

수용성 β -1,3-glucans의 면역 활성화 효능에 대한 연구

한국생명공학연구원 세포생물학연구실, ¹(주)더멋진 바이오텍, ²단국대학교 의과대학, ³충남대학교 낙농학과

심정현 · 최원아¹ · 김종완² · 이해숙 · 백태웅 · 조민철 · 이경애 · 상병찬³
윤도영

Immune Stimulating Efficacy of Soluble β -1,3-glucans

Jung-Hyun Shim, Won-A Choi¹, Jong-Wan Kim², Hae-Sook Lee, Tae-Woong Baek, Min-Cheol Cho, Kyung-Ae Lee, Byung-Chan Sang³ and Do-Young Yoon

Laboratory of Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, ¹DMJ Biotech Corp., Daejeon, Korea, ²Dankook University School of Medicine, Cheonan and ³Department of Dairy Science, ChungNam National University, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Background: β -1,3-glucans are well known to enhance the immune reactions, resulting in antitumor, antibacterial, antiviral, anticoagulatory and wound healing activities. β -1,3-glucans have various activities depending on molecular weight, degree of branching, conformation, water-solubility and intermolecular association. However, the β -1,3-glucan linked backbone structure is essential and β -D-glucopyranosyl units are required for immuno-potentiating activities. **Result:** In this study, we tested the immunopharmacological activities of soluble β -1,3-glucans and confirmed the following activities: (1) IFN- γ production in PBMCs in the presence or the absence of PHA, LPS, or IL-18; (2) induction of various cytokines in the spleen and thymus; (3) adjuvant effect on the antibody production; (4) nitrogen oxide synthesis in macrophages; (5) the cytotoxic and antitumor effects on cell lines and ICR mice. **Conclusion:** These results strongly suggested that β -1,3-glucans possessed various immuno-pharmacological activities. (*Immune Network* 2003;3(2):156-163)

Key Words: Soluble β -1,3-glucan, immunopharmacological activities, antitumor effect

서 론

Glucan은 포도당이 수십-수백 개가 연결된 고분자로서 α 와 β -glucan으로 나누어진다. 밀가루의 전분이나 텍스트린 등은 α -glucan이고, β -glucan은 β (1,3), β (1,4), β (1,6) 등이 있다. 대부분의 β -glucan이 면역 활성화 효능이 있는 것은 아니며 오직 β -1,3-glucan만이 항암 및 면역증강 작용을 하는 것으로 알려져 있다(1). 미생물의 발효로 생산되는 β -1,3-glucan은 포도당 분자 간에 β -1,3-결합을 이루는 고분자 물질이며, 1966년 일본 오사카대학교의 Tokuya Harada 교수에 의하여 처음 발견되었다(2). β -1,3-glucan은 사람과 동물에서 체액성 및 세포성 면역을 자

극하여 면역체계를 활성화시키고 면역 조절물질로 작용을 한다(3,4). β -glucan의 항암 효과는 암세포를 직접 죽이는 것이 아니고 대식세포(5), T 임파구(T lymphocyte), 자연 살해세포(NK cell) 등을 활성화시켜 저하되었던 몸의 면역력을 회복시키는 기작으로 암의 증식을 억제한다. 즉, 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터루킨(interleukin) 및 인터페론(interferon)의 생성을 촉진시키고, 활성 β -glucan은 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인(cytokine)을 생산함으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 활동을 지원하여 세포조직의 면역기능을 활성화시켜, 면역 담당세포의 신생을 촉진시킬 뿐만 아니라 암의 화학요법과 방사선요법으로 저하된 백혈구를 회복시키는 역할을 한다(6). β -1,3-glucan이 항암(7-12), 항세균성, 항바이러스성의 활성이 뛰어나고(13), 상처 치료 효과와 피부재생 효과가

책임저자 : 윤도영, 한국생명공학연구원 세포생물학연구실
☎ 305-600, 대전시 유성구 어은동 52번지
Tel: 042-860-4218, Fax: 042-860-4593
E-mail: dyyoon@kribb.re.kr

탁월해 항염증 및 피부의 노화방지 효과가 확인되었으며, 이밖에도 혈압 및 혈당 강하작용 등의 다양한 약리학적 효능이 있다(14).

본 연구는 *Agrobacterium* species로부터 분리 정제한 수용성 β -1,3-glucan DMJ-A와 DMJ-E의 면역 활성 효능을 검증하기 위하여, β -1,3-glucan이 인체 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)의 IFN- γ 생성에 미치는 영향, 마우스 조직(흉선과 비장)에서 사이토카인 발현양상, 항체생성의 보조 효과, 대식세포에서 nitrogen oxide (NO) 합성에 미치는 영향, 세포의 증식효과와 항암 효과 등을 검증하여 β -1,3-glucan의 이용을 위한 기초 및 응용 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

수용성 β -1,3-glucan 생산. 본 연구에 이용된 수용성 β -1,3-glucan은 *Agrobacterium* sp. beta 82 KCTC 10099BP (Korea Collection Type Culture, Daejeon, Korea)로부터 생산된 것(이하 DMJ-A)과 *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP로부터 생산된 불용성 β -1,3-glucan (이하 DMJ-D)을 glucanase에 의해 수용화한 것(이하 DMJ-E)이다.

