

# 대식세포에서 폐렴구균 협막 다당류에 의한 TNF- $\alpha$ 및 Nitric Oxide 생성

임성희 · 임진섭 · 인상환 · 문은이 · 이동권 · 표석능\*  
성균관대학교 약학대학

## Pneumococcal Capsular Polysaccharides Induce the Production of TNF- $\alpha$ and Nitric Oxide in Murine Peritoneal Macrophages

Sung-Hee UM, Jin-Sub UM, Sang-Hwan IN, Eun-Yi MOON, Dong-Kwon RHEE and Suhkneung PYO\*

College of Pharmacy Sungkyunkwan University Suwon City, Kyunggi-do 440-746

(Received February 5, 1997; accepted March 6, 1997)

**Abstract** – Capsular polysaccharides (CPs) from *Streptococcus pneumoniae* were examined for the ability to induce secretory responses in a pure population of peritoneal macrophages. The highly purified CPs were able to affect the macrophage, ie, secretion of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and nitrite. As after stimulation with CPs, secretion of TNF- $\alpha$  induced by these CPs reached its maximum within the first few hours of the interaction, while secretion of nitrite was increased with time. In addition, production of TNF- $\alpha$  and nitrite was increased in a dose-dependent manner. In the presence of indomethacin, CP-stimulated TNF- $\alpha$  production was not altered. In contrast, LPS with indomethacin stimulated 24.5% more TNF- $\alpha$  than LPS alone, suggesting that the intracellular signaling processes for TNF production are differentially stimulated by CP and LPS. The results demonstrate that CPs are potent inducer of macrophage secretory activities.

**Keywords** □ Pneumococcal capsular polysaccharide, TNF- $\alpha$ , NO

대식세포는 세균 감염에 대하여 중추적인 역할을 하는 세포로서 그람음성 세균의 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극물질에 노출되면 활성화되어 기능적변화를 나타낸다(Adams 등, 1984). LPS에 의해 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor(TNF- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1), IL-6와 nitrite 같은 암세포에 독성이 있는 여러 가지 물질들을 분비한다고 알려져 있다(Carswell 등, 1975; Hazuda 등, 1988; Stuehr 등, 1987; Tosato 등, 1988). 최근에 그람 양성균의 세포벽 성분인 peptidoglycan과 그 유도체들이 다양한 면역 조절 작용을 유도하고 체액성 면역과 세포성 면역의 보조제로서 역할을 하며 대식세포를 활성화한다고 보고되고 있다(Heumann 등, 1994). 또한 *Streptococcus mutans*의 polysaccharide가 단구세포를 활성화하여 TNF- $\alpha$ , IL-1의 분비를 유도한다고 알려졌으며(Benabelmoumene 등, 1991), mannose를 함유한 polysaccharide,  $\beta$ -1,4-linked D-mannuronic acid,  $\beta$ -1,3 glucan같은 polysaccharide 종류가 대식세포에서 cytokine 분비를 촉진한다고 보고되어 있다(Seljelid 등, 1989). 그람양성균중 최근에 보고되고 있는 이런 면역

활성을 가진 polysaccharide를 세균표면의 주성분으로 가지고 있는 균은 폐렴구균이다(Youmanen 등, 1987). 폐렴구균의 협막 다당류는 항원성과 면역성을 나타내는 중요한 성분으로 알려져있고, 생체내에서 면역반응을 매개한다고 알려져 있다(Muscher 등, 1986; Cohn 등, 1987). 특히 type 2 폐렴구균의 협막 polysaccharide는 면역활성에 중요한 역할을 한다고 밝혀진 성분인 L-rhamnose와 D-glucuronic acid로 구성되어 있다(Kenne 등, 1975). 본 연구는 시험관내 방법으로 type 2 폐렴구균의 협막 polysaccharide가 대식세포의 TNF- $\alpha$ 와 nitrite 생성에 대한 영향을 검토 하였다.

