

Chitosan이 마우스의 정상 및 cyclophosphamide로 억제된 일차 체액성 면역반응에 미치는 영향

표명윤# · 광영희

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 14, 2002; Revised February 27, 2002)

Effects of Chitosan on the Normal and Cyclophosphamide-suppressed Primary Humoral Immune Response in Mice

Myoung-Yun Pyo[#] and Young-Hee Kwak

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, 140-742, Korea

Abstracts — In order to investigate the effects of chitosan on the normal and cyclophosphamide (CY)-suppressed primary humoral immune response in mice, chitosan was orally administered alone (single dose of 62.5, 250 mg/kg) or with CY (20 mg/kg, i.p.) to female ICR mice on the 2nd day before or after immunization with SRBC-antigen. When chitosan alone was administered before antigenic challenge, splenic IgM plaque forming cells (PFC) and splenic cellularity were slightly increased and serum IgM was not changed when compared with control group. However, chitosan significantly enhanced PFC, serum IgM and splenic cellularity when administered after antigenic challenge. The PFC numbers, serum IgM and splenic cellularity were significantly decreased by the treatment of CY, whereas those values were slightly increased by the concomitant treatment of CY and chitosan when compared with CY alone-administration. These results indicate that chitosan is able to increase normal humoral immunity (HI) and to slightly inhibit the suppressive effects of CY on HI.

Keywords □ Chitosan, cyclophosphamide, splenic IgM plaque forming cells, serum IgM, splenic cellularity

최근 환경오염물질이나 의약품의 부작용 및 노화로 인하여 유발되는 생체 면역기능의 변화를 조절하여 정상으로 회복시키거나 이러한 변화를 경감시킬 수 있는 생리활성물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다. Cyclophosphamide(CY)는 알킬화제로 장기이식 후 나타나는 거부반응의 억제 및 악성종양 치료목적으로 사용되고 있는데 비선택적인 독성으로 인하여 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 똑같은 독성을 발현하여 빈혈, 탈모증, 백혈구 감소, 혈소판 감소 등 부작용¹⁾이 심하여 장기적 사용에 어려움을 주고 있다. 또한, CY는 동물실험과 임상적인 사용에서 CY의 투여용량과 항원주사와의 관계 등 투여시기의 조건에 따라서는 면역기능을 억제²⁾할 뿐만 아니라 항진³⁻⁵⁾시킬 수도 있는 면역독성 작용이 강한 물질로 많은 연구에서 보고되어 있다. 따라서, 이

와같은 부작용이나 면역독성 작용을 경감시킬 수 있는 물질 발굴이 절실히 요구되고 있다.

Chitosan(D-glucosamine β -(1,4)-polymer)은 게, 새우 등의 갑각류나 버섯, 곰팡이 등의 식물류, 또는 곤충의 껍질 중에 포함되어 있는 chitin(N-acetyl-D-glucosamine β -(1,4)-polymer)의 부분적 탈아세틸화물이다. Chitosan과 그 여러 유도체들은 생체에 독성이 적으면서 대식세포를 활성화시키거나⁶⁾ T세포를 자극시켜 면역기능을 강화하고,⁷⁾ 림포카인이나 TNF의 생성을 자극하여 항암효과⁸⁾도 나타내며, 그 외에 항균,⁹⁾ 혈당·혈압강하, 간장기능강화, 세포재생, 진통, 지혈효과¹⁰⁾가 보고 되어 있다. 이와 같이, chitosan과 그 유도체에 대하여 여러 생리작용이 있다고 보고되면서 일본, 한국 등에서 건강식품으로 널리 사용되고 있다.

그러므로, 본 연구에서는 chitosan이 정상 마우스의 일차 체액성 면역반응과 CY 치료로 억제된 체액성 면역반응을 조절할 수 있는지를 검토하고자, chitosan을 경구적으로 단독투여하거나 CY와 병용투여하여 비장세포수, 비장세포중 IgM 용혈반 형성 세포

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9573 (팩스) 02-710-9573
(E-mail) mypyo@sdic.sookmyung.ac.kr

수 및 혈청중 IgM 항체를 측정하였다.

