

## 가시오가피 다당체에 의한 항종양면역의 유도

윤택준 · 성지연<sup>1</sup> · 유광원<sup>2</sup> · 이호<sup>3</sup> · 이광호<sup>4\*</sup>

유한대학 식품영양학과, <sup>1</sup>(주)보령제약, <sup>2</sup>충주대학교 식품생명공학부, <sup>3</sup>경기대학교 식품생명공학부,  
<sup>4</sup>건국대학교 의료생명대학 생명공학전공

## Induction of Enhancement of Anti-Tumor Immunity by Polysaccharides Fractionated from *Acanthopanax Senticosus*

Taek Joon Yoon, Ji-Yeon Sung<sup>1</sup>, Kwang-Won Yu<sup>2</sup>, Ho Lee<sup>3</sup> and Kwang Ho Lee<sup>4\*</sup>

Dept. of Food & Nutrition, Yuhan College, Bucheon, 422-749, Korea

<sup>1</sup>Food Business R&D, Boryung Co., Ltd., Seoul 110-750, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science & Biotechnology, Chungju National University, Chungju, 380-702,

<sup>3</sup>Department of Food Science & Biotechnology, Kyounggi University, Suwon, 442-760, Korea

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju, 380-701, Korea

**Abstract** – The specific activation of the immune system to control cancer growth *in vivo* has been a long-standing goal in cancer immunology. Whole tumor lysates have been used either alone or combined with adjuvants to induce specific immune response *in vivo*. Here, we examined whether freezing/thawing (F/T) colon26-M3.1 tumor cell admixed with EN-3, glycoprotein purified from *Acanthopanax senticosus*, could stimulate *in vivo* immunity by using a murine experimental tumor metastasis model produced by colon26-M3.1 carcinoma cells. Vaccination of mice with F/T treated colon26-M3.1 carcinoma cells in combination with EN-3 as an adjuvant resulted in a significant inhibition in tumor metastasis of mice against live colon26-M3.1 carcinoma challenge. In addition, the splenocytes from vaccinated mice exhibited a higher proliferating activity and secreted interferon- $\gamma$ . These results suggest that EN-3 can be applied to immunoadjuvant to enhance the antitumor immunity *in vivo*.

**Key words** – *Acanthopanax senticosus*, tumor immunity, splenocytes, cytokines

암의 제거를 위하여 유효한 면역반응을 유도하는 항원에 대한 본질은 아직도 밝혀지지 않고 있다. 그러나 carcinogen에 의하여 암을 유도한 후, 그 암을 다시 동일 숙주에 이식한 경우, 암이 제거된 실험결과는 숙주가 암을 제거할 수 있는 면역반응의 유도 가능성을 제시하였다.<sup>1)</sup> 항종양활성의 유도를 위하여 종양백신의 면역에 의한 면역요법의 개발을 위한 여러 연구에서 항 종양 면역능의 유도에 기인된 종양의 예방 및 치료효과가 일부 인정되고 있으나,<sup>2-5)</sup> 아직 임상에서 실질적으로 유효하게 적용하는 방법은 개발되어 있지 않다.<sup>6)</sup> 종양의 면역요법이 실패하고 있는 가장 중요한 이유는 그들의 낮은 면역원성 및 종양세포 자신의 면역회피기전에 의한 것으로 알려져 있다. 즉, 암세포 자신은 class I- 발현이 억제되어 있음으로 MHC를 이용한 항원제시가 이루어지지

않고, 항원제시가 이루어진다 하더라도 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 세포의 작용에 의하여 종양에 대한 CTL 및 helper T cell의 기능을 방해하며, 종양세포 혹은 T세포로부터 생산되는 TGF- $\beta$ 와 같은 면역억제 cytokine을 생산함으로써 생체 면역계의 종양에 대한 면역반응을 억제하여 암에 대한 작동세포의 살해기전을 무능화 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>3-7)</sup>

악성 종양의 치료 혹은 예방을 위한 종양백신의 유도기전에서 professional APC인 dendritic cell (DC)의 항원제시능과 macrophage의 역할은 종양면역의 유도단계에서 가장 중요한 요소로 간주되고 있다.<sup>2,4)</sup> 현재, 여러 연구자들은 *in vitro*에서 DC 혹은 macrophage와 종양백신으로서 살해된 암세포(apoptotic or necrotic tumor cell)를 동시 배양시킨 후, 이들을 담임숙주에 면역함으로서 종양의 증식 및 전이에 유의한 억제활성을 유도하고 있다.<sup>2-5)</sup> 결국 앞서 언급한 종양의 면역 회피기전은 종양항원을 제시하기 위한 강력한 항원제