### 실험방법

#### 실험동물과 시약

CD-1 생쥐는 일본의 Charles River Breeding Laboratory로부터 공급받아 사용하였다. 모든시약은 특별한 언급이 없으면 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. RPMI 1640과 소혈청은 미국 GIBCO사에서, TNF- $\alpha$  항체는 미국 Genzyme에서 각각 구입하여 사용하였다. E-toxate kit를 사용하여 배양액내의 endotoxin의 양을 측정 한 결과는 0.05

\* To whom correspondence should be addressed.

unit/ml이하를 나타내었다.

#### 협막다당류의 분리

Brain Heart infusion broth에 폐렴균주를 접종하여 550 nm에서 흡광도가 약 0.6에 도달할 때 까지 37°C에서 배양한 후 phenol(최종농도 0.1%)을 가하여 용해시켰다. -70°C에서 냉각시킨 ethanol 1/2 volume을 가하여 4°C에서 3시간 방치한 다음, 4°C의 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 버린 후 침전물은 1/20 volume을 증류수에 완전히 녹이고, chloroform:butanol(5:1)을 1/5 volume 가하여 추출한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 cetalon(최종농도 0.2%)을 가하고 냉각시킨 ethanol을 2 volume 가하여 4°C에서 1시간 방치한 다음 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물을 증류수로 침전물을 증류수로 녹여 검액으로 하였다(Cambell 등, 1966). 전체 당의 분석은 Orcinol-Sulphuric acid법에 의하여 측정하였다(Whistler 등, 1962). 간단히 서술하면 분리한 검액 600  $\mu$ l에 c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 0.2% orcinol을 녹여, 4°C에 보관된 용액 2.4 ml을 혼합하여 80°C에서 15분간 끓인 후, 실온에서 냉각하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 당의 량을 산출하였다.

#### 대식세포 분리

대식세포의 분리를 위하여 Klimetzek 등(1980)이 사용한 방법을 이용하였으며 간단히 서술하면 다음과 같다. RPMI 1640 배양액으로 생쥐 복강을 두 번 세척한후 세척용액을 원심분리하여 얻은 복강세포를 배양액으로 두 번 세척하고 10%의 fetal bovine serum과 2% penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI배양액으로  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 만들었다. 세포를 teflon-coated petri dish에 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후 미부착 세포를 제거한 후 새로운 배양액을 가하고 10분간 4°C에서 배양한 다음, petri dish 표면을 차거운 phosphate buffer (PBS) 용액으로 세척하여 대식세포를 얻었다.

#### TNF- $\alpha$ 생성 측정

대식세포를 폐렴균 협막 다당류와 함께 다양한 시간 동안 배양한 후, 배양 상등액중의 TNF- $\alpha$  생성측정을 TNF- $\alpha$ 에 민감한 L929세포를 이용하여 실시하였다(Mand 등, 1991). L929( $1 \times 10^4$  cells) 100  $\mu$ l을 96 well plate에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 시료와 함께 50  $\mu$ l RPMI 1640 배양액과 50  $\mu$ l actinomycin D(2  $\mu$ g/ml)을 가한 후, 18시간 동안 더 배양하고 MTT(5 mg/ml) 25  $\mu$ l를 가하였다. 4시간 동안 배양한 후 DMSO 150  $\mu$ l씩 가하고 생성된 formazan이 녹을때까지 혼합한 뒤 Molecular Device microplate reader(Menlo, CA)을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### NO 생성 측정

대식세포를 폐렴균 협막 다당류와 함께 다양한 시간 동안 배양한 후 배양 상등액중의 NO 생성 농도를 Ding 등

(1988)의 방법에 따라 측정하였다. 100  $\mu$ l의 배양 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴후 각각의 well에 100  $\mu$ l의 Griess 시약을 가하여 Molecular Device microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NaNO<sub>2</sub>를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 증류수에 녹인 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride와 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

