

*Zoogloea sp.*의 다당체가 Meth A세포에 의한 종양형성 억제 효과

장명웅[†] · 김광혁 · 공재열*

고신대학교 의과대학 미생물학교실
부산수산대학교 생물공학과*

Antitumor Activities of Polysaccharides fractionized from *Zoogloea sp.* Against Meth A Cells

Myung Woong Chang[†], Kwang Hyuk Kim and Jai Yul Kong*

Department of Microbiology, School of Medicine, Kosin University, Pusan, Korea
Department of Biotechnology and Bioengineering, National Fisheries University, Pusan, Korea*

Abstract

The antitumor activities of the cell bound polysaccharide(CBP), water soluble polysaccharide(WSP) and sulfated polysaccharide(SP) of *Zoogloea sp.* were observed. The results obtained were as follows : 1) The CBP, WSP, and SP showed cytotoxic effect on the Meth A cells in vitro, however, the effect of CBP and WSP was more ten-fold greater than that of SP. 2) When CBP, WSP, and SP was inoculated into the peritoneal cavity of the Meth A cells transplanted mice, the average survival days tended to prolonged slightly as compared with the control. 3) When Meth A cells were transplanted subcutaneously into the back side of mice, and then CBP, WSP, and SP was inoculated into the peritoneal cavity of mice, the tumor growth inhibition ratio was 46.9% for WSP, 40.4% for CBP, and 16.2% for SP. 4) The phagocytic activity of peritoneal macrophages elicited with CBP, WSP, and SP was significantly increased than that of control. 5) The production of nitric oxide in the peritoneal macrophages stimulated with CBP, WSP, SP, and LPS alone was not increased than that of control. The production of nitric oxide in the peritoneal macrophages stimulated with IFN-r and CBP, IFN-r and WSP, and IFN-r and SP was significantly increased than that of control, but in the case of stimulated with IFN-r and WSP was increased 50% for CBP and SP.

These results suggest that the CBP, WSP and SP of *Zoogloea sp.* showed direct cytotoxic effect and tumor growth inhibition on Meth A cells in vitro and in vivo, and induced nitric oxide production of activated macrophages.

Key Word : *Zoogloea sp.*, Polysaccharide, Antitumor Effect.

[†] Corresponding author

서 론

동물, 식물, 미생물 등이 생성하는 다당류는 그 구성 성분도 다양하지만 그 응용 범위 또한 다양하며, 최근에는 항종양제로서의 이용 가능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{1,6,7)} 이 중에서도 주로 버섯류, 해양동물, 해조류, 생약제 등에서 추출된 다당류의 항종양성에 대한 연구가 많이 보고되고 있다.^{6,8,9,10,11)} 특히, 세균들 중에는 다당류를 생성하는 균주가 많으며, 어떤 세균의 다당류는 세균 독소로서 병원성과 관련이 있으며,^{12,13,14)} 해양 세균에서 분리되는 균체 다당류는 균체가 주위의 고형성 물체에 부착하는데 중요한 역할을 하며,^{12,15)} 어떤 세균의 다당류는 산업적으로나 의학분야에 널리 이용되는 등,^{14,16,17)} 이들 다당류의 응용 분야가 다양하다.^{5,11,15,18-20)} Bara 등²¹⁾ 은 세균에서 분리한 다당류가 단순 포진 바이러스, 시토포가로바이러스, 수포성구내염바이러스등의 증식을 억제시킨다고 보고하였으며, Baba 등¹⁹⁾ 은 세균에서 분리된 dextran sulfate는 human immunodeficiencyvirus type-1의 증식을 억제시킨다고 보고하였으며, Shirasugi 등²²⁾ 은 *Elsinoe leucospila*에서, Kishida 등²²⁾ 은 *Vovariella vovacea*에서 분리한 다당체가 항종양성이 있다고 보고하였다.

그러나 세균성 다당류에 의한 항종양성에 대한 연구는 세균의 다양한 그 종류에 비하면 아직 시작에 불과한 실정이다.^{23,24,28)}

이에 해양미생물 중에서 다당류를 많이 생성하는 균으로 알려진 *Zoogloea sp.*를 해수로 부터 분리동정하고, 이 균체로부터 다당류를 분리하여 성분을 분석한 후 각 성분에 따른 항종양 효과를 Meth A 세포를 이용하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. *Zoogloea sp.*에서 분리한 다당류 : 부산을 중심으로한 남해안 일대의 해수 및 갈조류와 남조류에서 분리 동정한 *Zoogloea sp.*로부터 분리 정제된 세포부착성 다당류(cell-bounded polysaccharide ; CBP), 수용성 다당류(water-soluble polysaccharide ; WSP) 및 황산염 다당류(sulfated polysaccharide ; SP) 분석은 부산수산대학교 생물공학과 공재열 교수로부터 분양받아 사용하였다.