\*교신저자(E-mail): kwangho@kku.ac.kr  
(FAX): 043-851-5235

시세포를 이용하여 극복할 수 있음을 암시하는 것이고,<sup>8)</sup> 결국 항종양면역을 유도하기 위한 암 항원의 제시능을 극대화하기 위하여 여러 adjuvant를 이용하는 노력도 진행되고 있다.<sup>8,9)</sup> 이러한 노력은 궁극적으로 낮게 발현된 암 항원의 면역원성을 높이려는 노력이며, 여러 연구결과는 종양백신의 임상에서의 적용을 위한 활성화 및 작동기전 연구에 중요한 기초연구가 되고 있다. 따라서 종양항원의 효과적인 면역반응의 유도를 위하여 면역증강제(adjuvant) 개념의 접목은 종양세포가 가지는 고유의 악성종양 항원의 규명과 함께 항종양면역의 유도에 가장 중요한 요소로 사료된다.<sup>8,9)</sup>

Adjuvant(면역증강제)는 면역세포의 기능을 조절하여 특이 항원에 대한 면역자극활성을 유도함으로써 항원 특이적인 체액(humoral) 및 세포성(cellular) 면역증강활성을 유도하는 물질이다.<sup>10)</sup> Adjuvant 개념이 도입되고 난 후 지금까지 80년 이상 여러 가지 adjuvant formulation에 대한 연구가 진행되어 왔으나, 임상에서 적용 가능한 adjuvant는 매우 제한적이다. 현재 임상에서 사용하는 adjuvant인 aluminium 함유 화합물(alum)은 항원에 따라 활성의 유도에 많은 차이를 나타내어 폭넓은 응용이 어렵고, 일부 항원에 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.<sup>10-12)</sup> 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 FCA (Freund's complete adjuvant)와 *Mycobacterium tuberculosis*가 함유되지 않은 FIA (Freund's incomplete adjuvant)가 가장 널리 알려져 있으며,<sup>13)</sup> 그 외에도 *Mycobacterium tuberculosis*의 세포벽 구성단위인 muramyl dipeptide (MDP)와 그 유도체인 MDP-Lys (L18) 또는 stearyl-MDP 및 lipid-A 계열의 물질도 강한 선천적 면역자극 활성이 있어 여러 가지 항원에 대한 adjuvant로의 사용이 진행되어 왔다.<sup>14,15)</sup> 그러나 이들 물질은 강한 염증반응과 함께 국소부위에 육종을 야기하기 때문에 주로 동물에 대한 용도로 사용되고 있다.<sup>11,12)</sup> 한편, 식물성 물질로서는 steroid 및 당으로 구성되는 saponin 류가 탐식세포의 항원탐식에 기인하여 항원제시 세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으나 발열반응의 유도에 의한 부작용이 일부 보고되고 있다.<sup>16)</sup> 즉, saponin 계통의 주성분인 Qual A 및 ISCOM는 높은 면역증강 활성의 유도로 동물용 백신에 대한 adjuvant로 사용되고 있는 중이며 나아가 이들의 임상에서의 적용을 위한 연구가 수행 중에 있다.<sup>17)</sup> 한편,  $\beta$ -glucan 혹은 polyanionic 물질은 B 및 T 세포에 대한 mitogen 활성의 유도와 함께 경구투여에서도 높은 활성을 나타냄으로서 동물 뿐만 아니라 인간에 적용하기 위한 임

상실험이 진행 중에 있어 차세대 adjuvant로서 주목받고 있다.<sup>18)</sup> 따라서 식물성 유래의 천연물에서 높은 면역자극 활성을 유도케 하는 물질의 탐색은 새로운 adjuvant의 개발에서 중요한 의의가 있다고 사료된다.<sup>18,23,26,27)</sup>