배양 배지(pH 7.0)는 리터당 sucrose 20 g, yeast extract 5 g, peptone 5 g으로 이루어졌으며, 발효배양액은 리터당 100 g sucrose, 4.42 g (NH₄)₂Cl, 1.44 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 10 ml의 미량원소용액(5 g/l FeSO₄ · 7H₂O, 2 g/l MnSO₄ · H₂O, 1 g/l CoCl₂ · 6H₂O, 1 g/l ZnCl₂, 초기 pH 7.0) 함유하고 있다. 발효조 배양은 용존산소분석기와 pH 조절기를 장착한 5l 발효기를 사용하였다. 30°C에서 17시간 동안 배양한 종배양액 300 ml을 발효배지 2.7l를 포함한 발효조에 접종하였다. pH는 3 N NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였으며 교반속도와 통기량은 각각 600 rpm, 0.5 vvm으로 하였다. 배양이 끝난 발효액을 적절한 농도로 희석하여 18,000 rpm, 30°C, 30분 동안 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 에탄올 농도가 80%가 되도록 에탄올을 가하여 4°C, 24시간 동안 방치한 후 원심 분리하여 상등액과 침전물을 얻었다. 2~3회 반복된 에탄올 처리 후 원심분리로 얻어진 침전물을 동결 건조하여 수용성 다당인 DMJ-A을 얻었다.

DMJ-E는 불용성 다당인 DMJ-D를 *Cellulomonas* sp. ATCC 21712로부터 생산된 glucanase에 의해 수용화한 것이다. *Cellulomonas* sp. ATCC 21712는 1% DMJ-D를 포함한 YCWD 배지(tryptone 10 g/l, yeast extract 1 g/l)에서 32°C, 48시간 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 2% DMJ-D를 첨가하여 40°C, 48시간 동안 진탕배양기에서 반응시킨 후 6,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 잔여 불용성 다당을 제거하였다. 상등액을 70°C, 20분 동안 처리하여 glucanase를 불활성화하였다. 이 시료에 에탄올 농도가

75%가 되도록 에탄올을 가하여 4°C, 8시간 동안 방치한 후 원심 분리하였으며, 침전물을 동결 건조하여 수용성 DMJ-E을 얻었다.

인체말초혈액단핵세포(PBMCs)의 IFN- γ 의 측정. Human PBMCs를 각각 5×10⁶ cells/ml의 농도로 96 well plate에 100 μ l씩 넣고, endotoxin에 의한 오염을 중화시키기 위해 10 μ g/ml의 polymyxin B를 처리하였다. Phytohemagglutinin (PHA) 1 μ g/ml, lipopolysaccharide (LPS) 5 μ g/ml, IL-18 50 ng/ml과 DMJ-A, DMJ-E를 30, 60 μ g/ml씩 처리하여 24시간 배양하여 OptEIA human IFN- γ ELISA kit (Pharmingen, USA)를 이용하여 측정하였다.

조직에서 사이토카인 측정. 마우스 4마리의 복강에 3일 동안 DMJ-A와 DMJ-E 250 μ g을 주사하고, 2마리는 24시간 후 흉선과 비장을 채취하였으며, 나머지 2마리는 LPS 10 μ g을 주사하고 12시간 후 흉선과 비장을 채취하여 acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction방법에(15) 의해 total RNA를 분리하였다. RNA 7 μ g과 400 ng p (dT)₁₅ primer (Roche, Germany), 75 U reverse transcriptase (Stratagene, USA), 10X reaction buffer, 300 mM dNTP (Roche)를 37°C에서 1시간 30분, 95°C에서 5분간 반응시켰다.

Primer 선정. GAPDH, IL-1 β , IL-2는 Colle 등이 보고한 primer를 사용하였으며(16), 다른 primer는 IL-6 sense primer(S): 5'-CTC TGC AAG AGA CTT CCA TC-3' antisense primer (AS): 5'-GCC GAG TAG ATC TCA AAG TG-3', TNF- α (S): 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG A-3', (AS): 5'-ACA GAG CAA TGA CTC CAA AG-3' IL-1Ra(S): 5'-CTT CTG TTT CAT TCA GAG GC-3', (AS): 5'-GAT GCC CAA GAA CAC ACT AT-3'를 사용하여 중합연쇄반응을 하였다. 유전자의 증폭을 위한 혼합액의 조성은 cDNA 4 μ l, 10 pmole sense primer, antisense primer, 0.2 mM dNTP, 10X reaction buffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 50 mM KCl₂, 0.001% gelatin), 5X Qual-upTM solution (Tulgene, Daejeon, Korea), 1unit Taq DNA polymerase (Tulgene) 및 3차 멸균수를 혼합하여 50 μ l 채운 후 GAPDH, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-1Ra와 IL-2 유전자의 증폭을 위하여 94°C에서 10분 1cycle, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분 30초 30 cycle, 72°C 10분 1cycle을 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)을 이용하여 중합연쇄반응을 하였다.

항체생성의 보조 효과 측정. E6과 E7는 pET28a vector (Novagen, USA)를 이용하여 *E. coli*에서 발현되도록 제조하였다(17). 제조한 E6 및 E7의 순수한 단백질 20 μ g과 DMJ-A, DMJ-E 250 μ g, 물 또는 MPL+TDM Adjuvant (Sigma, USA) 혼합물 200 μ l를 만들어 0, 7, 14 및 21일에 주사한 마우스에서 25일째 심장 혈관에서 혈액을 얻어 실온에서 2시간 방치 후 원심 분리하여 혈청을 수거하였

다. 혈청을 E6, E7이 코팅 되어진 plate를 사용하여 E6와 E7의 항원에 대한 항체 역가를 ELISA로 확인하였다.

