

Alginate의 면역조절작용

손은화 · 윤연숙¹ · 표석능*

성균관대학교 약학대학, ¹한국원자력연구소

Immunomodulating Activity of Alginate

Eun-Hwa SON, Yeon-Sook YOON¹ and Suhkneung PYO*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-ku,
Suwon City, Kyunggi-do 440-746

¹Laboratory of Immunology, Korea Cancer Hospital KAERI, Seoul 139-240

(Received November 1, 1999; accepted December 7, 1999)

Abstract—Alginates are polysaccharides with gel-forming properties composed of 1,4-linked β -D-mannuronic acid (M), α -L-guluronic acid (G), and alternating (MG) blocks. The M-and the MG-blocks, but not the G-blocks, have been known to be the active components of the alginates in experimental models. In this study, we have examined the ability of high M-alginate to activate immune cells. Alginate induced the macrophage antiviral activity and the lymphocyte blastogenesis, and enhanced cytotoxicity of natural killer cell. In addition, alginates stimulated the macrophages to induce the production of H_2O_2 , whereas alginates had no effect on NO production and suppressed the production of TNF- α . These findings suggest that high M-alginate may be modulating various elements of the host immune response.

Keywords □ Alginate, T and B lymphocyte, Macrophage, NK cell

Sodium alginate(이하 alginate)는 β -1,4-linked D-mannuronic acid와 α -1,4-L-guluronic acid가 선상중합체로 되어 있는 polysaccharide로 주로 미생물이나 해양조류에서 얻어진다. 미생물로부터 얻어지는 polysaccharide가 생체의 면역기능을 증강시키거나 억제된 면역기능을 정상으로 회복 시킴으로써 면역조절작용을 나타낸다는 것은 많은 연구결과에 의하여 밝혀진 바 있다(Seljelid, 1989a; Seljelid 등, 1989b; Wagner 등, 1988; Takahashi 등, 1988). 이에 근거한 *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*와 같은 bacteria에서 분비하는 alginate의 연구가 면역학적 측면에서 활발히 진행되고 있다. Alginate의 생산과 조절메커니즘이 연구되어졌고, 그 성과로 만성 폐렴환자의 타액, 눈물, 객담, 혈청에서 *P. aeruginosa*가 생산하는 alginate에 대한 specific antibody가 확인되었다(Pedersen, 1992). 또한 현재는 alginate의 virulence factor를 이용하여 *P. aeruginosa* alginate에 대한 항체 형성을 유도하는 vaccine 개발도 이루어지고 있다(Krough 등, 1991).

이에 반하여 해조에서 추출한 alginate에 관한 면역학적 연구는 거의 미비한 상태에 머물러있다. 해조류에서 만들어지는 alginate는 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid와 α -

(1 \rightarrow 4)-L-gulosyluronic acid의 선상 중합체로 이루어져 있으며 이는 미생물에서 분비하는 alginate와 그 구조가 유사하다. Schlichtman 등(1994)은 *P. aeruginosa*에서 생산되는 alginate 구조에서 mannuronic acid기의 -O acetyl부분이 neutrophil과 lymphocyte의 기능을 저하시킴으로써 *P. aeruginosa*로 인한 환자의 cystic fibrosis를 더욱 증가시킨다고 보고하였다. 그러나 해조에서 추출되는 alginate는 neutrophil과 lymphocyte의 기능을 저하시킨다는 mannuronic acid부위에 -O acetyl기를 가지고 있지 않아 구조적인 면에서 미생물이 생산하는 alginate와는 또다른 새로운 면역학적 효과가 기대된다.

최근에 해조추출물 alginate를 처리한 human monocyte에서 inflammatory cytokinetumor necrosis factor(TNF), interleukine-1(IL-1), interleukine-6(IL-6)의 생성이 증가하였다는 보고가 있었다(Otterlei 등, 1991). 이 보고에 의하면 특히 이러한 cytokine생성을 자극하는 alginate부위는 homopolymeric sequence β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid 부위이며, α -(1 \rightarrow 4)-L-gulosyluronic acid부위는 cytokine의 생성을 자극시키는 효과가 없다고 하였다(Otterlei 등, 1991). Seljelid 등(1989a)은 mannose를 함유한 β -1,4-linked D-mannuronic acid(D-Man), β -1,3 glucan(β -1,3-D-linked-D-glucose)과 같은 polysaccharide가 항암작용을

*To whom correspondence should be addressed.

나타내며 macrophage, monocyte를 자극하여 cytokine의 분비를 촉진시킨다고 하였다. 또한 Izaima-Mizui 등(1985)도 alginate가 *in vivo* system에서 sarcoma 180에 대한 항암효과를 가진다고 보고하였는데 이러한 항암작용을 가진 활성 polysaccharide fraction이 mannuronic acid residue를 많이 함유한 부분이라 하였다. 위의 연구들을 종합해보면, alginate가 가지는 D-mannuronic acid 부위는 면역증강작용을 나타낼 가능성이 매우 크다.

Alginate는 성분비율에 따라 물성-특히 viscosity-이 달라진다. 해조에서 추출한 alginate도 추출하는 시기나 종(species)에 따라서, 또는 동일한 종이라도 부위별에 따라서 추출물의 특성이 달라지기 때문에 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid(M)와 α -(1 \rightarrow 4)-L-gulosyluronic acid(G)의 함량 정도에 따라서 크게 high-G alginate와 high-M alginate, MG-alginate로 분류하고 있다.