가시오가피(*Acanthopanax senticosus* = *Eleutherococcus senticosus*)는 우리나라를 비롯한 동아시아 국가에서 전통적으로 당뇨, 고혈압, 피로감 등의 여러 병증을 완화시켜 주는 물질로 한방 및 민간에서 오래 전부터 사용한 대표적 생약 중 하나이다.<sup>19)</sup> 또한, 가시오가피는 러시아 혹은 유럽에서 인삼을 능가하는 약효를 가지는 물질로 인정되고 있고, 약리학적 효능으로는 피로, 스트레스, 면역계 등에 작용하여 생체의 항상성을 유지시키는 adaptogen으로서의 탁월한 효과가 있음이 보고되었다.<sup>20,21)</sup> 최근, 가시오가피 추출물의 면역계에 미치는 효과에 대한 연구 결과, 가시오가피 추출물 및 그의 유효성분은 cytokine의 inducer로서의 작용,<sup>22)</sup> 비특이적 면역자극효과에 의한 항종양 활성의 유도<sup>23)</sup> 및 항암제와 병용투여 시 항암 상승작용의 유도 등 강한 항암 작용이 있음이 시사되었고,<sup>24)</sup> 단백질 항원에 대한 항원 특이적 면역증강 효과가 인정됨<sup>25,26)</sup>으로서 adjuvant로서의 개발 가능성도 제시되었다.

본 연구는 가시오가피로부터 추출된 조다당체 성분의 단백질 항원에 대한 면역증강작용의 결과를 기초로 종양에 대한 특이적 면역증강능의 유도 가능성을 확인하기 위해 암세포를 얼리고 녹여서 제조한 종양백신과 가시오가피 다당체를 혼합하여 마우스에 면역한 후, 암세포에 대한 면역반응의 유도를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** - 생후 6-8주령의 자성 Balb/c를 (주)중앙실험동물에서 분양 받아 건국대학교 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5-10마리씩 넣어 정수 된 물과 실험동물용 펠릿사료(삼양사료주식회사)를 자유 공급하였고, 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

**시약 및 세포배양** - 비장세포 및 종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium (EMEM) 배지, fetal bovine serum (FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid 등은 Gibco사에서 구입하였다. 종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 B16-BL6 melanoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를 lymphocytes 및 bone marrow cells의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 및 37°C의 배양기에서 배양하였다.

**가시오가피의 열수추출물로부터 조다당 획분(EN-3)의 조**

**제** - 건조된 가시오가피(대효제약) 100 g에 증류수 2 L를 첨가하고 증류수가 반으로 감소될 때까지 추출한 후 금속체를 이용하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고 5,000×g에서 30 분간의 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 가시오가피의 열수추출물로 하였다(수율;14.4%). 이를 다시 5 L의 메탄올로 1시간씩 5회에 걸쳐 환류를 거친 후, 원심분리하여 메탄올-가용성 획분과 불용성 획분으로 분리하였다. 메탄올-불용성 획분은 증류수에 재 용해시킨 후, 4배의 에탄올을 첨가하고 12시간 교반, 원심분리하여 메탄올-불용성/에탄올-가용성 획분을 분리하고 침전물은 증류수에 재 용해시키고 투석한 후 원심분리, 농축, 동결건조를 거쳐 조다당 획분(EN-3, 수율;7.7%)으로 조제하였다.

**종양백신의 제조** - EMEM 배지에서 성장된 colon26-M3.1 carcinoma 혹은 B16-BL6 melanoma 세포를 이용한 종양백신의 제조하였다. 즉, 배양중이 종양세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양 flask로부터 분리 후, 배양배지를 넣고 1회, 그 후 PBS를 넣고 3회 세척함으로써 FBS 성분을 제거하였다. 종양백신의 제조는 세포 ( $1 \times 10^7$ /ml)를 PBS에 현탁 후 액체 질소를 이용하여 급속 냉동 및 해동 과정을 3회 반복하였다.<sup>3)</sup> 제조된 종양백신은  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였고, F/T 백신으로 칭하였다.

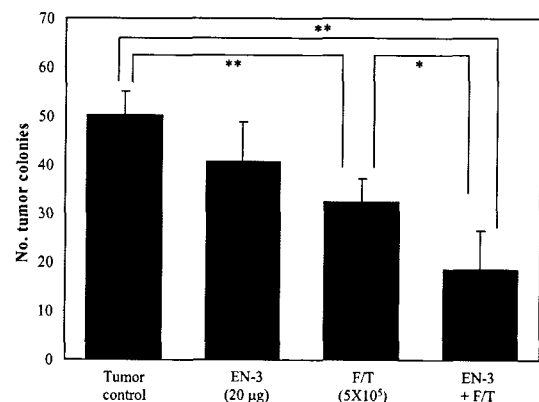
**종양전이 모델 및 백신의 면역** - 시료의 항종양 효과는 colon26로부터 얻은 고전이성 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다.<sup>23,27)</sup> 백신의 면역에 의한 항종양 활성의 측정을 위하여 colon26-M3.1 carcinoma 세포주  $5 \times 10^5$ 로 제조된 F/T 백신 단독 혹은 F/T+EN-3(20 mg)를 balb/c 마우스의 피하에 1주일 간격으로 총 3회 면역하였다. 최종 면역 1주일 후 배양 중인 colon26-M3.1 carcinoma( $2.7 \times 10^5$  cells)를 혈관 주사하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다.