대식세포에서 NO의 측정. 사람대식세포 THP-1세포는 10% heat inactivated FBS (HyClone®, Logan, UT)가 포함된 RPMI Medium 1640 (GibcoBRL, USA)에 2×10^5 cells/well 배양하고, 마우스대식세포 RAW 264.7 세포는 10% heat inactivated FBS가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (GibcoBRL)에서 2×10^5 cells/well을 배양하였다. DMJ-E의 처리는 THP-1세포에 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하고, 3시간이 지난 후 LPS $1 \mu\text{g/ml}$ 를 처리하고 대조군은 LPS를 처리하지 않았다. RAW 264.7 세포는 DMJ-A를 $50 \mu\text{g/ml}$ 처리한 후, LPS $0.1 \mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 Migliorini 등의 방법(18)으로 NO를 측정하였다.

in vitro에서 항암 효과 측정. 세포 배양에 있어서 정상 세포군은 섬유아세포 NIH/3T3세포를 사용하였으며, 암 세포군은 자궁암 세포군인 HPV 16(+) CaSki, C3와 복강암세포 Sarcoma 180을 이용하였다. 정상 세포군과 암 세포군을 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배지에서 1×10^5 cells/well로 분주하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 DMJ-A와 DMJ-E를 $40 \mu\text{g/ml}$, $120 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양된 세포에 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2H tetra-zolium, inner salt)와 phenazine methosulfate (PMS)를 39 : 1로 섞어서 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C 에서 1시간에서 3시간까지 배양 후 490 nm에서 측정하였다.

in vivo에서 항암 효과 측정. 복강암세포 Sarcoma 180을 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 배양한 후 PBS에 희석시켜 5×10^6 cells/mouse를 ICR 마우스에 주사하였다. 24시간 후 DMJ-A와 DMJ-E를 각각 $250 \mu\text{g/mouse}$ 씩 복강에 7일 동안 주사기로 투여하고, 일주일에 한번씩 생존 여부를 확인하였다.

결 과

인체말초단핵세포에서 IFN- γ 의 생성에 미치는 영향. 인체말초단핵세포를 분리해서 DMJ-A, DMJ-E와 PHA, LPS, IL-18을 24시간 처리하여 β -1,3-glucan이 인체말초 단핵세포의 IFN- γ 에 미치는 영향을 관찰하였다. β -1, 3-glucan을 단독처리하였을 경우 DMJ-A가 DMJ-E보다 300 pg/ml 정도의 IFN- γ 를 더 많이 유도하였고, PHA와 함께 처리한 DMJ-A가 PHA/DMJ-E보다 3배 정도 IFN- γ 의 생성을 더 많이 유도하였다. 그러나, LPS 혹은 IL-18 과 함께 처리했을 경우 DMJ-A와 DMJ-E가 비슷한 증가를 보였으며, 이들 β -1,3-glucan들에 의한 IFN- γ 의 생성에 대한 상승효과는 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

마우스 조직에서 사이토카인의 발현양상. DMJ-A, DMJ-E 투여와 LPS 투여군 및 무 투여군에 따른

GAPDH, IL- 1β , IL-6, IL-Ra와 IL-2 사이토카인 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과 GAPDH의 유전자의 발현이 마우스의 흉선과 비장조직에서 모두 일정하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 염증성 사이토카인 IL- 1β 는 흉선과 비장에서 많이 발현되었으며(Fig. 2), TNF- α 는 흉선과 비장에서는 잘 발현이 되지 않았다(data not shown). 흉선과 비장에서 β -1,3-glucan에 의한 IL-6의 발현량은 매우 적었다. IL-2 mRNA는 흉선에서는 DMJ-A, 비장에서는 DMJ-E에 의해 약간 증가함을 알 수 있었다. DMJ-A를 처리한 흉선에서 항염증성 사이토카인인 IL-1Ra mRNA의 발현양이 약간 증가되었으나 비장에서는 별 차이가 없었다. LPS를 처리한 흉선 조직에 DMJ-E를 함께 처리하면 LPS에 의한 IL-1Ra mRNA의 발현이 DMJ-E에 의해 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2). 본 연구에서는 β -1,3-glucan의 양성 대조군으로 LPS를 사용하였다. LPS는 endotoxic하며 동물숙주의 면역계를 자극하고 세균에 의한 동식물체의 감염과정에서 독성인자로서 작용한다(19). 세균 자신에 대한 LPS의 생리적 역할은 잘 알려져 있지 않으나, Mg^{++} 와 같은 2가의 양이온들과 결합하여 세포 내로 전달해 주거나(20), 소수성 항생제와 같은 물질들을 배척하여 세포를 보호하는 세포투과 차단체로 작용한다고 알려져 있다(21,22).

항체생성의 보조 효과. β -1,3-glucan이 B 세포를 활성화하여 항체를 생성하는 데 관여하는지 여부를 알아보기 위하여 β -1,3-glucan에 의한 항체형성의 보조 효과실험을 하였다. 비교 물질로 물과 항원으로 E6 및 E7을 함께 처리한 후 항원(E6, E7)에 대한 항체의 역가를 측정하였

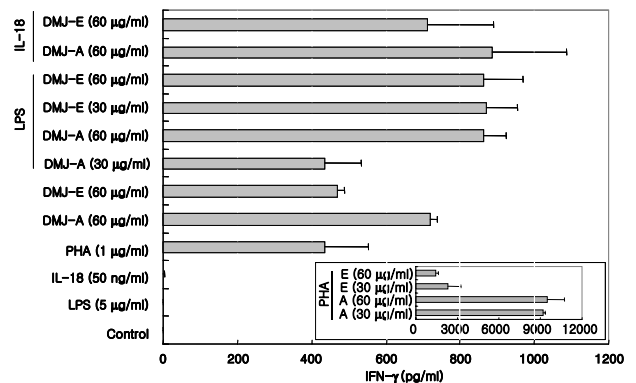


Figure 1. The effect of soluble β -1,3-glucans on IFN- γ production in PBMCs in the presence or absence of costimulator. Polymyxin B ($10 \mu\text{g/ml}$) was added to the cells to neutralize endotoxin. The concentrations of the reagents used were as follows; LPS ($5 \mu\text{g/ml}$), IL-18 (50 ng/ml), PHA ($1 \mu\text{g/ml}$), and β -1,3-glucans ($30, 60 \mu\text{g/ml}$). PBMCs (5×10^5 cells/well) were given with PHA and β -1,3-glucan, and incubated at 37°C for 24 h in a humidified 5% CO_2 incubator. Subsequently, the culture supernatants were collected and IFN- γ concentrations were measured as described in materials and methods.