실험방법

실험재료 - 실험물질로는 chitosan(이화여대 전동원 교수 제공)과 cyclophosphamide(CY, Alkylloxan[®])를 사용하였고, guinea pig complement, anti-mouse IgM(whole molecule), RPMI 1640 medium powder, DMEM powder, FBS, HEPES 등은 Gibco사의 제품을, Con A, LPS, sodium azide, disodium p-nitrophenyl phosphate, alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgM, MTT 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. SRBC는 한국 미디어에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 특수도로 구입하여 사용하였다.

실험동물 - 3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행 중앙연구소로부터 분양받아 고형사료와 물을 자유로이 공급하면서 2~3주정도 실험동물실에 적응시킨 후, 체중 23 ± 2 g인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 $21 \sim 24^\circ\text{C}$, 습도는 40~60%로 유지하였고, 조명은 12시간 간격으로 조정하였다.

실험물질 조제 및 투여 - Chitosan powder를 사용직전에 1% acetic acid에 용해시킨 후 1N-NaOH로 pH를 6.5~7.0으로 조정하여 62.5 mg/kg, 또는 250 mg/kg을 단독 또는 CY와 병용하여 경구투여하였다. CY는 주사직전에 생리식염수에 용해하여 20 mg/kg을 복강내에 주사하였고, 대조군에는 생리식염수만을 동일한 방법으로 투여하였다.

비장세포 중의 IgM 항체 생성 세포수 측정 - 비장세포의 IgM 용혈반 생성 세포수(plaque forming cell, PFC)를 측정하기 위한 항원으로 한국미디어에서 구입한 면양혈액을 냉장보관하여 3주 이내에 사용하였다. 사용직전 PBS용액으로 3회 원심세척(2500 rpm, 5 min, 4°C)한 후, 면양적혈구(sheep red blood cell, SRBC) 농도가 2×10^9 cells/ml가 되도록 PBS용액으로 조정하여 이 부유액 0.2 ml를 면역일(day 0)에 모든 실험동물의 복강내에 주사하였다.

비장세포 중의 PFC수는 Cunningham의 방법¹¹⁾을 약간 변형시킨 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 비장세포 현탁액은 면역 일로부터 4일 후에 모든 실험동물군의 비장을 적출하여 병내의 HBSS에 넣고 teflon pestle을 이용하여 100 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer를 가한 후 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 일정량의 HBSS용액을 가하여 현탁시킨 후 Turk's solution으로 희석하여 Hemacytometer를 이용하여 현미경하에서 총 비장세포수를 계수하였으며,¹²⁾ trypan blue exclusion method¹³⁾로 viable cell수를 측정하여 1×10^6 cells/ml의 비장세포 현탁액을 만들었다. SRBC 부유액은 광장보관된 면양혈액을 사용직전에 HBSS용액으로 3회 원

심세척(2500 rpm, 5 min, 4°C)한 후 5×10^9 cells/ml의 농도로 부유시켜 만들었다. SRBC 부유액 0.5 ml, guinea pig complement 0.3 ml, 10% FBS-HBSS용액 2.0 ml를 혼합한 액 50 μl 와 비장세포 현탁액 50 μl 를 혼합하여 microchamber에 35 μl 씩 주입하고, vaseline과 paraffin(1 : 1) 혼액으로 밀봉하여 37°C 에서 1시간 방치한 후 형성되는 용혈반 생성 세포수를 현미경하에서 측정하였다. 측정된 PFC수를 비장세포 10^6 개중의 IgM 항체 생성 세포수로 환산하여 나타내었다.

