

# 인삼다당체 진산과 유사구조 다당체의 면역증강활성작용

<sup>1</sup>원자력의학원 면역학연구소, <sup>2</sup>고려대학교 생명공학과

심지영<sup>1,2</sup> · 정인성<sup>1</sup> · 김찬화<sup>2</sup> · 윤연숙<sup>1</sup> · 송지영<sup>1</sup>

## Comparison between Immunostimulatory Activity and Molecular Structure of Different Polysaccharides

Ji-young Shim<sup>1,2</sup>, In-Sung Jung<sup>1</sup>, Chan-Wha Kim<sup>2</sup>, Yeon-Sook Yun<sup>1</sup> and Jie-Young Song<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea, <sup>2</sup>Laboratory of Biopharmaceutical Processes, Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background:** We previously reported that ginsan, a polysaccharide extracted from *Panax ginseng* had an immunostimulatory activity such as mitogenic activity, activation of macrophages and killer cells, and production of a variety of cytokines which resulted in antitumor and antiseptic effects. We further purified  $\alpha$ -(1→6)-glucan and  $\beta$ -(2→6)-fructan from the ginsan with size exclusion and ion-exchange column chromatography successively. In this study, we performed the structure-based activity of ginsan by comparison with known polysaccharides such as  $\beta$ -glucan, curdlan, laminarin, levan, dextran, lentinan and OK-432. **Methods:** To investigate the immunostimulatory activity of several polysaccharide compounds, we investigated the stimulation of lymphocytes proliferation, the generation of activated killer cells and the secretion of nitrites from activated macrophages. **Results:** Of polysaccharides tested, curdlan and ginsan stimulated lymphocyte proliferation, suggesting that the molecular weight and composition of polysaccharide are dependent on the mitogenic activity. The production of nitric oxide was significantly increased in curdlan, levan, ginsan and its fraction, indicating that fructan has also capacity to activate macrophages and may devote to kill pathogens. In addition, the activation of macrophages was seemed to be independent of molecular weight of polysaccharide. The generation of AK cells was exhibited in order of curdlan, OK-432 > F1, ginsan, F3 > levan > etc. The AK activity may be dependent on molecular weight and composition of polysaccharides. **Conclusion:** Unfortunately, purified polysaccharide from ginsan were less active on immunostimulatory activity than mixed compounds of polysaccharides. From the viewpoint of structure and activity relationships, we found several characteristic features. (*Immune Network* 2004;4(2):94-99)

**Key Words:** Polysaccharide, immunostimulatory activity, mitogenic, nitric oxide, activated killer (AK) cells

### 서 론

인류의 생존과 함께 다양한 위험요소가 질병을 유발하고 이의 퇴치를 위한 의학기술의 눈부신 발전에도 불구하고 새로운 질환은 끊임없이 위협을 가하고 있다. 이는

미생물이나 바이러스의 직접 감염에 의한 발병보다는 전반적으로 약해진 인체 면역시스템과 증가되는 환경오염, 스트레스 등의 사회적 요인이 더 큰 비중을 차지하는 것으로 생각되고 있다. 암이나 AIDS 혹은 SARS 같은 중한 난치성 질환뿐만 아니라 천식, allergy 같은 현대인에 증가하는 질환들도 일면에서는 개인의 내재된 면역 균형, 항상성(homeostasis)이 깨지면서 생겨난다고 볼 수 있다. 최근 분자생물학의 급격한 발전으로 세포 내 신호전달 과정과 세포 간의 상호작용에 대해 많은 정보를 얻게

책임저자 : 송지영, 원자력의학원 면역학연구소  
☎ 139-706, 서울시 노원구 공릉동 215-4  
Tel: 02-970-1308, Fax: 02-970-2402  
E-mail: immu@kcch.re.kr