해조물 alginate는 의학분야에서 조직이식 거부반응을 masking하기 위하여 cell을 microencapsulation시키는데 matrix로써 사용되고 있다. 조직이식술에 임상적으로 응용하기 위해 많은 시도가 이루어졌고, 현재는 동물실험이 성공적으로 이루어진 상태다. 실험 단계가 human model로 옮겨가면서 조직이식시에 발생하는 inflammatory reaction이 부작용으로 대두되었다(Soon-Shiong 등, 1991). 이에 따라 response를 일으키는 alginate에 대한 면역학적 관심이 집중되었고, 최근에는 inflammatory reaction을 감소시키기 위한 방향으로 alginate의 연구가 이루어지고 있다. 본 연구자는 새로운 시각에서 해조추출물 alginate가 인체에서 inflammatory reaction이라는 면역반응을 일으킨다는 점과, 그 구조가 mannose를 포함한 bacterial polysaccharide와 유사하다는 점에 중점을 두었으며, 따라서 해조류 high-M-alginate의 면역증강효과를 기대하였다. *In vivo* system에서의 면역체계가 복잡한 그물형태로 이루어져 있어서, 서로에게 반응하여 증강되고 상쇄되면서 효과를 발휘한다는 점을 감안하여 본 실험은 *in vivo* 실험을 하기 위한 전 단계로 *in vitro*에서 시행되었다. Alginate가 면역세포에 직접적으로 미치는 영향을 검토함으로써 *in vivo* system으로의 실험으로 연결하는데 도움이 되고자 하였다. 연구방법은 면역증강효과가 기대되는 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid(M)를 많이 함유한 high-M alginate를 선택하였으며 면역계에서 자연면역반응과 항원특이성면역반응을 담당하고 있는 전반적인 면역세포들의 활성화와 기능의 변화를 검토하였다. 간단히 설명하면 alginate를 처리한 Bcell과 Tcell의 세포증식력의 변화를 통하여 항원특이성 면역반응을 담당하는 세포들을 검토하였고, NK세포와 macrophage의 세포독성능력을 측정하여 자연면역반응을 담당하는 세포들에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 macrophage의 다양한 세포분비물의 변화와 macrophage의 항암능력과 항바

이러스작용을 함께 검토함으로써 alginate의 작용 기전을 확인 하고자 하였다.

실험방법

실험동물 및 재료

실험 동물은 5주령의 C57BL/6(20-25 g)계 mouse로 국립보건안전원에서 분양 받아 실험하였다. Alginate는 *Macrocystis pyrifera*(Kelp)에서 추출한 sodium salt 형태로(Sigma, A0682) anhydro- β -D-mannuronic acid residue (1 \rightarrow 4)를 가진 친수성 콜로이드 형태의 polyuronic acid이다. Alginate를 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)(Gibco, Grand Island, NY) 용액에 완전히 녹여 0.22 μ m filter에 여과하여 100, 10, 1 μ g/ml 농도로 만들었다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma사(St Louis, MO)에서 구입하였다.

Splenocyte 및 thymocyte preparation

Mice를 ether로 치사시킨 후 무균상태에서 spleen을 꺼내어 3 ml RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY) 배지가 있는 60 mm petri dish에 넣었다. 5 ml 용주사기를 이용하여 splenocyte를 부유시킨 후 잘 현탁하여 원심분리관에 옮겨서 100 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 버린 후 37°C의 0.83% Tris-NH₄Cl 용액에 부유시켜 10분간 정지하여 red cell을 용해시켰다. 다시 원심분리하여 0.83% Tris-NH₄Cl 용액을 완전히 세척하고 난 후 splenocyte를 원하는 농도로 희석시켰다. Thymocyte의 경우 red cell이 포함되지 않도록 주의깊게 thymus를 꺼내어 위와 동일한 방법으로 준비하였다.

Splenocyte 및 thymocyte blastogenesis

Splenocyte를 96 well plate에 5×10^5 /well이 되도록 하였다. Alginate를 농도별로 처리하고, 10 μ g/ml lipopolysaccharide(LPS)와 2.5 μ g/ml concanavalin A(ConA)를 각각의 alginate 농도에 첨가하여 Bcell과 Tcell의 세포증식력을 측정하였다. 전체 배양부피를 200 μ l로 하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후에 25 μ l의 MTT (2 mg/ml)를 가하였다. 4시간 더 배양한 후 형성된 formazan을 150 μ l의 DMSO를 가하여 용해하고 10분간 진탕한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Carmichael 등, 1987). 준비된 thymocyte도 위와 동일한 방법으로 세포증식력을 측정하였다.

Natural killer antitumor activity

Mice로부터 분리한 splenocyte를 96 well plate에 5×10^5 /well이 되도록하여 effector cell로 사용하였다. Target cell로 Yac-1세포를 이용하여 effector cell과 target cell의 비율을 10:1로 하였다. 함께 20시간 배양한 후에 MTT를

가하여 4시간 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성을 계산한 방법은 아래와 같다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{O.D. (NK cells + Tumor cells)} - \text{O.D. (NK cells)}}{\text{O.D. (Tumor cells)}} \times 100$$

