

## 밀 arabinoxylan의 면역세포 활성화 작용

최은미 · 임태수<sup>1</sup> · 이혜림<sup>1</sup> · 황재관\*

연세대학교 생물산업소재연구센터, <sup>1</sup>연세대학교 생물소재공학과

## Immune Cell Stimulating Activity of Wheat Arabinoxylan

Eun-Mi Choi, Tae-Soo Lim, Hye-Lim Lee and Jae-Kwan Hwang\*

Bioproducts Research Center, Yonsei University

<sup>1</sup>Department of Biomaterials Science and Engineering, Yonsei University

Effects of wheat arabinoxylan on mouse spleen lymphocytes and peritoneal macrophages were examined *in vitro*. Among three wheat arabinoxylans (A1: low MW, A2: medium MW, A3: high MW), A3 (50-100 µg/mL) increased the viability of spleen lymphocytes up to 114-125% of the control. A1 and A3 (20 µg/mL) increased the viability of lipopolysaccharide-treated lymphocytes synergistically. Viability of murine peritoneal macrophages treated with wheat arabinoxylans (10-100 µg/mL) was increased up to 135-175% of the control. The cytotoxic activity of macrophages against murine lymphocytic leukemic cell increased in the presence of wheat arabinoxylan. Phagocytic index of macrophages treated with wheat arabinoxylans (20 µg/mL) significantly increased 197-232% compared with the control, and lysosomal phosphatase and myeloperoxidase activities also increased significantly ( $p < 0.05$ ). Treatment of wheat arabinoxylans tended to decrease nitrite production, but significantly stimulated  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  productions of macrophages ( $p < 0.05$ ). These results indicate that the immunostimulating effect of wheat arabinoxylan may be closely related with lysosomal enzyme activity and reactive oxygen intermediate production of macrophages.

**Key words:** arabinoxylan, macrophage, phagocytosis, lysosomal enzyme,  $H_2O_2$

### 서 론

면역체계에서 중추적인 역할을 하는 B, T 림프구, 대식세포 등은 세포 분화를 거치면서 활성화된다. 이들의 초기활성화는 이종 단백질이나 미생물, 종양세포, 바이러스 감염세포 등과 같은 면역원들이 림프구의 세포막 수용체들과 특이적 또는 비특이적 결합을 통하여 세포내로 일련의 신호를 줌으로써 개시된다. 이러한 면역세포의 초기활성화와 관련된 신호전달 과정에 대한 분자 단계의 연결과 조절 현상들이 최근에 밝혀지면서 천연 및 합성 물질들을 대상으로 면역 조절 물질을 탐색 개발하려는 시도가 활발히 진행되고 있다<sup>(1,2)</sup>. 항암 활성을 나타내는 다당류에 대한 연구는 주로 보체계의 활성화, 면역세포의 증식, 항체 생성, phagocyte 수용체에 미치는 영향에 집중되었으나 항암 작용의 생화학적 기전은 완전

히 밝혀지지 않았다. 연구 결과를 종합해 볼 때 항암성 다당류는 대식세포를 중심으로 한 비특이적인 숙주 저항성을 유도하여 면역계 활성화에 의해 암세포 성장을 억제하는 것으로 여겨진다<sup>(3)</sup>.

밀은 전세계적인 주요 작물 중 하나이며 전체 곡류 생산 중 거의 30%를 차지하는 주된 에너지 급원으로서, 밀가루 뿐 아니라 밀 부산물의 생리활성에 대한 관심이 높아지고 있다. 밀 배아 세포벽의 주된 다당류는 pentosan인 arabinoxylan으로 이는 5탄당인 arabinose와 xylose로 구성되어 있다<sup>(4)</sup>. 밀 배아의 arabinoxylan은  $\alpha$ -(1→2)-와  $\alpha$ -(1→3)-으로 연결된 arabinose의 매우 짧은 곁가지로 분지된  $\beta$ -(1→4)-xylan 골격을 가진 고도로 분지된 구조를 보이며 곁가지의 말단 비환원 위치에 glucuronic acid와 이의 4-O-methyl ether도 존재한다<sup>(5)</sup>. 한편 미강에서 추출된 arabinoxylan이 NK(natural killer) cell의 암세포 독성 효과를 증가시킨다고 보고<sup>(6)</sup>되었으므로 밀에서 분리된 arabinoxylan도 이와 같은 면역세포 활성화 작용을 가질 것으로 기대해 볼 수 있다.

이에 본 연구에서는 *in vitro*에서 마우스 비장 림프구와 복강 대식세포를 대상으로 밀 배아에서 분리된 arabinoxylan의 면역세포 활성화 활성을 살펴보았다.

\*Corresponding author : Jae-Kwan Hwang, Bioproducts Research Center, Yonsei University, 134, Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea  
Tel: 82-2-2123-3596  
Fax: 82-2-312-6821  
E-mail: jkhwang@yonsei.ac.kr

## 재료 및 방법

### 재료

밀 배아에서 분리된 arabinoxylan은 Megazyme Co.(Australia)에서 제공받았으며 제조된 제품의 분자량 차에 따라 A1(low MW), A2(medium MW), A3(high MW)로 구분하였다. 양성 대조군으로 사용된 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma 사(USA)에서 구입하였다. 각 시료는 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline, Sigma, USA)에 녹인 후 0.22 µm filter(Nalgene Nunc Co., Denmark)로 여과 멸균하여 실험에 사용하였다.