되면서 한 방향으로 전달되리라고 생각했던 신호전달이 쌍방향 혹은 역방향으로도 작용할 수 있고 하나의 전달 체계가 아닌 거대한 network를 구성한다는 결론을 얻게 되었다. 따라서 중요한 신호전달과정을 조절함으로써 인체 자연 방어시스템에 긍정적으로 영향을 미칠 수 있는 전략을 모색하게 되었으며, 특히 면역계에 작용하여 생체의 반응을 조절할 수 있는 물질을 면역조절제 (immuomodulators) 혹은 생체 응답조절제(biological response modifiers, BRM)라 하여 질병의 예방과 치료에 이용하고자 하는 연구가 20여 년간 지속되어 왔다(1-4). 최근에는 장기이식이나 류마티스성 관절염과 같은 면역질환에 우수한 효능이 있음이 보고되었다. 하지만 이러한 물질은 대부분 활성-용량 곡선이 bell type(5)으로 실험관 내 실험에서의 우수한 활성과는 달리 생체 내 입증단계에서 투여 용량, 투여 경로, 투여 시간에 따라 매우 큰 효력의 차이를 보여 대부분이 전임상 단계에서 중단되고 있는 실정이다. 아시아 지역을 비롯한 유럽 몇 개국은 약용식물을 유용하게 질병치료에 사용하여 왔으며 이러한 천연자원으로부터 많은 의약품 선도물질들이 발굴되었다. 본 연구실에서도 인삼에서 면역증강활성이 우수한 다당체 진산을 분리하였으며 임파구 증식 및 골수세포 증식작용, 다양한 사이토카인 생성능, 대식세포 활성을 통한 항암작용 등을 보고한 바 있다(6,7). 본 연구에서는 진산을 단일성분으로 분리하였으며 기존의 상용되는 유사 구조의 다당체와 면역활성을 비교 분석해 보고자 한다.

재료 및 방법

**실험 동물.** Charles River Breeding Laboratory에서 구입한 6~8주령의 C3H/HeN 마우스(20±2 g)를 사용하였다. 사육실의 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%로 유지시켰으며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되게 하였고 고형사료 (NIH-7-open formula)와 물을 자유로이 공급하였다.

**시료.** 인삼의 물추출물로부터 80% 에탄올 침전물을 만든 다음 투석을 통해 내부분획, 진산(ginsan)(7)을 얻었으

며 이를 sephacryl S-500 및 DEAE-A50 column을 순차적으로 통과시켜 분획(F1~3)을 얻었다. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 분석을 통해 F1은 α(1→6)-glucan과 β(2→6)-fructan이 5 : 2 분자비로 구성되어 있으며 F3은 β(2→6)-fructan으로 규명하였다. 활성을 비교하기 위한 시료로 levan (WAKO), laminarin (Fluka), curdlan (Sigma), β-glucan (Sigma), lentinan (Ajinomoto, Japan), OK-432 (Chugai, Japan)를 각각 구입하여 사용하였으며 물질에 대한 상세 설명은 Table I에 요약하였다.

**사용배지.** 본 실험에 사용된 배지는 RPMI 1640에 5% Fetal Bovine Serum, 2×10<sup>-2</sup> M의 HEPES buffer, 2×10<sup>-3</sup> M glutamine, 1×10<sup>-3</sup> M pyruvate, 100 U/ml penicillin과 50µg/ml streptomycin, 5×10<sup>-5</sup> M의 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid를 첨가하여 사용하였으며 모두 GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

**임파구 증식능 실험.** 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 뒤 비장을 떼어내어 세분절편한 다음 single cell suspension을 만들었다. 시료를 농도별로 처리한 96 well flat-bottom microplate에 비장세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/0.2 ml로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양하였다. 세포를 수확하기 18시간 전에 <sup>3</sup>H-thymidine을 2µCi/well로 처리하였으며, scintillation cocktail을 3 ml 가한 다음 β-counter로 cpm을 측정하였다. 각 실험은 3배수로 하였고 같은 실험은 5회 이상 실시하였다.

