터 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체의 열수추출 및 열수 추출물의 에탄올, UF처리 분획들은 항암활성, 면역활성, 지질 과산화 억제효과 및 유리기 제거능이 있음을 확인할 수 있었다.

## 문 헌

1. Lucas, E. H. and Ringler, R. L. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotics and Chemotherapy* 7: 1-4 (1957)
2. Chihara, G., Hamuro, H., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, K. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* 30: 2776-2781 (1970)
3. Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res.* 65: 557-560 (1974)
4. Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum*



- commune*. Gann 60: 137 (1969)
5. Sugiura, M. and Ito, H. Toxicological studies of *Ganoderma lucidum* Karst. Tokyo Yakakyo Daigaku Kenkyu Nempo 27: 722-725 (1977)
  6. Browder I. W. Role of immunomodulation in surgical infections. Surv. Immunol. Res. 2: 299-301 (1983)
  7. Mansell, P. W. A., Ichinose, H., Reed, R. J., Krementz, E. T., McNamee, R. and Di Luzio, R. Macrophage-mediated destruction of human malignant cells *in vitro*. J. Natl. Cancer. Inst. 54: 571-580 (1975)
  8. Hirose K. and Matsushima, K. The biological significance of the induction of manganese superoxide dismutase by interleukin 1 and tumor necrosis factor. Free Radic. Clin. Med. 7: 71 (1993)
  9. Ebihara K. and Minamishima, Y. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. J. Virology 51: 117 (1984)
  10. Yamamae, S. Medical treatment and new drug. 25: 2357 (1988)
  11. Kaneyoshi, A. Hwahan-yaku. p694. Isikoyaku press. Tyoko. Japan (1974)
  12. Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. Gann 59: 155-157 (1968)
  13. Maeda, Y. Y., Ishimura, K. and Chihara, G. Antitumor polysaccharides and host defence against cancer; a new way for cancer immuno-chemotherapy. Protein Nucleic Acid Enzyme 21: 426-436 (1976)
  14. Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W., Kim, K. H. Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. Arch. Pharm. Res. 16: 336-338 (1993)
  15. Kong, Y. Y., Lee, K. K., Nam, S. Y. and Hong, N. D. Experimental studies on activity of the cultivated mycelia of *Phellinus linteus*. Kor. J. Pharmacogn. 22: 233-239 (1991)
  16. Hayashi, T., Kanetoshi, A., Ikura, M. and Shiirahama, H. Bolegrevilol, a new lipid peroxidation inhibitor from the edible mushroom *Suillus grevillei*. Chem. Pharm. Bull. 37: 1427 (1989)
  17. Jung, I. C., Park, S., Park, K. S., Ha, H. C., Kim, S. H., Kwon, Y. I. and Lee, J. S. Antioxidative effect of fruit body and mycelial extracts of *Pleurotus ostreatus*. Kor. J. Food Sci. Technol. 28: 464-469 (1996)
  18. Lee, G. D., Chang, H. K. and Kim, H. K. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. Kor. J. Food Sci. Technol. 29: 432-436 (1997)
  19. Kim, Y. S., Park, K. S., Park, H. K., Kim, S. W. Compositional sugar analysis of antitumor polysaccharides by HPLC and GC. Arch. Pharm. Res. 17: 337-342 (1994)
  20. Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kim, Y. S., Han, M. D. and Ha, I. S. Characteristics of polysaccharide isolated from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. Kor. J. Mycol. 27: 424-429 (1999)
  21. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharides. Planta Med. 50: 163-167 (1984)
  22. Ding, A. J., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J. Immunol. 144: 2407-2413 (1988)
  23. Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattory, M., Sakamoto, T. and Namba, T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin; Effect on free radical generation and lipid peroxidation. Planta Med. 50: 298-303 (1984)
  24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351-358 (1979)
  25. Uchiyama, M., Suzuki, Y., Fukuzawa, K. Biochemical studies of Physiological Function of Tocopheronolactone. Yakugaku Zasshi 88: 678-683 (1968)
  26. Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharide. Nature New Biol. 238: 59-60 (1972)
  27. Pizarro. Genezyme user manual. ELISA kit for quantification of mouse tumor necrosis factor- $\alpha$ . Genezyme corporation. Cambridge MA. USA (1994)
  28. Hibbs, Jr, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. Nitric oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 87-94 (1988)
  29. Bendtzen, K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol. Letters 19: 183-192 (1988)
  30. Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Tani, T., Arichi, S., Okuda, H. and Kirigiya, M. *Ganoderma lucidum*, fruit body) study. Base and Clinic 14: 2455 (1980)
  31. Kafalas, V. and Stacey, N. H. Potentiation of carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by trichloroethylene in isolated rat hepatocytes (No role in enhanced toxicity). Toxicol. Appl. Pharmacol. 101: 158-169 (1989)
  32. Long, R. M. and More, L. 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 (1988)
  33. Franz, G. Polysaccharides in pharmacy: Current applications and future concepts. Planta Med. 55: 493-497 (1989)
  34. Gao, Q. P., H. kyohara, J. C. Cyong and Yamada, H. Chemical properties and anti-complement activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. Planta Med. 55: 9-12 (1988)
  35. Miura, T., N. Ohno, N. N. Miura, S. Shimada and Yadomae, T. Inactivation of a particle  $\beta$ -glucan by proteins in plasma and serum. Biol. Pharm. Bull. 20: 1103-1107 (1997)

36. Marletta, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 268: 12231-12234 (1993)
37. Adams, L. B., Hibbs, J. B., Taintor, R. R. and Krajenbuhl, J. L. Microbiostatic effect of murine macrophages for *Toxoplasma gondii*: Role of synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 2725 (1990)
38. Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S. and Bloom B. R. *J. Exp. Med.* 175: 1111 (1992)
39. Nakano, Y., Onozuka, K., Terada, Y., Shinomiya, H. and Nakano, M.: Protective effect of recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine salmonellosis. *J. Immunol.* 144: 1935-1941 (1990)
40. Mihara, M. and Uchiyama, M. Evaluation of thiobarbituric acid(TBA) value as an index of lipid peroxidation in CCl<sub>4</sub>-intoxicated rat liver. *Yakugaku Zasshi* 101: 221-226 (1981)
41. Villarruel, M. C., Diaz Gomez M. I and Castro, J. A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33: 106 (1975)
42. Sawaki, S., Inagaki, T., Kato, K., Ito, R., Koike, Masato, Takiya, S., Matsuura, M., Sugiura, M., Ito, Y. and Hirano, K. Biological and immunological activities of superoxide dismutase in human serum with various hepatic diseases. *IyakunoAyumi* 122: 1136-1137 (1982)
43. Lee, J. W., Jeong, H., Kim, K. N., Lee, S. M., Han, M. D., Lee, S. Y. and Kang, S. M. Effect of G009 on lipid peroxidation induced by peroxidizer in rats. *The J. Appl. Pharmacol.* 4: 244-250 (1996)

---

(2000년 3월 20일 접수)