### 실험동물 및 세포주

생후 7주된 female Balb/c 마우스(체중 20 g)를 (주)샘타코에서 구입한 후 일주일 정도 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 murine leukemia cell line인 YAC-1 cell(한국세포주은행)을 세포독성 시험의 표적세포로 사용하였다. 세포를 배양하기 위해서 10% FBS(fetal bovine serum, GIBCO, USA)가 함유된 RPMI1640 배지(GIBCO, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>와 37°C를 유지하면서 배양하였다.

### 비장에서 림프구의 분리

마우스로부터 얻은 비장을 DPBS로 씻은 후 5 mL의 10% FBS가 함유된 RPMI1640 배양액 속에서 절제하고 배양액을 첨가하여 200×g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포들을 배양액으로 한번 더 씻은 다음, 다시 배양액을 첨가하여 동량의 Lympholyte<sup>®</sup>-Rat 용액(Cedarlane, Canada) 위에 얹은 후 1,200×g에서 20분간 원심분리하였다. 중간 층의 림프구를 모아 배양액으로 세척한 후 glass petri-dish에 넣고 37°C에서 1 h 동안 배양한 후 상층의 림프구들을 수집하여 시료로 처리한 후 24시간 배양하였다<sup>(1)</sup>.

### 복강 대식세포의 유도 및 분리

희생 3일 전 마우스 복강에 4% thioglycolate(DIFCO, Detroit, USA) 2 mL를 주사하여 대식세포를 유도하였다. 마우스를 희생시키고 복강에 8 mL의 RPMI1640 배지를 주입하여 부드럽게 마사지하고 복강세포를 수확하였다. 회수한 복강세포를 배지로 2회 세척한 후 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지를 사용하여 1×10<sup>6</sup> cells/mL 농도로 희석하였다. 세포액 0.2 mL을 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2 h 배양하여 monolayer를 형성하게 되면 비부착세포를 제거하였다. Trypan blue dye exclusion test, 탐식지표, 및 형태학적 관찰을 통해 살아있는 대식세포가 98% 이상임을 확인하였다<sup>(7)</sup>. 대식세포는 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지로 3회 세척하였으며 여러 농도의 시료 용액으로 처리하여 24 h 배양하였다<sup>(8)</sup>.

### 세포 생존능 측정

세포 생존능은 MTT assay로 측정하였다<sup>(9)</sup>. 시료로 처리된 세포에 50 µL MTT(3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) 용액(2 mg/mL)을 첨가하고 2 h 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하고 150 µL DMSO(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 540 nm에서

흡광도를 측정하였다.

### 암세포에 대한 대식세포의 세포독성시험

분리한 대식세포에 시료를 가하고 암세포(대식세포의 10%)와 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양한 후 50 µL의 MTT(2 mg/mL)를 가하고 2 h 배양하였다. 상층 제거 후 150 µL DMSO를 가해 formazan 결정을 용해하고 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 의해 세포 독성을 계산하였다.

암세포 독성(%) =

$$100 - \frac{O.D.(대식세포 + 암세포) - O.D.(대식세포)}{O.D.(암세포)} \times 100$$

### Phagocytic index 측정

복강 대식세포(1×10<sup>6</sup> cell/well)를 8-well chamber에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 90 min 배양한 후 10% FBS가 함유된 RPMI1640 배지로 3회 세척하고 시료가 첨가된 배지로 처리하여 24 h 배양하였다. 배양 후 10% FBS-RPMI1640 배지로 3회 세척하였고 같은 배지 200 µL와 0.5% latex bead (2 µm) 10 µL를 첨가하고 37°C에서 60 min 반응시켰다. 반응 후 DPBS로 2회 세척하였고 MeOH 200 µL를 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 고정시켰다. Giemsa 염색용액(0.4% in 20 mM phosphate buffer: 6.63% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.56% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 200 µL를 첨가하여 10 min 정도 상온에 방치한 후 DPBS로 2회 세척하여 상온에서 건조시켰다. Phagocytic index는 총 200개의 대식세포 중 6개 이상의 bead를 포함한 세포의 수로서 대조군에 대한 %로 나타내었다<sup>(10)</sup>.

### Lysosomal phosphatase 활성 측정

시료로 24 h 처리된 배양액을 제거하고 0.1% triton X-100을 25 µL 가하여 세포를 용해시킨 후 기질 용액인 p-nitrophenylphosphate(Sigma, USA) 200 µL를 첨가하여 37°C에서 30 min 반응시켰으며 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>(11)</sup>. Phosphatase 활성은 p-nitrophenylphosphate로부터 생성되는 p-nitrophenol을 측정하여 대조군에 대한 %로 나타내었다.