2. 종양 세포의 배양 : Meth A 세포는 경희대학교 의과대학 면역연구실로부터 분양받아, BALB/c 마우스의 복강

내에 이식하여 15일 간격으로 마우스에 계대배양 보존하여 오는 것을 사용하였다. Meth A 세포는 증식이 왕성한 시기에 복강으로 부터 세포를 분리하여 PBS로 3회 씻은 후에 세포의 밀도가 1×10^6 /ml되게 10% 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 완전배지에 부유시키고, 이 부유액 1ml씩을 마우스의 복강내와 서혜부에 1회씩 접종하거나, 기타 실험에 사용하였다.

3. 실험동물 : BALB/c 마우스는 한국생명공학센터(경북, 대구)로 부터 분양받은 생후 6-8주령의 수컷을 사용하였다. 한 실험군에는 10마리의 마우스를 사용하였다.

4. 실험 방법

1) 시험관 내에서 *Zoogloea sp.* 다당류의 종양세포 증식 억제 효과 : Meth A 세포를 24 well plate에 1×10^5 cell/ml씩 분주하고, 3 well씩을 한 실험군으로 하였다. 대조군을 제외한 각 실험군에 *Zoogloea sp.* 균체 다당체인 CBP, WSP, SP를 각각 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도로 접종하여 배양하였다. 배양하면서 각 시간대 별로 각 배양 well의 세포를 주거하여 1ml의 PBS에 부유시킨 다음 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수와 죽은 세포수를 계산하여 세포의 증식과 사멸의 정도를 대조군과 비교 검토하였다.^{4,5,25)}

2) 생체내에서 *Zoogloea sp.* 다당류의 종양피 형성 억제 효과 : 각 실험군 마우스는 CBP, WSP, SP등의 *Zoogloea sp.* 균체성분 100 μ g/ml씩을 1일 1회로 10회 접종하였다. Meth A 세포를 이식한 후 35일에 정상대조군과 실험군 마우스를 희생시키고 각 마우스에서 종양피를 분리하여 무게를 측정하고 다음 공식에 의하여 종양증식억제율을 비교하였다.^{1,5,26,27)}

$$\text{종양증식억제율} = \frac{\text{대조군의 평균종양무게} - \text{실험군의 평균종양무게}}{\text{대조군의 평균종양무게}} \times 100$$

3) *Zoogloea sp.* 다당류 접종 마우스에서 비장계수의 변화 : CBP, WSP, SP 등의 균체 다당류를 상기 농도별로 접종한 각 군별 마우스의 비장계수를 비교검토하였다.^{1,3)}

4) *Zoogloea sp.* 다당류가 Meth A 세포이식 마우스의 수명연장 효과 : 정상 마우스와 meth A 세포이식 마우스에 CBP, WSP, SP 등의 균체 다당류를 100 μ g/ml씩 마우스 복강내로 10회 접종한 후에 각 군별 마우스의 평균수명을

Zoogloea sp.의 다당체가 Meth A세포에 의한 종양형성 억제 효과

비교검토하였다.^{5, 15, 27)}

5) *Zoogloea sp.* 다당류가 활성화된 대식세포의 탐식능 : 정상 마우스의 대식세포를 CBP, WSP, SP등의 균체 다당류에 노출시킨 후 *C. albicans*에 대한 탐식능은 다음 공식에 의하여 탐식율을 비교검토하였다.^{5, 29)}

$$\text{탐식율} = \frac{\text{C. albicans를 탐식한 대식세포의 수}}{\text{대식세포수(300)}} \times 100$$

6) *Zoogloea sp.* 다당류가 복강대식세포의 nitric oxide 생성능에 미치는 영향 : 복강대식세포를 1×10^6 cell/ml씩 24 well plate에 부주한 후에 각 well에 IFN-r, LPS, CBP, WSP, SP분획을 각각 또는 동시에 자극한 후에 시간별로 각 배양상층액에서 nitric oxide의 농도를 Griess 시약을 이용한 등의 방법에 준하여 측정 비교하였다.^{26, 30)}

결과 및 고찰

1. 시험관내에서 *Zoogloea sp.* 다당류의 종양세포 증식 억제 효과 : 우태아혈청이 10% 함유된 RPMI 1640 완진배지에 Meth A 세포를 10×10^4 ml 접종한 후 *Zoogloea sp.* 다당류를 각 농도별로 투여하고 시간별로 살아있는 세포와 죽은 세포수를 비교한 성적은 표 1과 같다. Meth A 세포 대조군에서는 배양 72시간 후에 살아있는 세포수는 95.2×10^4 ml이었으며, 죽은 세포가 9.5×10^4 ml로 총 세포수는 110×10^4 ml이었으며, 세포생존율은 86.8%이었다. Meth A 세포 배양액에 CBP10 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수가 16.8×10^3 ml로 대조군에서 보다 현저히 감소하였으며, 죽은 세포는 28.8×10^4 ml로 대조군에서 보다 증가하였으며, 총 세포수는 45.4×10^4 ml로 대조군에 비하여 세포의 증식이 현저히 억제되었으며, 세포 생존율은 37.0%로 대조군에서 보다 현저히 감소하였다. CBP 50 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 9.7×10^4 ml로 대조군에서 보다 현저히 감소하였으며, 죽은 세포수는 22.7×10^4 ml로 대조군에서 보다 현저히 증가하였으며, 총 세포수는 32.4×10^4 ml로 대조군의 30% 수준으로 세포증식이 현저히 억제되었으며, 세포 생존율은 30%로 대조군에서 보다 현저히 감소되었다. CBP 100 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 4.0×10^4 ml로 감소하였

