

오가피 조다당의 단백질 항원 (BSA and OVA) 에 대한 면역증강효과

황수현 · 하은숙* · 유광원** · 신광순 · 이상훈 · 이재권 · 이경호*** · 윤택준# · 박우문*
경기대학교 식품생물공학과, *(주) 구푸, **청주국립대학교 김치식품과학과, ***코오롱 중앙기술연구원
(Received May 27, 2003; Revised June 16, 2003)

Effect of the Crude Polysaccharides Fraction from *Eleutherococcus senticosus* as a Immunoadjuvant to Soluble Antigens (BSA and OVA)

S. H. Hwang, E. S. Ha*, K.-W. Yu**, K.-S. Shin, S.-H. Lee, J. K. Lee, K. H. Lee***,
T. J. Yoon and W.-M. Park*

Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University

*Research Team, GOOFOO Inc.

**Dept. of Kimchi & Food Science, Chongju National College of Science & Technology

***Kolon Central Research Park

Abstract — *Eleutherococcus senticosus* is a typical oriental folk medicinal herb. It has been used clinically as a anti-rheumatic disease, anti-stress, ischemic heart disease and gastric ulcer. In the present study, we examined the adjuvant activity of the crude polysaccharides fraction from *Eleutherococcus senticosus*, EN-3, on the induction of humoral and cellular immune responses against bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OVA). The thioglycollate-induced macrophages and silica-induced dendritic-like cells cultured with BSA and EN-3 synergistically increased the production of TNF- α and IL-12. When mice were subcutaneously immunized with BSA + EN-3, the antibody titer against BSA was showed significantly higher than those immunized with BSA alone. In addition, when mice were immunized with OVA + FIA + EN-3, the antibody titer was showed similar patterns with the FCA. The assay for determining subisotype of antibody revealed that EN-3 augmented OVA-specific antibody titer of IgG1 and IgG2b. The culture supernatant obtained from splenocytes of mice treated with OVA + FIA + EN-3 also showed a higher level of both OVA-specific Th1-type (IL-2, IFN- γ and GM-CSF) and Th2-type cytokine (IL-4, IL-6 and IL-10). *In vitro* analysis of T cell proliferation to OVA on 8 weeks, the splenocytes of mice treated with OVA + EN-3 showed a significantly higher proliferating activity than those treated with OVA alone. These results suggest that EN-3 may possess adjuvant activities to potentially to enhance humoral as well as cellular immune response.

Keywords □ *Eleutherococcus senticosus*, adjuvant, antibody, T cell, cytokines

Adjuvant(면역증강제)는 면역세포의 기능을 조절하여 특이 항원에 대한 면역자극활성을 유도함으로써 궁극적으로 항원 특이적인 체액 (humoral) 및 세포성 (cellular) 면역증강활성을 유도케 하는 물질로써¹⁾ adjuvant 개념이 도입되고 난 후 지금까지 80여 년 동안 여러 가지 adjuvant formulation에 대한 연구가 진행되어 왔으나, 임상에 적용 가능한 물질로는 항원의 저장작용에 의해 면역증강활성이 유도되는 aluminium 함유 화합물(alum)이 유일하다.²⁾ 그러나 alum은 항원에 따라 활성의 유도에 많은 차이를 나타내어 폭넓은 응용이 어렵고, 일부항원에 대해서는 알레르기를

유도하는 IgE 항체를 과잉생산하며, 주로 체액성 면역증강 활성만을 유도하는 단점을 가지고 있어, 효과적으로 백신에 적용하기 위하여 alum을 대체할 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.¹⁻⁵⁾

현재까지 항원에 대한 면역증강 활성을 유도하는 adjuvant로서 세균성 및 식물성의 여러 물질이 개발되어 왔다. 세균성 물질은 가장 높은 활성을 유도하는 전통적인 adjuvant로서 가열 사멸된 *Mycobacterium tuberculosis*를 paraffin oil에 함유한 Freund's complete adjuvant(FCA)와 *Mycobacterium tuberculosis*가 함유되지 않은 Freund's incomplete adjuvant(FIA)가 가장 널리 알려져 있으며,⁶⁾ 그 외에도 *Mycobacterium tuberculosis*의 세포벽 구성단위인 muramyl dipeptide(MDP, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine)와 그 유도체인 MDP-Lys(L18) 또는 stearyl-MDP 및 lipid-A 계열의 물질도 강한 항

#본 문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-245-7096 (팩스)
(E-mail) yoon_tj@hanmail.net

원 비특이적 면역자극활성이 있어 여러 가지 항원에 대한 adjuvant 로의 개발이 진행되어 왔다.^{7,8)} 그러나 이들 물질은 강한 염증반 응과 함께 국소부위에 육종을 야기함으로써 주로 동물에 대한 용 도로 개발되고 있다.^{4,5)} 한편, 식물성 물질로서는 steroid 및 당 으로 구성되는 saponin류가 탐식세포의 항원탐식에 기인하여 항 원제시세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 일부 발열반 응의 유도에 의한 부작용이 보고되고 있으나,⁹⁾ saponin류의 주 성분인 Qual A 및 ISCOM의 높은 활성의 유도로 동물용 백신 에 대한 adjuvant로 사용되고 있고 이들의 임상에서의 적용을 위 한 연구가 수행 중에 있다.¹⁰⁾ 특히, 면역자극 복합체 cholesterol 과 Qual의 복합체로 구성되는 ISCOM은 단백질 항원에 대하여 경구투여에 의한 활성이 증명되면서 임상실험을 진행하고 있 다.¹⁰⁾ 한편, β -glucan 혹은 polyanionic 물질은 B 및 T 세포에 대 한 mitogen 활성의 유도와 함께 경구투여에서도 높은 활성을 나 타냄으로서 동물뿐만 아니라 인간에 적용하기 위한 임상실험이 진행 중에 있어 차세대 adjuvant로서 주목받고 있다.¹¹⁾ 따라서 식물성 유래의 천연물에서 높은 adjuvant 활성을 유도케 하는 전 신 및 경구투여제 물질의 탐색과 작용기전의 확립은 새로운 adjuvant의 개발에서 중요한 의의가 있다고 사료된다.