**대식 세포 활성능 측정(질소산화물 생성실험).** 마우스 대식세포주인 Raw 264.7세포를 96 well-round bottomed plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well로 부착시킨 후 대상 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양한 상층액 50µl와 대조군으로 PBS 50µl을 각각 취하여 96 well-flat bottomed plate에 넣고 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid) 50µl을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준품으로는 아질산나트륨(NaNO<sub>2</sub>)을 사용하여 표준

Table I. Chemical structure of antitumor and immunostimulating polysaccharides

Polysaccharides	Species	Structure	Molecular mass
β-glucan	Barley	β-(1→3), β-(1→4)-glucan	1.95 × 10 <sup>5</sup>
Curdlan	Alcaligenes faecalis var. myxogenes	β(1→3)-glucan	9.7 × 10 <sup>4</sup>
Laminarin	Laminaria digitata	β(1→3), β-(1→6)-glucan	7.7 × 10 <sup>3</sup>
Levan	Serratia levanicum	β(2→6)-fructan	>1 × 10 <sup>6</sup>
Lentinan	Lentinus edodes	β(1→3), β-(1→6)-glucan	4.8 × 10 <sup>5</sup>
OK-432	Streptococcus aureus Su strain	Whole bacteria component	-
Dextran	Leuconostoc mesenteroides	α(1→6)-glucan	5 × 10 <sup>5</sup>
Ginsan	Panax ginseng	Mixture of glucan and fructan	6.8 × 10 <sup>5</sup>

용량 곡선을 작성하고 대상시료 처리에 의한 대식세포의 질소 산화물(nitric oxide, NO<sub>2</sub>) 생성을 산출한다.

**AK 세포 생성능 측정.** 임파구 살해 활성 실험은 4시간 <sup>51</sup>Cr 유리법을 이용하였다. 작동 세포는, 비장 세포를 24 well plate (Corning, New York, USA)에 1.5×10<sup>6</sup> cells/ml 이 되도록 RPMI1640-5% FBS배지로 희석한 후 대상 시료를 넣고 총 2 ml씩 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 양성 대조군으로는 30 U/ml의 recombinant mouse IL-2를 사용하였다. 5일 후 배양액 2 ml을 15 ml tube에 옮겨 담고 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후 2회 세척하고 5×10<sup>6</sup> cells/ml로 고정하였다. 표적세포는 murine leukemia cell line인 YAC-1을 사용하여 방사선 동위원소인 Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 200μci를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 60분간 표지시킨 다음 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 농도를 고정하였다. 작동세포와 표적세포의 비율이 100 : 1, 30 : 1 또는 10 : 1이 되도록 조정하여 96 well U-bottomed microplate (Corning, New York, USA)에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 2,200 rpm에서 5분간 원심 분리하고 상층액 0.1 ml씩 취해 γ-counter로 측정하여 다음과 같은 식에 의해 % 세포 독성(cytotoxicity)을 산출하였다.

$$\text{세포독성(\%)} = (\text{experimental release-spontaneous release} / \text{maximum release-spontaneous release}) \times 100$$

**통계분석.** 실험결과는 mean±SEM으로 나타내었고 one-way ANOVA를 이용하여 통계처리한 후 신뢰구간(P value)이 0.01 및 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

**임파구 증식능.** 인삼 다당체 진산의 임파구 증식능은 T cell mitogen인 concanavalin A (Con A)에는 미치지 못하나 B cell mitogen인 lipopolysacchride (LPS)보다는 우수하며 진산의 분획물인 F1이나 F3는 활성을 크게 상실한 것으로 나타났다. F3분획은 같은 구조의 levan보다 활성이 약간 작게 나타났으며 F1분획과 비슷한 활성을 보였다. β-glucan, lentinan, OK-432는 임파구 증식능이 거의 없으며 가지쇄가 없는 고분자량의 curdlan이 유의적인 임파구 증식활성을 나타낸 반면 저분자량의 laminarin은 활성이 약하게 나타났다(Table II). 따라서 임파구 증식능은 다당체의 분자량이 클수록, 가지쇄가 없는 β-(1→3)glucan에서 우수하며 triple helix 구조가 random coiled 구조보다 활성이 크게 나타남을 알 수 있었다. 또한 fructan은 약한 임파구 증식작용을 보였으며, F3분획의 분자량이 levan보다 작으므로 활성이 약간 감소하는 것은 타당한 결과로 해석되며 F1과 F3분획의 유사한 활성으

로 판단하여 볼 때 F1분획 중 α-(1→6)glucan은 임파구 증식활성이 없는 것으로 사료된다. 이는 dextran과 동일한 결과를 보였다.