으며, 죽은 세포수는 12.8×10^4 ml이었으며, 총 세포수는 16.8×10^4 ml로 세포의 증식이 거의 일어나지 않았으며, 세포생존율은 23.8%로 대조군에서 보다 현저히 감소하였다. WSP 10 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 8.0×10^4 cell/ml로 감소하였으며, 죽은 세포수는 12.7×10^4 ml이었으며, 총 세포수는 20.7×10^4 ml로 세포의 증식이 현저히 억제되었으며, 세포생존율은 38.6%로 대조군에 비하여 현저히 억제되었다.

WSP 50 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 5.8×10^4 cell/ml로 감소하였으며, 죽은 세포수는 8.7×10^4 ml이었으며, 총 세포수는 14.5×10^4 ml로 세포의 증식이 거의 일어나지 않았으며, 세포 생존율은 40%로 대조군에서 보다 현저히 억제되었다. WSP 100 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 1.5×10^4 cell/ml로 감소하였으며, 죽은 세포수는 10.2×10^4 ml이었으며, 총 세포수는 11.7×10^4 ml로 세포의 증식이 거의 일어나지 않았으며, 세포생존율은 12.8%로 대조군에 비하여 현저히 감소하였다. SP 10 μ g/ml과 50 μ g/ml를 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 각각 88.0×10^4 ml, 86.2×10^4 ml로 증가하였으며, 죽은 세포수는 각각 7.2×10^4 ml, 6.5×10^4 ml로 대조군과 유사하였으며, 총 세포수는 95.3×10^4 ml, 92.7×10^4 ml로 대조군에서 보다는 감소하였으나 유의한 차이가 없었으며, 세포 생존율은 각각 81.8%, 92.8%로 대조군과 차이가 없었다. SP 100 μ g/ml로 투여한 72시간 후에 살아있는 세포수는 68.4×10^4 cell/ml로 대조군 보다 감소하였으며, 죽은 세포수는 7.0×10^4 ml로 대조군과 차이가 없었으며, 총 세포수는 75.4×10^4 ml로 대조군보다 감소하였다. 세포생존율은 90.7%로 대조군과 차이가 없었다. 따라서 시험관 내에서 CBP, WSP는 10 μ g/ml 농도에서, SP는 100 μ g/ml 농도에서 Meth A 세포에 직접적인 세포독성이 있음을 시사하는 것으로, 이는 Maeda 등¹⁵⁾이 S. 180 세포에 대한 lentinan의 결과와는 상이하였으나 종양세포의 종류와 투여한 물질이 다르므로 서로 상이한 결과가 있을 수 있는 것으로 생각된다.

2. 생체내에서 *Zoogloea sp.* 다당류의 종양세포 증식억제 효과 : Meth A 세포를 피하에 접종한 마우스에 *Zoogloea sp.* 다당류를 10회 투여한 30일 후 종양피의 무게를 비교한 성적은 표 2와 같다.

Table 1. Effect of polysaccharide produced by *Zoogloea sp.* on viability test of Meth A cells by trypan blue stain method