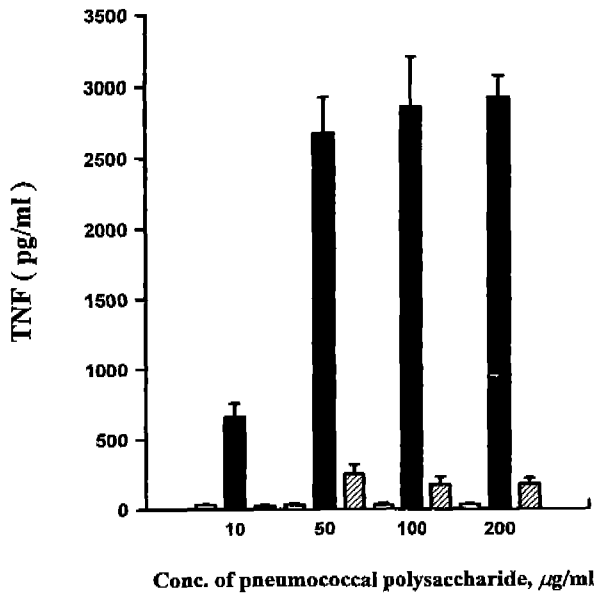
#### iNOS (inducible nitric oxide synthase) 활성측정

폐렴균 협막 다당류와 함께 20 시간 동안 배양한 대식세포를 3번 PBS로 세척한후 4°C에서 10분간 500 $\times$ g로 원심분리하였다. 세포 침사(pellet)는 1 ml DDT 0.1 mg/ml, phenylmethyl sulfonyl fluoride 0.01 mg/ml, trypsin inhibitor, 0.01 mg leupeptin, 50 mM Tris HCl(pH 7.4)가 포함된 용액에 현탁시켰다. 초음파 파쇄(10s $\times$ 2, 60% output)로 세포를 파괴하고 4°C에서 30분간 100,000 $\times$ g에서 원심분리한후 상층액에서의 NOS활성을 측정하였다. NOS 활성은 Vodovotz 등(1993)의 방법에 따라 측정하였다. 96 well plate의 각 well에 4  $\mu$ M FAD, 4  $\mu$ M BH<sub>4</sub>, 2  $\mu$ M L-arginine, 3 mM DTT 및 2  $\mu$ M NADPH를 각각 10  $\mu$ l씩 포함한 20 mM Tris buffer(pH 7.9)와 세포 분해액을 50  $\mu$ l씩 가하여 37°C에서 2시간 동안 NOS 효소가 반응하도록 하고 전체부피는 100  $\mu$ l로 하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 NOS 효소의 반응이 끝난 각각의 well에 직접 가하여 일어나는 발색 반응으로 알 수 있었다. 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 단백질 량을 고려하여 NOS의 활성을 계산하였다. 혼탁도가 클 경우에는 plate를 원심분리하여 상등액에 대한 흡광도를 측정하였다.