### Myeloperoxidase 활성 측정

시료로 24 h 처리된 배양액을 제거하고 배지로 3번 씻은 후 반응 혼합액(0.4 mg/mL o-phenylene diamine and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pH 5 phosphate-citrate buffer)을 100 µL 첨가하여 10 min 후에 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 중지하고 492 nm에서 흡광도를 측정하였고 myeloperoxidase 활성의 지표는 O.D.<sub>492</sub>×100으로 계산하여 대조군에 대한 %로 나타내었다<sup>(12)</sup>.

### Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 생성의 지표로서 배양액 내로 유리된 nitrite 양을 측정하였다. 96 well plate에 배양액 100 µL와 100 µL의 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid: 1% N-naphthylamine-2HCl in water = 1:1(v/v))을 혼합하여 실온에서 15 min 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>(3)</sup>.

### Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생성량 측정

Hydrogen peroxide 분비 정도는 fluorescence spectrophotometer(Varian Co., Australia)를 이용하여 측정하였다. 시료로 처리된 세포를 0.9% NaCl 용액으로 여러 번 세척한 후 30 μM scopoletin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 purpurgallin-unit/mL horseradish peroxidase, 및 100 μg/mL phorbol myristic acetate(PMA)를 포함한 반응액을 100 μL씩 첨가하여 37°C에서 2 h 반응시킨 후 excitation 360 nm, emission 460 nm에서 scopoletin 형광의 감소도를 측정하였다<sup>(13)</sup>.

### Superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) assay: NBT reduction

푸른색 formazan으로의 NBT 환원을 이용한 superoxide assay는 비록 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 완전히 특이적이지는 않지만 superoxide 생성을 측정하기 위한 간편한 실험법으로 사용되고 있다<sup>(14)</sup>. 밀 arabinoxylan으로 24 h 처리된 복강 대식세포의 상층액을 제거한 후 RPMI1640 배지로 세척한 후 100 μg/mL PMA를 포함한 600 μg/mL NBT 반응액을 50 μL 첨가하여 2 h 배양시킨 후 상층액을 제거하고 methanol로 2회 세척한 후 140 μL DMSO로 결정을 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성의 지표는 O.D.<sub>540</sub>×100으로 계산하여 대조군에 대한 %로 나타내었다.

### 자료 분석

실험결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며 집단간의 차이는 일원분산분석(one-way ANOVA)을 사용하여 유의성을 검증하였다(p<0.05).

**Table 1. Effect of wheat arabinoxylans on the viability of mouse spleen lymphocytes**

Treatment	Treated dose (μg/mL)	Viability (% of control)
Control	-	100
A1	5	104
	20	107
	50	106
	100	114
A2	5	110
	20	119
	50	109
	100	106
A3	5	104
	20	105
	50	114*
	100	125*
LPS	5	132*
	20	137*
	50	129*
	100	119*

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h. \*P<0.05; significantly different from control.

## 결과 및 고찰

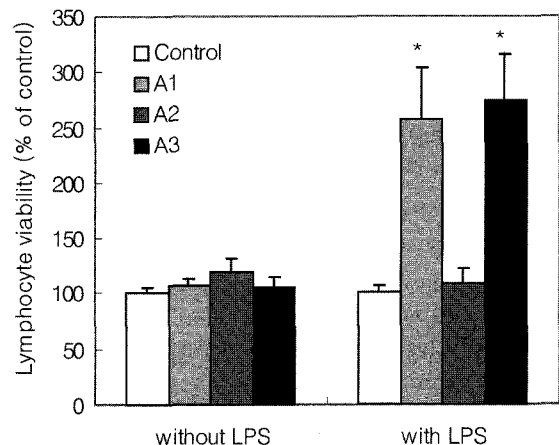
### 밀 arabinoxylan에 의한 마우스 비장 림프구 생존능

밀 배아에서 제조 방법을 달리하여 추출한 분자량이 다른 세 가지 arabinoxylan인 A1, A2 및 A3이 비장 림프구 생존능에 미치는 영향을 MTT assay로 측정하여 양성 대조군인 LPS와 비교하여 관찰한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 A3이 50, 100 μg/mL 농도에서 각각 114, 125%의 유의적인 증식능을 보인 것을 제외하고 A1과 A2는 사용된 모든 농도(5~100 μg/mL)에서 LPS에 비해 유의적으로 비장 림프구의 생존능을 증가시키지 못했다(p<0.05). 그러나 비장 림프구에 10 μL/mL LPS를 첨가하여 활성화된 상태에서 20 μL/mL arabinoxylan을 처리한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 A1과 A3이 대조군에 비해 각각 257%와 274% 정도로 비장 림프구의 생존능을 유의적으로 증가시켰다(P<0.05).