		Number of Meth A cells($\times 10^4$ /ml)				
		0	24hr	48hr	72hr	96hr
Control	alive	10.0	30.3 \pm 2.2	66.7 \pm 1.9	95.2 \pm 2.9	87.4 \pm 2.6
	dead	0.0	1.3 \pm 0.7	4.5 \pm 1.0	9.5 \pm 1.5	23.4 \pm 2.3
	total	10.0	31.6 \pm 1.4	71.2 \pm 1.4	104.7 \pm 2.2	110.8 \pm 2.5
CBP* 10 μ g/ml	alive	10.0	30.5 \pm 4.3	29.2 \pm 6.6	16.8 \pm 2.0	9.3 \pm 0.8**
	dead	10.0	1.5 \pm 0.9	7.5 \pm 1.5	28.8 \pm 1.9	26.2 \pm 3.1
	total	10.0	32.0 \pm 2.6	36.7 \pm 4.1	45.4 \pm 2.0	35.5 \pm 2.0**
CBP 50 μ g/ml	alive	10.0	25.5 \pm 1.3	23.2 \pm 3.4	9.7 \pm 2.1	6.0 \pm 1.8**
	dead	0.0	2.0 \pm 0.5	6.0 \pm 1.3	22.7 \pm 3.3	25.5 \pm 0.9
	total	10.0	27.5 \pm 0.9	29.2 \pm 2.4	32.4 \pm 2.7	31.5 \pm 1.4**
CBP 100 μ g/ml	alive	10.0	10.2 \pm 1.3	7.8 \pm 1.0	4.0 \pm 1.0	3.2 \pm 0.3**
	dead	0.0	8.0 \pm 1.8	8.2 \pm 1.8	12.8 \pm 1.6	8.3 \pm 0.8
	total	10.0	18.2 \pm 1.6	16.0 \pm 2.4	16.8 \pm 1.3	11.5 \pm 0.6**
WSP* 10 μ g/ml	alive	10.0	25.5 \pm 1.3	24.7 \pm 1.3	8.0 \pm 2.0	6.8 \pm 0.8**
	dead	0.0	1.3 \pm 0.6	5.7 \pm 1.8	12.7 \pm 2.1	21.8 \pm 2.4
	total	10.0	26.8 \pm 2.0	30.4 \pm 1.6	20.7 \pm 2.1	28.6 \pm 1.6**
WSP* 50 μ g/ml	alive	10.0	21.0 \pm 2.2	11.0 \pm 1.0	5.8 \pm 1.2	5.7 \pm 0.8**
	dead	0.0	1.7 \pm 0.6	6.8 \pm 0.6	8.7 \pm 2.1	11.3 \pm 1.3
	total	10.0	22.7 \pm 1.4	17.8 \pm 0.8	14.5 \pm 1.7	17.0 \pm 1.1**
WSP 100 μ g/ml	alive	10.0	4.3 \pm 1.0	2.0 \pm 0.5	1.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.5**
	dead	0.0	5.5 \pm 0.9	9.5 \pm 1.3	10.2 \pm 0.8	7.7 \pm 1.3
	total	10.0	9.8 \pm 1.0	11.5 \pm 0.9	11.7 \pm 0.4	8.7 \pm 0.9**
SP* 10 μ g/ml	alive	10.0	19.0 \pm 1.1	59.1 \pm 1.5	88.0 \pm 2.2	85.3 \pm 3.6
	dead	0.0	0.9 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5	7.3 \pm 0.9	27.4 \pm 1.7
	total	10.0	19.9 \pm 0.8	60.8 \pm 1.0	95.3 \pm 1.6	112.7 \pm 2.7
SP 50 μ g/ml	alive	10.0	18.6 \pm 0.5	53.8 \pm 1.1	86.2 \pm 1.8	83.8 \pm 4.3
	dead	0.0	0.8 \pm 0.4	1.4 \pm 0.4	6.5 \pm 0.4	27.1 \pm 2.8
	total	10.0	19.4 \pm 0.5	55.2 \pm 0.8	92.7 \pm 1.1	110.9 \pm 3.5
SP 100 μ g/ml	alive	10.0	16.3 \pm 0.9	44.9 \pm 3.5	68.4 \pm 2.7	71.0 \pm 4.3**
	dead	0.0	0.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	7.0 \pm 0.8	23.7 \pm 4.0
	total	10.0	16.7 \pm 0.6	46.2 \pm 1.9	75.4 \pm 1.8	94.7 \pm 4.2**

* : CBP ; cell bounded polysaccharide,
 WSP ; water-soluble polysaccharide,
 SP ; sulfated polysaccharide.

** : Significantly different from the control with $p < 0.01$

*Zoogloea sp.*의 다당체가 Meth A세포에 의한 종양형성 억제 효과

Table 2. Antitumor activities against Meth A cells of cell-bounded polysaccharide(CBP), water soluble polysaccharide (WSP), and sulfated-polysaccharide(SP) from the *Zoogloea sp.*

Stimulants	Dose(10days)	Tumor weight (g)*	Inhibition ratio (%)	No. of animals
Meth A	-	6.18±2.2	0.0	11
MethA+CBP	100µg/ml	3.69±1.9**	40.38**	14
MethA+WSP	100µg/ml	3.28±2.1**	46.9**	11
MethA+SP	100µg/ml	5.18±2.7	16.2	13

* ; Data represent weight of solid tumor, mean±S.D. in each group.

** ; Significantly different from the control with $p < 0.01$.

Meth A 세포만 접종한 종양대조군 마우스에서 형성된 종양괴의 평균 무게는 6.18g인데 비하여, Meth A 세포 접종 후 CBP 100µg/ml를 투여한 마우스군에서 종양괴의 평균 무게는 3.69g으로 대조군에서 보다 현저히 감소하여 종양증식 억제율은 40.38%이었으며, Meth A 세포 접종 후 WSP 100µg/ml를 10회 투여한 마우스에서 종양괴의 평균 무게는 3.28g으로 대조군에서 보다 현저히 감소하여 종양증식억제율은 46.9%이었으나, Meth A 세포 접종 후 SP 100µg/ml를 투여한 마우스군에서 종양괴의 평균 무게는 5.18g으로 대조군 보다는 감소하였으며 종양증식억제율은 16.2%로 대조군과 유의성 있는 차이는 없었다. 이로서 *Zoogloea sp.*의 CBP나 WSP는 100µg/ml 투여로 생체내에서도 종양증식을 억제하였으나, SP는 100µg/ml 투여로는 종양증식이 억제되지 않음을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 Shirasugi 등¹¹⁾이 *Elsinoe leucospi*에서 분리한 다당류

가 항종양성이 있다는 보고나, Kishida 등²⁰⁾이 *Volvariella volvacea*의 균사로 부터 분리한 다당류가 S. 180세포에 의한 종양증식을 억제하는 것으로 보고한 결과와, 박 등⁵⁾의 *Mycoplasma hominis* 항원이 S. 180 세포에 의한 종양증식을 억제시킨다는 보고와, 장 등²⁷⁾의 *Mycoplasma fermentans* 항원이 S. 180 세포에 의한 종양증식을 억제시킨다는 보고와 같은 결과이었다.