Peritoneal macrophage preparation

Peritoneal macrophage는 thioglycollate(Difco Lab. Detroit, MI)를 이용하여 외부자극에 대한 항암작용을 쉽게 알아볼 수 있도록 inflammatory macrophage 상태로 만들어 실험하였다. Mice에 4.05% thioglycollate를 복강주사하고 3일 후에 RPMI1640 배양액으로 복강을 세척하여 복강세포를 취하였다. 복강세포로부터의 macrophage 분리는 Klimetzek와 Remold(1980)가 서술한 방법대로 시행하였다. 간단히 설명하면, 복강세포를 teflon-coated petri dish (100×15 mm)에 $5-6 \times 10^5$ cells/cm²으로 분주하여 macrophage가 바닥에 부착하도록 하였다. Petri dish에 부착하지 않은 세포를 제거한 후 1.5% FBS를 포함한 D-PBS 용액 15 ml을 가한 후 0.3 ml의 0.1M EDTA(pH7.0)를 첨가하여 15분동안 상온에 방치하였다. 주사기를 이용하여 바닥으로부터 macrophage를 떼어내어 원심분리한 후 세척하여 macrophage를 원하는 농도로 희석하였다.

Macrophage antiviral activity

Virus의 cytopathic effects(CPE)를 측정하기 위해 alginate를 농도별로 처리한 후에 7 m.o.i.(multiplicity of infection)의 HSV-1 KOS strain으로 macrophage를 감염시켰다. 1시간 후에 흡착하지 않은 virus를 제거하였고, 다시 새로운 배지를 가한 후 macrophage를 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. CPE는 neutral red dye uptake방법으로 측정하였다(Lazdins 등, 1990). 이 방법을 간단히 서술하면 다음과 같다. HSV-1이 감염된 macrophage를 배지로 2회 수세하고 배지에 neutral red dye를 0.006%의 농도로 하여 200 ml씩 가한 후 2시간 동안 염색하였다. 염색된 macrophage를 배지로 수세하고, 50% ethanol을 포함한 Sorensen's buffer(pH 7.4)를 200 ml씩 첨가하여 neutral red dye를 추출하도록 30분간 교반하였다. 염색이 녹아 나온 정도를 ELISA reader를 이용하여 492 nm 흡광도로 측정하였다. Virus의 CPE는 감염된 세포의 염색액 흡수를 감염되지 않은 세포의 염색액 흡수로 나눈 값으로써 생존 계수(viability index)를 나타내었다.

$$\text{Viability Index (\%)} =$$

$$\frac{\text{O.D. of virus infected cells}}{\text{O.D. of uninfected cells}} \times 100$$

Macrophage phagocytosis

Macrophage phagocytosis 능력은 Okimura 등(1986)의 zymosan particle 도입 방법과 Stossel(1973)에 의해 변형된 NBT reduction방법을 이용하여 측정하였다. 분리한 macrophage를 96 well plate에 1×10^5 /well이 되도록 하여 부착시켰다. Alginate를 농도별로 처리하고 세척한 후, 탄소원인 5×10^5 particle/ml zymosan 과 0.6 mg/ml NBT 시약을 첨가하여 zymosan과 함께 NBT 시약이 uptake하도록 하였다. NBT 환원 물질인 청보라색 불용성 formazan의 생성량을 540 nm에서 측정함으로써 phagocytosis 능력을 알아보았다.

Macrophage hydrogen peroxide production

Hydrogen peroxide(H₂O₂)의 분비량은 형광 물질인 scopoletin이 H₂O₂에 의하여 비형광 물질의 산화생성물로 바뀌어 형광이 감소하는 정도로부터 측정할 수 있는데, 이는 Nathan과 Root (1977)가 언급한 방법에 따라서 행하였다. 위에서 기술한 방법대로 macrophage를 plate에 준비한 후 alginate를 농도별로 처리하였다. Plate를 세척한 후 2 µg/ml의 scopoletin과 20 u/ml의 horseradish peroxidase를 첨가하고 18시간 더 배양하였다. 이 때 macrophage가 분비하는 H₂O₂에 의해 형광물질인 scopoletin이 산화되는데, 360 nm의 광선으로 여기(excitation)될 때 환원 상태의 scopoletin으로부터 나오는 460 nm의 감광(emmission)을 fluorimeter가 형광학적으로 측정한다. 주어진 실험 조건 하에서 형광의 감소는 생성된 H₂O₂의 양과 비례하였는데 결과는 투여군의 형광 감소를 대조군의 형광감소와 비교하여 productability index로 나타내었다.

$$\text{Productability index(\%)} = \frac{\text{시험군의 형광감소}}{\text{대조군의 형광감소}} \times 100$$

Macrophage antitumor activity

Macrophage를 96 well plate에 1×10^5 /well이 되도록 분주하고 effector cell로 사용하였다. Macrophage에 alginate를 농도별로 처리하고 target cell과 함께 20시간 배양하였다. Target cell로는 B16세포를 이용하였으며 effector cell과 target cell의 비율을 10:1로 하여 MTT assay를 실시하였다. 세포독성능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} =$$

$$1 - \left\{ \frac{\text{O.D. (Macrophages + Tumor cells)} - \text{O.D. (Macrophages)}}{\text{O.D. (Tumor cells)}} \times 100 \right\}$$

Macrophage nitric oxide production

Macrophage의 활성화 정도를 측정하기 위하여 macrophage가 분비하는 nitric oxide의 생성량을 측정하였다(Ding 등, 1988). Macrophage를 96 well plate에 $1 \times$

10^5 /well이 되도록 분주하고 alginate를 농도별로 20시간 처리하였다. 새 배양액으로 바꾸어 20시간 더 배양한 후, 상층액 100 μ l만을 취하여 새 plate에 옮긴 후 100 μ l Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치하였다. ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로부터 macrophage가 분비하는 nitric oxide를 정량하였다.