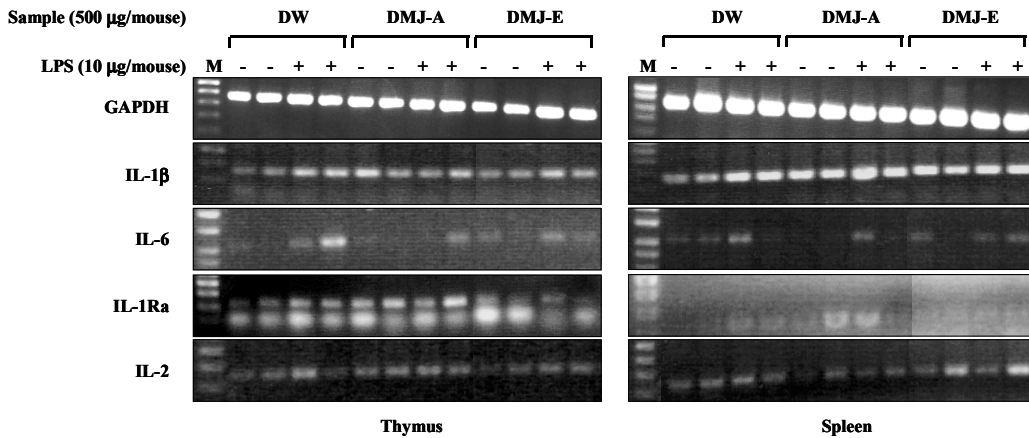


Figure 2. Expression of IL-1 β , IL-6, IL-1Ra, and IL-2 mRNAs in thymi and spleens of Balb/c mice treated with DMJ-A and DMJ-E in the presence or absence of LPS. Balb/c mice were injected 3 times with DMJ-A, DMJ-E (250 μ g/mouse) and treated with or without LPS (10 μ g/mouse). Total RNAs extracted from thymi and spleens were performed by RT-PCR and PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel.

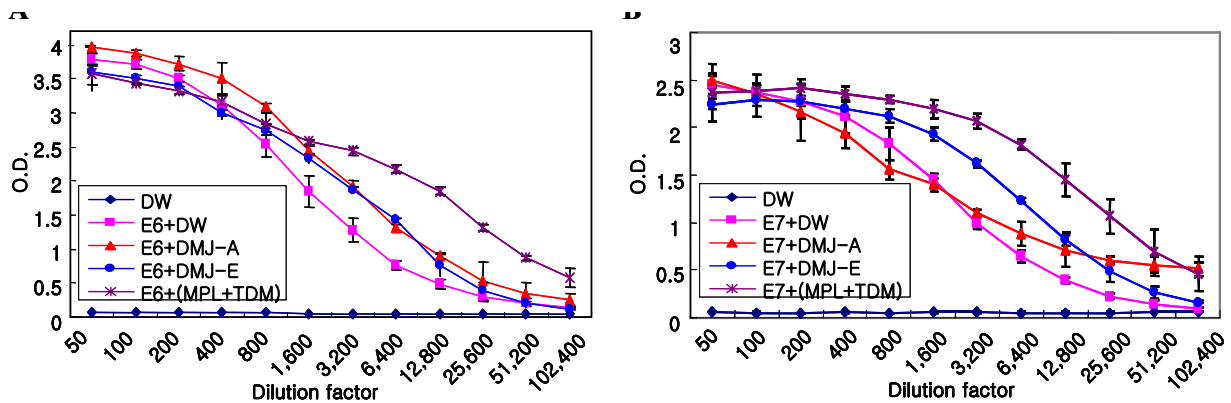


Figure 3. The adjuvant effects of β -1,3-glucans on antibody titers against E6 and E7 antigens. A; E6 (20 μ g/mouse) or B; E7 (20 μ g/mouse) and β -1,3-glucans (250 μ g/mouse), MPL+TDM (100 μ l/mouse) or saline were *i.p.* administered to ICR mice on day 0, 7, 14 and 21. Blood was obtained by cardipuncture on day 25. The E6 or E7 antibodies in sera were measured by ELISA.

다. 항원을 코팅한 microtiter well에 항혈청을 희석하여 반응시킨 후 결합된 항체를 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체로 확인해 본 결과, E6, E7 항원 자체에 대한 항체의 역가는 각각 1600, 2400 정도로 낮았으나 E6, E7 항원에 adjuvant기능이 매우 우수한 MPL+TDM을 혼합하여 처리한 경우에는 E6, E7 항원에 대한 각각의 항체의 역가는 140,800, 22,400 정도로 높게 나타났다. DMJ-A 및 DMJ-E의 항체 형성의 보조 효과를 알아보기 위해 E6, E7 항원에 DMJ-A나 DMJ-E를 각각 함께 혼합하여 처리하였다. DMJ-A를 혼합하여 주사하였을 때 E6, E7항원에 대한 각각의 항체의 역가는 2,880, 2,560 정도로 이들 수치는 E6, E7 항원 자체에 대한 항체의 역가보다 약간 높은 편이었다. DMJ-E를 혼합하여 주사한 실험군의 경우, E6, E7항원에 대한 각각의 항체의 역가는

3,250, 8,533 정도로 이들 수치는 E6, E7 항원 자체에 대한 항체의 역가보다는 높은 편이었으나 adjuvant기능이 매우 우수한 MPL+TDM을 혼합하여 처리한 경우보다는 낮게 나타났다(Fig. 3, Table I).