김 등<sup>(15)</sup>은 홍삼에서 분리한 중성다당체는 림프구 증식능을 보이지 않았고 산성다당체가 1 mg/mL 농도에서 최대 림프구 증식능을 보였으며 다당체의 산성도가 증가함에 따라 림프구 증식능이 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 밀 arabinoxylan은 중성다당체로서 대체로 통계적 유의성을 보이지는 않았으나 A3이 50 μg/mL 이상의 농도에서 림프구 생존능을 증가시키고 LPS와 함께 저농도로 배양하였을 때 상승작용(synergy effect)이 있는 것으로 보아 분자량이 상대적으로 높은 arabinoxylan이 림프구 생존 증가에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

### 밀 arabinoxylan이 마우스 복강 대식세포 생존에 미치는 영향

밀 arabinoxylan이 마우스 복강 대식세포의 생존에 미치는 효과를 MTT assay로 관찰한 결과 Table 2에서 보는 바와 같



**Fig. 1. Effect of wheat arabinoxylans on the viability of mouse spleen lymphocytes stimulated with LPS.**

Mouse spleen lymphocytes were treated with vehicle or 20 μL/mL arabinoxylans (A1, A2, and A3) in the presence of LPS (10 μL/mL) for 24 h. The viability was expressed as a percentage of control (mean±SD). The control values in the absence or presence of LPS were 0.14±5.70, 0.21±6.21 respectively. \*P<0.05; significantly different from control.

**Table 2. Effect of wheat arabinoxylans on the viability of mouse peritoneal macrophages**

Treatment	Treated dose (µg/mL)	Viability (% of control)
Control	-	100
A1	5	117
	10	135*
	20	143*
	50	144*
	100	158*
A2	5	174*
	10	171*
	20	171*
	50	165*
	100	160*
A3	5	132
	10	158*
	20	156*
	50	175*
	100	174*
LPS	5	152*
	10	147*
	20	135*
	50	118
	100	118

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h. \*P<0.05: significantly different from control.

이 A1은 10~100 µL/mL 농도에서 대조군에 비해 135~158%의 유의적인 생존 증가를 나타내었고 A2는 사용된 모든 농도(5~100 µL/mL)에서 160~174%의 유의적인 증가를 보였으며 A3의 경우는 10~100 µL/mL 농도에서 156~175%의 유의적인 생존 증가 효과를 나타내었다(p<0.05). 양성대조군으로 사용한 LPS가 저농도에서 유의적인 활성을 보이고 이후에 감소하는 경향을 보이는 데 비해 arabinoxylan은 지속적으로 세포 생존을 증가시키는 경향을 보였다. 따라서 밀 arabinoxylan은 비장 림프구보다는 복강 대식세포에 더 효과적으로 작용하여 생존을 증가시키는 것을 알 수 있었고 이 후에는 복강 대식세포의 활성을 중심으로 면역세포 활성화 작용을 살펴보았다.

**밀 arabinoxylan이 마우스 복강 대식세포의 암세포 살해능에 미치는 영향**

밀 arabinoxylan A1, A2, 및 A3과 양성 대조군인 LPS를 첨가하여 배양한 마우스 복강 대식세포의 암세포 살해능을 MTT assay로 관찰한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 5~100 µL/mL 농도에서 대조군에 비해 A1은 165~346%, A2는 152~315%, A3은 282~589%, LPS는 718~797% 정도로 암세포 살해능을 증가시켰으나 LPS 군과 5 µg/mL 농도의 A3을 제외한 모든 군에서 통계적 유의성을 보이지는 않았다(p<0.05).

**Table 3. Effect of wheat arabinoxylans on the cytotoxic activity of mouse peritoneal macrophages against cancer cell.**

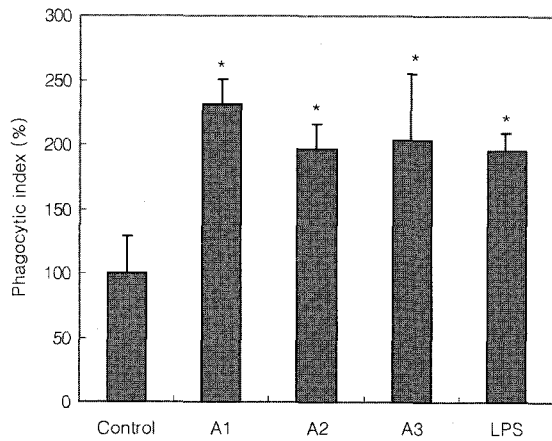
Treatment	Treated dose (µg/mL)	Cytotoxicity (%)	% of control
Control	-	15.31±24.97	346
A1	5	52.96±7.97	206
	10	31.60±13.30	165
	20	25.19±1.28	249
	50	38.15±20.37	316
	100	48.40±26.67	346
A2	5	38.89±25.19	254
	10	48.15±35.93	315
	20	38.15±10.74	249
	50	23.21±13.90	152
	100	33.89±6.85	221
A3	5	90.12±6.83*	589
	10	59.38±23.89	388
	20	50.25±13.43	328
	50	43.21±23.73	282
	100	46.67±10.00	305
LPS	5	113.21±17.15*	740
	10	121.98±4.70*	797
	20	109.88±5.29*	718
	50	116.30±7.92*	760
	100	115.56±9.71*	755

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h. The results were expressed as the mean±S.D. of six wells from three independent experiments. \*P<0.05: significantly different from control.