혈청 중 IgM 항체 측정 - 항원(SRBC)주사 후 4일째에 마우스의 안정맥총에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였으며, 실험 직전에 혈청을 불활성화시킨 후 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 혈청 중의 SRBC에 대한 IgM 항체를 측정하였다. Anti-mouse IgM을 0.05% NaN_3 -PBS로 희석(1:1000)하여 96 well microtiter tray에 well당 50 μl 씩 가하여 4°C 에서 18시간 방치한 후 부착되지 않은 anti-mouse IgM 용액을 제거한 다음, 각 well을 washing solution으로 3회 세척하였다. 모든 세척과정은 이와 동일하게 행하였다. Milk protein 1 g에 0.02% NaN_3 -PBS를 가하여 100 ml로 한 blocking buffer를 각 well당 50 μl 씩 가한 후 37°C 에서 30분간 방치 후 세척하고, 각 실험군의 혈청을 blocking buffer로 8배 희석하여 각 well당 100 μl 씩 가한 다음 37°C 에서 1시간동안 방치한 후 세척하였다. Anti-mouse IgM phosphatase conjugate를 blocking buffer로 500배 희석하여 각 well에 50 μl 씩 가한 다음 37°C 에서 1시간 경과 후 세척하였다. 기질 용액(p-nitrophenyl phosphate)을 각 well당 50 μl 씩 가한 다음 37°C 에서 30분 경과한 후 1N-NaOH를 각 well당 50 μl 씩 가하여 반응을 종료시키고 microplate reader로 흡광도(405 nm)를 측정하여 실험군과 대조군의 흡광도를 비교하였다.

통계처리 - 각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고 대조군의 실험치와 비교하여 Student's *t*-test로 유의성을 검증하였으며, chitosan과 CY 병용투여군은 CY 단독투여군의 측정값과도 비교하여 유의성 검증을 하였다.

실험결과 및 고찰

항원주사 전 실험물질을 투여한 경우 - SRBC 항원주사 2일 전(day-2)에 chitosan(62.5, 250 mg/kg) 또는 CY(20 mg/kg)을 단독투여하거나 CY 20 mg/kg과 chitosan 250 mg/kg을 병용투여하고, IgM 항체 생성 세포수는 1차 면역 후 4일째에 최고에 달하므로¹⁴⁾ 항원주사 후 4일째(day 4)에 비장세포수, 비장세포중의 PFC 수 및 혈청 중의 IgM 항체 생성능을 측정하였다.

그 결과를 Table I에서 보면, 비장세포수는 chitosan의 고용량 투여군에서는 유의성은 없으나 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보이고, CY 투여군에서는 약간 감소하였으며, CY와 chitosan

Table I – Primary humoral immune response in mice administered with chitosan and/or CY before immunization (SRBC)

Exp. groups	Dose (mg/kg)	PFC/10 ⁶ splenocytes	IgM level (O.D.)	Spleen cellularity (× 10 ⁶ cells/spleen)
Control		964 ± 168	0.540 ± 0.091	204 ± 35
Chitosan I	62.5	1032 ± 190	0.560 ± 0.077	212 ± 68
Chitosan II	250	1183 ± 227*	0.483 ± 0.054	242 ± 75
CY	20	847 ± 167	0.456 ± 0.040	189 ± 41
CY+chitosan	20+250	1003 ± 227	0.499 ± 0.065	200 ± 38

Chitosan was orally administered with doses of 62.5, 250 mg/kg and/or cyclophosphamide (CY) was i.p injected with dose of 20 mg/kg to female ICR mice on the 2nd day before immunization. Mice were i.p. immunized with SRBC-antigen (day 0) and sacrificed on day 4 following immunization. IgM level (O.D., 405 nm) was determined by using ELISA in mice serum (1:8) obtained on day 4. Each group consists of 5 mice. Results are mean ± S.D. of 3 different experiments.

Significant difference from control group (*p<0.05).