대식세포에서 NO합성에 미치는 영향. 사람대식세포 THP-1에 LPS를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우에서 β -1,3-glucan DMJ-E의 농도가 NO의 농도에 미치는 효과를 측정해 본 결과, DMJ-E의 농도가 증가할수록 NO의 농도가 비례적으로 증가하는 경향을 보였다. DMJ-E만을 처리한 세포와, LPS를 DMJ-E와 함께 처리한 THP-1 세포에서의 NO 생성에는 별 변화가 없었으며 LPS 처리만으로 THP-1 세포에서 NO 생성은 유도되지 않았다(Fig. 4A). 마우스 대식세포 RAW 263.7에 DMJ-A, LPS를 처리하여 NO의 농도를 측정해 본 결과 LPS보다 DMJ-A에

의해 NO가 약간 더 분비되었다. LPS와 DMJ-A를 함께 처리 한 결과 LPS의 영향은 없는 것으로 생각된다(Fig. 4B). 인체말초단핵세포에서는 모두 DMJ-A, DMJ-E에 의해 NO가 유도됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4C).

in vitro에서 세포의 증식효과와 항암 효과. 물질의 독성 또는 세포의 증식 효과를 알아보기 위해 정상 세포인 섬유아세포 NIH3T3, 복강암 세포 Sarcoma 180, 자궁경부암세포 HPV 16(+) CaSki와 C3에 DMJ-A와 DMJ-E를 종류와 농도별로 각각 처리하여 MTS assay로 반응시키고, ELISA Reader로 발색 정도를 측정하여 control 100을 기준으로 하여 환산한 결과 NIH3T3 세포에서는 DMJ-A 및

DMJ-E 40 μ g/ml 농도에서는 약 18%가 증가된 것으로 보아 세포 증식 효과가 있고 세포에 독성이 없다고 생각되었다. 120 μ g/ml 정도의 높은 농도에서는 10~15% 정도 약간 감소된 것으로 보아 세포에 약간의 독성이 있어 세포의 증식을 억제하는 것으로 생각된다(Fig. 5A). 항암 효과는 복강암세포 Sarcoma 180 세포에서는 DMJ-A와 DMJ-E의 40 μ g/ml에서는 약 40%가 감소된 것으로 보아 항암 효과가 있는 것으로 판단된다(Fig. 5B). 자궁 경부암세포 CaSki세포에서는 DMJ-A와 DMJ-E 모두 20% 정도 감소된 것으로 나타났으며(Fig. 5C), 자궁경부암세포 C3세포에서는 DMJ-A에 의해 50% 정도, DMJ-E에 의해서는 20~30% 정도 감소된 것으로 나타났다(Fig. 5D). **in vivo에서의 항암 효과.** *in vivo*에서의 항암 효과를 조사하기 위하여 복강암세포 Sarcoma 180을 마우스의 복강에 투입하여 암을 생성시키고, DMJ-A, DMJ-E와 물을 7일 동안 투여한 후 생존율을 확인하였다. 물과 DMJ-A를 투여군은 3주가 되면서 모두 폐사하였으나, DMJ-E를 투여한 군에서는 2마리가 9주 후까지 생존하였다. 항암 효과는 Sarcoma 180을 복강에서 주입한 후 DMJ-A와 DMJ-E를 처리한 경우에 β -1,3-glucan의 종류에 따라 항암 효과는 다르지만 명백한 생존율을 확인할 수 있어 β -1,3-glucan이 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Table II). 모든 β -1,3-glucan이 암세포를 주입 전 또는 후에 β -1,3-glucan을 복강 주사, 구강 투여와 정맥주사를 할 경우에 항암 효과를 나타낸다고 보고한 결과와 일치한다(7-12).

Table I. The comparison of β -1,3-glucans as adjuvant for Ab production against E6 and E7 antigens

| β -1,3-glucans | E6 Ab Titer | E7 Ab Titer |
|----------------------|-------------|-------------|
| Normal | - | - |
| DW | 1,600 | 2,400 |
| DMJ-A | 2,880 | 2,560 |
| DMJ-E | 3,250 | 8,533 |
| MPL+TDM | 140,800 | 22,400 |

E6 (20 μ g/mouse) or E7 (20 μ g/mouse) and DMJ-A, E (250 μ g/mouse), MPL+TDM (100 μ l/mouse) or saline were i.p. administered to ICR mice on day 0, 7, 14 and 21. Blood was obtained by cardipuncture on day 25. The levels of E6 and E7 antibodies in sera were measured by ELISA