오가피(*Eleutherococcus senticosus*)는 우리나라 한방에서도 풍 습비통(風濕痺痛), 요슬연약(腰膝軟弱), 수종(水腫)에 오래 전부 터 사용하여 왔으며, 현재 식품공전에서 결명자, 구기자 등과 함께 기호식품으로 분류된 식품허가 물질로서 이미 생체에 대한 안전성 검증이 완료된 물질이다. 특히, 러시아 혹은 유럽에서 가 시오가피는 인삼을 능가하는 약효를 가지는 물질로 인정되고 있 고, 약리학적 효능으로는 피로, 스트레스, 면역계 등에 작용하여 생체의 항상성을 유지시키는 adaptogen으로서의 탁월한 효과가 있음이 보고되었고¹²⁻¹⁶⁾ 현재 세계적으로 각 활성에 대한 연구가 수행 중에 있다.^{12,17-20)} 특히, 국내에서 오가피 추출물의 경우 면 역 억제적 활성으로 항 알러지 활성이 보고된 바¹³⁾ 있고, 본 저 자들도 동일한 활성에 대하여 확인한 바 있다.¹⁵⁾ 오가피의 연구 에서 연구자에 따라 면역억제^{13,16)} 혹은 면역증강^{16,17)}에 관한 논 문이 보고되는 것은 오가피가 여러가지 약리작용을 가지고 있음 을 의미하며, 따라서 각 활성을 나타내는 대표 물질 및 그 생리활 성에 대한 연구는 계속해서 진행되어야 할 주요한 주제로 생각된다.

본 연구는 오가피로부터 추출된 다당체를 이용하여 면역계에 미치는 활성을 조사함으로써 이후 여러 항원에 대한 면역증강제 로의 응용가능성을 조사하기 위하여 비특이적 면역자극활성 및 항원 특이적인 면역 증강활성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

생후 6~7주된 자성의 Balb/C 마우스를 대한 바이오링크에서

구입하여 사용하였다. 실험동물은 경기대학교 실험장에 설치된 clean rack에서, 정수된 물과 실험동물용 펠렛사료(삼육사료)를 자유 급식하여 사육되었다.

오가피의 열수추출물로부터 조다당 획분(EN-3)의 조제

건조된 오가피 100 g에 증류수 2 l를 첨가하고 증류수가 반으 로 감소될 때까지 추출한 후 금속체를 이용하여 상등액과 잔사 로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고 7,000 rpm에서 30분간의 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 오가피의 열수 추출물로 하였다. 열수추출물은 다시 5%의 메탄올로 1시간씩 5회 에 걸쳐 환류를 거친 후 원심분리하여 메탄올-가용성 획분과 불 용성 획분으로 분리하였다. 메탄올-불용성 획분은 증류수에 재용 해시킨 후 4배의 에탄올을 첨가하고 12시간 교반, 원심분리하여 메탄올-불용성/에탄올-가용성 획분을 분리하고 침전물은 증류수 에 재용해시키고 투석한 후 원심분리, 농축, 동결건조를 거쳐 조 다당 획분(EN-3)으로 조제하였다.

복강 내 대식세포의 활성화 및 TNF- α , IL-1 및 IL-12의 유도

마우스의 복강 내 대식세포(macrophage)를 얻기 위하여 6주 령의 Balb/C 혹은 C57BL/6 마우스 복강에 3% thioglycollate 배 지를 1 ml 주사하고, 3일 후에 복강 내에 유도된 대식세포를 회 수한 후, 원심분리와 세척을 하였다. 대식세포의 활성화 정도를 측정하기 위하여 96 well plate에 1×10^6 cell/ml로 세포 수를 조 정하여 분주 후 배양하였다. 대식세포는 배양배지를 이용하여 배 양 plate에 부착되지 않은 세포를 세척함으로써 수집하였고, 시 료의 대식세포 자극활성을 측정하고자 여러 농도의 EN-3와 대 조군으로서 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 Lipopolysaccharide(LPS)를 각각 첨가하 고 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 대식세포의 활성화는 lysosomal enzyme의 생산량으로서 측정하였으며,²¹⁾ 대식세포로 부터 생성된 다양한 cytokine, 즉 TNF- α , IL-1 β 및 IL-12의 양 은 24 well plate에 2×10^6 cells/ml로 조정된 대식세포를 분주하 고 시료를 첨가하여 24시간 후에 수집한 상등액을 이용하여 Pharmingen(USA)으로부터 구입한 ELISA kit로 측정하였다.

수지상돌기세포의 TNF- α 및 IL-12 유도능력

전문 항원제시세포인 dendritic cell(DC)의 수집은 Masse, D. 등의 방법²²⁾에 준하여 실시하였는데, 6주령의 Balb/C 마우스 복 강에 silica(5 mg/ml)를 주사하고 24시간 후에 복강세포를 회수 한 후 1.5×10^6 cell/ml로 조정하여 48 well plate에 분주하였다. 2시간 배양 후에 RPMI-1640 배양배지로 3회 세척하고 항원으 로 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 OVA 및 시료인 여러 농도의 EN-3를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 배양상등액을 수집하고, 각 cytokine에 대한 2차 항체를 이용하는 상용 sandwich ELISA kit

로써 생산된 TNF- α 와 IL-12의 양을 측정하였다.

마우스의 면역 및 항혈청의 수집

항체생산을 위한 항원으로 bovine serum albumin(BSA; Sigma)과 ovalbumin(OVA; Sigma)을 사용하였다. 각 항원에 대한 항체의 생산을 위하여 6주령의 Balb/C 마우스에 10 μ g BSA 단독 혹은 adjuvant로서 여러 농도의 EN-3(50 μ g/mouse)를 혼합하여 피하주사로 2주 간격으로 총 2회 면역하였다. OVA(5 μ g)의 면역의 경우, 대조군 adjuvant로는 FCA를 항원 OVA와 유효하여 사용하였고, 실험군으로는 adjuvant로 EN-3 단독 혹은 FIA에 EN-3를 혼합하고 유효하여 사용하였다. 면역 후 1주일부터 1~3주 간격으로 마우스로부터 채혈한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 항체가의 측정 시까지 -20°C에 보관하였다.