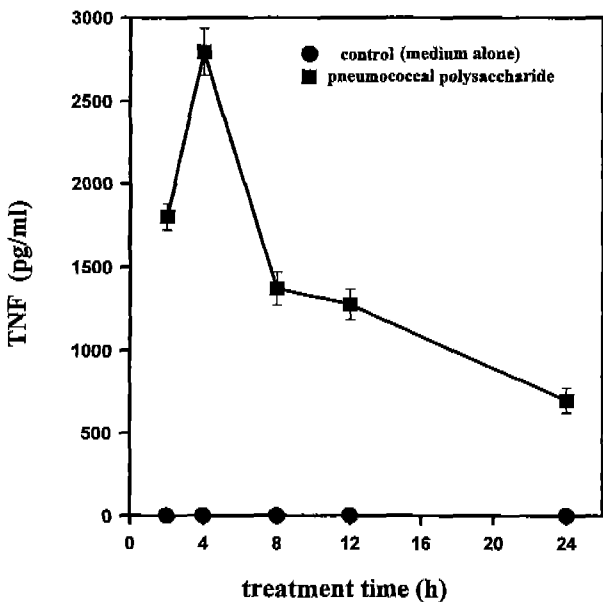
## 결 과

#### 폐렴균 협막다당류에 의한 대식세포의 TNF- $\alpha$ 생성 효과

폐렴균 협막다당류가 대식세포를 자극하여 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유도할 수 있는지를 알아보기위해 다양한 농도(10  $\mu$ g/ml~200  $\mu$ g/ml)로 세포를 처리하였다. 저농도인 10  $\mu$ g/ml에서 조차 배양액으로 처리한 대조군에 비해 폐렴균 협막 다당류의 생성이 현저하게 증가하는 것을 알수 있었으며 또한 농도 의존적으로 TNF- $\alpha$ 의 생성이 증가되었다. 또한 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체와 다당류를 함께 처리시 폐렴균 협막 다당류에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비가 TNF- $\alpha$ 항체에 의해 감소되었다(Fig. 1). 폐렴균 협막다당류의 처리한 시간에 따른 대식세포의 TNF- $\alpha$  생성을 알아보기 위하여 대식세포를 50  $\mu$ g/ml의 협막다당류로 2, 4, 8, 12, 24시간 동안 처리한 후 상층액에서 TNF- $\alpha$  생성을 측정한 결과 4시간 동안 처리한 대식세포의 상층액에서 최대의 TNF- $\alpha$ 가 생성되었으나 8시간 후에는 점진적으로 생성이 감소되었다(Fig. 2).



**Fig. 1.** Detection of TNF- $\alpha$  in supernatants from capsular polysaccharide-treated macrophages. Macrophages were treated with various doses of capsular polysaccharide for 4 hrs. Controls were cultured with medium alone. After supernatants were collected, L929 cells were treated for 12 hrs with culture supernatant in the presence or absence of antibody to TNF- $\alpha$  (500 units/ml). The results are mean  $\pm$  SD.  $\square$  control (medium alone),  $\blacksquare$  pneumococcal polysaccharide (P.P.),  $\hatched$  anti-TNF  $\alpha$ +P.P.



**Fig. 2.** Kinetics of TNF- $\alpha$  production by capsular polysaccharide-treated macrophages. Macrophages were treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  of capsular polysaccharide for various times. Controls were cultured with medium alone. After supernatants were collected, L929 cells were treated for 12 hrs with culture supernatant for TNF- $\alpha$  activity. The results are mean  $\pm$  SD.

**Table 1.** Effect of indomethacin on TNF- $\alpha$  production of macrophages induced by pneumococcal polysaccharides

Treatment	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
None	2 $\pm$ 0.2
Capsular polysaccharide (50 $\mu\text{g/ml}$ )	
Capsular polysaccharide	3500 $\pm$ 230
+Indomethacin (1 $\mu\text{M}$ )	3270 $\pm$ 460
LPS (100 ng/ml)	2460 $\pm$ 270
LPS+Indomethacin (1 $\mu\text{M}$ )	2900 $\pm$ 150*

Peritoneal macrophages were stimulated for 4 hrs with capsular polysaccharide (50  $\mu\text{g/ml}$ ) or LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of indomethacin (1  $\mu\text{M}$ ). The supernatants were harvested and assayed for TNF bioactivity. Data shown are the means  $\pm$  SD. \*Significantly different from LPS-treated,  $p < 0.01$ .

**TNF- $\alpha$  생성에 대한 Indomethacin의 효과**

Arachidonic acid 대사물질인 prostaglandin(PG)  $E_2$ 와  $PGI_2$ 가 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 생성된 TNF- $\alpha$ 를 억제한다고 알려져 있다(Kunkel 등, 1988; Renz 등, 1988). 따라서 arachidonic acid 대사물이 헤파다당류에 의한 TNF- $\alpha$  생성이 억제되는지 알아보기 위해 indomethacin와 함께 대식세포를 헤파다당류(50  $\mu\text{g/ml}$ ) 또는 LPS(100 ng/ml)로 처리하였다. 예상대로 indomethacin은 비해 LPS로 처리한 대식세포에서 TNF- $\alpha$  생성을 유의성 있게 약간 증가시켰으나, 헤파다당류로 처리한 대식세포에서는 TNF- $\alpha$  생성량을 증가시키지 않았다(Table 1).

