

## 참다시마 다당체의 면역 증강 활성

류덕선<sup>1,2</sup> · 오승민<sup>1</sup> · 김기훈<sup>1</sup> · 김수환<sup>1,2</sup> · 최현주<sup>1,2</sup> · 이동석<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, <sup>2</sup>인제대학교 BK21 식의약생명공학과

### Immunomodulating Activity of *Laminaria japonica* Polysaccharides

Deok Seon Ryu<sup>1,2</sup>, Seung Min Oh<sup>1</sup>, Ki Hoon Kim<sup>1</sup>, Soo Hwan Kim<sup>1,2</sup>, Hyun Ju Choi<sup>1,2</sup>, and Dong Seok Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University

<sup>2</sup>Department of BK21 Smart Foods and Drugs, Inje University

**Abstract** *Laminaria japonica* polysaccharides (LP) were prepared from *L. japonica* through hot water extraction, ultrafiltration and gel chromatography. In this study, we investigated the immunomodulating activity of LP (0.25-1 mg/mL) on the mitogen/alloantigen reactive proliferation and killing activity of the Balb/c mouse splenocytes. The LP directly induced the proliferation of splenocytes that was stimulated with mitogen or alloantigen in a dose-dependent manner. The killing activity of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and lymphokine activated killer cells (LAKs) were enhanced significantly in the LP treated cells. Also, the treatment of splenocytes with LP increased production of interleukin-2 (IL-2). These results suggest that polysaccharides from *L. japonica* show a substantial immunomodulating activity in mouse immune cells.

**Key words:** *Laminaria japonica*, polysaccharides, immunomodulating activity

## 서 론

면역 요법은 19세기 초 William B. Coley가 *Streptococcus*속 세균과 *Serratia*속 세균의 혼합배양액인 Cloney's toxin을 말기 암환자에게 주사하여 암을 치료한데서부터 시작되었다(1,2). 그 후 BCG(bacille de Calmette-Guérin), *Corynebacterium parvum* 등의 미생물이나 그 대사 산물 및 그 합성 물질을 이용한 면역 요법이 연구되었고(3), 1980년대부터는 여러 가지의 cytokine, lymphokine, growth factor 등을 이용하여 생체 면역 반응의 상태를 호전시키려는 노력이 계속되어 왔다(4). 그러나 이들의 임상적 이용에 있어서 많은 문제점들이 나타나는데, 대표적인 예로 생체 내에 다량의 cytokine을 투입하여도 혈중 내 적정 농도를 유지하기 어렵고 독성이 매우 심하며, 또한 이들 cytokine은 단독이 아닌 여러 종류가 같이 어우러져 상호간의 작용을 상승 또는 억제하기 때문에 하나 또는 두 종류의 cytokine을 대량 투여하더라도 그 효과는 크게 기대할 수 없다. 이에 많은 연구자들은 독성이 약하고 생체 내에서 여러 면역 세포를 자극하여 cytokine을 유도하는 생리활성물질 탐색에 초점을 맞추고 있다(5-7). 이와 관련하여 lentinan(8), schizophilan(9), polysaccharide K(PSK)(10) 그리고 ginsan(11)을 들 수 있는데, lentinan은 표고버섯(*Lentinus edodes*) 추출물에서 정제한 고분자 다당체로서 이는 대식 세포와 T 세포

그리고 자연 살해 세포(NK 세포)를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. Schizophilan은 치마버섯(*Schizophyllum commune* Fries)의 균 사체가 생산하는 다당체로서 대식세포와 세포독성 T 림프구(CTLs)를 활성화시키며, 림포카인 활성 살해세포(LAKs)를 유도하고 NK 세포의 활성을 촉진시킨다고 보고되었다. PSK는 구름버섯(*Coriolus versicolor*)에서 추출한 당단백질로 T 세포, NK 세포 그리고 대식 세포의 활성을 증가시킨다고 하였으며, ginsan은 인삼으로부터 분획된 다당체로서 NK 세포와 CTLs, T 보조 세포를 활성화시키는 작용이 보고된 바 있다. 이와 같이 면역 증강 활성이 기대되는 천연물에서 유래한 다당체에 대한 관심이 증대되고 있는 실정이다. 자연계에는 다양한 약리 효과가 기대되는 천연 식물들이 존재하는데, 그 중 다당체로서 연구가 활발히 진행되고 있는  $\beta$ -1,3-glucan인 laminarin이 대표적이다. Laminarin은 포도당 잔기들로 이루어진 가지가 난  $\beta$ -1,3-glucan 중합체로서 해양에 다량 존재하는 갈조류인 *Laminaria saccharina* 등의 저장성 다당류이다(12). 우리나라에서 생산되는 대표적인 갈조류는 참다시마(*Laminaria japonica*)로서 칼슘, 칼륨, 요오드, 아연 등 생체 대사에 관여하는 무기질이 풍부하게 함유되어 있다고 알려져 있으며, 현재까지 지질 대사 개선 효과, 항당뇨 활성(13), 해독 작용(14), 고혈압 예방, 항암(15), 항돌연변이(16), 항바이러스(17) 등 다양한 생리활성 효과가 보고되고 있다. 본 연구에서는 참다시마에서 다당체를 얻어 마우스 비장 세포의 면역 활성화에 미치는 효과를 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 참다시마(*L. japonica*)로부터 다당체의 추출