**비장세포의 증식활성 및 cytokine 유도 양식** - 종양백신 단독 혹은 adjuvant와 혼합하여 1주 간격으로 총 3회 면역하고, 최종면역 1주 후 살아있는 동계의 암세포를 마우스를 주사 후, 14일이 경과된 마우스 혹은 정상마우스로부터 비장을 취하여 세포의 농도가  $3 \times 10^6$ /well이 되도록 조정 후, 24-well culture plate에 분주하였다. 비장세포가 분주된 각 well에  $5 \times 10^4$  cells로 제조된 F/T 백신을 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 72시간 배양시켰다. 비장세포 증식활성은 배양 완료 후, cell counting kit(Dojindo, Japan)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생산된 cytokine의 측정을 위하여 원심분리(500×g/10 min) 후 배양 상등액을 준비하였다. IFN- $\gamma$  및 GM-CSF의 측정은 ELISA kit(Pharmingen, USA)을 이용하여 조사하였다.

**통계처리** - 대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

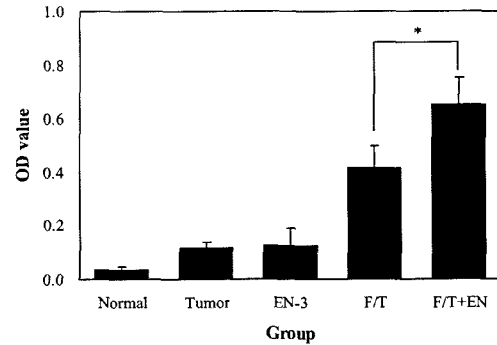
**F/T 백신 면역에서 EN-3에 의한 항종양 면역의 유도** - 악성종양의 극복을 위한 연구결과, 암세포가 스스로 면역반응을 유도한다는 것은 인정되고 있으나, 현재까지 확실한 항종양 면역을 유도하는 종양항원의 실제 및 방법에 대한 논란은 계속되고 있다.<sup>1,4,8)</sup> 따라서 여러 연구자가 종양에 대한 면역반응의 유도를 위하여 단일 항원 보다는 whole vaccine을 이용한 연구를 진행하고 있으며,<sup>2)</sup> 면역원성을 높이기 위하여 adjuvant의 이용에 관한 관심이 고조되고 있다.<sup>8,9,28)</sup> 본 실험은 이미 단백질 항원에 대하여 adjuvant 활성이 인정된 EN-3<sup>29)</sup>를 이용하여 종양의 F/T 백신에 대하여 adjuvant 활성이 유도되는지 확인하고자 실시하였다. 즉, colon26-M3.1 carcinoma 세포주로 제조된 F/T 백신의 예방적 면역에서 adjuvant로 사용된 EN-3가 *in vivo*에서 colon26-M3.1 세포주의 전이를 유효하게 억제하는지 조사하였다(Fig. 1). 실험결과, 종양 대조군에 비하여 F/T 백신 단독 면역군의 경우 약 35.5%의 종양전이 억제가, F/T 백신에 EN-3를 혼합하여 면역한 결과 약 63.0%의 종양전이능이 인정되었다. 항종양 면역의 유도를 위한 종양백신의 면역에 의한 동물실험에 의한 연구에서 F/T cell lysates와 같은 necrotic cell은 macrophage를 활성화시킴으로서 TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-6와 같은 cytokines를 생산시키며, 이들 백신에 노출된 macrophage



**Fig. 1.** Inhibition of tumor metastasis produced by colon26-M3.1 carcinoma following vaccination with EN-3 and colon26-M3.1 F/T lysates. Five Balb/c mice per groups of mice were vaccinated 3 times for a week intervals with EN-3 (20 mg) alone, F/T lysates ( $5 \times 10^5$  cells) alone and F/T lysates plus EN-3. Groups were inoculated i.v. with colon26-M3.1 carcinoma cells 7 days after final vaccination and killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. The mean  $\pm$ SD of metastasized tumors are shown. \*\* $p < 0.05$  and \* $p < 0.5$  compared with the indicated compared group by Student's two-tailed *t*-test.