Macrophage TNF- α production

TNF- α 측정은 TNF- α 에 sensitive한 L929 세포를 이용한 bioassay방법으로 실시하였다. L929 cell(4×10^5 cells) 100 μ l를 96 well plate에서 18시간 배양하여 monolayer 상태로 준비하였다. Alginate를 처리한 macrophage의 상층액을 앞에서 서술한 방법(macrophage nitric oxide production)으로 준비하였다. Plate에 부착된 L929 cell에 준비된 상층액 100 μ l를 가하고 50 μ l actinomycin D(2 μ g/ml)를 첨가하였다. 18시간 동안 더 배양한 후 MTT assay를 이용하여 TNF- α 분비량에 따른 L929 세포의 증식

저해율을 알아보았다.

실험결과

Thymocyte & Splenocyte blastogenesis에 미치는 영향

Alginate를 처리한 lymphocyte가 mitogen에 의하여 어떻게 변화되어 반응하는지 알아보기 위하여 Bcell mitogen LPS와 Tcell mitogen ConA를 처리하였다(Fig. 1). 실험결과 alginate는 splenocyte blastogenesis에서 세포증식력의 증가를 일으켰고 thymocyte blastogenesis에서도 증식효과를 나타내었다. Alginate는 spleen을 이루는 matured T cell은 물론 thymus에 있는 미분화단계의 immatured T cell에도 영향을 미치는 것으로 생각되며, ConA 처리군과 LPS 처리군 모두에서 유의성 있는 증가가 나타난 점으로 보아 Tcell뿐만 아니라 Bcell에도 세포증식력에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

Natural killer cell antitumor activity

Alginate가 NK세포의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 alginate를 처리한 splenocyte와 NK세포에 sensitive하게 반응하는 Yac-1을 함께 배양하여 antitumor activity를 측정하였다. 그 결과 alginate 100 μ g/ml 농도처리군에서 antitumor activity가 유의성 있게 증가하였다. 그 효과가 현저하지는 않지만 Fig. 2에서 보는 바와 같이 dose-dependence한 경향을 나타내었다.

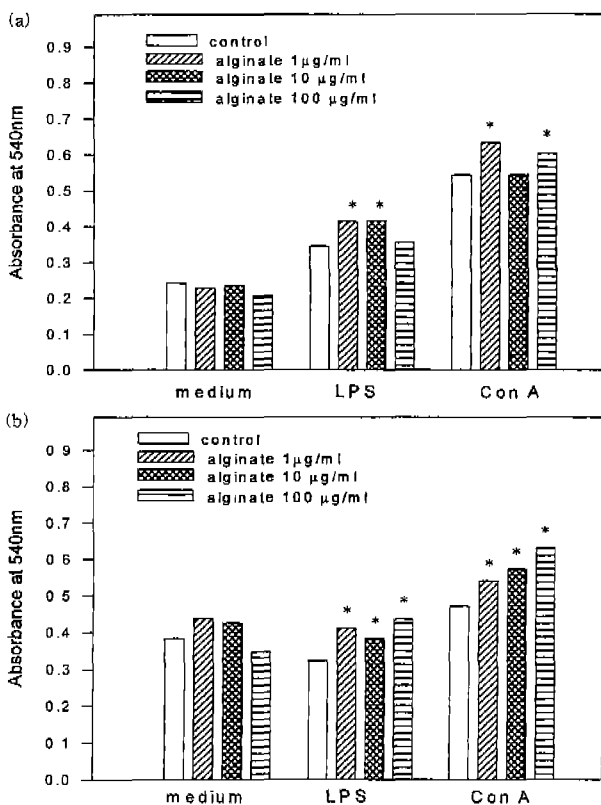


Fig. 1. (a) The effect of alginate on splenocyte blastogenesis (a) and thymocyte blastogenesis (b). Cells (5×10^5 cells/well) were treated with Con A(4 μ g/ml) or LPS(10 μ g/ml) for 48 hrs in the presence of various concentrations of alginate. The proliferation of splenocytes or thymocyte was assessed by MTT assay. Cell density was measured at 540 nm. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Alginate-treated groups were significantly different from control group (* $p < 0.05$).

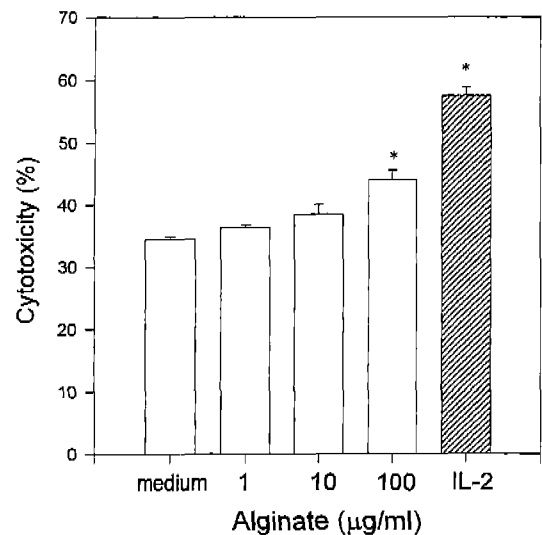


Fig. 2. Activation of NK cell antitumor activity by alginate. Splenocytes from mice were cocultured for 20 hrs with target cells (Yac-1) in the presence of various doses of alginate at an initial effector/target ratio of 10:1. Tumoricidal activity was assessed by MTT assay. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Alginate-treated groups were significantly different from control group (* $p < 0.05$).