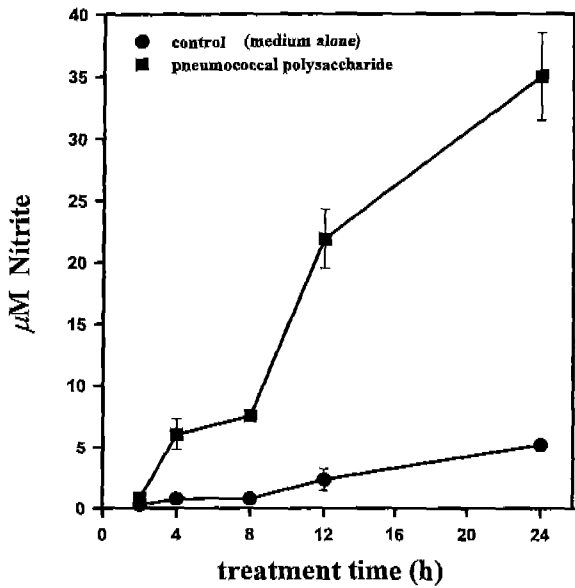
**대식세포의 NO 생성에 대한 폐렴구균 헤파다당류의 영향**

$NO_2^-$ 의 농도가 NO의 생성을 반영하므로  $NaNO_2$ 를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터  $NO_2^-$  농도를 측정하였다. 폐렴구균 헤파다당류의 다양한 농도(10  $\mu\text{g/ml}$ ~200  $\mu\text{g/ml}$ )로 대식세포를 처리하였다. 배양액으로 처리한 대조군에 비해  $NO_2^-$ 의 생성이 농도에 의존하여 증가되었으며 50  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 뚜렷한 증가를 나타내지 않았다. NO 생성의 저해

**Table 2.** Effect of pneumococcal capsular polysaccharide on nitrite production

Capsular polysaccharide ( $\mu\text{g/ml}$ )	Nitrite concentration ( $\mu\text{M}$ )	
	(-) NMMA	(+) NMMA*
None (control)	0.9 $\pm$ 0.0	-
10	7.4 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.2
50	25.4 $\pm$ 2.0*	6.0 $\pm$ 1.0
100	28.4 $\pm$ 3.1*	6.7 $\pm$ 0.5
200	30.0 $\pm$ 2.9*	5.5 $\pm$ 0.5

Peritoneal macrophages were treated for 20 hrs in medium supplemented with pneumococcal capsular polysaccharide in the absence or presence of inhibitor. Culture supernatants were collected for  $NO_2^-$  assay. Data presented are mean  $\pm$  SD. \*NMMA= 0.5 mM. \*Significantly different from control,  $p < 0.001$ .



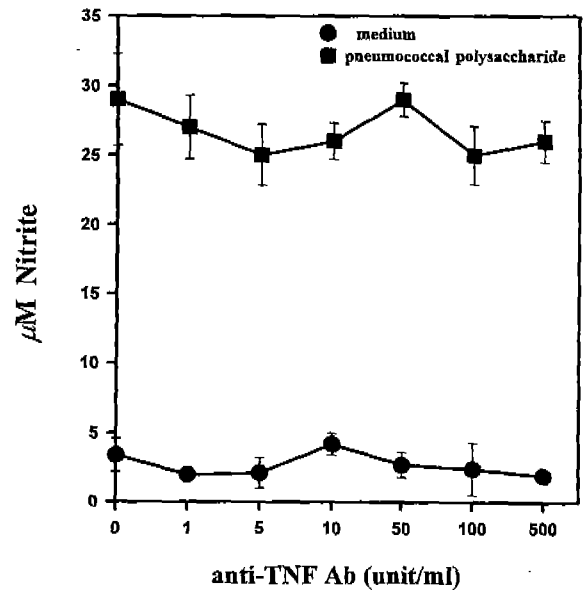
**Fig. 3.** Kinetics of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production by capsular polysaccharide-treated macrophages. Macrophages were treated with 50 µg/ml of capsular polysaccharide for various times. Controls were cultured with medium alone. Supernatants collected were assayed for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production. The results are mean ± SD.