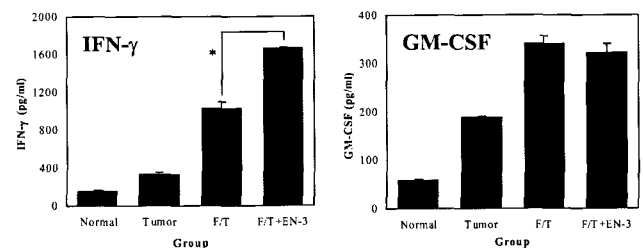
의 능동면역은 *in vivo*에서 종양의 예방 뿐 아니라 치료적 측면에서 종양의 증식을 유의하게 억제하였다고 보고하였다.<sup>2)</sup> 본 실험 결과에서도 F/T 백신 단독면역의 경우, 유의한 항종양 전이능이 인정되어 앞선 결과를 지지하였으며, EN-3를 혼합하여 면역한 경우는 F/T 백신 단독의 경우에 비하여 유의하게 높은 종양의 전이가 유도됨으로서 EN-3는 종양백신에 대한 면역증강효과가 있는 것으로 생각되었다. 종양면역의 유도에서 가장 중요한 요인은 종양세포에 대한 작동세포로서 세포성 면역계인 세포독성 T 세포의 활성화를 유도하기 위한 항원제시세포의 항원제시능(성숙)의 획득으로 알려져 있다.<sup>2,5,28)</sup> 앞선 보고에서 EN-3는 *in vitro*에서 대식세포 혹은 DC like cell로부터 항원 특이적인 면역증강 활성의 유도에서 중요한 cytokine으로 인정되는 TNF- $\alpha$  및 IL-12와 같은 cytokine을 유도함으로써 항원 특이적인 면역증강 활성의 유도를 위한 항원제시능을 높이는 작용이 있음을 보고 하였다.<sup>25)</sup> 따라서 Fig. 1의 결과에 제시한 F/T 백신과 EN-3를 혼합하여 면역한 결과 유도되는 높은 종양전이 억제활성 기전 중의 하나는 EN-3가 항원제시세포의 항원제시능을 높이는 기전에 기인될 것으로 사료되었다.

**EN-3의 종양세포 특이적 면역증강 활성** - Fig. 1의 동물 실험 결과를 해석을 위하여 EN-3의 종양세포에 대한 세포성 면역반응에 미치는 효과를 조사하였다. F/T 백신 단독, F/T 백신에 EN-3 adjuvant를 동시에 면역 후, 살아있는 colon26-M.31 carcinoma 세포를 주사한 마우스로부터 비장 세포를 취한 후 *in vitro*에서 비장세포의 증식활성을 조사하였다. 실험 결과, 비장세포 증식활성은 F/T 백신에 EN-3를 혼합하여 면역한 군이 F/T 백신 단독 면역군의 비장세포에 비하여 높은 증식활성을 보였으며, 두 경우 모두 대조군인 암세포만을 처리한 군에 비하여 높은 증식활성을 보임으로서(Fig. 2), F/T 백신 단독의 면역으로도 살아있는 암세포에 대하여 유의한 종양면역이 유도됨을 시사하였다.<sup>25,29)</sup> 이 경우 EN-3의 동시 면역는 F/T 백신에 의한 종양면역반응을 유의하게 증진시키는 활성이 있는 것으로 생각되었다. 이러한 세포성 면역반응은 주로 T 세포가 생산하는 cytokine에 의하여 조절<sup>4,9,29)</sup>되고 있기에 배양 상등액에 존재하는 각 cytokine의 생산 양식을 조사하였다. 각 백신의 면역 후, 살아있는 암세포가 주사된 마우스의 비장세포를 배양배지 혹은 syngeneic 및 allogenic tumor로 제조된 F/T 백신을 첨가하여 3일간 배양 후 배양상등액에 생산된 Th-1 type의 cytokine (IFN- $\gamma$  및 GM-CSF) 생산양식을 조사하였다. IFN- $\gamma$ 의 생산능 실험결과, F/T 백신 면역군은 종양만이 이식된 대조군 (340.2 pg/ml)에 비하여 약 3배 정도의 높은 IFN- $\gamma$ 가 생산(1030.5 pg/ml)되었으며, EN-3를 동시에 면역한 군의 경우는 1660.9 pg/ml의 높은 IFN- $\gamma$  생산양식을 보였다. IFN- $\gamma$ 는 주로 Th1 type의 T cell, 혹은 종양세포에 대하여 살해력을 가지는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell; CTL)이 생산하는