**대식세포 활성능.** 많은 연구결과에서 β-glucan의 면역증강작용이 대식세포, T세포, 자연살해세포의 활성화를 통한 다양한 기전으로 밝혀져 있으므로 대식세포의 활성화를 질소산화물 분비량으로 측정된 결과 curdlan, levan, 진산 및 진산의 분획물 F1, F3가 유의적으로 질소산화물의 생성을 증가시켰다. 대식세포 활성인자로 IFN-γ (50 U/ml)와 LPS (10μg/ml)를 양성 대조군으로 사용하였으며 IFN-γ가 LPS보다 활성이 우수하였다(Table III). 질소산화물 생성능은 curdlan이 효과적인 반면 laminarin은 활성을 나타내지 않았으므로 random coiled 구조가 대식세포 활성에 반응하지 못함을 시사하였다. 본 실험에서도 dextran은 효능이 없는 것과 일관되게 F1과 F3 분획물의 활성이 유사하였으며, 진산의 처리결과에서 혼재하는 화합물에 의한 농도의 증가는 있더라도 fructan의 대식세포 활성능(F3, levan)과 정도가 거의 유사하므로 masking현상은 없는 것으로 유추할 수 있다.

**AK세포 생성능.** 비장세포를 여러 종류, 다양한 농도의 다당체와 5일간 배양한 다음 암세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과 curdlan, OK-432, F1 > ginsan, F3 > levan > laminarin > lentinan > β-glucan, dextran 순으로 활성이 나타났다(Fig. 1). 임파구 증식작용이나 질소산화물 생성에서 우수한 활성을 나타낸 curdlan이 AK세포 생성도 유의적으로 증가시켜 암세포 살상효능이 높게 나타났으며

Table II. Mitogenic activity of polysacchrides

Samples	Optimal concentration	<sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm)
NS	-	2476.8 ± 1060.6
Con A	2.5μg/ml	309654.0 ± 65068.1**
LPS	10μg/ml	88205.3 ± 15678.9*
β-glucan	250μg/ml	2163.2 ± 114.1
Curdlan	1,000μg/ml	131862.4 ± 16666.0**
Laminarin	1,000μg/ml	33424.5 ± 4687.2
Levan	1,000μg/ml	53926.6 ± 8968.6
Lentinan	1,000μg/ml	4295.0 ± 351.3
OK-432	62.5μg/ml	2896.8 ± 563.5
Dextran	62.5μg/ml	5196.9 ± 1203.5
Ginsan	500μg/ml	299527.3 ± 36840.7**
F1	500μg/ml	31422.6 ± 7304.2
F3	125μg/ml	34710.1 ± 10780.9

Murine spleen cells (NS, 1.5×10<sup>5</sup> cells/well) were cultured with various doses of several polysacchrides on microtiter plates. After 3 days, the growth of lymphocytes was determined by the incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine after 4 h pulsing with 2μCi of [<sup>3</sup>H]-thymidine. Results are presented the mean±S.E.M for quintuplicate from a representative experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01; significantly different from control.

Table III. Effect of some polysaccharides on the production of nitric oxides

Samples	Optimal concentration	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> production (μM)
NS	-	4.57 ± 0.61
IFN-γ	50 U/ml	39.23 ± 4.94*
LPS	10 μg/ml	21.29 ± 3.21*
β-glucan	1,000 μg/ml	3.35 ± 0.02
Curdlan	30 μg/ml	26.46 ± 0.28*
Laminarin	30 μg/ml	7.49 ± 0.13
Levan	30 μg/ml	27.72 ± 0.44*
Lentinan	125 μg/ml	4.00 ± 0.46
OK-432	125 μg/ml	8.56 ± 0.32
Dextran	1,000 μg/ml	8.72 ± 1.37
Ginsan	500 μg/ml	20.98 ± 0.13*
F1	30 μg/ml	20.85 ± 0.30*
F3	30 μg/ml	22.95 ± 0.70*

Raw264.7 cells were treated with several polysaccharides at serial dilutions for 48 h. Culture supernatants were collected and the levels of nitrite were measured by Griess reagent. The results are mean ± S.E.M of five independent experiments. \*P < 0.01; significantly different from control.