3. *Zoogloea sp.* 다당류 접종 마우스의 비장계수 변화 : Meth A 세포 접종 및 *Zoogloea sp.* 다당류 접종 후 마우스의 비장계수 변화는 표 3과 같다.

마우스에 *Zoogloea sp.*로 부터 분리된 다당류인 CBP, WSP, SP 100µg/ml씩 복강내로 접종한 30일 후 각 마우스의 비장계수는 대조군 보다 증가하는 경향이었으나 유의한 차이는 없었으나, Meth A 세포를 접종한 30일 후 마우스의 비장계수는 대조군 보다 유의하게 증가되었다. 또한,

Table 3. Spleen index of the mice inoculated with Meth A cell, CBP, WSP and SP from the *Zoogloea sp.*

	Body weight(g)*	Spleen weight(g)*	Spleen index
Control	24.5±1.82	0.15±0.02	0.783
CBP100µg/ml	25.3±1.02	0.17±0.07	0.820
WSP100µg/ml	25.1±1.53	0.17±0.05	0.823
SP100µg/ml	24.9±0.97	0.16±0.08	0.802
Meth A×10 ⁶ /ml	24.7±1.34	0.22±0.13	0.854**
CBP+Meth A	28.9±1.99	0.22±0.13	0.873**
WSP+Meth A	30.0±1.91	0.23±0.09	0.876**
SP+Meth A	31.9±1.47	0.24±0.06	0.867**

* ; Data represent mean±S.D. of 10 mice each group.

** ; Significantly different from the control with $p < 0.05$.

CBP, WSP, SP의 접종과 함께 Meth A 세포를 접종한 각 마우스군에서 각각의 비장계수는 대조군에서 보다 유의성 있게 증가되었다. 이와같은 결과는 김 등¹⁻³⁾이 *Acetobacter pasteurianus* 다당체를 투여한 마우스의 비장계수가 증가되었다는 보고와 같은 결과로 Meth A 세포와 CBP, WSP, SP 등을 접종한 마우스에서 세포성 면역이 증가되었음을 의미하는 것으로 생각된다.

4. *Zoogloea sp.* 다당류로 자극된 마우스 복강대식 세포의 탐식능 : 정상마우스와 *Zoogloea sp* 다당류인 CBP, WSP, SP를 각각 100 μ g/ml씩 복강내로 접종한 3일 후에 채취한 복강대식세포의 *C. albicans*에 대한 탐식능을 비교한 성적은 표 4와 같다.

WSP로 유도된 복강대식세포의 탐식능은 1시간 후에 29.4%로 대조군과 차이가 없었으나, 4시간 후에는 77.4%로 대조군 보다 현저히 증가되었다. SP로 유도된 복강대식세포의 탐식능은 1시간 후에 30.2%로 대조군과 차이가 없었으나, 4시간 후에는 69.6%로 대조군 보다 현저히 증가되었다. 그러나, CBP, WSP, SP로 자극된 복강대식세포 간에 탐식능의 차이는 없었다. 이와 같은 결과는 김 등¹⁻³⁾, 류 등⁴⁾, 박 등⁵⁾, 장 등²⁷⁾의 결과와 유사한 것으로 이들 세균 다당체나 균체항원이 대식세포를 활성화시킨다는 것을 보여주는 결과로 생각된다.

4. *Zoogloea sp.* 다당류가 Meth A 세포 이식 마우스의 수명연장 효과 : Meth A 세포(1×10^6 /ml)를 복강내로

Table 4. Phagocytic rate of mouse peritoneal macrophages stimulated with CBP, WSP, and SP purified from *Zoogloea sp.*

Stimulants	Hour after stimulation			
	1	2	3	4
Control	27.3 \pm 2.5*	35.7 \pm 1.9	42.4 \pm 1.1	48.8 \pm 2.1
CBP	33.9 \pm 1.8	50.8 \pm 2.8**	67.9 \pm 2.0**	73.7 \pm 2.6**
WSP	29.4 \pm 2.3	58.6 \pm 1.8**	68.7 \pm 2.4**	77.4 \pm 3.0**
SP	30.2 \pm 2.7	53.1 \pm 2.6**	58.9 \pm 3.2**	69.6 \pm 2.3**

* : Data represent mean \pm S.D. of 10 mice each group.
 ** : Significantly different from the control with $p < 0.01$.