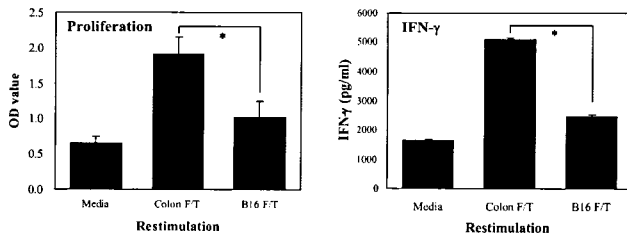


**Fig. 2.** Proliferating effect of splenocytes from mice vaccinated with EN-3 plus colon26-M3.1 F/T lysates. The splenocytes were collected from mice of Fig. 1 and cultured in a absence of a stimulus. Proliferative activity was determined by commercially available cell counting kit after 3 days of culture. The mean  $\pm$ SD of triplicate determinations are shown. \* $p$ <0.01 compared with the indicated compared group by Student's two-tailed *t*-test.

cytokine으로, F/T 백신 면역군에서 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증진된 것은 F/T 백신이 직접 CTL을 활성화 또는 helper T cell을 경유하는 cross-priming에 의한 CTL의 활성화가 유도될 수 있음을 강하게 시사한다.<sup>3-5,30)</sup> 한편, F/T+EN-3의 면역군은 F/T 백신의 경우보다 통계적으로 높은 IFN- $\gamma$ 의 생산양식을 보임으로서 Fig. 1의 각 면역군의 항암활성과 동일한 경향의 결과를 얻었다. 따라서 EN-3는 불활성화 종양세포인 F/T 백신의 면역에 의한 종양세포 살해능을 유의하게 증진시키는 adjuvant 활성이 있음을 확인하였다.<sup>25,26)</sup> F/T 백신의 면역군에서 GM-CSF의 생산양식을 조사한 결과, 종양 대조군, F/T 백신, EN-3가 혼합된 F/T 백신 면역군에서 각각 188.4, 341.2 및 320.6 pg/ml의 GM-CSF 생산양식을 보임으로서, F/T 면역에서 EN-3에 의한 GM-CSF의 생산양식은 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 3). GM-CSF는 DC의 성숙을 유도하고, 항원제시능을 직접 증진시킴으로서, 결국 종양에 대한



**Fig. 3.** Cytokine production from splenocytes of mice vaccinated with EN-3 plus colon26-M3.1 F/T lysates. The splenocytes of each vaccinated groups were collected from mice of Fig. 1 and cultured in an absence of a stimulus for three days. The levels of IFN- $\gamma$  and GM-CSF in the culture supernatant were measured using an each ELISA kit. The mean  $\pm$ SD of triplicate determinations are shown. \* $p$ <0.01 compared with the control group by Student's two-tailed *t*-test.



**Fig. 4.** Effect of EN-3 on the enhancement of tumor specific T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production. The splenocytes of each vaccinated groups were collected from mice of Fig. 1 and cultured with syngeneic (colon26-M3.1) or allogenic (B16-BL6) tumor lysates for three days. Proliferating effect and IFN- $\gamma$  production were measured using commercially available each kit. The mean  $\pm$ SD of triplicate determinations are shown. \* $p$ <0.01 compared with the indicated group by Student's two-tailed  $t$ -test.