**밀 arabinoxylan이 마우스 복강 대식세포의 식세포 작용에 미치는 영향**

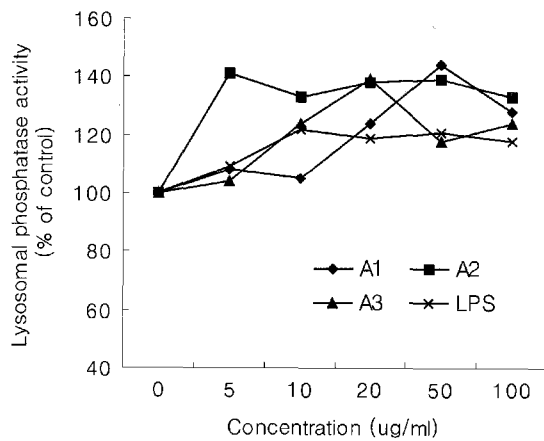
밀 arabinoxylan이 활성화된 대식세포의 식세포 작용(phagocytic activity)에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 세포를 자극시키는 bead를 사용하였다. 대식세포가 활성화되면 첨가된 bead를 외부 이물질로 인식하게 되어 세포내로 흡수하게 된다. 이를 이용하여 phagocytic index를 측정된 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 arabinoxylan 시료 A1, A2, A3과 양성대조군으로 사용한 LPS를 20 µg/mL 농도로 처리했을 때, 대조군에 비하여 각각 232, 197, 203, 및 195%의 유의적인 증가 효과를 나타내어 밀 arabinoxylan이 대식세포의 식세포 작용을 증가시킴을 알 수 있었다(p<0.05).

대식세포의 lysosome 내에 들어있는 phosphatase는 대표적인 가수분해 효소로서 탐식능이 왕성한 세포에 다량 존재하며, 물질대사가 활발하고 흡수기능이 왕성한 대식세포에서는 일반적으로 phosphatase 활성이 높아진다<sup>(16)</sup>. 즉, 대식세포가 이물질이나 LPS와 같은 mitogen의 자극을 받아 활성화되면 이물질을 탐식하여 lysosomal enzyme인 phosphatase를 생성하여 이물질을 분해한다. 따라서 대식세포의 lysosomal phosphatase를 측정하여 밀 arabinoxylan이 mitogen으로 작용할 수 있는지 살펴보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 A1은 20, 50 및 100 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 각각 124, 144, 128%



**Fig. 2. Effect of wheat arabinoxylans on the phagocytic index of mouse peritoneal macrophages.**

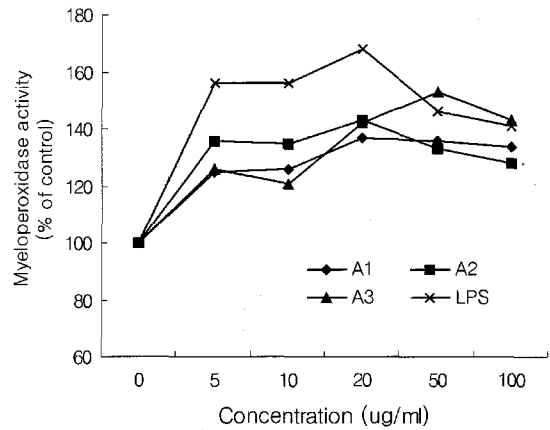
The results were expressed as the mean±S.D. of three chambers from three independent experiments. \*P<0.05: significantly different from control.



**Fig. 3. Effect of wheat arabinoxylans on the lysosomal phosphatase activity of mouse peritoneal macrophages.**

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h.

의 유의적인 phosphatase 활성 증가를 보였으며 A2는 사용한 모든 농도(5~100 µg/mL)에서 약 133~141%의 유의적인 증가를 보였고 A3은 20 및 50 µg/mL 농도에서 각각 139와 118%의 유의적인 증가를 나타내었으며 양성대조군으로 사용한 LPS는 10~100 µg/mL 농도에서 약 118~122% 정도로 lysosomal phosphatase 활성을 증가시켰다(p<0.05). Myeloperoxidase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에서 chloride가 hypochlorite(HOCl)로 산화되는 반응을 촉매하는 효소로서 대식세포의 탐식 기능을 측정할 때 많이 사용되는 지표이다. 대식세포에 밀 arabinoxylan과 양성대조군인 LPS를 5~100 µg/mL 농도로 24 h 처리한 후 myeloperoxidase 활성 지표를 측정하였을 때 (Fig. 4), 대조군에 비해 A1은 125~137%, A2는 128~143%, A3는 121~153%, LPS는 141~168% 정도로 myeloperoxidase 활성을 증가시켰으며 A2는 20 µg/mL 농도에서만 통계적 유의성을 나타내었고 이를 제외한 다른 시료들은 10 µg/mL 이상의 농도에서 대조군에 대한 유의적인 차이를 나타내었다 (p<0.05).



**Fig. 4 Effect of wheat arabinoxylans on the myeloperoxidase activity of mouse peritoneal macrophages.**

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h.

따라서 밀 arabinoxylan은 대식세포의 탐식 기능을 증가시키며 이와 관련된 lysosomal enzyme의 활성을 증가시켜 이 물질의 분해를 촉진할 것으로 생각되었다.