참다시마를 고온, 가압 조건 하에서 3시간 동안 열수 추출한 후에 filter paper(Whatman No. 1)로 여과하여 조추출물인 crude

\*Corresponding author: Dong Seok Lee, Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae, Gyeongnam 621-749, Korea  
Tel: 82-55-320-3262  
Fax: 82-55-334-3426  
E-mail: mbdlee@inje.ac.kr  
Received December 30, 2009; February 23, 2010;  
accepted March 2, 2010

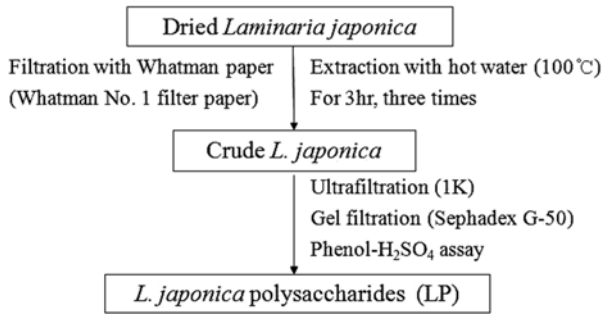


Fig. 1. Purification of polysaccharides from *L. japonica*.

*L. japonica* extract를 얻었다. Filter paper 여과 후 참다시마의 salt를 제거하기 위하여 1 kD membrane을 사용하여 ultrafiltration을 시켰다. 고온 가압으로 멸균시킨 2차 증류수로 Sephadex G-50 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 칼럼(2.5 cm×50 cm, Sigma Chemical Co.)에 충전시켰으며, 충전 후 crude *L. japonica* extract를 칼럼에 2 mL 주입하여 분당 3 mL 유속으로 2.5 mL씩의 분획을 얻었다. 각각의 분획은 페놀-황산법으로 총 당량을 측정하였고, *L. digitata* 유래의 laminarin(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 standard로 하여 *L. japonica* extract로부터 분리·정제되어 나온 다당체인 *L. japonica* polysaccharides(LP)를 얻었다(Fig. 1).

**실험 동물**

실험 동물은 효창 사이언스(Daegu, Korea)로부터 특정 병원체 부재(specific pathogen free) Balb/c 마우스와 동종 번식(inbred) C57BL/6 마우스를 공급받아 사용하였다. 이들 마우스는 1주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 가능한 스트레스를 최소화하여 사육하면서, 생후 4-7주 된 암컷을 사용하였다. 실험 동물의 사육 조건은 실내 온도 25°C, 습도는 50% 전후로 하였고, 명암은 12시간(day light 06:00-18:00)을 주기로 조절하였다. 본 연구는 실험 동물의 사육에 대한 인제대학교 동물실험 윤리위원회의 가이드라인을 토대로 진행하였다.

**시약 및 세포 배양**

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1 임파종 세포의 배양을 위한 RPMI-1640 배지, fetal bovine serum(FBS) 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 생쥐 유래 YAC-1 임파종 세포는 10% FBS-RPMI 1640 배지를 이용하였으며, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 및 37°C incubator에서 배양하였다.

**비장 세포 분리법**

마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI-1640으로 씻은 다음 핀셋과 멸균 슬라이드를 이용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 RPMI-1640으로 2회 세척한 다음 lysing buffer(BD PharmLyse™ Lysis Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 3분간 현탁시켜 적혈구를 제거하고 다시 원심 세척한 다음 5×10<sup>6</sup> cells/mL 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well 당 90 μL씩 첨가하여 세포 증식능 측정에 이용하였다.