하는 T 세포를 활성화 시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>29,30)</sup> 이러한 T-세포는 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 다른 cytokine들과의 작용에 의하여 종양을 살해하는 작동세포의 수를 높임으로서 항종양 면역이 유도된다고 한다.<sup>29)</sup> 따라서, 본 실험결과, F/T 백신은 단독 면역만으로도 항원 제시세포의 활성화 및 항원제시능을 유도하며 항종양 활성을 가지는 IFN- $\gamma$ 와 같은 cytokine을 생산하는 작동세포를 활성화하는 기능이 있는 것으로 사료되었다.<sup>29,30)</sup> 결론적으로, F/T 백신의 면역 시 EN-3의 혼합투여에 의한 항종양 활성의 증진 효과는 F/T 백신의 면역에 의한 항원제시능이 아니라 항종양 활성을 가지는 IFN- $\gamma$ 와 같은 cytokine을 생산하는 작동세포의 기능을 높이는 작용에 기인되는 것으로 사료되었다. 따라서 F/T 백신과 EN-3를 혼합하여 면역한 마우스의 비장세포를 syngeneic tumor인 colon26-M3.1 F/T 백신 및 allogenic tumor인 B16-BL6 melanoma로 제조된 F/T 백신으로 재자극 후 항원특이적인 비장세포의 증식활성을 조사하였다. 즉, EN-3를 동시에 면역한 마우스의 비장세포의 IFN- $\gamma$ 의 생산이 면역한 암세포 특이적인 활성인지 확인하고자, 면역 마우스의 비장세포를 syngeneic (colon26-M3.1) 및 allogenic tumor(B16-BL6)로부터 제조된 F/T lysates로 재자극 후, 비장세포의 증식활성 및 IFN- $\gamma$ 의 생산양식을 조사하였다(Fig. 4). 실험 결과, 비장세포의 증식활성은 syngeneic tumor인 colon26-M3.1 carcinoma로 제조된 F/T 백신의 재자극 경우가 allogenic tumor에 비하여 통계적으로 유의한 높은 증식활성(Fig. 4-A) 및 IFN- $\gamma$ 의 생산(Fig. 4-B)을 유도함으로써 상기의 면역반응은 종양특이적인 면역반응에 의하여 유도됨을 확인하였다.<sup>3-5,25)</sup>

결론적으로 항종양 면역의 유도를 위한 adjuvant의 탐색 차원에서 EN-3는 종양세포주로 제조된 F/T 백신의 면역에 의한 항종양 면역의 유도에서 adjuvant 활성이 있는 것으로 사료되었고, 그 반응은 F/T 백신에 의한 항원제시세포의 항원제시 후, 종양특이적인 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 작동세포의 활

성화에 기인되는 결과로 사료되었다.

## 결론

가시오가피로부터 분리한 다당획분인 EN-3의 종양에 대한 특이적 면역증강 효과를 조사하기 위하여 colon26-M3.1 carcinoma로부터 제조된 F/T 백신과 혼합하여 면역 후, 살아있는 암세포를 이식하여 면역된 마우스의 종양 전이 억제능을 조사하였다. F/T 백신만을 면역한 경우에 비하여 F/T 백신에 EN-3를 혼합하여 면역한 결과 유의한 ( $p$ <0.5) 종양전이 억제효과가 나타났다. 백신 면역 후 살아있는 암세포가 주사된 마우스의 비장세포의 증식활성을 조사한 결과, EN-3를 혼합하여 면역한 경우가 백신 단독의 경우에 비하여 높은 비장세포의 증식활성을 유도하였다. 또한, F/T 백신 단독 혹은 F/T와 EN-3를 혼합하여 면역한 마우스의 비장세포를 F/T 백신으로 재자극 후 배양 상등액에 생산된 cytokine을 조사한 결과, 백신 특이적인 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가된 결과를 얻었다. 이 결과로부터 EN-3는 종양백신의 면역시 종양에 대한 세포성 면역반응을 증진시켜 종양의 전이를 유의하게 억제하는 adjuvant 활성이 있음을 확인하였다.

## 사사

이 논문은 2006년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

## 인용문헌

1. Burnet, F. M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**: 1-27.
2. Gough, M. J., Melcher, A. A., Ahmed, A., Crittenden, M. R., Riddle, D. S., Linardakis, E., Ruchatz, A. N., Emilien, L. M. and Vile, R. G. (2001) Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* **61**: 7240-7247.
3. Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S. and Eigler, A. (2002) Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* **62**: 2347-2352.
4. Strome, S. E., Voss, S., Wilcox, R., Wakefield, T. L., Tamada, K., Flies, D., Chapoval, A., Lu, J., Kasperbauer, J. L., Padley, D., Vile, R., Gastineau, D., Wettstein, P. and Chen, L. (2002) Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res.* **62**: 1884-1889.
5. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* **7**: 297-303.
6. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. and Restifo, N. P. (2004) Can-