제인 N<sup>o</sup>monomethyl-L-arginine(NMMA)와 함께 처리하였을 경우 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성이 감소되었다(Table 2). 폐렴균 협막다당류의 처리한 시간에 따른 대식세포의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성을 알아보기 위하여 대식세포를 50 µg/ml의 협막다당류로 2, 4, 8, 12, 24시간 동안 처리한 후 상층액에서 NO µ 생성을 측정 한 결과 현저하게 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 폐렴균 협막다당류에 의해 활성화된 대식세포에 의해 분비된 NO가 iNOS 활성의 증가로 인한 것인지 알아보기 위해 폐렴균 협막다당류(50 µg/ml)로 대식세포를 20 시간 동안 처리한 후 효소의 활성을 측정하였다. 대조군에 비해 현저하게 iNOS의 활성 증가를 볼 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 폐렴균 협막다당류에 의해 활성화된 대식세포는 iNOS 활성이 증가되어 NO를 많이 분비함을 알 수 있었다

**Table 3.** Effect of pneumococcal capsular polysaccharide on nitric oxide synthase (NOS) activity in mouse peritoneal macrophages

Treatment	NOS specific activity (pmol NO/mg protein/min)
None (control)	25 ± 4.8
Capsular polysaccharide (50 µg/ml)	400 ± 23.2*
LPS (1 µg/ml)+Interferon-γ (100 U/ml)	460 ± 32.5*

Peritoneal macrophages were treated with medium alone or capsular polysaccharide for 20 hrs, and assayed for nitric oxide synthase activity. Data presented are mean ± SD. \*Significantly different from control, p<0.005.



**Fig. 4.** Effects of anti-TNF antiserum on the production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> by activated macrophages. Macrophages were treated with 50 µg/ml of capsular polysaccharide for 20 hrs in the presence or absence of anti-TNF-α antibodies (500 units/ml). The supernatants were collected for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> assay. The results are mean ± SD.

(Table 3).

폐렴균 협막다당류가 TNF-α의 생성을 유도하고 계속해서 TNF-α가 NO의 생성을 유도할 수 있기 때문에 협막다당류에 의해서 생성된 NO가 TNF-α에 의해 매개되는지를 알아보기 위해 협막다당류와 TNF-α 항체를 함께 처리하였을 때 항체는 활성화된 대식세포에 의해 생성되는 NO를 억제하지 못하여 TNF-α가 NO생성에 영향을 주지않는 것을 시사해 주고 있다(Fig. 4)

분리한 협막다당류에 LPS 오염 가능성을 측정하기 위한 LPS의 지표인 3-hydroxy tetradecanoic acid(Fischer 등, 1990)에 대한 실험결과는 음성을 나타내었으며 협막다당류 용액의 LPS는 세포배양액만에 대한 LPS의 량(0.05 unit 이하)보다도 더 적은 량을 나타내었다. 또한 LPS에 의한 nitrite 생성을 억제하는 polymixin B는 협막다당류에 의한 nitrite 생성에 전혀 영향을 주지 못하였다(결과를 별도로 기재하지 않았음).

### 고 찰

폐렴균이 체내에서 항원항체 반응을 일으키는 물질로서는 협막다당류, C substance, F 항원, M 단백질 등이 있다. 특히 C substance는 c-reactive protein인 γ-globulin과 결합하여 보체를 활성화하고 식작용을 조절한다. M 단백질은 type specific 항원으로 세포표면이나 fimbriae에 존재하며