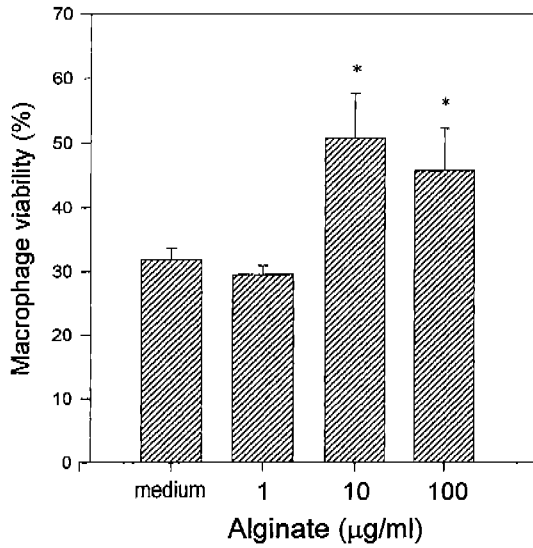


Fig. 3. The effect of alginate on antiviral activity of macrophages against herpes simplex type 1 virus. Macrophages were pretreated with various doses of alginate for 20 hrs before infection with HSV-1 at 7 m.o.i. Cytopathic effect was determined by neutral red dye uptake assay 48 hrs later. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Alginate-treated groups were significantly different from control group (* p <0.05).

Macrophage activation에 미치는 영향

Antiviral activity

Alginate가 macrophage의 항바이러스 효과를 증가시키는 지를 알아보기 위하여 HSV-1에 대한 macrophage의 생존률을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 10 µg/ml 와 100 µg/ml 농도에서 macrophage의 항바이러스 작용을 유도하였다. 이러한 효과는 macrophage가 분비하는 interferon(IFN)에 의하여 이루어진다고 알려져 있는데, IFN이 cell receptor에 결합하여 세포신호전달체계를 통하여 숙주세포의 단백질합성을 유도한다. 따라서 alginate가 macrophage의 항바이러스작용을 증가시키는 효과는 단지 alginate가 macrophage의 항바이러스작용에 효과를 나타냈다는 것 외에도, IFN에 의하여 생성되는 새로운 단백질에 의하여 다른 면역세포들이 활성화되는 2차적인 면역조절작용효과의 가능성을 제시해 준다.

Phagocytosis activity

Phagocytosis는 macrophage가 외부 물질을 제거하기 위해 가장 먼저 일어나는 면역반응이다. 외부자극에 의하여 활성화되면 macrophage는 phagocytosis 능력이 증가하게 되어 외부물질에 대한 제거능력이 증가하게 된다. Alginate로 인한 macrophage phagocytosis능력변화를 측정하기 위하여 alginate를 처리한 macrophage에 탄소원 zymosan을 가하여 탐식 작용을 일으키게 하였다. 그 결과 alginate는 macrophage의 phagocytosis능력에 영향을 주지 않았다

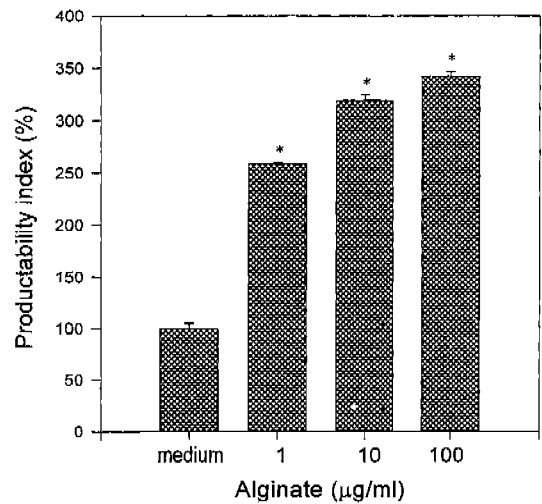


Fig. 4. The effect of alginate on hydrogen peroxide production by macrophages. Macrophages pretreated with alginate for 20 hrs. Culture supernatants were assayed for hydrogen peroxide released. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment after the calculation of the percentage of hydrogen peroxide production in comparison with that of control. Alginate-treated groups were significantly different from control group (* p <0.05).

(Data는 별도로 기재하지 않았다).

Hydrogen peroxide production

Macrophage는 활성화되면 respiratory burst system이 작동하여 활성산소물질 H₂O₂가 생성된다. Alginate가 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 alginate를 처리한 macrophage의 배양상층액으로부터 H₂O₂ 분비량을 측정하였다. 실험결과 alginate 처리군에서 H₂O₂ 생성이 증가하였다(Fig. 4).

Antitumor activity

Alginate가 macrophage를 직접 활성화시켜 항암효과를 발휘하는지를 알아보기 위하여 alginate를 처리한 macrophage와 암세포를 함께 배양한 후 macrophage 암세포독성능을 측정하였다. 실험결과 alginate 처리군에서 유의성있는 항암효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 alginate가 직접적으로 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 단계로 활성화시키지 않음을 말해준다(Data는 별도로 기재하지 않았다).