항체가 측정 및 항체의 subisotype의 결정

혈청에 존재하는 각 항원에 대한 총항체가의 측정은 ELISA법으로 측정하였다. Flat-bottomed microtiter plate의 각 well에 50 μ g/ml의 각 항원을 well 당 100 μ l씩 분주하고 항원의 coating을 위하여 4°C에서 16시간 동안 부착시켰다. PBS-Tween 20 (0.05%; PBST)으로 각 well을 3회 세척 후에 3% BSA를 이용하여 blocking하고 PBST로서 다시 세척하였다. 준비한 각각의 항원에 대한 혈청을 100배부터 2배 희석법으로 희석하여 각 well에 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. PBST로 ELISA plate의 각 well을 세척하고 마우스 면역글로브린(mouse Ig)에 peroxidase가 conjugation된 2차 항체(peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgGAM-HRP, Zymed, USA)를 PBS에 희석하여 각 well에 첨가 후, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역글로브린 subisotype의 분석은 마우스 면역글로브린의 각 subisotype에 대한 특이적인 2차 항체(peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG1, G2a 및 G2b, Zymed, USA)를 이용하여 ELISA로 조사하였다. 발색을 위한 기질로써 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 용액을 사용하였으며, 2 N H₂SO₄을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 항체의 역가는 정상 마우스 혈청($\times 100$)의 흡광도보다 5배 높은 흡광도를 나타내는 최고 희석비로 나타냈다.

Lymphocyte 자극실험

군당 3마리의 Balb/C 마우스에 5 μ g의 OVA를 단독 혹은 adjuvant와 2주 간격으로 면역하고, 1차면역 10주 후에 면역마우스 혹은 정상마우스로부터 비장을 취하였다. 각 비장은 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에 부유시켜 세포의 농도가 2.5 $\times 10^5$ /well이 되도록 조정 한 후, 96-well culture plate에 분주하였다. 비장세포가 분주된 각 well에 항원인 0.2 μ g/ml의 Concanavalin A(Cor. A)와 동시에 혹은 단독으로 OVA를 50 μ g/ml부터 5배 희

석법으로 희석하여 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 72시간 동안 배양하였다. 배양완료 6시간 전에 1 mg/ml의 MTT 용액을 첨가하고, 생산된 formazan의 정도를 570 nm에서 흡광도로 측정하였다.

비장세포의 증식활성 및 cytokine 유도 양식

5 μ g의 OVA를 단독 혹은 adjuvant와 2주 간격으로 면역하고, 최종면역 8주 후에 면역마우스 혹은 정상마우스로부터 비장을 취하여 세포의 농도가 3 $\times 10^6$ /well이 되도록 조정 후, 24-well culture plate에 분주하였다. 비장세포가 분주된 각 well에 항원 최종농도 20 μ g/ml의 OVA를 단독 혹은 Con A(최종농도 0.22 μ g/ml)와 동시에 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양시켰다. 배양완료 후 원심분리(900 rpm/10 min)에 의하여 배양상등액을 준비하였으며 cytokine의 측정 시까지 -80°C에 저장하였다. 비장세포 배양상등액에 유도된 IL-2, IFN- γ , IL-4, GM-CSF 및 IL-10 등의 cytokine의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit을 이용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

EN-3 획분의 복강세포 자극에 의한 cytokine의 유도양식

활성화된 대식세포는 스스로 여러 가지 cytokine을 생산함으로써 이후의 면역반응을 유도한다는 것은 잘 알려진 사실이다.²³⁾ 본 실험은 EN-3이 대식세포를 직접 자극하여 활성화시키는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 실시하였으며, 그 지표로서 EN-3으로 자극된 대식세포의 배양상등액에 유도 생산된 TNF- α , IL-1 및 IL-12의 양을 조사하였다. 그 결과, Fig. 1에 제시한 바와 같이 EN-3 획분은 대식세포를 직접 자극하여 IL-1과 TNF- α 의 경우에는 100 μ g/ml의 농도에서 LPS와 유사한 정도의 cytokine을 생산성을 나타내었으며, 각각의 cytokine의 생산정도는 자극하는 EN-3의 농도(1~100 μ g/ml)에 의존적인 경향을 보임으로서 EN-3 획분은 면역반응의 개시단계인 대식세포와 같은 선천적 면역계(innate immune system)를 직접 활성화시키는 능력이 있음을 확인하였다. 한편, 전문적인 항원제시세포인 DC로부터 항원 특이적인 IL-12²⁴⁾ 및 TNF- α ²⁵⁾의 유도는 항원 특이적인 면역증강활성의 유도에서 중요한 cytokine으로 인정되고 있다. 즉, 전문적인 항원제시세포인 DC는 MHC class I/II molecule을 이용하여 T-cell에 항원제시를 함으로서 세포성 혹은 체액성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 항원의 processing 과정에서 생산되는 IL-12는 주로 Th1 성향의 면역반응을 유도하고,^{24,25)} 자연살해세포(NK-cell)를 effector form으로 분화하게 하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 DC로부터 IL-12의 생산능은 항원에 대항하는 자연 및 획득면역계의 활성화에 중요한 요소로 작용되는 cytokine으로 간주되고 있다.²⁷⁾ Fig. 2