Table 5. Effect of CBP, WSP and SP of *Zoogloea sp.* on the survival days of BALB/c mice intraperitoneally inoculated with Meth A cells

Samples	Dose/Times	Number of Tumor cells	Average survival days	Number of mice
CBP	100 μ g/ml/10	-	44 \pm 3.1	10
WSP	100 μ g/ml/10	-	41 \pm 2.4	10
SP	100 μ g/ml/10	-	46 \pm 1.9	10
Meth A	-	1×10^6 /ml	23 \pm 2.7	10
Meth A+CBP	100 μ g/ml/10	1×10^6 /ml	27 \pm 3.9	10
Meth A+WSP	100 μ g/ml/10	1×10^6 /ml	28 \pm 4.1	10
Meth A+SP	100 μ g/ml/10	1×10^6 /ml	30 \pm 6.3	10

정상 마우스 복강대식세포의 *C. albicans*에 대한 탐식능은 *C. albicans* 접종 1시간 후에 27.3%이었으나, 4시간 후에는 48.8%하였다. CBP로 유도된 복강대식세포의 탐식능은 1시간 후에 33.9%로 정상 대조군과 차이가 없었으나, 4시간 후에는 73.7%로 대조군 보다 현저히 증가하였다.

이식한 마우스에 CBP, WSP, SP를 각각 100 μ g/ml씩 10회 복강내로 접종한 후 마우스의 수명은 그림 4와 같다. Meth A 세포만 접종한 군에서 20일째 4마리가 죽었으며, 25일에 나머지 6마리가 모두 죽어 평균 수명은 23일이었다. Meth A 세포와 CBP를 동시에 접종한 군에서는 20일에 1

*Zoogloea sp.*의 다당체가 Meth A 세포에 의한 종양형성 억제 효과

마리, 25일에 3마리 30일에 5마리, 35일에 1마리가 죽어 평균 수명은 27일로 Meth A군에서 보다 연장되었다. Meth A 세포와 WSP를 동시에 접종한 군에서는 20일에 3마리, 25일에 2마리, 30일에 3마리, 35일에 2마리가 죽어 평균 수명은 28일로 Meth A 세포군에서보다 지연되었으나 CBP군에서 보다는 길었다. Meth A 세포와 SP를 동시에 접종한 군에서는 25일에 3마리, 30일에 5마리, 35일에 2마리가 죽어 평균 수명은 29.5로 Meth A 세포군에서보다 지연되었으며, CBP군이나 WSP군에서 보다 길었다. 박 등⁴¹의 S. 180세포 접종 마우스에 *M. hominis* 항원을 투여한 경우와, 장 등²⁷의 S. 180 세포 접종 마우스에 *M. fermentans* 항원을 접종한 경우에서 모두 마우스의 수명이 연장되었다는 결과와 같은 것으로 이들 균체항원을 투여한 마우스에서 대식세포의 활성화에 따른 여러가지 생물활성물질의 분비가 촉진되고, NK세포등 이 활성화되므로 종양증식을 억제하므로서 나타나는 결과라고 생각된다.

5. *Zoogloea sp* 다당류가 마우스 복강대식세포의 nitric oxide 생성능에 미치는 영향 : 마우스 복강대식세포를 1×10^6 cell/ml씩 24well에 분주하여 배양한 후 IFN-r, LPS, CBP, WSP, SP로 자극한 후 각 시간별로 배양상층액에서 nitric oxide의 양을 Griess법으로 측정된 결과는 그림 1, 2, 3과 같다.

정상 마우스 복강대식세포를 6, 24, 48, 72, 96시간 배양한 후 nitric oxide 생성능은 각각 15.4nM/ml, 15.3nM/ml, 14.9nM/ml, 12.2nM/ml, 10.4nM/ml로 각 시간별로 감소하는 경향이 있었다. 복강대식세포를 LPS 10ng/ml로 자극하였을 경우 nitric oxide 생성능은 각각 13.0nM/ml-10.2nM/ml로 정상대조군과 차이가 없었으며, CBP 10 μ g/ml로 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 16.8nM/ml-13.2nM/ml로 대조군과 차이가 없었으며, WSP 10 μ g/ml로 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 15.6nM/ml-11.3nM/ml로 대조군과 차이가 없었으며, SP 10 μ g/ml로 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 14.2nM/ml-18.5nM/ml로 대조군과 차이가 없었다. 그러나, IFN-r 10u/ml로 자극하였을 경우 nitric oxide 생성능은 각각 15.3nM/ml-31nM/ml로 대조군에서 보다 증가하였으며, IFN-r 10u/ml와 LPS 10ng/ml를 동시에 자극하였을 경우 nitric oxide 생성능은 각각 14.6nM/ml-39.6nM/ml로 대조군에서 보다 현저히 증가하였다. IFN-r 10u/ml와

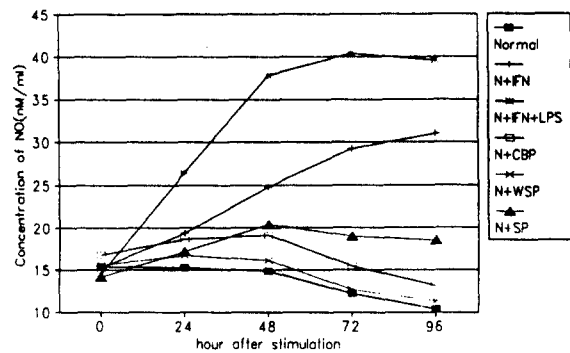


Fig. 1. Effect of CBP, and SP from *Zoogloea sp.* on nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages in vitro.