- cer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**: 909-915.
7. Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E. and Morris, J. C. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* **113**: 1515-1525.
  8. Chaput, N., Scharz, N. E., Andre, F., Taieb, J., Novault, S., Bonnaventure, P., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Merad, M., Adema, G., Adams, M., Ferrantini, M., Carpentier, A. F., Escudier, B., Tursz, T., Angevin, E. and Zitvogel, L. (2004) Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J. Immunol.* **172**: 2137-2146.
  9. Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002) CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J. Immunol.* **168**: 1212-1218.
  10. Azuma, I. (1992) Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine* **10**: 1000-1006.
  11. Audibert, F. M. and Lise, L. D. (1993) Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today* **14**: 281-284.
  12. Gupta, R. K. and Siber, G. R. (1995) Adjuvant for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1376.
  13. Bennet, B., Check, I. J., Olsen, M. R. and Hunter, P. L. (1992) A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Method* **153**: 31-40.
  14. Tamura, M., Yoo, Y. C., Yoshimatsu, K., Yoshida, R., Oka, T., Ohkuma, K., Arikawa, J. and Azuma, I. (1995) Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Vaccine.* **13**: 77-82.
  15. 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. (1991) Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A, and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet* **337**: 998-1001.
  16. Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. and Marciani, D. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria Molina Cortex*. *J. Immunol.* **146**: 431-437.
  17. Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C. K. (1993) Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvaticity. *Vaccine* **11**: 293-306.
  18. Navarro-Garcia, F., Pedroso, M. and Lopez-Revilla, R. (2000) Immunodulation of rat serum and mucosal antibody responses to *Entamoeba histolytica* trophozoites by beta-1,3-glucan and cholera toxin. *Clin. Immunol.* **97**: 182-188.
  19. Park, E. J., Nan, J. X., Zhao, Y. Z., Lee, S.H., Kim, Y. H., Nam, J. B., Lee, J. J. and Sohn DH. (2004) Water-soluble polysaccharide from *Eleutherococcus senticosus* stems attenuates fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **94**: 298-304.
  20. Davydov, M. and Krikorian, A. D. (2000) *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol.* **72**: 345-393.
  21. 윤택준, 이석원, 신광순, 최원희, 황수현, 서상희, 김성훈, 박우문 (2002) 가시오가피 열수추출물의 전신성 anaphylaxis에 대한 억제효과. *한국식품과학회지* **34**: 518-523.
  22. Han, S. B., Yoon, Y. D., Ahn, H. J., Lee, H. S., Lee, C.W., Yoon, W. K., Park, S. K. and Kim, H.M. (2003) Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 1301-1312.
  23. Ha, E. S., Hwang, S. H., Shin, K. S., Yu, K. W., Lee, K. H., Choi, J. S., Park, W. M. and Yoon T. J. (2004) Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 217-224.
  24. 하은숙, 황수현, 유광원, 신광순, 조형민, 김창찬, 박우문, 윤택준 (2003) 오가피로부터 분리된 조다당분획물의 면역 자극활성 및 cisplatin과의 병용투여에 의한 항암 상승작용의 유도. *약학회지* **47**: 159-166.
  25. 황수현, 하은숙, 유광원, 신광순, 이상훈, 이재권, 이경호, 윤택준, 박우문 (2003) 오가피 조다당의 단백질 항원(BSA and OVA)에 대한 면역증강효과. *약학회지* **47**: 167-175.
  26. Sung, J. Y., Yoon, T.J., Yu, K.W., Lee, K.H. and Lee, H. (2006) Enhancement of immunological activities in mice by oral administration of pectic polysaccharides from *Eleutherococcus senticosus*. *Food Science Biotech.* **15**: 117-121.
  27. 윤택준, 이창권, 박태규, 이광호 (2005) 팔선초 물추출물의 면역자극 및 항종양 활성. *생약학회지* **36**: 332-337.
  28. Ribas, A., Butterfield, L. H., Glaspy, J. A. and Economou, J. S. (2003) Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J. Clin. Oncol.* **21**: 2415-2432.
  29. Fields, R. C., Shimizu, K. and Mule, J. J. (1998) Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9482-9487.
  30. Hill, H. C., Conway, T. F. Jr., Sabel, M. S., Jong, Y. S., Mathiowitz, E., Bankert, R. B. and Egilmez, N. K. (2002) Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptive antitumor immunity and cure of disseminated disease. *Cancer Res.* **62**: 7254-7263.