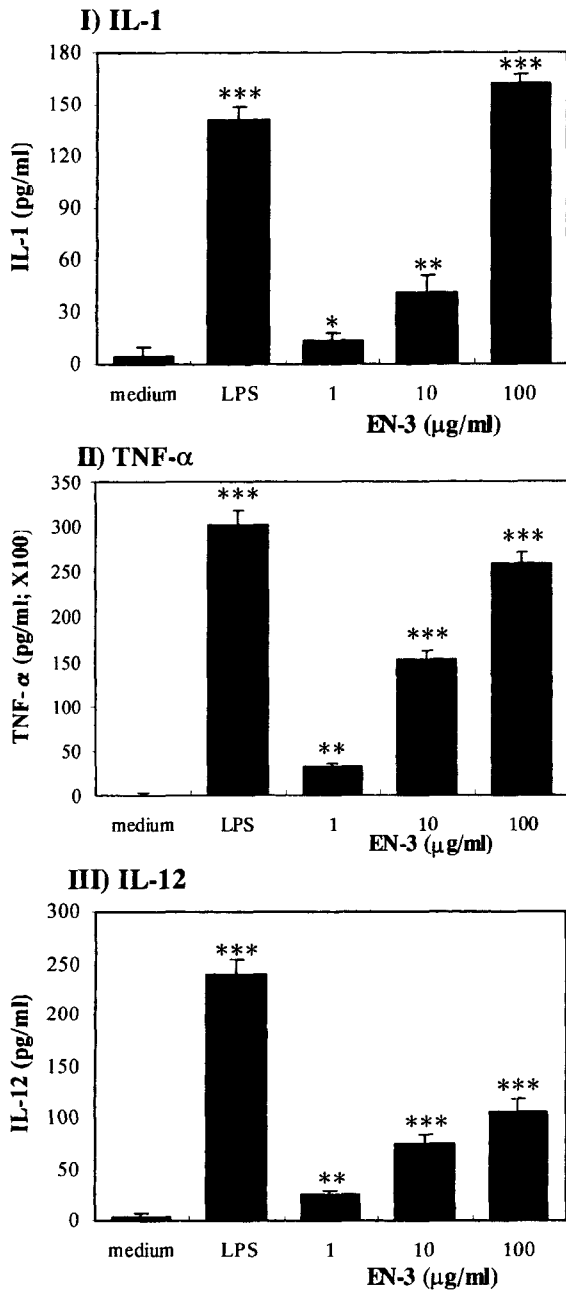


Fig. 1 – The effects of EN-3 on the induction of IL-1, TNF-α and IL-12 from macrophages. *P<0.05, **<0.01; ***<0.001, compared with the control group (by Student's two-tailed *t* test).

의 결과에서 silica-유도 복강세포와 항원(BSA) 및 EN-3의 동시 배양 결과 유도된 상등액에 함유된 IL-12의 함량을 조사한 결과 항원 단독으로는 유도하지 못했던 IL-12 생산에 있어 EN-3 확 분은 상승적으로 작용함을 알 수 있었다. 따라서 EN-3는 항원제 시세포의 성숙과 이후 항원 특이적인 면역증강효과에서 항원제 시세포의 항원에 대한 항원제시능을 높이는 작용이 있음을 제시 하였다고 생각되며, 이러한 경향은 TNF-α의 유도양식에서도 동

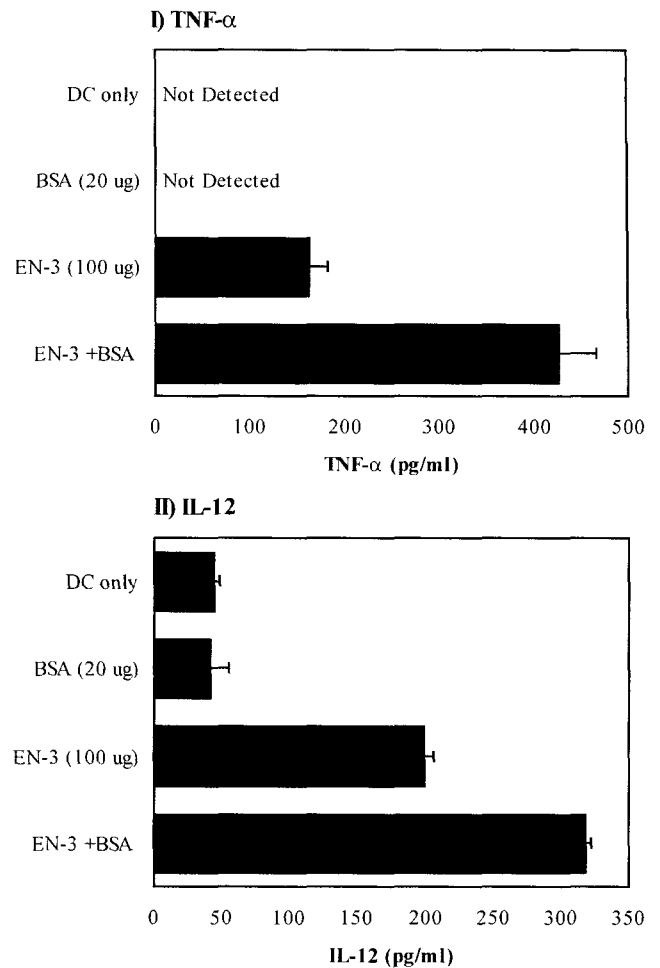


Fig. 2 – The effects of EN-3 on the induction of TNF-α and IL-12 from dendritic-like cells.

일한 결과를 보였다. TNF-α는 미성숙 DC의 표면에 MHC 혹은 보조자극인자(co-stimulatory molecule)의 발현을 촉진함으로써 성숙된 형태의 DC로 전환시키는 작용이 있다.²⁵⁾ Silica-유도 복강 세포에서 DC로 추정되는 MHC II⁺, CD80⁺ 및 CD86⁺ 세포는 약 20% 정도이며, 나머지는 대식세포 및 lymphocyte를 포함하는 세포로 구성됨을 보고한 바,²²⁾ silica-유도 복강세포에서 TNF-α를 생산하는 세포는 주로 대식세포로 추정되었다. 이들 silica-유도 복강세포와 항원 및 EN-3 단독 혹은 항원과 EN-3의 동시 자극 결과, TNF-α의 유도 양식은 항원 단독으로는 유도되지 않았고, EN-3 + 항원의 경우는 EN-3 단독의 경우에 비하여 2.5배 이상 높은 TNF-α의 생산 양식을 보였다. 결국, EN-3는 복강세포의 TNF-α의 생산성을 증진시킴으로서 미성숙 DC를 성숙시키게 되고, 따라서 항원에 대한 항원제시능을 획득한 성숙 DC는 IL-12를 생산함으로써 항원 특이적인 T 세포의 활성화가 유도되는 것으로 생각되었다.^{24,26,27)} 이와 같은 가설은 EN-3가 동시에 면역된 마우스의 경우에서 T 세포가 생산하는 cytokine의 생산 양식으로 확인할 수 있었다. 결론적으로, EN-3는 항원제시세포

의 항원 제시능을 획득하기 위한 성숙된 form으로의 전환을 자극하는 cytokine의 유도능에 의해 면역단계의 개시단계를 자극하는 활성이 있다고 사료되었다.^{26,27)}