Nitric oxide production

Alginate가 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 좀더 자세히 규명하기 위하여, macrophage가 분비하는 세포독성물질 nitric oxide(NO)를 측정하였다. 그 결과 NO 생성량이 증가하지 않았다(Fig. 5a). NO는 macrophage가 분비하는 세포독성물질로 잘 알려져 있기 때문에, 이와 같이 alginate가 NO 생성량을 증가시키지 않은 결과는 alginate에 의한 macrophage의 항암효과가 나타나지 않았던 결과

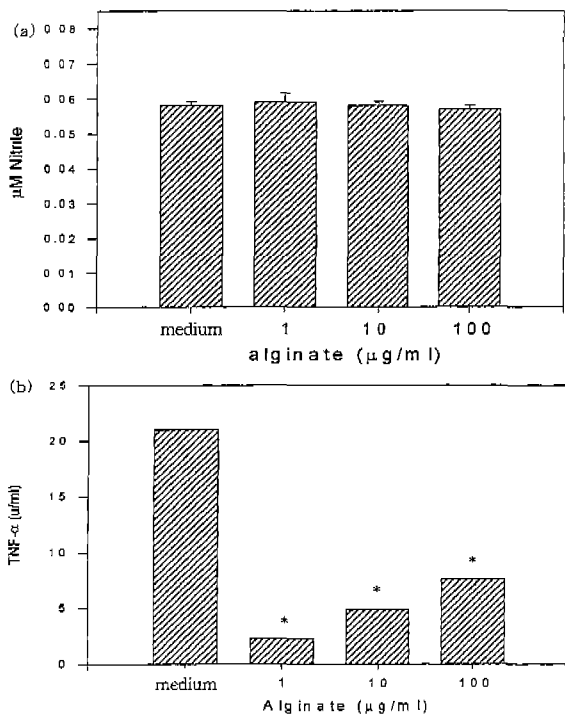


Fig. 5. The effect of alginate on the production of NO (a) and TNF- α (b) by macrophages. Macrophages were pretreated with various doses of alginate for 20 hrs. The 24 hrs-conditioned media were collected for NO₂⁻ assay and TNF- α bioactivity, respectively. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Alginate-treated groups were significantly different from control group (* p <0.05).

를 뒷받침 해준다.

TNF- α production

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 주로 LPS에 의해 자극된 macrophage가 분비하는 cytokine으로 알려져 있으며 항암작용을 나타낼 뿐 아니라 염증반응에도 관여한다. Alginate가 macrophage를 활성화하여 TNF- α 를 분비하게 하는지 알아보기 위하여 alginate를 처리한 macrophage의 상층액으로부터 TNF- α 분비량을 측정해 보았다. 실험결과 alginate는 오히려 대조군에 비하여 macrophage의 TNF- α 생성량을 감소시켰다 (Fig. 5b). TNF- α 와 NO는 macrophage가 분비하는 항암물질로 알려져있다. 따라서 alginate에 의하여 macrophage가 TNF- α 분비량에 증기를 보이지 않은 결과는 NO 생성량에 영향을 미치지 않았던 결과와 함께 alginate가 macrophage의 항암효과에 영향을 미치지 않았음을 뒷받침해준다.

고 찰

Macrocystis pyrifera라는 Laminariaes(다시마목)에 속하는 갈조류에서 추출한 sodium alginate에서 면역증강효과를

기대하는 데에는 두가지 이유가 있다. 첫째는 Alginate가 구조적인 측면에서 면역증강효과가 클 것으로 예상되는 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid를 많이 함유하였다는 점과, 둘째로 임상적으로 사용되고 있는 alginate가 조식이식과정에서 생체내 inflammatory reaction을 일으키는 요인으로 지적되고 있다는 점이다. 이러한 생각을 바탕으로 본 연구자는 high M-alginate를 가지고 항원특이성 면역반응에 관여하는 lymphocyte와 자연면역반응에 관여하는 macrophage 그리고 NK세포에 미치는 영향을 알아보았고, 이러한 연구자료를 바탕으로 더욱 복잡하게 얽혀서 발현되는 *in vivo* 실험으로의 진행을 결정하기로 하였다.

시행된 연구자료들을 종합해 보면, 해조추출물 alginate는 그 효과가 크진 않지만 다양한 면역세포들의 활성화에 영향을 미친다. Tcell과 Bcell의 세포증식력을 증가시키며 NKcell의 암세포독성능력도 증가시키고 macrophage의 다양한 기능에도 변화를 주고 있다. Alginate가 면역세포들의 활성화를 최대한으로 증대하고 있진 않지만, 면역계를 이루는 전반적인 세포에 유의성있는 활성화를 나타내고 있으며, 이러한 사실은 서로에게 반응하고 더욱 증대될 수 있는 *in vivo* system에서의 뚜렷한 면역증강효과를 암시한다.

면역체계에서 어떤 항원에 대해 노출된 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격 대상세포를 파괴하는 자연 면역반응은 실로 중요하다. 외부침입에 따른 가장 즉각적인 반응이며 1차적인 방어체제이고, 이를 담당하는 세포의 활성화가 다른 면역세포를 자극하여 더욱 단단한 방어체계를 구축하기 때문이다. 생체내에서 일어나는 면역반응이 더욱 증대되기 위해서는 이러한 세포들의 활성이 매우 중요하다.