**세포 증식 측정법**

준비된 96 well plate에 concanavalin A(Con A, 10 μg/mL),

interleukin(IL-2, 200 ng/mL) 및 alloantigen(anti-C57, 5×10<sup>6</sup> cells/mL)으로 전처리한 세포 90 μL와 최종 농도가 0.25, 0.5, 1 mg/mL 가 되도록 조제된 각각의 추출물을 10 μL씩 각 well에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 세포 증식 측정은 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 μL에 CellTiter 용액을 20 μL씩 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 Fluorescence Multi-Detection Reader(Synergy HT, BIOTEK, Winooski, VT, USA)로 490 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식 정도를 측정하였다.

**세포 독성 T 림프구(CTLs)의 활성 측정**

C57BL/6 마우스에서 분리한 비장 세포를 단일화하여 10% FBS-RPMI 1640에 부유시킨 후, mitomycin C(MMC, 5 mg/mL)를 첨가하여 37°C 수조에서 30분간 처리하였다. 그런 후 RPMI-1640 배지로 4°C 250×g에서 8분간 5번 원심 분리에 의한 침전을 반복하여 세척한 다음 동종 항원 비장 세포 또는 표적 세포로 이용하였다. 표적 세포(target cells)와 동종 항원에 반응하는 Balb/c로부터 분리된 비장 세포(effector cells)의 비율을 10:1로하여 96 well plate에 90 μL가 되게 분주한 후, 최종 농도가 0.25, 0.5, 1 mg/mL 가 되도록 조제된 각각의 추출물을 10 μL씩 첨가하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다.

**림포카인 활성 살해세포(LAK cells)의 활성 측정**

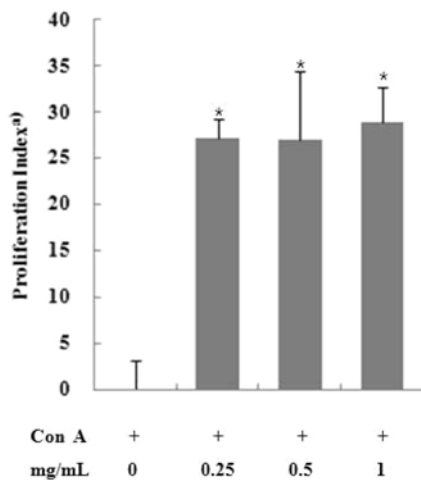
Balb/c 마우스에서 분리한 비장 세포를 IL-2로 자극한 뒤 effector cells(5×10<sup>6</sup> cells/mL)로 이용하였으며, 한국세포주은행에서 분양받은 생쥐 유래 YAC-1 임파종 세포를 표적 세포로 이용하였다. 동종 항원에 반응하는 Balb/c로부터 분리된 비장 세포(effector cells)와 표적 세포(target cells)의 비율을 10:1로하여 96 well plate에 90 μL가 되게 분주한 후, 최종 농도가 0.25, 0.5, 1 mg/mL가 되도록 조제된 각각의 추출물을 10 μL씩 첨가하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다.

**세포 독성능 측정**

세포 독성능 시험은 Cyto Tox 96® Non-radioactivity Cytotoxicity Assay(Promega)를 이용하였다. Effector cells과 target cells의 비율을 10:1로 하여 96 well plate에 100 μL가 되게 넣고 4°C 250×g에서 5분간 원심 분리로 침전하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 8시간 배양하였다. 배양 시간이 종료되기 45분 전에 target maximum과 volume correcting control에는 lysis buffer를 첨가하여 세포 용해도가 최대가 되도록 하였다. 배양 후에 4°C 250×g에서 5분간 원심 분리로 침전시킨 후 상등액 50 μL를 96 well plate에 옮기고 여기에 50 μL의 substrate mix buffer를 첨가하여 실온에서 알루미늄 호일을 덮어 30분간 반응시켰다. 그런 후 50 μL의 stop solution을 각 well에 첨가하고 Fluorescence Multi-Detection Reader (Synergy HT, BIOTEK, Winooski, VT, USA)를 이용하여 490 nm에서 상등액 내에 있는 lactate dehydrogenase(LDH)의 양을 반영하는 O.D.값을 측정하여 세포 독성능을 산출하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{A - B - C}{D - C} \times 100$$

- A: Experimental release
- B: Effector cell spontaneous release
- C: Target cell spontaneous release
- D: Target cell maximum release



**Fig. 2. Effects of LP on the proliferation of splenocytes stimulated with Con A.** 100  $\mu$ L of the splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was cultured with Con A and LP for 48 hr. The results are represented as a proliferation index. Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group ( $*p < 0.05$ ). <sup>a</sup>Proliferation (%) = (Mean of O.D. in test wells / Mean of O.D. in control wells - 1)  $\times$  100.