단백질 항원 BSA 및 OVA에 대한 체액성 면역반응의 증진효과

외래물질이 숙주에 들어오면 숙주는 항원에 대항하기 위하여 항원 특이적인 면역반응을 유도하며, 이 면역반응은 크게 두 가지 즉, 체액성 및 세포성면역계로 구분할 수 있다. Fig. 3A에서 제시한 결과는 EN-3의 단백질 항원 BSA에 대한 체액성면역 증진효과를 BSA에 대한 항체 생산능으로 조사한 것이다. 결과에서 보여주는 것처럼 BSA 단독면역의 경우는 낮은 항체가를 나타냄으로서 정상 혈청과 비교하여 유의하게 높은 항체가를 가지는 항체가 생산되지 않았으나, BSA를 EN-3와 혼합하여 면역한 경우는 유의하게 높은 항체가가 유도됨을 확인하였다. 본 모델에서 EN-3 50 µg 및 0.5 µg의 농도는 5 µg 보다 유의적으로 낮은 활성을 보임으로서 5 µg의 동시투여가 적정농도임을 확인하였다(Fig. 3A). 항체의 역가는 최종면역 2주 후인 4주 째에 가장 높은 경향을 보였으며, 5주 째부터 급격하게 항체가가 낮아지는 결과를 보여주었다. 결국 adjuvant로서 EN-3는 항원에 대한 체액성 면역증강 작용을 유도하나 면역반응의 지속기간을 연장시키

키는 활성은 없는 것으로 사료되었다. 따라서 oil 성분에 의한 항원의 저장작용을 유도하는 FIA^{5,6)}에 EN-3를 혼합한 형태를 adjuvant로 사용하였으며, 항원 OVA에 대한 항체가를 대조군으로 FCA의 활성과 비교하였다(Fig. 3B). FCA는 결핵균의 세포벽 성분을 FIA인 paraffin oil에 혼합하여 제조한 것으로서 FCA의 면역증강 활성은 세포벽 성분에 의한 항원제시세포의 활성화 및 oil의 유화(emulsion)에 의한 항원의 저장작용에 의하여 높은 adjuvant 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 따라서 본 실험은 oil 성분으로 구성되는 FIA에 EN-3를 혼합하여 adjuvant로 사용할 경우에 유도되는 항체가 증진활성을 FCA와 비교함으로써 조사하였다. 실험결과 FIA에 EN-3를 혼합하여 면역한 경우는 FCA 및 FIA 단독보다 높은 항체가가 유도됨으로서 adjuvant로의 응용가능성이 있음을 제시하였다(Fig. 3B). 또한 생산된 항체의 subtype를 조사한 결과, FIA에 EN-3를 혼합한 경우는 FCA의 경우와 같이 IgG1 및 IgG2b type의 항체가 생성됨으로서 이상적인 adjuvant로의 가능성이 있음을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 수용성 물질인 EN-3는 면역원성이 낮은 물질일 경우 단독으로는 유의한 항체생산을 높이지는 못하였으나, 항원의 저장작용이 증진될 경우 대조군으로 사용한 FCA 이상의 높은 adjuvant activity를 나타낼 수 있는 물질의 하나로 응용 가능성이 있음이 확인되었다.

항원 특이적인 lymphocyte의 증식효과

EN-3의 T 세포 매개 세포성 면역반응을 조사하고자 항원 OVA 단독, OVA와 상용 adjuvant 또는 EN-3의 혼합물 및 FIA와 EN-3의 혼합물 등으로 동시에 면역한 마우스의 비장세포를 in vitro에서 항원 OVA로 재자극한 후에 비장세포의 증식 정도를 조사하였다. 재자극 활성의 조사를 위하여 OVA에 대한 최대항체 측정 후, 즉, 최초면역 10주 후의 마우스를 이용하였다. Fig. 5에 제시한 바와 같이 항원에 adjuvant를 혼합하여 면역한 마우스의 비장세포는 항원인 OVA(10 µg/ml)의 재자극에 의하여 유의한 비장세포의 증식활성이 유도되었다.

Th1 및 Th2-type cytokine 측정

OVA 특이적인 항체의 생산에서 adjuvant로서 EN-3가 T 세포에 미치는 영향을 T 세포 배양상등액에 생산된 항원 특이적인 Th1-type 및 Th2-type cytokine의 양을 측정함으로써 조사하였다. Fig. 6에 제시한 바와 같이 항원 OVA와 EN-3를 혼합하여 면역한 마우스는 항원 단독면역군의 마우스에 비하여 실험에 적용한 Th1-type인 IL-2, IFN-α, GM-CSF 및 Th2-type인 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine 생산성이 증진되는 경향을 보여 adjuvant 활성이 확인되었다. Th1-type cytokine은 B 세포가 IgG2 type의 항체를 생산하는데 관여하며 Th2-type cytokine은 주로 IgG1 type의 항체를 생산하는 B 세포로의 분화를 촉진하

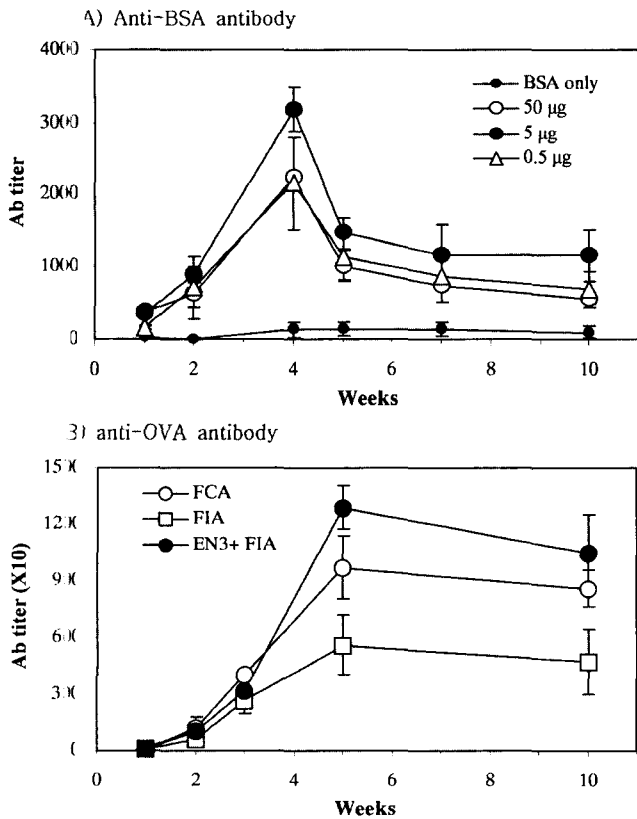


Fig. 3 - Effect of EN-3 on the induction of antigen-specific antibody response.