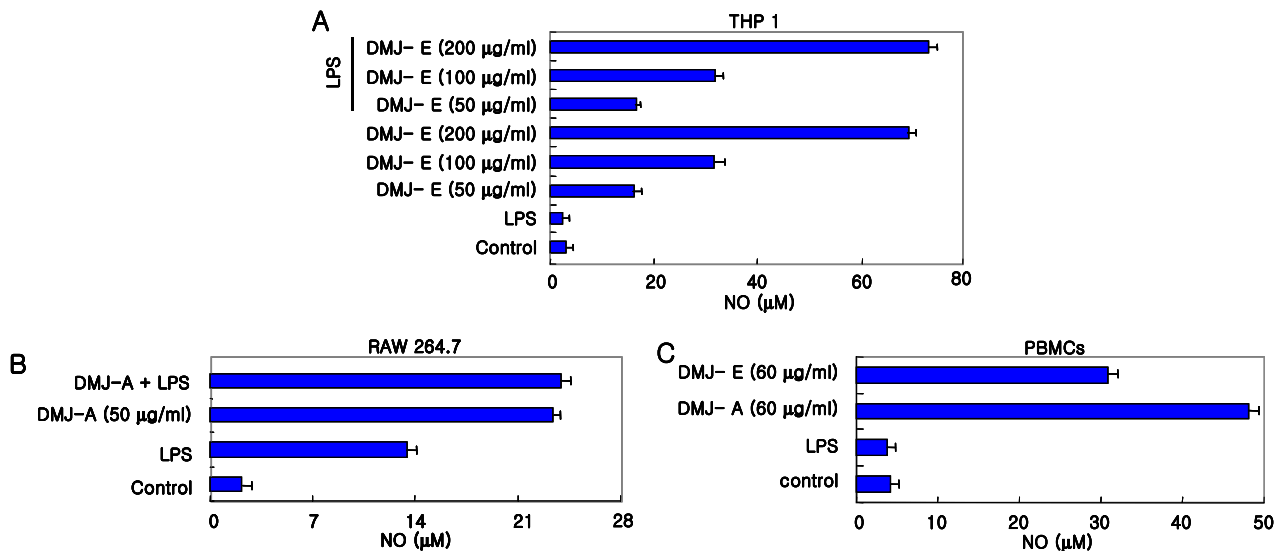


Figure 4. The effects of β -1,3-glucans on the NO production in THP-1, RAW 263.7 and PBMCs. A). THP-1 cells (2×10^5 /well) were incubated for 4 h with various doses of E (DMJ-E, 50, 100, 200 μ g/ml) in the presence or absence of LPS (1 μ g/ml). B). RAW 263.7 cells (4×10^4 /well) were incubated for 4 h and treated with DMJ-A (50 μ g/ml), LPS (0.1 μ g/ml). C). PBMCs (1×10^6 /well) were incubated for 4 h and treated with A, E (60 μ g/ml) and LPS (0.1 μ g/ml). After an additional 24 h incubation at 37 $^{\circ}$ C in a humidified 5% CO₂ incubator, the culture supernatants were collected and nitric oxide concentrations were measured as described in materials and methods.

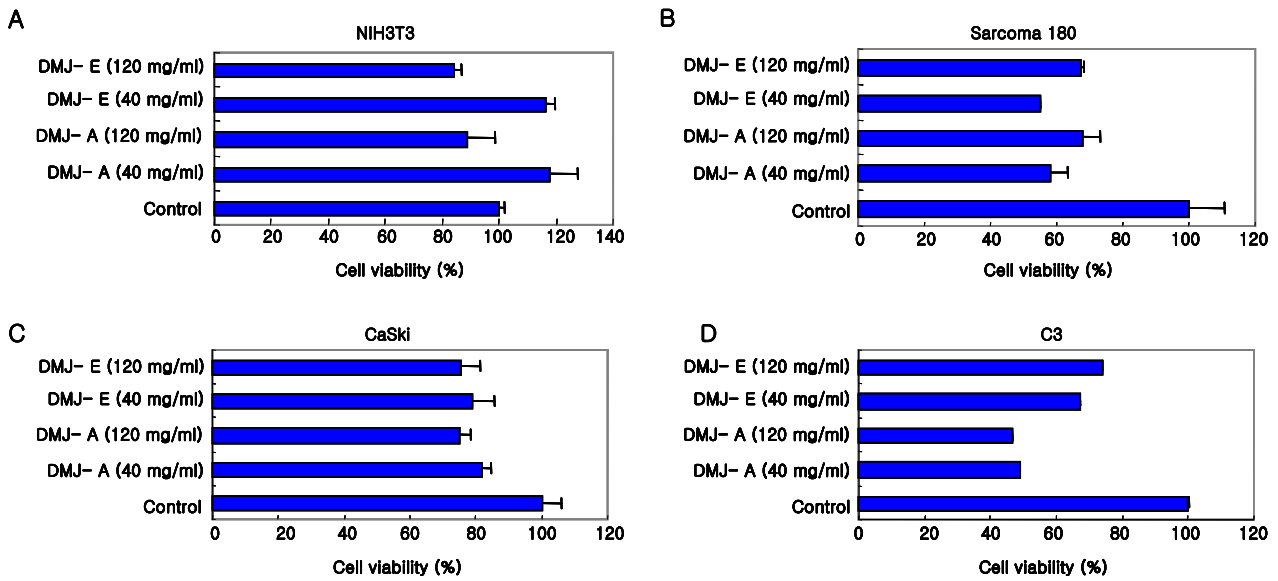


Figure 5. The effect of β -1,3-glucans on the viability of various cells by MTS assay. A; NIH3T3, B; Sarcoma 180, C; CaSki and D; C3 cells (1×10^5 cells/well) were preincubated at 37°C for 24 h in a humidified 5% CO_2 . The different doses of DMJ-A, DMJ-E (40, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were given into NIH3T3, Sarcoma 180, CaSki and C3 for 48 h, respectively.

Table II. Antitumor activity of β -1,3-glucans against Sarcoma 180 ascites tumor in ICR mice

| β -1,3-glucans | NO. of survivors/total | | | |
|---|------------------------|---------|---------|---------|
| | <3 week | <4 week | <7 week | <9 week |
| DW (100 μl) | 0/7 | - | - | - |
| DMJ-A (250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) | 0/7 | - | - | - |
| DMJ-E (250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) | 3/7 | 2/7 | 2/7 | 2/7 |

Sarcoma 180 tumor cells (5×10^6) were inoculated into ICR mice on day 0. DMJ-A, E or H_2O were i.p. administered to the same mice on 7 times (1~7 day). For 9 weeks after tumor inoculation, survival rate were checked and the values in the table represent number of survivors.