**밀 arabinoxylan이 마우스 복강 대식세포의 산화물 생성에 미치는 영향**

대식세포가 활성화될 때 분비되는 과산화물의 일종인 nitric oxide(NO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 및 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성을 관찰하였다. 밀 arabinoxylan 시료 A1, A2, 및 A3을 농도별(5~100 µg/mL)로 복강 대식세포에 첨가하여 24 h 배양한 후 상등액을 취하여 생성된 NO의 안정한 산화물 형태인 nitrite를 측정하여 시료 무첨가군과 양성대조군인 LPS 군과 비교하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 LPS는 사용된 모든 농도에서 대조군에 비해 대식세포의 NO 분비를 166~177% 정도 유의적으로 증가시킨 반면, arabinoxylan 시료는 A1과 A3이 5 µg/mL 농도에서만 각각 114, 113% 정도 증가시켰고, 이를 제외한 나머지 농도에서 arabinoxylan은 오히려 NO 생성을 감소시키는 경향을 나타내었으며 A1의 경우 50과 100 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 각각 90, 89 %의 유의적인 NO 감소 효과를 보였다(p<0.05). 활성화된 대식세포에서 생성되는 NO는 숙주 방어 기전에 중요한 역할을 한다고 보고<sup>(17)</sup>되었으나 본 연구에서 밀 arabinoxylan이 NO 생성을 증가시키지 못한 것으로 미루어보아 밀 arabinoxylan의 대식세포 활성 증진 효과는 NO를 매개하지 않는 것으로 생각되었다.

세균과 같은 이물질을 대식세포가 탐식하게 되면 산소를 이용하는 대사가 촉진되어 산소의 소모가 급격히 증가하게 된다. 즉, 이 과정에서 탐식세포 막에 있는 효소에 의하여 산소가 superoxide anion으로 되고 계속하여 hydroxyl group, singlet oxygen 및 hydrogen peroxide를 생성하게 되는데 이들을 반응성 산소종(ROI)이라 하며 이들이 탐식세포내의 살균작용 및 세포독성작용에 중요한 역할을 하는 것으로 많은 연구가 보고되고 있다<sup>(18)</sup>. 그러나 대식세포는 이러한 기능을 항상 보유하고 있는 것은 아니며 외부로부터의 자극에 의해서 활성화되었을 때 비로소 그 기능을 나타낸다. 본 연구에서 밀 arabinoxylan이 대식세포가 분비하는 ROI 중에서

hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 대식세포에 밀 arabinoxylan을 5~100 µg/mL 농도로 24 h 처리한 후 assay system에 phorbol myristic acetate(PMA)가 첨가되어 유도된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 측정된 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 arabinoxylan A1과 A3은 사용한 모든 농도(5~100 µg/mL)에서 대조군에 비해 각각 120~135%, 132~138% 정도로 유의적인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 증가를 나타내었다(p<0.05). 그러나 A2는 5 µg/mL 농도에서만 대조군에 비해 115% 증가하였고 나머지 농도에서는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 양성 대조군으로 사용한 LPS는 저농도(5~20 µg/mL)에서만 대조군에 비해 118~128%의 유의적인 증가를 보였고 전체적으로 볼 때 각 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성능은 A3>A1>LPS>A2의 순으로서 비록 집단간에 통계적 유의성은 없었으나(p<0.05) arabinoxylan A3과 A1이 효과적으로 대식세포의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 증가시킴을 알 수 있었다. 한편, 대식세포의 respiratory burst 능력을 관찰할 때 보통 O<sub>2</sub><sup>-</sup>를 측정하게 되며 이 superoxide anion 생성 측정에 일반적으로 간편한 NBT 환원법을 널리 사용하고 있다. 밀 arabinoxylan 시료를 5~100 µg/mL 농도로 대식세포에 처리한 후 NBT 환원법으로 대식세포의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성 지표를 측정하였다. Table 4에서와 같이 밀 arabinoxylan 시료는 모두 10 µg/mL 이상의 농도에서 A1은 154~173%, A2는 138~173%, A3은 141~171% 정도로 대조군에 비해 유의적으로 대식세포의 NBT 환원을 증가시켰고(p<0.05) 20 µg/mL 이상의 농도에서는 양성대조군으로 사용한 LPS보다 높은 경향을 나타내었다. 따라서 밀 arabinoxylan은 NO가 아닌 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 및 이와 관련된 ROI의 생성을 증가시킴으로서 대

식세포의 기능에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되었다.

다당류의 면역 증강 작용에 관한 연구에서 다당류 유도체의 이온기와 적절한 수용성 정도가 림프구 자극 활성화에 중요하다 보고되었다<sup>(19)</sup>. 이온기들을 적절하게 도입하게 되면 intact(1→3)-α-glucan의 수용성을 증가시킬 뿐 아니라 분자 내와 분자들 사이의 수소 결합을 변화시켜 electrostatic repulsion 효과를 증진시키므로 수용액상에서 polymer 사슬이 어떤 구조와 결합하기 쉬워진다고 한다<sup>(20)</sup>. 대식세포의 자극, Fc receptor 발현 및 항보체 활성을 나타내는 펙틴 다당류의 활성 부위를 밝혀내기 위한 연구가 많이 수행되었는데<sup>(21-23)</sup>, 이들 활성화에 대해서 ramified region이 활성 부위로서 중요하다고 제시되었고 신 등<sup>(24)</sup>은 대식세포의 Fc receptor 발현 증진 및 IL-6 생성을 증가시키는 인삼 잎 다당체가 rhamnogalacturonin II라고 보고하였다. 또한 Matsumoto와 Yamada<sup>(25)</sup>는 *Bupleurum falcatum* L.의 펙틴 다당류가 PKC(protein kinase C)나 PKA(protein kinase A) 경로가 아니라, calmodulin을 활성화시켜 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키는 기전으로 대식세포의 Fc receptor 상응을 유도한다고 보고하였다. 그 밖에 β-1,3-D-polyglucose 유도체가 대식세포를 활성화시켜 IL-6 생성을 유도하며<sup>(26)</sup>, *Echinacea purpurea*에서 추출한 다당체가 대식세포의 TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 생성을 유도하였다고 보고되었으므로<sup>(27)</sup> 이러한 연구들에 근거하여 볼 때 밀에서 분리한 다당류 arabinoxylan도 대식세포의 cytokine 생성 및 receptor 발현 자극에 효과적일 것으로 여겨진다.