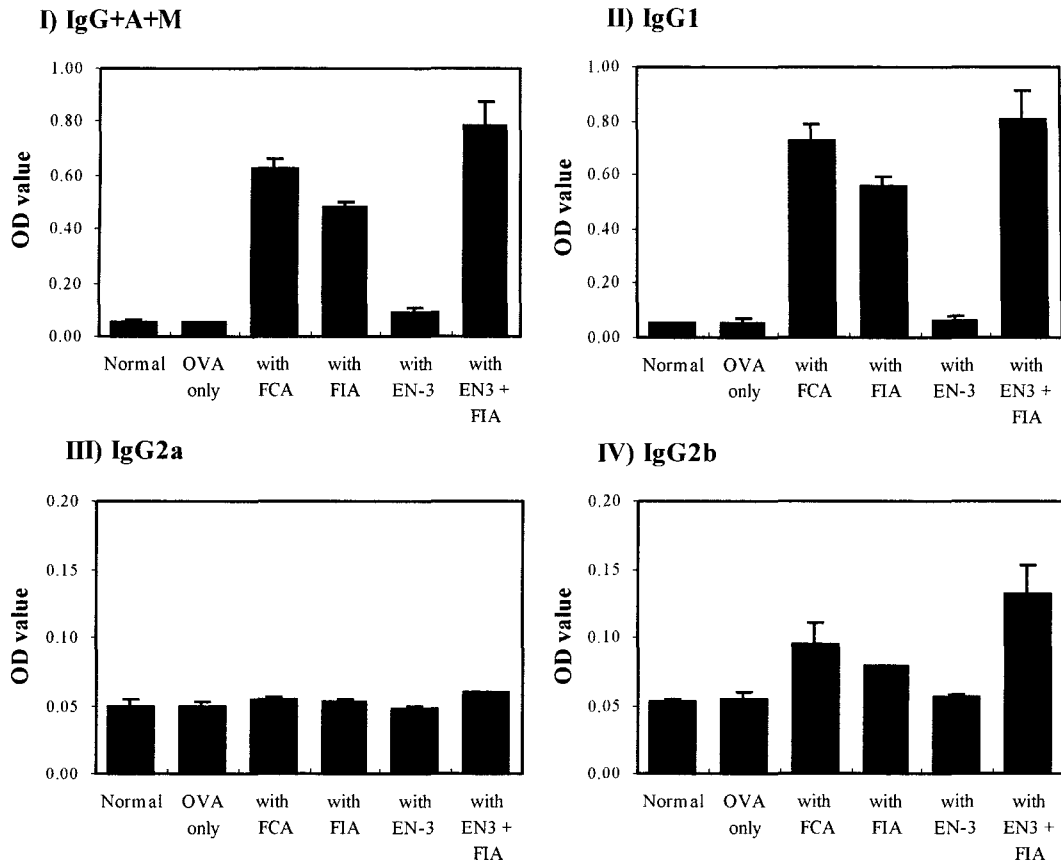


Fig. 4 – Determination of subclasses of OVA-specific antibodies in serum specimens.

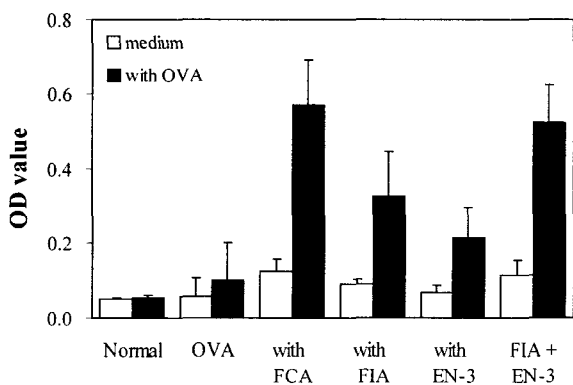


Fig. 5 – Effect of EN-3 on T lymphocyte proliferating activity to OVA.

는 것으로 보고되고 있다.²⁸⁾ 따라서 Fig. 4의 EN-3에 의한 두 가지 type의 항체 생산능은 항원을 면역한 마우스의 비장세포를 OVA로 재자극 후에 생산되는 OVA-특이적인 cytokine을 측정할 결과 동일한 경향을 보임으로서 지지되었다(Fig. 6). 즉, 각 면역 마우스의 비장세포를 항원 OVA로 재자극한 후 상등액에 생산된 Th1 및 Th2-type의 cytokine의 생산 양식을 조사한 결과, adjuvant로 EN-3 단독으로 사용한 결과는 Th1-type cytokine인

IFN- γ 및 GM-CSF와 Th2-type cytokine인 IL-6 및 IL-10의 생산을 증가시키는 경향을 보임으로서 EN-3는 adjuvant로서 항원에 대한 항원제시능 및 세포성 면역능을 주로 유도하는 adjuvant 활성을 함유하는 것으로 생각되었다. 한편, EN-3에 FIA를 혼합하여 adjuvant로 사용한 경우는 실험에 적용한 모든 cytokine에서 FIA에 비하여는 높은 cytokine의 생산양식을 보였고, 대조군으로 사용한 FCA의 경우와 비교한 결과, IL-4의 생산 양식만 낮은 결과를 보였고 나머지 cytokine의 유도양식은 유사한 경향을 보였다. 특히, EN-3는 조사한 여러 가지 cytokine에서 항원에 대하여 특이적인 GM-CSF의 유도를 증진시켰다. GM-CSF는 여러 보고에서 DC의 성숙을 유도하고, 항원제시능을 직접 증진시키는 cytokine으로서 결국, 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역증강효과를 유도하는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.²⁹⁾ 따라서 EN-3의 GM-CSF의 생산능은 IFN- γ 의 생산능과 함께 항원에 대한 effector CTL의 유도에 직접 관여함으로써 외인성 항원 뿐 아니라 암, 바이러스 감염세포와 같은 내인성 항원에 대하여 예방은 물론 치료효과를 유도할 수 있는 가능성을 제시하였다고 사료된다.²⁶⁻²⁹⁾ 결론적으로 본 실험 결과, EN-3는 단백질 항원에 대한 항체 생산과 일부 세포성 면역증강작용에서 항원에 대한 저장작용이 충족될 경우, FCA에 상당하는 adjuvant