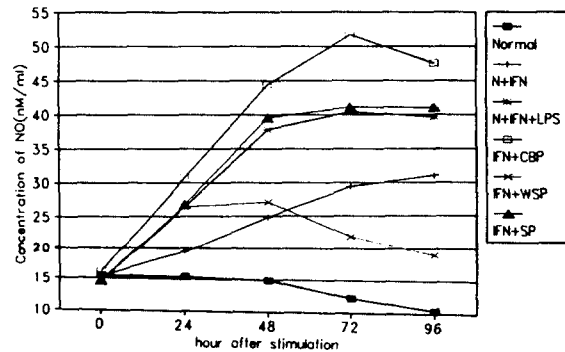


Fig. 2. Effect of CBP, WSP, and SP from *Zoogloea sp.* on nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages stimulated with or without IFN-r in vitro.

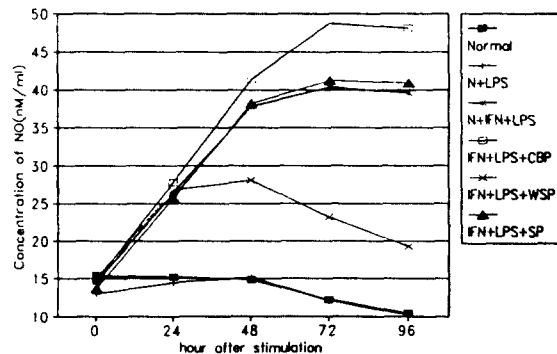


Fig. 3. Effect of CBP, WSP, and SP from *Zoogloea sp.* on nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages stimulated with or without IFN-r and LPS in vitro.

CBP10 μ g/ml를 동시에 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 16.1nM/ml-47.5nM/ml로 대조군 보다 현저히 증가되었으며, IFN-r 10u/ml와 WSP 10 μ g/ml를 동시에 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 15.0nM/ml-19.0nM/ml로 대조군 보다 증가하였으나 IFN+CBP군에서 보다는 낮았다. IFN-r 10u/ml와 SP 10 μ g/ml를 동시에 자극한 경우 nitric oxide 생성능은 각각 14.5nM/ml-41.0nM/ml로 대조군 보다 현저히 증가되었다. IFN+LPS+CBP와 IFN+LPS+SP로 자극한 경우에 nitric oxide 생성능은 모두 대조군 보다는 현저히 증가하였으며 두 군간의 차이는 없었으나, IFN+LPS+WSP로 자극한 경우에는 대조군 보다는 증가하였으나, CBP나 SP군의 50% 수준이었다. 이를 종양증식억제 효과와 비교해 볼때 nitric oxide의 생성능 증가와 항종양 효과가 일치되는 것은 아닌 것으로 생각된다. 장³¹⁾ 등은 *Mycoplasma fermentnas* 항원이, 이²⁶⁾ 등은 *Mycoplasma pneumoniae* 항원이 대식세포의 nitric oxide 생성능을 증가시킨다는 보고와 항원의 종류는 다르나 모두가 세균의 균체성분이라는 점에서 유사한 결과라고 생각된다.

결 론

*Zoogloea sp.*으로 부터 분리된 CBP, WSP, SP의 항종양 효과와 nitric oxide생성능에 미치는 영향을 검토한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

시험관내에서 CBP와 WSP는 10 μ g/ml농도에서, SP는 100 μ g/ml농도에서 Meth A 세포의 증식을 억제하였다. 생체내에서 WSP, CBP와 SP의 종양증식 억제효과는 각각 46.9%, 40.4%, 16.2%의 순으로 높았다. CBP, WSP와 SP를 접종한 마우스의 비장계수는 대조군에서 보다 높았으며, CBP, WSP와 SP로 자극된 마우스 복강대식 세포의 탐식능은 모두 대조군에서 보다 증가되었다. IFN-r와 CBP 혹은 SP로 자극된 복강대식 세포의 nitric oxide생성능은 대조군에서 보다 증가하였으나, IFN-r와 WSP로 자극된 복강대식 세포의 nitric oxide생성능은 CBP나 WSP에 의한 자극의 nitric oxide생성능의 50%수준이었다.

이상의 결과로 미루어 *Zoogloea sp.*로 부터 분리된 CBP, WSP, SP의 자극은 복강대식세포를 활성화시켜 탐식능과 nitric oxide생성능 등을 증가시키며, 시험관내에서나 밖에서 종양증식억제효과를 나타내었으며, 그 정도는 WSP,

CBP, SP의 순이었다.