본 연구자료에 의하면 alginate는 자연면역반응을 담당하는 NK세포의 암세포독성능력을 증강시켰다(Fig. 2). 그러나 그 효과는 splenocyte를 구성하는 약간의 macrophage(10%)에 영향을 주어 macrophage로부터 IFN을 분비하게 함으로써 간접적으로 NK세포의 암세포독성능력을 증강시켜서 나타났을 가능성이 있다. 이러한 가능성은 macrophage의 항바이러스 실험결과가 설명해 준다 (Fig. 3). Macrophage의 항바이러스작용은 IFN의 분비를 유도함으로 이루어진다고 알려져 있으며, NK세포의 암세포독성능력은 이러한 IFN을 포함한 cytokine에 의해 증강되기 때문이다 (Stanton 등, 1984). 실험결과에 의하면 alginate에 의한 macrophage 항바이러스효과가 유의성있게 나타났다. NK세포의 항암효과가 macrophage가 분비하는 IFN에 의해서만 이루어진다고 가정한다면, NK세포 항암효과는 alginate를 농도별로 처리한 macrophage 항바이러스작용의 결과와 같은 경향성을 나타내어야 한다. 그러나 Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 macrophage의 항바이러스효과는 alginate 10 μ g/ml와 100 μ g/ml에서 유의성있게 유도된 반면에,

NK세포의 암세포독성능력은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 유의성있게 나타났다. 즉 alginate에 의한 macrophage의 IFN의 분비는 alginate 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 크게 이루어졌고 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 나타났다. 그러나 NK세포의 암세포독성능력은 alginate 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 유의성을 보였다. NK세포의 활성이 IFN에 의한 것이라면 적어도 IFN이 가장 많이 분비되는 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 NK세포의 암세포독성이 이루어져야 한다. 따라서 NK cell의 암세포독성능력이 증가된 결과는 alginate에 의하여 활성화된 macrophage에 의한 효과가 아니라, alginate가 NK cell의 활성화에 직접적으로 영향을 미친 것으로 해석된다.

자연면역반응에 관여하는 또다른 중요한 면역세포는 macrophage다. Macrophage는 항바이러스효과 뿐만아니라 항암작용도 가지고 있다. 이러한 항암작용은 macrophage가 활성화 단계를 거쳐 여러 가지 기능이 변화되면서 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 상태로 전환되어서 나타난다. 대략 macrophage가 활성화되어 암세포를 죽이게 되기까지의 성장변화를 4단계로 나누며, resident, responsive, primed, activated macrophage로 명명한다. 각 단계는 암세포를 죽일 수 있는 능력을 획득해 가는 과정으로 구분한다. Alginate가 macrophage의 활성화에 영향을 미치고 있는지, 이러한 영향이 어느단계로의 변화를 의미하는지 알아보고자, 각 단계에서 특징지을 수 있는 몇가지 macrophage의 활성분비물을 측정하였다. 실험결과 alginate는 macrophage를 fully activated 상태로 만들지는 못했다. Antitumor effect가 나타나지 않았고, 또 세포독성물질로 알려진 $\text{TNF-}\alpha$, NO의 분비량도 증가하지 않았다. 그러나, respiratory burst system의 작동으로 일어나는 활성산소물질 H_2O_2 의 생성량이 크게 증가하였다. 또 antiviral effect도 나타났다. 이러한 사실은 alginate가 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage로 변화시키지는 못하나, primed macrophage 상태로 활성화시키고 있음을 말해준다. 활성산소물질 H_2O_2 생성은 primed macrophage에서 크게 발휘되며 activated macrophage에서도 그 기능이 유지된다. Activated macrophage에서 분비되는 H_2O_2 는 암세포를 죽이는 물질의 하나로 제시되어져 왔다. 그러나 이 실험에 의하면 alginate 처리에 의하여 macrophage가 암세포를 죽이지 못했음에도 불구하고 상당량의 H_2O_2 를 생산하였다. 이러한 결과는 H_2O_2 가 단독으로 암세포를 죽이기에 충분치 않다는 것을 말해 주며, 이는 항암작용을 갖고 있지 않은 responsive macrophage에서 상당량의 H_2O_2 생성이 보고되었다는 사실에서도 알 수 있다(Cohen 등, 1982).

Alginate를 처리하여 macrophage의 항암작용과 항바이러스효과를 알아본 실험결과들을 비교해 보면, alginate는 macrophage의 항바이러스효과를 나타냈지만, 항암작용에는

영향을 미치지 않았다는 사실을 알았다. 이는 macrophage의 항암작용과 항바이러스작용이 함께 나타나는 것이 아니라, 서로 다른 기전에 의하여 발휘되고 각기 다른 조절물질에 의하여 매개됨을 암시한다.

Bacteria에서 유래하는 alginate는 extracellular bacteria thick polysaccharide coat를 이루며, 이는 bacteria가 phagocyte 면역세포의 recognition을 피하는 evading factor로써 그 기능을 한다. 따라서 구조가 유사한 해조류 alginate에서도 phagocyte가 쉽게 recognition 할 수 없을 가능성이 있으며, 실제로 recognition이 잘 이루어지지 않으면 phagocyte에 대한 직접적인 alginate 효과는 기대하기 어렵다. 실제로 phagocyte macrophage에 대한 실험 결과들을 종합해보면 macrophage의 phagocytosis의 능력은 물론 다양한 활성화 효과도 현저히 나타나지 않았다. 이러한 구조적인 요소가 phagocyte인 macrophage에 대해서 *in vitro* effect를 감소시켰다고 생각된다. 이러한 요소는 alginate가 생체내로 주입되었을 경우, alginate가 직접적으로 영향을 미치고 있는 다른 면역세포들의 활성화에 의하여 *in vitro*에서 발휘될 수 없었던 macrophage의 다양한 기능이 더욱 활성화 될 것으로 생각된다.