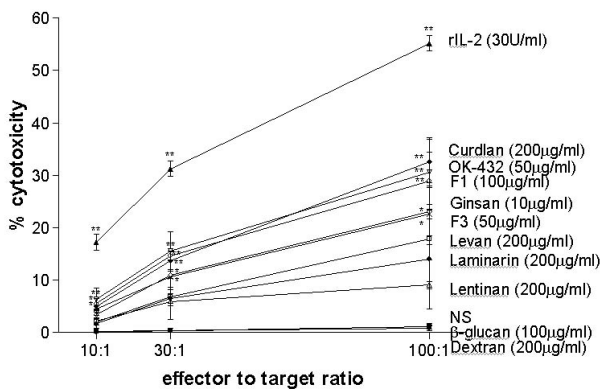


Figure 1. The generation of AK cells by several polysaccharides. C3H/HeN mouse splenocytes (3 × 10<sup>6</sup>/ml) were cultured in the presence of rIL-2 (30 U/ml) or each optimal concentration of several polysaccharides for 5 days. Cells were collected and assayed for AK cell activity. The results represented the mean ± S.E.M of values obtained from five replicated experiments. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; significantly different from control.

OK-432처리에서도 유의적인 활성이 나타났다. F3나 levan보다 진산이, 진산보다 진산 분획물 F1에서 효과가 크게 나타났으므로 진산은 fructan 외에 상승적으로 작용하는 물질이 혼재함을 시사하며, dextran의 AK세포 생성 효과가 없는데 반해 F1분획의 활성은 진산보다 오히려 우수하므로 3차 구조를 고려하거나 α-(1→6)glucan 외에 다른 소량의 물질이 존재함을 배제할 수 없다.

고찰

BRM은 1980년대에 실험관 내 실험에서 매우 고무적인 결과를 얻어 생체 내 실험으로 진행되었으나 용량-반응곡선이 일반 화합물처럼 sigmoidal curve가 아닌 bell-type curve로 최적용량을 정하지 못해 실패한 사례가 많아 담보상태에 놓여 있다(5). 하지만 암 치료에 있어 수많은 표적지향 화합물의 치료효율이 크게 증진되지 못한 결과를 나타내므로 대체요법이나 보완요법의 일환으로 다시 주목을 받고 있다. 이상적인 BRM이란 정상세포에 독성을 나타내지 않으면서 비특이적 혹은 특이적으로 모든 면역세포(T, B, NK cells, Macrophages)를 자극, 조절하는 물질을 말하며, 이에 준해서 비장세포의 증식능으로 비특이적 면역세포 활성능을 측정하였으며 다당체의 주요 표적세포인 대식세포를 대상으로 활성을 측정하고 직접적인 세포독성을 평가할 수 있는 AK세포 생성능으로 BRM screening system을 확립하였다.