Table II – Primary humoral immune response in mice administered with chitosan and/or CY after immunization (SRBC)

Exp. groups	Dose (mg/kg)	PFC/10 ⁶ splenocytes	IgM level (O.D.)	Spleen cellularity (× 10 ⁶ cells/spleen)
Control	-	1350 ± 327	0.612 ± 0.110	244 ± 38
Chitosan I	62.5	2034 ± 605**	0.745 ± 0.212	266 ± 75
Chitosan II	250	2178 ± 526**	0.781 ± 0.230*	276 ± 56
CY	20	98 ± 99**	0.346 ± 0.103**	139 ± 49**
CY+chitosan	20+250	125 ± 140**	0.398 ± 0.075**	182 ± 55**#

Chitosan was orally administered with doses of 62.5, 250 mg/kg and/or cyclophosphamide (CY) was i.p injected with dose of 20 mg/kg to female ICR mice on the 2nd day after immunization. Mice were i.p. immunized with SRBC-antigen (day 0) and sacrificed on day 4 following immunization. IgM level (O.D., 405 nm) was determined by using ELISA in mice serum (1:8) obtained on day 4. Each group consists of 5 mice. Results are mean ± S.D. of 3 different experiments. Significant difference from control group (*p<0.05, **p<0.01). Significant difference from CY group (#p<0.05).

을 병용투여한 군은 대조군과 비슷하여졌다. 또한, 비장세포 10⁶ 개당 SRBC 항원에 대한 PFC 수는 대조군에 비해 chitosan 62.5 mg/kg 투여군에서 다소 증가되었으며, 250 mg/kg 투여군에서는 유의성 있게(p<0.05) 증가되었다. CY 투여의 경우에는 대조군에 비하여 PFC 수가 다소 감소되고, CY 처리군에 chitosan을 병용투여시에는 감소된 PFC 수가 대조군과 비슷하게 되었으나 유의성은 없었다. Chitosan 투여에 의하여 혈청 중 IgM 항체 생성능은 대조군에 비해 뚜렷한 변화를 보이지는 않았고, CY 투여군은 대조군에 비해 IgM 항체 생성능이 약간 감소되었으며, chitosan을 병용투여함으로써 CY 투여군에 비해 다소 증가되는 양상을 보였으나 유의성은 없었다.

항원주사 후 실험물질을 투여한 경우 – SRBC 항원주사 2일 후(day 2) chitosan(62.5, 250 mg/kg) 또는 CY(20 mg/kg)을 단독투여하거나 CY 20 mg/kg과 chitosan 250 mg/kg을 병용투여하고, 항원주사 후 4일째(day 4)에 비장세포수, 비장세포중의 PFC 수 및 혈청 중의 IgM 항체 생성능을 측정할 결과는 Table II와 같다.

그 결과를 보면, chitosan을 62.5 mg/kg과 250 mg/kg 경구투여시 SRBC에 대한 PFC 수는 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 상당히 증가하였고, CY 투여시에는 현저히 유의성 있게 저하되었다. 이러한 CY의 체액성 면역반응의 저해작용은 이

미 여러 논문^{15,16}의 보고와 일치하고 있다. 그러나, CY와 chitosan을 병용투여한 경우에는 CY 투여군에 비해 유의성 없이 약간 증가하는 경향만을 보였는데, 이는 CY 투여 후 2일째에 비장을 취하여 실험하였으므로 CY의 세포독성이 최고에^{15,17} 달하여 chitosan이 CY의 면역독성을 감소시키지 못한 것으로 생각할 수도 있다. 또한, chitosan을 단독으로 경구투여시 IgM 항체 생성능도 유의성 있게 현저히 증가하였고, CY 투여군의 경우는 대조군에 비하여 유의성 있게 매우 낮은 항체 생성능을 나타내어 비장세포의 PFC 수에 미치는 영향과 비슷한 결과를 보였으며, CY 처리군에 chitosan을 병용투여한 경우 CY 처리로 감소된 IgM 항체 생성능에 큰 변화는 보이지 않았다. 비장세포수는 chitosan 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성은 없으나 다소 증가되는 경향을 보이고, CY 투여군의 경우에는 유의성 있게(p<0.01) 저하되었으며, chitosan과 병용투여로 CY 투여군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 다소 증가되었다.