결론적으로, 인류의 식생활에서 중요한 자리를 차지해 온 밀의 다당류 성분은 대식세포의 활성을 증가시키며 이러한

**Table 4. Effect of wheat arabinoxylans on the oxidative stress of mouse peritoneal macrophages**

Treatment	Dose (µg/mL)	Myeloperoxidase activity	Nitrite production	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> production	NBT reduction
Control	-	100 <sup>1)</sup>	100	100	100
A1	5	125*	114*	135*	105
	10	126*	96	134*	154*
	20	137*	95	130*	159*
	50	136*	90*	123*	173*
	100	134*	89*	120*	158*
A2	5	136	94	115*	160*
	10	135	91	109	173*
	20	143*	91	107	162*
	50	133	94	100	163*
	100	128	105	103	138*
A3	5	126	113*	138*	101
	10	121*	93	137*	141*
	20	142*	94	137*	167*
	50	153*	94	134*	171*
	100	143*	94	132*	163*
LPS	5	156*	168*	128*	147*
	10	156*	171*	122*	151*
	20	168*	170*	118*	145*
	50	146*	177*	112	144*
	100	141*	166*	109	115*

Mouse peritoneal macrophages were treated with vehicle or arabinoxylans (A1, A2, and A3) and LPS for 24 h. <sup>1)</sup>Results were expressed as % of control. \*P<0.05: significantly different from control.

면역 증진 효과로 인해 각종 세균의 침입을 방지하여 세균성 질환을 예방할 뿐 아니라 체내에서 돌연변이된 세포를 효율적으로 제거시킴으로써 암 등 각종 성인병을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 arabinoxylan의 분자량, 구성당의 분포 및 결합방식 등의 분자 미세구조가 면역활성에 미치는 영향에 대한 보다 세부적인 연구가 필요하다.

## 요 약

밀 배아에서 제조된 arabinoxylan(A1: low MW, A2: medium MW, A3, high MW)의 면역세포 활성화 작용을 *in vitro*에서 마우스 비장 림프구와 복강 대식세포를 대상으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 밀 arabinoxylan으로 처리된 마우스 비장 림프구의 생존능을 살펴보았을 때 50, 100 µg/mL 농도에서 A3이 비장 림프구의 생존을 증가시켰고 비장 림프구에 10 µL/mL LPS를 첨가하여 활성화된 상태에서 20 µL/mL arabinoxylan을 처리한 결과 A1과 A3이 대조군에 비해 비장 림프구의 생존을 유의적으로 증가시켰다 ( $P<0.05$ ). 마우스 복강 대식세포의 생존을 관찰한 결과 10~100 µL/mL 농도에서 A1과 A3은 대식세포의 생존을 유의적으로 증가시켰다( $p<0.05$ ). 대식세포의 암세포 살해능을 살펴보았을 때 5 µg/mL 농도의 A3이 암세포독성을 유의적으로 증가시켰으며, phagocytic index를 측정된 결과 arabinoxylan을 20 µL/mL 농도로 처리했을 때, 대조군에 비하여 유의적인 증가 효과를 나타내어 밀 arabinoxylan이 대식세포의 식세포 작용을 증가시킴을 알 수 있었다( $p<0.05$ ). 또한 arabinoxylan은 대식세포의 lysosomal phosphatase와 myeloperoxidase 활성을 유의적으로 증가시켰으며( $p<0.05$ ) NO 생성을 감소시키는 경향을 나타내었다. 대식세포에서 분비되는  $H_2O_2$ 의 양을 측정된 결과, arabinoxylan은 유의적인  $H_2O_2$  생성 증가를 나타내었고( $p<0.05$ ), NBT 환원법으로 대식세포의  $O_2^-$  생성 지표를 측정하였을 때, arabinoxylan은 유의적으로 대식세포의 NBT 환원을 증가시켰다( $p<0.05$ ). 이상의 결과로 미루어 볼 때, 밀 arabinoxylan의 면역세포 활성화 효과는 대식세포에서 분비되는 lysosomal enzyme 및 반응성산소종(ROI)의 생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