효모의 불용성 세포벽 성분인 zymosan이 망내계를 자극하여 면역계를 비특이적으로 활성화한다고 보고된 1960년 이래(8), 이와 같은 작용을 하는 활성성분이 β-glucans임이 밝혀졌으며(9,10), 이를 의약적으로 개발하려는 노력이 활발히 진행되어 왔다. Beta-glucans은 효모, 곰팡이, 박테리아와 같은 병원균의 세포벽에 존재하며 항암(11-13), 박테리아 및 바이러스 감염 억제(14), 조혈 작용(15), 상처치유(16) 등 다양한 면역조절작용을 한다. BRM활성이 있는 β-(1→3)-glucan의 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)에서 분리되었으며 자낭균류(Ascomycetes), 난균류(Oomycetes) 유래의 물질도 소수 존재한다. Glucans은 구조적으로는 유사하지만 중앙별 항암효능이나 각종 세포와의 반응, 사이토카인 생성능이 매우 다르게 나타남으로써 구조와 항암작용과의 관계를 다각도로 검토하고자 많은 노력을 경주해 왔으나 아직도 일관성 있는 이론을 수립하기에는 역부족이다. 예로서 항암작용과 관련하여 Yadomae(17,18)와 Kishida 등(19)은 고분자량의 triple helix, β-(1→6)-glucan가치쇄가 필수적인 요소라고 보고하였으나 Saito 등(20)과 Goma 등(21)은 single helix구조가 핵심이라고 언급하고 있다. 또한 Demleitner 등(22)은 면역증강작용과 항암작용에서 β-(1→3)-glucan이 중요한 구조로 고분자량은 요구되지 않는다고 보고하였다. 한편으로 조혈촉진 작용은 glucan의 single helix나 triple helix 같은 conformation과 무관하며(23,24), 대식세포로부터 사이토카인 생성능, 질소산화물 및 과산화수소 생성능 등은 single helical구조가 중요하다고(18,25) 발표되어 있으므로 여전히 구조, 분자량, 분지도, 수용체와의 결합능력, 수용성 등등이 면역학적 활성과 맞물려 풀어야 할 대과제로 남아 있다.

본 실험에서는 인삼다당체의 성분과 비교 가능한 물

질로 보리에서 추출된  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)glucan과 버섯 유래 curdlan, 저분자량의 laminarin, fructan인 levan,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)glucan인 dextran, 시판중인 대표적 면역활성 다당체인 lentinan, OK-432를 선정하였다. Curdlan은  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)glucan구조의 고분자량 polymer로 비감염성, 무독성의 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*(26) 배양에서 분리된 물질로 미국 식품의약국이 제제용도(formulation aid)로 승인한 물질이다. Curdlan은 가지쇄가 없는 구조이며 불용성으로 그 자체로는 항암이나 면역활성이 없는 것으로 나타나지만 sulfonation, sulfation, phosphorylation, carboxymethylation 등의 화학적 변형을 통해 용해도를 증가시킴으로써 항암활성을 나타냄이 보고되었다(27,28). Laminarin은 curdlan과 마찬가지로  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)glucan 골격이지만 저분자량의 다당체로(29) 용해성이 우수하며,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6)glucose 가지쇄를 지닌 것으로 보고되어 있다. Laminarin도 그 자체로는 면역증강작용이 없는 것으로 보고되어 있으나 crosslinking을 통해 활성을 증가시킬 수 있으며 주로  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)glucan 수용체 연구에 많이 사용되고 있다. Levan은  $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)fructose를 가지는 polymer로 단자엽식물에서 탄수화물의 저장성분으로 혹은 과당으로부터 미생물 levansucrase에 의해 합성이 되며 미생물에서 추출된 경우에는 가지쇄를 많이 지니고 있다(30,31). Levan의 활성은 주로 B cell에 의한 항체 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다. Lentinan은 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 얻어진 대표적인 버섯다당체로 5개의  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)glucose당 2개의  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)glucose 가지쇄를 지닌 right-handed triple helix 구조이며(32), 일본에서 1985년부터 위암환자 치료에 사용되고 있다. OK-432는 *Streptococcus pyogenes* (group A)의 전염성이 약한 Su 균주를 페니실린 처리하여 죽인 다음 동결건조한 제제(33)로 악성종양 환자의 면역증강제나 면역치료제로 많이 사용되고 있다. OK-432는 대식세포, T 세포, NK 세포를 활성화하고 IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  등의 다양한 cytokine의 분비를 촉진함으로써 항종양작용을 나타낸다고 보고되어 있다(34-38). 하지만 많은 연구자가 OK-432의 주된 활성성분과 구조를 규명하려고 노력하였으나 아직 성공하지 못하고 있다.