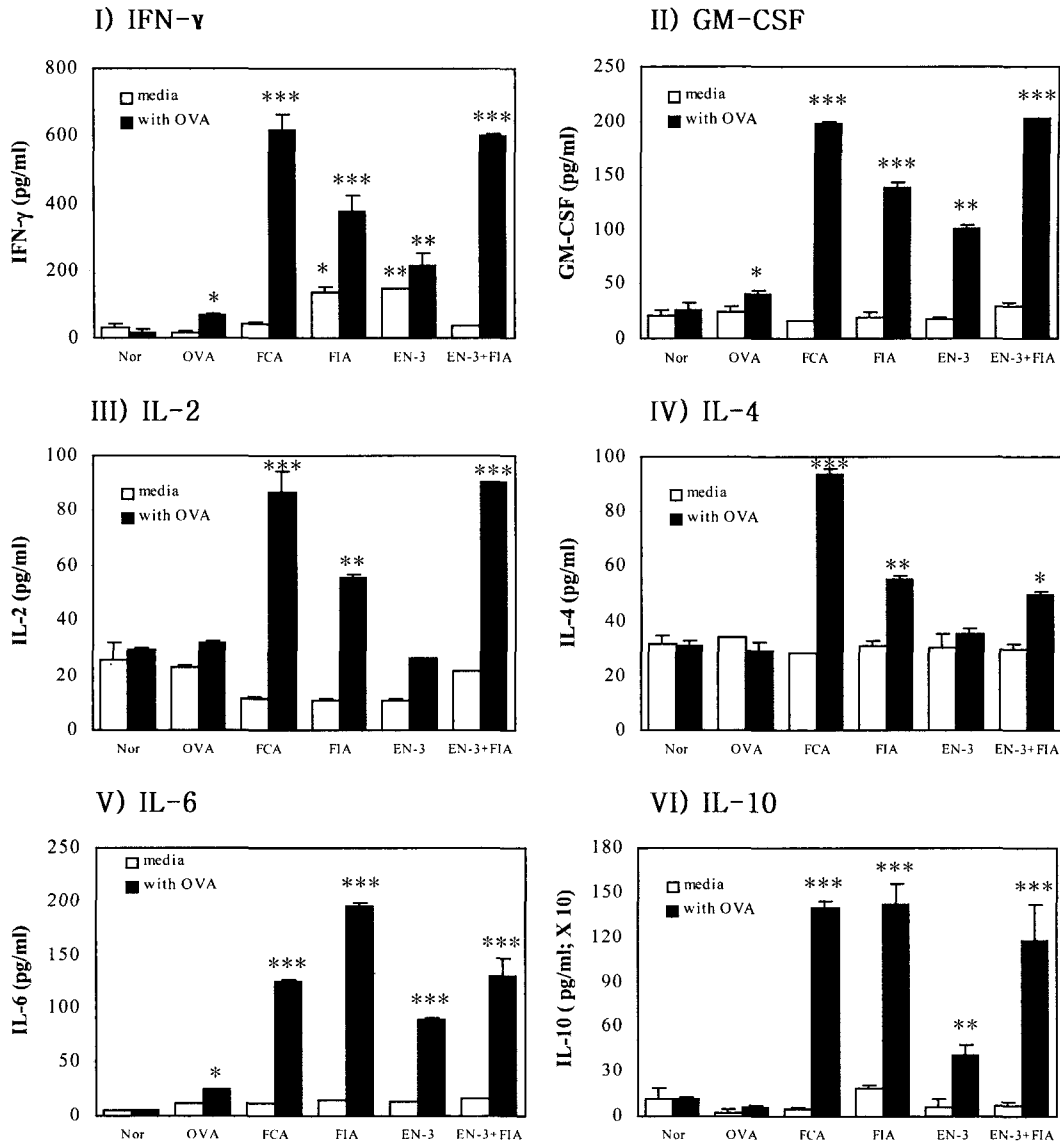


Fig. 6 – Profiles of Th 1 and Th 2-type cytokine synthesis. *P<0.05, **<0.01, ***<0.001, compared with the control group (by Student's two-tailed *t* test).

활성이 있는 것으로 사료되었고, 그 반응은 항원제시세포의 항원처리능을 증진시킴으로서 이후 Th1 및 Th2-type의 면역반응을 활성화시키는 작용을 하는 것으로 사료되었다.

결론

오가피로부터 분리한 다당획분인 EN-3의 면역자극활성과 더불어 항원 BSA 혹은 OVA에 대한 세포성 및 체액성 면역증진능을 조사하였다. EN-3는 thioglycollate에 의하여 유도된 macrophages를 자극하여 IL-1, TNF-α 및 IL-12을 생산하였고, silica-induced dendritic-like cells에 대하여 항원 BSA 및 EN-3의 동시배양은 각 시료 단독배양에 비하여 높은 TNF-α 및 IL-

12을 생산하였다. 이 결과는 EN-3가 면역자극활성 및 항원제시세포의 성숙을 증진시킴으로서 이후 항원 특이적인 T 세포의 활성화를 유도한다는 점을 제시하였다. 항원 BSA에 EN-3를 혼합하여 면역한 결과 EN-3는 BSA에 대한 항체의 역가를 높이는 활성이 있었고, 항원 OVA에 EN-3를 혼합 후 FIA에 유화시켜 면역한 결과, OVA에 대한 항체가는 FCA를 사용한 경우에 비하여 높은 활성이 있었다. 이때 생산된 항체의 subisotype는 주로 IgG1 and IgG2b이었으며, 면역 마우스의 비장세포를 항원 OVA로 자극 후 배양상등액에 생산된 cytokine을 조사한 결과 항원 특이적인 Th1(IL-2, IFN-γ와 GM-CSF) 및 Th2-type의 cytokine(IL-4, IL-6와 IL-10)이 증가된 결과를 얻었다. 또한 면역 마우스의 비장세포를 항원 OVA와 재자극한 후 비장세포의 증식활성을 조사