## 문 헌

- Lee, H.Y. and Lee, H.S. Stimulatory effect of Korean red-ginseng extract on the proliferation and cellular activity of lymphocytes. Korean J. Ginseng Sci. 22: 60-65 (1998)
- Kim, K.H., Lee, I.R., Jung, I.S., Chung, H.Y. and Yun, Y.S. The pattern of cytokine mRNA expression induced by polysaccharide from *Panax ginseng* C.A. Meyer. J. Ginseng Res. 22: 324-330 (1998)
- Han, M.D., Lee, E.S., Kim, Y.K., Lee, J.W., Jeong, H. and Yoon, K.H. Production of nitric oxide in Raw 264.7 macrophages treated with Ganoderan, the  $\beta$ -glucan of *Ganoderma lucidum*. The Korea J. Mycology 26: 246-255 (1998)
- Adams, G.A. Constitution of a hemicellulose from wheat bran. Can. J. Chem. 33: 56-67 (1955)
- Ring, S.G. and Selvedran, R.R. Isolation and analysis of cell wall material from beeswing bran (*Triticum aestivum*). Phytochemistry 19: 1723-1730 (1980)
- Ghoneum, M. Enhancement of human killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran (MGN-3). Int. J. Immunotherapy 14: 89-99 (1998)
- Saiki, I. and Fidler, I.J. Synergistic activation of recombinant mouse interferon- and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 135: 684-688 (1984)
- Klimetzek, V. and Remold, H.G. The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. Cell Immun. 53: 257 (1980)
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Loggia, R.D., and Yasumoto, T. Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. Toxicon 34: 965-974 (1996)
- Yoshida, T., Sakai, M., Kitao, T., Khil, S.M., Araki, S., Saitoh, R., Inpno, T. and Inglis, V. Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout. Oncorhynchus mykiss. Aquaculture 109: 209-214 (1993)
- Burstone, M.S. and Kalpow, L.S. Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoietic cells in healthy and in various hematological disorder using azo dye technique. J. Histochem. Cytochem. 12: 805 (1964)
- Pinegin, B.V., Butakov, A.A. and Shelcina, T.L. Complex of methods for determination of functional activity of phagocytosing cells. pp. 146-154 In: Ecological Immunology. Khaïtov, R.M., Pinegin, B.V. and Istamov, H.I. (eds.). Moscow: VNIRO. (1995)
- Kang, N.S., Moon, E.Y., Cho, C.G. and Pyo, S. Immunomodulating effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. Nutr. Res. 21: 617-626 (2001)
- Munoz, M., Cedeno, R., Rodriguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E. and Bachere, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191: 89-107 (2000)
- Kim, K.H., Jung, I.S., Chung, H.Y., Jo, S.K. and Yun, Y.S. Pre-clinical evaluation of polysaccharides extracted from Korea red-ginseng as an antineoplastic immunostimulator. Korean J. Ginseng Sci. 21: 78-84 (1997)
- De Duve, C. and Wattiaux, R. Functions of lysosome. Ann. Rev. Physiol. 28: 435 (1966)
- Nathan, C.F. and Hibbs, J.B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion Immunol. 3: 65-70 (1991)
- Klebanoff, S.J. Phagocytic Cells: Production of Oxygen Metabolism in Inflammation; Basic Principles and Clinical Correlates. pp. 391-444 (eds.) Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R. Raven Press, New York. (1988)
- Bao, X., Duan, J., Fang, X. and Fang, J. Chemical modifications of the (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. Carbohydrate Research 336: 127-140 (2001)
- Zhang, L.N., Zhang, M., Zhou, Q., Chen, J.H. and Zeng, F.B. Solution properties of antitumor sulfated derivative of  $\alpha$ -(1→3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2172-2178 (2000)
- Yamada, H. and Kiyohara, H. Complement activating polysaccharides from medicinal herbs. pp. 161-202. In: Immunomodulating Agents from Plants. Wagner, H. (ed.). Basel: Birkhauser (1999)
- Zhao, J.F., Kiyohara, H., Yamada, H., Takemoto, N. and Kawamura, H. Heterogeneity and characterization of mitogenic and anticomplementary pectic polysaccharides from roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et DC. Carbohydrate Research 219: 149-172 (1991)
- Matsumoto, T., Cyong, J.C., Kiyohara, H., Matsui, H., Abe, A., Hirano, M., Danbara, H. and Yamada, H. The pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L. enhances immune complexes binding to peritoneal macrophages through Fc receptor expression. Int. J. Immunopharmacology. 15: 683-693 (1993)
- Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H. Rham-

- nogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Mayer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydrate Research* 300: 239-249 (1997)
25. Matsumoto, T. and Yamada, H. Regulation of immune complexes binding of macrophages by pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L.: pharmacological evidence for the requirement of intracellular calcium/calmodulin on Fc receptor up-regulation by bupleuran 2IIb. *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 152-156 (1995)
26. Rasmussen, L.T. and Selhelid, R. The modulatory effect of lipoproteins on the release of interleukin 1 by human peritoneal macrophages stimulated with -1,3-polyglucose derivatives. *Scand. J. Immunol.* 29: 477-484 (1989)
27. Burger, R.A., Torres, A.R., Warren, R.P., Caldwell, V.D. and Hughes, B. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 19: 371-379 (1997)

---

(2002년 2월 20일 접수)