본 연구에서는 인삼다당체 진산을 단일물질로 순수 분리하여 이와 유사한 구조나 분자량의 다당체와 면역학적 활성을 비교하였다. 임파구 증식능 실험 결과, 고분자량의 진산과 curdlan이, 대식세포의 질소산화물 생성은 진산 및 그 분획 F1, F3, curdlan, levan이 거의 유사하게, AK세포 생성능은 정제된 저분자량의 F1 분획이 진산보다 우수하였으며 curdlan의 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 진산의 경우 분리 정제된 단일성분의 다당체보다는 혼합물 상태에서 면역증강활성이 우수하였다. 일본에서 광범위하게 사용되고 있는 항암면역증강제 중

OK-432는 임파구 증식작용은 없으나 AK세포 활성이 우수하며 lentinan은 본 실험조건에서는 별로 효과적이지 못한 것처럼 보였으나 다른 문헌을 토대로 고찰한 바 이는 최적용량을 잡지 못한 것으로 판단되었다. 하지만 같은 시스템으로 활성을 측정할 경우라기보다는 사이토카인 분비능이나 세포독성시험의 결과이므로 농도 구배를 넓혀 재실험을 수행하더라도 같은 효과를 획득하기는 어려울 것으로 보인다. 또한 levan은 주로 분자량을 달리 하여 공업적으로 응용 가능한 다당체 polymer를 개발하려는 연구가 주로 진행 중이며 본 실험에서 최초로 그 면역학적 활성을 확인한 결과 대식세포 활성능이 상당히 우수한 것으로 판명되었다. 본 실험에 사용된 curdlan은 유도체 화합물이 아님에도 불구하고 실험농도에 전혀 지장이 없는 수용성을 나타내었으며 의외로 모든 실험에서 유의적인 결과를 나타내었다.

결론적으로 다당체의 면역활성을 평가함에 있어 고려할 사항이 너무 다양하므로 많은 수의 시료를 확보한 다음 확실적인 스크리닝 시스템을 통해 일괄적으로 data base화하는 작업이 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Wimer BM: The ideal biological response modifier. *Mol Biotherapy* 1;311-317, 1989
2. Talmadge JE, Herbermann RB: The preclinical screening laboratory: Evaluation of immunomodulatory and therapeutic properties of biological response modifiers. *Cancer Treat Reports* 70;171-182, 1986
3. Terry WD, Rosenberg SA: *Immunotherapy of Human Cancer*. Elsevier North-Holland. New York, 1982
4. Herbermann RB: Biological response modifiers for the treatment of cancer. In: Tsubura E, Urashizaki I, Aoki T, Sone S, Kaneto Y eds: *Rationale of Biological response Modifiers in Cancer Treatment*, p240-255, Excerpta Medica, Princeton, 1985
5. Talmadge JE, Herberman RB: The preclinical screening laboratory: Evaluation of immunomodulatory and therapeutic properties of biological response modifiers. *Cancer Treat Rep* 70;171-182, 1986
6. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY: Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int Immunopharmacol* 2;857-865, 2002
7. Lee YS, Jung IS, Lee IR, Kim KW, Hong WS, Yun YS: Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunomodulator acidic polysaccharide Ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res* 17;323-332, 1997
8. Riggi SJ, DiLuzio NR: Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Am J Physiol* 200;297-300, 1961
9. Bacon JSD, Farmer VC, Jones D, Taylor IF: The glucan component of the cell wall of Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultra-structure. *Biochem J* 114;556-557, 1969
10. Phaff HJ: Cell wall of yeasts. *Annu Rev Microbiol* 17;15-30, 1963
11. Zakany M, Chihara G, Facht J: Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic hosts. *Int J Cancer* 25;371-376, 1980
12. Singh PP, Whistler RL, Tokuzen R, Nakahara W: Scleroglucan, an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucum*. *Car-*