감사의 글

이 논문은 1992년 한국과학재단 특정기초연구비(연지 2-2122-2755)에 의하여 연구 되었음

참고문헌

1. 김동석, 류병호 : *Acetobacter pasteurianus* IFO 1375-5 변이주가 생산하는 다당류의 항암효과. 한국식품과학회지, 23, 405(1991)
2. 김동석, 등 : *Acetobacter pasteurianus* 변이주가 생산하는 다당류의 면역효과(I). 한국생물공학회지, 7, 39(1992)
3. 김동석, 등 : *Acetobacter pasteurianus* 변이주가 생산하는 다당류의 면역효과(II). 한국생물공학회지, 7, 45(1992)
4. 류태형, 등 : 생쥐에 이식한 암세포에 있어서의 linolic acid의 암 억제효과. 대한암학회지, 24, 293(1992)
5. 박무인, 등 : 마우스에 이식된 Sarcoma 180에 대한 *Mycoplasma hominis*의 항암 효과. 대한암학회지, 26, 484(1994)
6. 이신영 : 다당의 최근 연구 동향, 미생물과 발효, 12, 6(1991)
7. 官崎利夫 : 多糖の構造と生理活性, 朝倉書店, 東京, pp. 1-36, 97-133(1990)
8. Ha Y.W. et al : Some chemical and physical properties of extracellular polysaccharides produced by *Butyrivibrio fibrisolvnus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(7), 2016(1991)
9. Marges A.M. et al : Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp.* strain EPS-5082. *Appl. Environ Microbiol.*, 52(5), 1221(1986)
10. Nahmias A.J. and Kibrick S. : Inhibition effect of herpes simplex virus. *J. Bacteriol.* 87(5), 1060(1964)
11. Shirasugi N. and MIsaki A. : Isolation, characterization and antitumor activities of the cell wall polysaccharides from *Elsinoe leucospila*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(1), 29(1992)
12. Haratel P.G. and Alexander M. : Role extracellular polysaccharide production and clays in the desiccation tolerance of *Cowpea bradyrhizobia*. *Soil Sci Soc Am. J.*, 50, 1193(1986)
13. Isobe Y. et al : Properties of highly viscous polysac-

- charide produced by a Bacillus strain isolated from soil. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(4), 636(1992)
14. Sobert I.S. and Coeman M.J. : The virulence of *Erwinia amylovora* molecular genetic perspectives. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1453(1989)
 15. Maeda Y.Y. et al : The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethylpachyman and zymosan, and their effects on various immune responses. *Int. J. Cancer*, 11, 152(1973)
 16. Coplin D.L. and Cook D. : Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 3, 271(1990)
 17. Chillini E. and Solaro R. : New bioerodible-biodegradable hydrophilic polymer. *CHEMTECH*, 23(7), 29(1993)
 18. Bitton G. and Frihofer V. : Influence of extracellular polysaccharide on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.*, 4, 119(1978)
 19. Baba M. et al : Novel sulfated polysaccharide : Dissociation of antihuman immunodeficiency virus activity from antithrombin activity. *J. Infect. Dis.*, 161, 208(1990)
 20. Collins F.M. et al : Growth of *Mycobacterium bovis* (BCG) in T-lymphocytes-depleted mice. *Infect. Immun.*, 11, 57(1975)
 21. Bara M. et al : Sulfated oligosaccharide are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11), 1742(1988)
 22. Kishida E. et al : Structures and antitumor of polysaccharide isolated from mycelium of *Vovariella volvacea*. *Biosci. Biochem.*, 58(8), 1308(1992)
 23. Knorr D. : Food Biochnology, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 63-68(1987)
 24. Sanderson G.R. and Clark R.C. : Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturing agent. *Food technology*, 63, 38(1983)
 25. Naoka S. and Misaki A. : Isolation, characterization, and antitumor activities of the cell wall polysaccharides from *Elsinoe leucospila*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 29(1992)
 26. 이한국, 등 : Mycoplasma pneumoniae 항원 및 mitogen이 마우스 대식세포의 nitric oxide생성에 미치는 영향 : 대한이비인후과학회지, 38, 684(1995)
 27. 장명웅, 등 : Sarcoma 180세포 이식 마우스에서 *Mycoplasma fermentans*항원접종에 의한 종양증식 억제 효과. 한국마이크로플라스마학회지, 4, 17(1993)
 28. Bodie E.A., et al : Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(3), 629(1985)
 29. Kohno N. et al : A new method utilizing nitroblue tetrazilium reduction to evaluate superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes at phagocytosis of *Candida albicans*. *Jpn. J. Med. Mycol.* 30, 281(1989)
 30. Ding A.H. et al : Release of Reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages : Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immun.*, 141, 2407(1988)
 31. 장명웅, 등 : *Mycoplasma fermentans* 항원이 마우스 복강대식세포의 nitric oxide생성에 미치는 영향. 한국마이크로플라스마학회지, 5, 3(1994)