면역체계란 단독으로 일어나는 것이 아니라 생체내에서 서로 상호적인 보완작용으로 이루어지는 것이므로 alginate의 이러한 결과들은 *in vivo* system에서 또 다른 면역학적 효과를 나타낼 것이다. 앞에서도 언급한 해조류 alginate의 구조적인면이나, 임상으로 사용하는데 있어서 inflammation 발생이 지적되고 있는 점을 고려한다면, 그리고 본 연구에 의해서 나타난 *in vitro*내에서의 면역세포 전반에 걸친 유의성 있는 결과들을 살펴본다면 *in vivo* 내에서의 면역증강효과는 이미 예측되는 결과이다. Alginate는 해양의 자원으로부터 손쉽게 얻을 수 있고 합성해 낼 수 있는 장점을 가지고 있어 새로운 면역조절제로서 가능성을 제시해준다. 이러한 가능성은 질병치료와 예방에 응용될 수 있을 것이며 또한 복잡한 면역세포들간의 활성을 연구하는데에도 도움이 될 것이다.

참고문헌

- Adams, D. O. and Hamilton, T. A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 283-318.
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay; Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Clark, R. A. and Klebanoff, S. J. (1975). Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity; Role of the peroxidase system. *J. Exp. Med.* 141, 1442-1450.
- Cohen, M. S., Taffer, S. M. and Adams, D. O. (1982). The relationship between secretion of H_2O_2 and completion of

- tumor cytotoxicity by BCG-elicited murine macrophages. *J. Immunol.* **128**, 1781-1785.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407-2412.
- Evans, R. and Alexander, P. (1976). In *immunobiology of the macrophage* (D. S. Nelson, Ed.), Academic press., pp. 535.
- Grewal I. S. and Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 111-135.
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, I. and Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87-92.
- Iizima-Mizui, N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I., Nagumo, T. (1985). Antitumor activity of polysaccharide fraction from the brown seaweed *Sargassum Kjellmanianum*. *Kitasato. Arch. Exp. Med.* **58**, 59-65.
- Klimetzek, V. and Remold, H. G. (1980). The murine bone marrow macrophages, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immun.* **53**, 257-265.
- Krough J., Hoiby, H., Stenvang, N., Pedersen, S. (1991). Experimental immunization with *Pseudomonas aeruginosa* alginate induces IgA and IgG antibody response. *APMIS.* **99**(12), 1061-1068.
- Lazdins, J., Alteri, E., Cook, K. W., Burgin, C. and Gangemi, J. D. (1990). Use of human monocytes in the evaluation of antiviral drugs; Quantitation of HSV-1 cytopathic effects. *Antiviral. Res.* **137**, 175-180.
- Morgan, P. S., Conner, J. R. and Leary, K. R. (1985). Viruses and the versatile macrophage. *Br. Med. Bull.* **410**, 150-158.
- Nathan, C. F. and Root, R. K. (1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages; Dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med.* **146**, 1648-1662.
- Okimura, T., Ogawa, M. and Yamauchi, T. (1986). Stress and immune responses III; Effect of restraint stress on delayed type hypersensitivity (DTH) response, natural killer (NK) activity and phagocytosis in mice. *Japan. J. Pharmacol.* **41**, 229-235.
- Otterlei, M., Østgaard, K., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., Espevik, T. (1991). Induction of cytokine production from human monocytes stimulated by alginate. *J. Immunother.* **10**, 286-291.
- Pedersen, S. S., Moller, H., Espersen, F., Sorensen, C. H., Jensen, T., Hoiby, N. (1992). Mucosal immunity to *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis. *APMIS.* **100**(4), 326-334.
- Schlichtman, D., Kavanaugh-Black, A., Shankar, S., Chakrabarty, A. M. (1994). Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*; Role of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* **176**(19), 6023-6029.
- Seljelid, R., Figenschau, Y., Børgwald, J., Rasmussen, L. T. and Austgulen, R. (1989a). Evidence that tumor necrosis factor induced by aminated β 1-3D polyglucose is mediated by a concerted action of local and systemic cytokines. *Scand. J. Immunol.* **30**, 687-694.
- Seljelid, R. (1989b). Tumor regression after treatment with aminated β 1-3D polyglucose is initiated by circulatory failure. *Scand. J. Immunol.* **29**, 181-188.
- Soon-Shiong, P., Otterlei, M., Skjak-Braek, G. et al. (1991). An Immunologic basis for the fibrotic reaction to implantation microcapsules. *Transplant. Proc.* **23**, 758-9.
- Stanton, G. J. and Baron, S. (1984). Interferon and viral pathogenesis. In *Concepts in viral pathogenesis* (A. L. Notkins and M. B. A. Oldstone) Springer, New York.
- Stossel, T. P. (1973). Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood.* **42**, 121-130.
- Takahashi, K., Watanuki, Y., Yamazaki, M., Abe, S. (1988). Local induction of a cytotoxic factor in a murine tumor by systemic administration of an antitumor polysaccharide. *MGA. J. Cancer.* **57**, 170-179.
- Thomas, P. M. and Edginton, S. (1984). Hummam monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* **132**, 1980-1986.
- Wagner, H., Stuppner, H., Schafer, W., Zenk, M. (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echnacea purpurea* cellcultures. *Phytochemistry.* **27**, 119-124.
- Yu, Y. Y. L., Kumar V., and Bennett, M. (1992). Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Ann Rev Immunol* **10**, 189-214.