결 론

Chitosan을 마우스에 SRBC 항원주사 전 또는 항원주사 후에 단독 또는 CY와 병용하여 경구투여하고 비장세포수, SRBC에 대한 IgM 항체 용혈반 생성 세포수(PFC) 및 혈청 중 IgM 항체 생

성능을 측정하여 chitosan이 정상 및 CY로 억제되는 일차 체액성 면역반응에 미치는 영향을 알아 보았다.

Chitosan을 항원주사 전에 단독으로 투여시 대조군에 비하여 비장세포수, PFC 수 및 혈청 중 IgM 항체 생성능이 다소 증가되는 경향만을 보였으나, 항원주사 후에 chitosan 투여시에는 유의성 있고 뚜렷한 증가현상을 나타내었다. 또한, chitosan을 CY와 병용투여함으로써 CY로 감소된 비장세포수, PFC 수 및 IgM 항체 생성능이 다소 증가되는 경향을 보여 주었다.

이상의 실험 결과, chitosan은 마우스의 일차 체액성 면역기능을 증가시키고 그 효과는 항원주사 후 투여시에 더욱 뚜렷하였으며, 체액성 면역기능을 억제하는 CY의 작용을 다소 경감시키는 경향을 보여 더욱 연구가 진행되어야 할 필요가 있다고 사료된다

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부의 여자대학교 연구기반 확충사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Balmer, C. and Valley, A. W. : Basic principles of cancer treatment and cancer chemotherapy. In *Pharmacotherapy* (J.T. Dipiro *et al*, Ed.), Elsevier, New York, p. 1902 (1992).
- 2) Diasio R. B, Lo Buglio A. F. : Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J.G. Hardman *et al*, Ed.), MacGraw-Hill, New York, p. 1291 (1996).
- 3) Berd D., Mastrangelo M. J, Engstrom P. F, Paul, A., Maguire, H. : Augumentation of the human immune response by cyclophosphamide. *Cancer Res.* **42**, 4862 (1982).
- 4) Mastrangelo, M. J., Berd, D., Maguire, H., Jr. : The immunozugumenting effects of cancer chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* **13**, 186 (1986).
- 5) Izai, T. S, Lin, J. S, Chow, N. H. : Modulation of antitumor immunity of tumor-bearing mice with low-dose cyclophosphamide. *J. Surg. Res.* **65**, 139 (1996).
- 6) Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avallone, B. and Balsamo, G. : Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* **15**, 1215 (1994).
- 7) Nishimura, K., Nishimura, S. and Azuma, I. : Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* **2**, 93 (1984).
- 8) Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Res.* **151**, 403 (1986).
- 9) Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* **28**, 903 (1984).
- 10) Malette, W., Quigley, H., Gaines, R., Johnson, N. and Gerald Rainer, W. : Chitosan: a new hemostatic. *Ann. Thorac. Surg.* **36**, 55 (1983).
- 11) Cunningham, A. and Szenberg, A. : Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *J. Immunol.* **14**, 599 (1968).
- 12) Mishell, B. B and Shiigi, S. M. : Preparation of mouse cell suspensions. In *Selected methods in cellular immunology* (B.B. Mishell and S. M. Shiigi, Ed.), Freeman, San Francisco, p. 14 (1980).
- 13) Mishell, B. B and Shiigi, S. M. : Preparation of mouse cell suspensions. In *Selected methods in cellular immunology* (B.B. Mishell and S. M. Shiigi, Ed.), Freeman, San Francisco, p. 16 (1980).
- 14) Robert, I. and Richard, W. : Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. *Science* **153**, 1004 (1966).
- 15) Balow, J., Parrillo, J. and Fauci, A. : Characterization of the direct effects of cyclophosphamide on cell-mediated immunological responses. *Immunol.* **32**, 899 (1977).
- 16) Winkelstein, A. : Mechanisms of immunosuppression: Effects of cyclophosphamide on cellular immunity. *Blood* **41**, 273 (1973).
- 17) Cox, P., Phillips, B. and Thomas, P. : The enzymatic basis of the selective action of cyclophosphamide. *Cancer Res.* **35**, 3755 (1975).