한 결과, EN-3를 혼합하여 면역한 경우가 항원 단독의 경우에 비하여 높은 비장세포의 증식활성을 유도하였다. 이 결과는 EN-3가 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응을 유효하게 증진시키는 면역증강제로의 활성이 있음을 제시하였다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(벤처 및 중소기업기술개발지원 연구개발사업; HMP-01-PJ4-PG4-01VN01-0375)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문헌

- 1) Azuma, I. : Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine* **10**, 1000 (1992).
- 2) Edelman, R. : Vaccine adjuvants. *Rev. Infec. Dis.* **2**, 370 (1980).
- 3) Hunter, R. L. and Bennett, B. : The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. III. Characterization of selected biologically active surfaces. *Scand J. Immunol.* **23**, 287 (1986).
- 4) Audibert, F. M. and Lise, L. D. : Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today.* **14**, 281 (1993).
- 5) Gupta, R. K. and Siber, G. R. : Adjuvant for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**, 1263 (1995).
- 6) Bennet, B., Check, I. J., Olsen, M. R. and Hunter, P. L. : A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunological Method.* **153**, 31 (1992).
- 7) Tamura, M., Yoo, Y. C., Yoshimatsu, K., Yoshida, R., Oka, T., Ohkuma, K., Arikawa, J. and Azuma, I. : Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Vaccine* **13**, 77 (1995).
- 8) Rickman, L. S., Gordon, D. M., Wistar, R. Jr., Krzych, U., Gross, M., Hollingdale, M. R., Egan, J. E., Chulay, J. D. and Hoffman, S. L. : Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A, and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet* **27**, 998 (1991).
- 9) Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. and Marciani, D. : Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* **462**, 431 (1991).
- 10) Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C. K. : Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvaticity. *Vaccine* **11**, 293 (1993).
- 11) Navarro-Garcia, F., Pedroso, M. and Lopez-Revilla, R. : Immunomodulation of rat serum and mucosal antibody responses to *Entamoeba histolytica* trophozoites by beta-1,3-glucan and cholera toxin. *Clin. Immunol.* **97**, 182 (2000).
- 12) Davydov, M. and Krikorian, A. D. : *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 345 (2000).
- 13) Yi, J. M., Hong, S. H., Kim, J. H., Kim, H. K., Song, H. J. and Kim, H. M. : Effect of *Acanthopanax senticosus* stem on mast cell-dependent anaphylaxis. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 347 (2002).
- 14) Lin, C. C. and Huang, P. C. : Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acanthopanax senticosus*. *Phytother. Res.* **14**, 489 (2000).
- 15) Yoon, T. J., Lee, S. W., Shin, K. S., Choi, W. H., Hwang, S. H., Seo, S. H., Kim, S. H. and Park, W. M. : Effect of hot water extract from *Acanthopanax senticosus* on systemic anaphylaxis. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 518 (2002).
- 16) Cheng, X. J., Li, P. Z., Sheng, X. H., Li, B. J. and Zhu, C. L. : Antitumor and immunological activities of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms polysaccharides. *Chinese J. Cancer* **3**, 191 (1984).
- 17) Schmolz, M. W., Sacher, F. and Aicher, B. : The synthesis of Rantes, G-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 and IL-13 in human whole-blood cultures is modulated by an extract from *Eleutherococcus senticosus* L. roots. *Phytother. Res.* **15**, 268 (2001).
- 18) Steinmann, G. G., Esperester, A. and Joller, P. : Immunopharmacological in vitro effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. *Arzneimittelforschung* **51**, 76 (2001).
- 19) Bohn, B., Nebe, C. T. and Birr, C. : Flow-cytometric studies with *Eleutherococcus senticosus* extract as an immunomodulatory agent. *Arzneimittelforschung* **37**, 1193 (1987).
- 20) Kupin, V. I., Polevaia, E. B. and Sorokin, A. M. : Immunomodulating action of an *Eleutherococcus* extract in oncologic patients. *Sov. Med.* **5**, 114 (1987).
- 21) Herscowitz, B. H., Holden, H. T., Bellanti, J. A. and Ghaffar, A. : Manual of macrophage methodology. In *Induction and Collection of Peritoneal Exudates Macrophages*. Marcel Dekker Inc.: New York and Basel: 7-10 (1981).
- 22) Masse, D., Voisine, C., Henry, F., Cordel, S., Barbieux, I., Josien, R., Meflah, K., Gregoire, M. and Lieubeau, B. : Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells. *Cancer Res.* **62**, 1050 (2002).
- 23) Saiki, I., Saito, S., Fujita, C., Ishida, H., Iida, J., Murata, J., Hasegawa, A. and Azuma, I. : Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine* **6**, 238 (1988).
- 24) Lee, J. K., Lee, M. K., Yun, Y. P., Kim, Y., Kim, J. S., Kim, Y. S., Kim, K., Han, S. S. and Lee, C. K. : Acemannan purified

- from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1275 (2001).
- 25) Kikuchi, K., Yanagawa, Y., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iwabuchi, K. and Onoe, K. : Tumour necrosis factor-alpha but not lipopolysaccharide enhances preference of murine dendritic cells for Th2 differentiation. *Immunology* **108**, 42 (2003).
- 26) Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. and O'Garra, A. : Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071 (1995).
- 27) Dredge, K., Marriott, J. B., Todryk, S. M. and Dalglish, A. G. : Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 521 (2002).
- 28) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Her, E., Kim, S. H., Kim, K., Azuma, I. and Kim, J. B. : Cellular and humoral adjuvant activity of lectin isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) *Int. Immunopharmacol.* **1**, 881 (2001).
- 29) Westermann, J., Reich, G., Kopp, J., Haus, U., Dorken, B. and Pezzutto, A. : Granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor plus interleukin-2 plus interferon alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol. Immunother.* **49**, 613 (2001).