#### IL-2의 생산량 측정

비장 세포 90  $\mu$ L에 Con A를 10  $\mu$ L씩 분주하고 대조군에는 3차 멸균 증류수를 동량 분주한 후, 각 well에 최종 농도가 0.25, 0.5, 1 mg/mL가 되도록 조제된 각각의 추출물을 첨가하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 후에 배양 상등액을 100  $\mu$ L씩 회수하여 상등액에 포함된 IL-2의 양을 Mouse IL-2 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 통계 분석

모든 실험 결과는 통계 프로그램인 SAS(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균과 표준 편차를 구하였다. 통계 처리는 one-way analysis of variance(ANOVA)에 의해 수행하였고  $p < 0.05$  수준에서 Student *t*-test에 의해 유의차를 검증하였다.

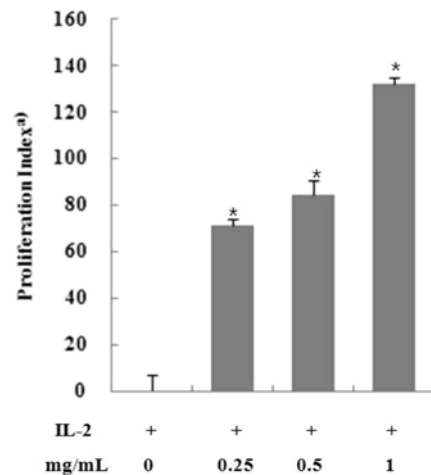
## 결과 및 고찰

#### 참다시마로부터 다당체의 분리 및 정제

참다시마로부터 열수 추출하여 얻은 crude *L. japonica* 추출물을 1 kD membrane으로 ultrafiltration한 후, 추출한 다당체 분획의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC) column을 40°C로 유지하면서 RI detector를 이용하여 확인하였다. 이때 이동상은 증류수를 사용하였고, 1 mL/min의 유속으로 흘러주며 분석한 결과, 다량의 10,000-30,000 Da과 소량의 5,000-10,000 Da의 2가지 분획으로 나누어졌다. 그리고 Sephadex G-50으로 충전된 칼럼에 주입하여 gel filtration chromatography를 수행한 후, laminarin을 standard로 하여 페놀-황산법으로 다당체 분획을 분리·정제한 결과, LP의 분자량이 5,000-30,000 Da으로 밝혀졌다(18).

#### 비장 세포 증식능에 미치는 영향

비장은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 면역 반응이 개시되고 발전되는 부위로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 말초 림프 기관에 속하며 비장 내 림프구의 증식은 면역 시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다

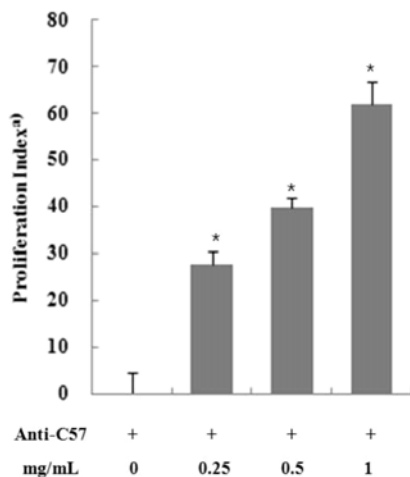


**Fig. 3. Effects of LP on the proliferation of splenocytes stimulated with IL-2.** 100  $\mu$ L of the splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was cultured with IL-2 and LP for 48 hr. The results are represented as a proliferation index. Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group ( $*p < 0.05$ ). <sup>a</sup>Proliferation (%) = (Mean of O.D. in test wells / Mean of O.D. in control wells - 1)  $\times$  100.