- bohy Res 37;245-247, 1974
13. DiLuzio NR, Williams DL, McNamee RB, Edwards BF, Kitahama A: Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int J Cancer* 24; 773-779, 1979
  14. Reynolds JA, Castello MD, Harrington DG, Crabbs CL, Peters CJ, Jemski JV, Scott GH, DiLuzio NR: Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect Immun* 30;51-57, 1980
  15. Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T: Increases in Hematopoietic Responses Caused By  $\beta$ -Glucans in Mice. *Biosci Biotech Biochem* 61;1548-1553, 1997
  16. Browder W, Williams DL, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee RB: Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery* 104;224-230, 1988
  17. Ohno N, Asada N, Adachi Y, Yodome Y: Enhancement of LPS triggered TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha) production by (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in mice. *Biol Pharm Bull* 18;126-133, 1995
  18. Ohno N, Miura N, 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
  19. Kishida E, Kinoshita C, Sone Y, Misaki A: Structures and antitumor activities of polysaccharides isolated from mycelium of *Volvariella volvacea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56;1308-1309, 1992
  20. Saito H, Yoshioka Y, Uehara N, Aketagawa J, Tanaka S, Shibata Y: Relationship between conformation and biological response for (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in the activation of coagulation factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydr Res* 217;181-190, 1991
  21. Goma K, Kraus J, Franz G, Roper H: Structural investigations of glucans from cultures of *Glomerella cingulata* Spaulding & von Schrenck. *Carbohydr Res* 217;153-161, 1991
  22. Demleitner S, Kraus J, Franz G: Synthesis and antitumor activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. *Carbohydr Res* 226;239-246, 1992
  23. Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T: Increases in hematopoietic responses caused by beta-glucans in mice. *Biosci Biotech Biochem* 61;1548-1553, 1997
  24. 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 Biotech Biochem* 63;104-110, 1999
  25. Ohno N, Hashimoto T, Adachi Y, Yadomae T: Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by beta-glucans in vitro. *Immunology Letters* 52;1-7, 1996
  26. Harada T: Studies on bacterial gel forming  $\beta$ -1,3-glucans (Curdlan type polysaccharides) in Japan Proc IV IFS Ferment. Technol Today 603-607, 1972
  27. Ohna N, Kurachi K, Yadomae T: Physicochemical properties and antitumor activities of carboxymethylated derivatives of glucan from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Chem Pharm Bull* 36;1016-1025, 1988
  28. Sasaki T, Abiko N, Nitta K, Takasuka N, Sugino Y: Antitumor activity of carboxymethylglucans obtained by carboxymethylation of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140. *Eur J Cancer* 15;211-215, 1979
  29. Williams DL, McNamee RB, Jones EL, Pretus HA, Ensley HE, Browder IW, Di Luzio NR: A method for the solubilization of  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res* 219;203-213, 1991
  30. Han YW: Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 35;171-194, 1990
  31. Kojima IT, Saito M, Iizuka N, Minamiura, Ono S: Characterization of levan produced by *Serratia* sp. *J Ferment Bioeng* 75;9-12, 1993
  32. Chihara G: Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. *Dev Biol Stand* 77; 19-197, 1992
  33. Okamoto H, Shoin S, Koshimura S, Shimizu R: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn J Microbiol* 11;323-336, 1967
  34. Oshimi K, Kano S, Takaku F, Okumura K: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. *J Natl Cancer Inst* 65;1265-1269, 1980
  35. Saito M, Ebina T, Koi M, Yamaguchi T, Kamade Y, Ishida N: Induction of interferon- $\gamma$  in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Cell Immunol* 68; 187-192, 1982
  36. Ichimura O, Suzuki S, Saito M, Sugawara Y, Ishida N: Augmentation of interleukin 1 and interleukin 2 production by OK-432. *Int J Immunopharmacol* 7;263-270, 1985
  37. Fukui H, Koshihara Y, Nagamuta M, Mizutani Y, Uchida A: Production of interleukin 6 by human spleen cells stimulated with streptococcal preparation OK-432. *Immunol Lett* 21; 127-130, 1989
  38. Misaki T, Watanabe Y, Iida Y, Hidaka A, Kasagi K, Fukushima H, Konishi J: Recruitment of T lymphocytes and induction of tumor necrosis factor in thyroid cancer by a local immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 35;92-96, 1992