식세포가 작용을 하지 못하는 것으로 알려져 있다(Joklik 등, 1988). 이러한 여러 가지 성분중에 협막 다당류가 항원성을 나타내는 중요한 성분으로 알려져 있고 생체내에서 면역반응을 매개한다는 것이 밝혀졌다(Muscher 등, 1986). 최근에 폐렴예방의 목적으로 23 type의 협막 다당류를 성분으로 하는 백신이 개발되었으며 협막다당류로 구성된 백신에 의해 체액성 면역반응이 일어난다는 많은 보고가 있다(Shapiro 등, 1991). 그러나 폐렴예방의 관점외에 면역증강을 통한 치료제로서의 폐렴균 협막다당류의 가능성에 관한 연구는 미미한 실정이며 또한 협막 다당류가 병원체에 대한 1차적 생체 방어기능을 하는 대식세포에 미치는 영향에 관하여서는 거의 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 폐렴균 협막다당류로 처리한 대식세포가 분비하는 독성물질의 분비와 이와 관련된 효소활성을 측정하였다. 폐렴균 협막다당류로 처리한 대식세포의 상층액에서 TNF- $\alpha$ 와 NO의 생성을 확인할 수 있었으며 각각의 분비는 TNF- $\alpha$  항체나 NMMA 처리시 억제되어 폐렴균 다당류가 대식세포를 자극하여 TNF- $\alpha$ 와 NO의 생성을 유도하는 것을 알 수 있었다. 또한 NO 제거제인 oxyhemoglobin을 동시에 처리시 감소되었다(발표되지 않은 결과임). 이것은 oxyhemoglobin이 NO와 반응하여 NO<sub>3</sub>와 methemoglobin을 형성함으로써 NO를 제거한 결과에 의한 것으로 생각된다(Doyle 등, 1981). 또한 폐렴균 협막다당류는 대식세포의 iNOS활성을 증가 시켜 그 결과 NO분비를 촉진하는 것으로 사료된다.

TNF- $\alpha$ 의 세포독성기전은 세포표면의 수용체에 결합한 후 free radical을 유도함으로써 세포에 손상을 유발하며 NO 분비를 유도하고 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 설명되고 있다(Thomas 등, 1984; Grell 등, 1994). 그러나 폐렴균 협막다당류와 TNF- $\alpha$ 항체를 함께 처리시 NO분비가 전혀 억제되지 않는 것으로 보아 TNF- $\alpha$ 에 의한 2차적 효과에 의해 NO가 분비되지 않는 듯 하며 폐렴균 협막다당류에 의한 직접적인 효과의 결과임을 알 수 있었다.

Arachidonic acid 대사물질인 PGE<sub>2</sub>와 PGL<sub>2</sub>는 LPS에 의해 생성되는 TNF의 중요한 조절인자로 알려져 있다(Kunkel 등, 1988). 그러나 저농도의 PGE<sub>2</sub>는 대식세포에서 TNF의 생성을 증가 시켰다(Renz 등, 1988). LPS와 함께 indomethacin을 처리한 경우 TNF의 분비를 증가시켰다. 이는 아마도 내인성 prostaglandin생성을 차단하기 때문으로 생각된다(Kunkel 등, 1986). 이와는 반대로 폐렴균 협막다당류와 함께 indomethacin 처리는 대식세포의 TNF 생성에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 보아 prostaglandin이 협막다당류에 의한 TNF의 생성에 관여하지 않는다고 사료된다. 이러한 결과는 협막다당류의 TNF 생성에 대한 신호전달과정이 LPS와는 다르다는 것을 시사한다.

또한 대식세포는 IFN- $\gamma$ 가 먼저 작용하여 초회 감작시키

고 LPS가 초회감작된 대식세포에 작용하여 triggering시켜 활성화시킨다고 보고 되어 있다(Meltzer 등, 1981). 그러나 본 실험에서 사용된 폐렴균 협막다당류는 LPS와는 달리 IFN- $\gamma$  없이도 대식세포 활성화 지표인 TNF- $\alpha$ 와 NO를 생성하므로 대식세포의 활성화를 유도하는데 필요한 신호를 전달하는데 있어서 폐렴균 협막다당류만으로도 충분하였다는점이 LPS와 다르다는 것을 알 수 있었다.