고찰

β -1,3-glucan은 곰팡이, 효모, 조류, 박테리아와 고등 식물과 같은 다양한 종류에서 얻을 수 있다. β -1,3-glucan은 면역체계를 활성화시키고 면역 조절물질로서 작용을 하고(23,24), 면역 반응을 증폭하여 항암 치료제로 사용하고 있다(25-28). 이러한 내용을 바탕으로 여러 가지 사이토카인의 생성(29,30)과, 항체 보조제 효과(31), NO 분비, 항암 효과(32-35)를 확인하였다. 본 연구에 이용된 수용성 β -1,3-glucan은 *Agrobacterium* sp. beta 82 KCTC 10099BP로부터 생산된 DMJ-A와 *Agrobacterium*

sp. R259 KCTC 10197BP로부터 생산된 불용성 β -1,3-glucan DMJ-D를 glucanase에 의해 수용화한 DMJ-E이다. 본 연구에서는 면역체계를 증폭하고 다양한 면역 조절 물질의 가능성을 확인하였다. 다양한 사이토카인들은 면역계를 구성하는 세포에 작용하여 면역세포의 분화와 특이적인 기능을 담당하며, 하나의 네트워크로서 연결하고 있다. 본 실험에서는 말초혈액단핵세포, 비장과 흉선에서 사이토카인의 발현을 측정하였다. DMJ-A, E는 말초혈액 단핵세포에서 $\text{IFN-}\gamma$ 를 방출하였다. β -1,3-glucan을 처리하여 $\text{IFN-}\gamma$ 가 다량 방출되면 세포가 2'-5' oligoadenylate synthetase와 같은 효소를 합성하게 되는데, 이들 효소는 바이러스의 RNA 혹은 DNA의 복제를 방해하여 바이러스 복제를 억제하는 역할을 할 뿐만 아니라, 자연살해세포의 용해 능력을 증가시키며, T 임파구와 NK세포를 활성화하여 선천성과 후천성 면역반응에 작용할 것으로 생각된다(36). $\text{IFN-}\gamma$ 는 대식세포를 활성화한다. 활성화된 대식세포는 세균의 탐식, 항원의 발현, 염증성 사이토카인을 분비한다고 알려져 있다(37,38). 그러나, 베타 글루칸에 의해 생성된 $\text{IFN-}\gamma$ 의 작용 기전은 아직 알려지지 않았다(39). 본 연구에서 흉선과 비장의 사이토카인 발현 정도를 측정할 이유는 비장은 대표적인 세망 내피계의 기관이고, 흉선은 체내의 면역학적 발현 및 성숙에 필수적인 기관이므로, 글루칸 투여 시 나타나는 비특이적인 면역학적 반응을 관찰하기 위하여 DMJ-A와 DMJ-E로 자극을 주었을 때 흉선과 비장에서 다양한 사이토카인 IL-1 β , IL-6, IL-1Ra와 IL-2의 발현 정도를 알아보았다. 사이토카인의 mRNA 변화는 DMJ-A,

E를 처리하였을 때나, LPS로 자극을 주었을 경우 큰 변화는 없었다(Fig. 2). DMJ-A와 DMJ-E는 모두 IL-1 β mRNA를 흉선과 비장에서 증가시키고, DMJ-E는 흉선에서 LPS에 의해 증가된 IL-1Ra가 β -1,3-glucan을 처리하였을 때 감소하였다. 이 결과로 미루어 DMJ-A와 DMJ-E는 IL-1 저해제인 IL-1Ra 발현을 저해하고 염증성 반응 매개인자 IL-1을 증가시키는 것으로 생각된다. 증가된 IL-1은 세균의 탐식, 살균작용을 하고(40), 종양세포에 상해 및 증식을 억제할 뿐만 아니라(41), 면역계의 T세포를 증식할 것으로 생각된다. DMJ-A와 DMJ-E에 의한 항체 생성의 보조효과를 확인해 본 결과 모두 항체 보조효과가 있음을 확인할 수 있었다(31). β -1,3-glucan은 사이토카인을 생산하여 T임파구와 B임파구의 항원 특이적인 면역반응이 활성화됨으로써 IL-2와 IFN- γ 가 분비된다. 이렇게 분비된 사이토카인은 세포 장애성 T세포를 활성화시키고, 대식세포의 세포장애기능도 활성화시킴으로써 IL-1 β 가 분비된다. IL-1 β 는 암세포를 파괴하는 작용을 할 것으로 생각된다. 본 실험에서도 DMJ-A와 DMJ-E를 처리하여 IL-1 β 가 발현되고 iNOS가 활성화되어 NO의 합성이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. IL-1에 의해 매개되는지를 알아보기로 DMJ-A와 DMJ-E를 IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist)와 함께 처리한 후 NO의 생성여부를 측정해 보아야 할 것이다. DMJ-A와 DMJ-E에 의해 분비된 NO에 의해 세포사멸을 유도하거나 보호를 하고, 사이토카인이 생산되어 면역 담당세포의 신생을 촉진시키며 암의 화학요법과 방사선 요법으로 저하된 백혈구를 회복시키는 역할을 하는 것으로 생각된다. 본 실험에서도 마우스의 복강 암에 DMJ-A와 DMJ-E를 투여하여 항암 효과를 실험한 결과, DMJ-E를 처리하였을 경우에는 항암효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 살펴보면 DMJ-A와 DMJ-E 모두 다양한 사이토카인들은 면역계를 구성하는 세포에 작용하여 하나의 네트워크로서 연결하여 면역반응을 증폭할 것으로 생각되며 더 나아가 DMJ-E는 항암 치료제로도 사용가능할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 제 9차 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업(SCS0100119)으로 수행된 결과이며, 본 연구에 사용된 수용성 β -1,3-glucan을 공급해 준 (주)더멋진바이오텍에 감사드린다.