대식세포가 폐렴균 협막다당류에 의해 활성화되어 TNF- $\alpha$ 와 NO를 생성함으로써 이들 물질들에 의해 대식세포가 항암작용을 갖고 있는지 실험중이며 또한 생체내에서 폐렴균 협막다당류가 면역 증강을 유도하여 면역요법제로서 항암효과를 나타낼 수 있는지에 대한 연구가 있어야 할 것이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1997년도 성균관대학교 63학술 연구비의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Admas, D. O. and Hamilton, T. A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* **2**, 283-318.
- Benabdelmoumene, S., Dumont, S., Petit, C., Poindron, P., Wachsmann, D. and Klein, J. P. (1991). Activation of human monocytes by *Streptococcus mutans* serotype f polysaccharide: Immunoglobulin G Fc receptor expression and tumor necrosis factor and interleukin-1 production. *Infect Immun* **59**, 3261-3266.
- Cambell, J. H. and Pappenheimer, A. M. (1966). Quantitative studies of the specificity of anti-pneumococcal polysaccharides, Type III and VIII-1. *Immunochemistry* **3**, 195-212.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3666-3670.
- Cohn, D. A. and Schiffman, G. (1987). Immunoregulatory role of the spleen in antibody responses to pneumococcal polysaccharide antigen. *Infect Immun* **55**, 1375-1380.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* **141**, 2407-2412.
- Dolye, M. P. and Hoekstra, J. W. (1981) Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins *J Inorg Biochem* **14**, 351-354.
- Fisher, W. (1990). Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids, pp 123-234. In M. Kates (eds.) *Handbook of lipid research*, vol 6. Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids. Plenum Press, New York.
- Grell, M., Zimmermann, G. and Scheurich, P. (1994) TNF re-

- ceptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol* **153**, 1963-1972.
- Heumann, C., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P. and Tomasz, A. (1994). Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* **62**, 2715-2721.
- Joklik, W. E., Willett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert, C. M. (1988) Zinsser Microbiology 20th eds Appleton & Lange Norwalk.
- Kenne, L., Lindberg, B., Svensson, S. (1975). The structure of capsular polysaccharide of the pneumococcus type II. *Carbohydr Res* **55**, 49-63.
- Klimetzek, V. and Remold, H. G. (1980). the murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell of murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell Immunol* **53**, 237-266.
- Kunkel, S. L., Wiggins, R. C., Chensue, S. W. and Larrick, J. (1986). Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* **137**, 404-410.
- Kunkel, S. L., Spengler M, May, M. A., Spengler, R., Larrick, J. and Remick, D. (1988). Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* **263**, 5380-5384.
- Mand, H. M. and Vogel, S. N. (1991) Measurement of mouse and human TNF: In current protocols in Immunology eds. pp 6.10.1-6.10.5 Greene Publishing and Wiley-Interscience New York.
- Meltzer, M. S. (1981) Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Characterization of priming and triggering signals during lymphokine activation. *J Immunol* **127**, 179-188.
- Muscher, D. M., Chapman, A. J., Goree, A., Jonsson, S., Briles, D. and Baughn, R. E. (1986). natural and vaccine-related immunity to streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis* **154**, 245-256.
- Renz, H., Gong, J. H., Schmidt, A., Nain, M. and Gemsa, D. (1988). Release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from macrophages: enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic nucleotides. *J Immunol* **141**, 2388-2393.
- Seljelid, R., Figenschau, Y., Bogwald, J., Rasmussen, L. T. and Austgulen, R. (1989). Evidence that tumor necrosis factor induced by aminated  $\beta$ 1-3D polyglucose is mediated by a concerted action of local and systemic cytokines. *Scand J Immunol* **30**, 687-694.
- Shapiro, E. D., Berg, A. T., Austrian, R. and Schroeder, D. (1991) the protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide antigen. *Infect Immun* **55**, 1375-1380.
- Stuehr, D. J. and Marietta, M. A. (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in macrophage cell lines. *Cancer Res.* **47**, 5590-5594.
- Thomas, P. M., and Edginton, S. (1984) Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J Immunol* **132**, 1980-1986
- Tosato, G., Seamon, K. B., Goldman, N. D., Seghal, P. B., May, L. T., Washington, G. C., Jones, K. D. and Pike, S. E. (1988). Monocyte-derived human B cell growth factor identified as interferon- $\beta$ (BSF-2, IL-6). *Science* **239**, 502-504.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, and Nathan C. (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- $\beta$ . *J Exp Med* **178**, 605-613.
- Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L. (1962). Methods in Carbohydrate chemistry vol I. Academic press.
- Youmanen, E., Rich, R and Zak, O. (1987). Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am rev respir Dis* **135**, 869-874.