참 고 문 헌

1. Bohn JA, Bemiller JN: (1 \rightarrow 3)- β -glucan as biological response modifier: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28;3-114, 1995
2. Hamada H, Sato M, Ozawa M, Ohi Y, Muramatsu T: Transmembrane control of laminin, lectin receptors and surface villi in teratocarcinoma-derived endodermal cells. *Exp Cell Res* 154; 299-303, 1984
3. Williams DL: Overview of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation* 6;247-250, 1997
4. Doita M, Rasmussen LT, Seljelid R, Lisky PE: Effects of soluble aminated β -1, 3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function. *J Leukocyte Biol* 49;342-351, 1991
5. Artursson P, Edman P, Ericsson JLE: Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scand J Immunol* 25;245-254, 1987
6. Petersen RD, Reinhold W, Tyborczyk J: Cytokines in cosmetology. *Cosmetics and Toiletries Magazine* 112;165, 1997
7. Kasai S, Fujimoto S, Kazuo N, Baba H, Kunimoto T: Antitumor Activity of Polymorphonuclear Leukocytes Activated by a β -1, 3-D-Glucan. *J Pharmacobio DYN* 14;519-525, 1991
8. Krause J, Franz G: Immunomodulating effects of polysaccharides from medicinal plants. *Adv Exp Med Biol* 319;299-308, 1992
9. Miura T, Niura NN, Ohno N, Adachi I, Shimada S, Yadomae T: Failure in antitumor activity by overdose of an immunomodulating β -glucan preparation, sonifilan. *Biol Pharm Bull* 23; 243-253, 2000
10. Miura T, Ohno N, Minra NN, Shimada S, Yadomae T: Inactivation of a Particle β -glucan by Proteins in Plasma and Serum. *Biol Pharm Bull* 20;1103-1107, 1997
11. Ohno N, Niura NN, Chiba N, Adachi Y, Yadomae T: Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice. *Biol Pharm Bull* 18;1242-1247, 1995
12. Wagner H, Stuppner H, Schafer W, Zenk M: Immunologically active polysaccharides of Echinacea purpura cell cultures. *Phytochem* 27;119-126, 1988
13. Adrian J, Puren G, Fantuzzi, Dinarello CA: Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci* 96;2256-2261, 1999
14. Chang ST, Miles PG: Historical record of the early cultivation of lentinus in china. *Mushroom J Tropics* 7;31, 1987
15. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162;156-159, 1987
16. Colle JH, Pierre BF, Singer M, Hevin B, Milon G: Quantitation of messenger RNA by competitive RT-PCR: a simplified read out assay. *J Immunol Method* 210;175-184, 1997
17. Cho YC, Cho O, Lee K, Park S, Yoon D: Development of screening systems for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res* 47;199-206, 2000
18. Migliorini P, Corradin G, Corradin SB: Macrophage NO-production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ . *J Immunol Methods* 139;107-114, 1991
19. Raetz CR: Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59;129-170, 1990
20. Ferris FG, Beveridge TJ: Site specificity of metallic ion binding in Escherichia coli K-12 lipopolysaccharide. *Can J Microbiol* 32;52-55, 1986
21. Labis H, Barnickel HB, Naumann ETR, Giesbrecht P: High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane. *J Bacteriol* 162;9-20, 1985
22. Lam JS, Graham JL, Dasgupta T, Beveridge TJ: Ultrastructural examination of the lipopolysaccharides of pseudomonas aeruginosa strains and their isogenic rough mutants by freeze-substitution. *J Bacteriol* 174;7159-7167, 1992
23. Di Luzio NR: Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin Immunopathol* 8;387-400, 1985

24. Williams DL, Pretus HA, McNamee RB, Jones EL, Ensley HE, Browder IW, Di Luzio NR: Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Immunopharmacology 22;139-155, 1991
 25. Chihara G: Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. Dev Biol Stand 77;191-197, 1992
 26. Fujimoto S: Clinical efficacies of schizophyllan (SPG) on advanced gastric cancer. Nippon Geka Gakkai Zasshi 90;1447-1450, 1989
 27. Rios-Hernandez M, Dos-Santos N, Silvia-Cardosa, Bello-Garciga J, Pedroso M: Immunopharmacological studies of beta-1,3-glucan. Arch Med Res 25;175-180, 1994
 28. Taguchi T, Kaneko Y, Chihara G: Lentinan. Biotherapy 2;509, 1988
 29. Kondo Y, Kato A, Hojo H, Nozoe S, Takeuchi M, Ochi K: Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a beta-(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Euglena gracilis*. J Pharmacobiodyn 15;617-621, 1992
 30. Nemoto J, Ohno N, Saito K, Adachi Y, Yadomae T: Analysis of cytokine mRNAs induced by the administration of a highly branched (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan, OL-2. Biol Pharm Bull 17;948-954, 1994
 31. Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N: IFN-gamma induction by SCG, 1,3-beta-D-glucan from *sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro. J Interferon Cytokine Res 22;1227-1239, 2002
 32. Mohagheghpour N, Dawson M, Hobbs P, Judd A, Winant R, Dousman L, Waldeck N, Hokama L, Tuse D, Kos F: Glucans as immunological adjuvants. Adv Exp Med Biol 383;13-22, 1995
 33. Oka M, Hazama S, Suzuki M, Wang F, Wadamori K, Iizuka N, Takeda S, Akitomi Y, Ohba Y, Kajiwara K, Suga T, Suzuki T: In vitro and in vivo analysis of human leukocyte binding by the antitumor polysaccharide, lentinan. Int J Immunopharmacol 18; 211-216, 1996
 34. Suda M, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T: Modulation of the antitumor effect and tissue distribution of highly branched (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan, SSG, by carrageenan. Biol Pharm Bull 18;772-775, 1995
 35. Tsuzuki A, Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T: Increase of hematopoietic responses by triple or single helical conformer of an antitumor (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan preparation, sonifilan, in cyclophosphamide-induced leukopenic mice. Biosci Biotechnol Biochem 63;104-110, 1999
 36. Wasser SP: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuno-modulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 60;258-274, 2002
 37. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA: Kuby Immunology 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, p. 303-327, 2000
 38. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY: Identification of interferon- γ the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med 158;670-689, 1983
 39. Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RA: Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. J Leukocyte Biol 64;108-113, 1998
 40. Onozaki K, Matsushima K, Kleinerman E, Saito T, Oppenheim J: Role of interleukin-1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. J Immunol 135;314-320, 1985
 41. Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal B: Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. J Immunol 135;3962-3968, 1985
-