(19). 비장 세포의 증식 반응을 알아보기 위하여, 분리한 비장 세포를  $5 \times 10^6$  cells/mL로 넣고 시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양하여 증식 정도를 비교하였다. 세포 배양 시 T 림프구의 mitogen(림프구 비특이 활성화제)인 Con A를 전처리하여 T 림프구를 자극한 뒤 LP를 농도별로 처리한 후 비장 세포의 증식능을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. LP를 0.25, 0.5, 1 mg/mL 첨가하여 배양한 경우 LP를 첨가하지 않은 대조군에 비해  $27.13 \pm 2.07$ ,  $27.05 \pm 7.37$ ,  $28.88 \pm 3.82$  수준으로 비장 세포 증식이 다소 증가하는 경향을 보였다. 그리고 Fig. 3에 나타난 것과 같이, 세포 배양 시 T 림프구의 growth factor로 작용하는 IL-2를 전처리하여 T 림프구를 자극한 뒤 LP를 농도별로 처리한 후 비장 세포의 증식능을 측정된 결과, 농도 의존적으로  $71.47 \pm 2.44$ ,  $84.27 \pm 6.11$ ,  $132 \pm 2.88$  수준의 비장 세포 증식능을 보였다. 또한 C57BL/6 마우스에서 분리한 비장 세포에 MMC를 처리하여 alloantigen(anti-C57)으로 만든 후, 이를 Balb/c로부터 분리한 비장 세포에 전처리하여 T 림프구를 자극한 뒤 LP에 대한 비장 세포 증식능을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. LP를 첨가하여 배양한 경우  $27.58 \pm 3.00$ ,  $39.61 \pm 2.08$ ,  $61.96 \pm 4.90$  수준으로 LP를 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 비장 세포 증식능이 향상되었다. 바이러스 감염 및 항종양 면역 반응과 같은 생체 내 세포성 면역은 주로 T 림프구와 NK 세포에 의해서 매개가 된다(20,21). 이와 관련하여 Con A, IL-2 및 alloantigen으로 자극한 비장 세포의 LP에 대한 세포 증식능을 측정된 결과 유의적인 비장 세포 증식능이 관찰되었다. 이는 mitogen과 관련하여 Cho 등(22)이 다시마 분말 투여에 의한 당뇨쥐의 비장 세포 기능에 관한 연구에서 4주간의 투여에 의해 비당뇨군의 비장 세포 증식능이 촉진되었고, 특히 Con A 첨가에 의해 비장 세포 증식능이 3배까지 상승되었다는 보고와 유사하다. 그리고 *L. japonica*로부터 얻은 immunostimulatory complexes(ISCOMs)를 mitogen과 같이 비장 세포에 첨가한 경우 비장 세포 증식능이 상승하였음이 보고된 바 있다(23).

#### 세포 독성 T 림프구(CTLs)에 미치는 영향

동종 항원 반응 비장 세포가 동종 항원을 가진 세포를 인식해



**Fig. 4. Effects of LP on the proliferation of splenocytes stimulated with anti-C57.** 100  $\mu$ L of the splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was cultured with anti-C57 and LP for 48 hr. The results are represented as a proliferation index. Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05). <sup>a</sup>Proliferation (%)=(Mean of O.D. in test wells/Mean of O.D. in control wells-1) $\times$ 100.

서 죽일 때, 죽은 세포가 분비하는 LDH의 양을 측정하여 살해 세포 독성 작용에 미치는 영향을 알아보았다. 표적 세포(target cells)로서 MMC로 증식을 억제된 alloantigen인 C57BL/6 마우스 비장세포를 사용하였고, 작동 세포(effector cells)로서 Balb/c 마우스 비장 세포를 사용하였다. 작동 세포를 표적세포로 자극한 뒤, LP를 농도별로 첨가하여 세포 독성 T 림프구(CTLs)의 활성을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 작동 세포와 표적 세포를 10:1 비율로 혼합한 뒤, LP를 농도별로 0.25, 0.5, 1 mg/mL 첨가하여 48 시간 배양한 후, 표적 세포에 대한 lysis 정도를 측정 한 결과 대조군으로 동중 항원 반응 비장 세포와 MMC 처리한 동중 항원 비장 세포만을 배양했을 때 분비되는 LDH의 양은  $25 \pm 0.28$ 이었 으며, 여기에 1 mg/mL 농도의 LP를 첨가하였을 때 분비되는 LDH의 양은  $32.29 \pm 1.03$ 으로 나타나서, 동중 항원 반응 비장 세포의 살해 세포 작용이 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 LP에 대한 항원 특이 CTL 유도를 증가시키는 생체 방어력 증강 효능을 보여주는 결과이다.

**림포카인 활성 살해 세포(LAKs)에 미치는 영향**

NK 세포는 세포 내 미생물에 의해 감염된 세포 및 암세포를 직접 살해하거나, 타 포식 세포를 활성화시킬 수 있는 사이토카인을 포함한 수용성 인자를 분비하는 세포로서 선천 면역에 주요한 역할을 담당하고 있는 면역 세포이다(24). LP 첨가에 의한 NK 세포의 활성화에 대한 영향을 측정하기 위하여, Balb/c 마우스로부터 분리한 비장 세포를 IL-2로 자극하여 림포카인 활성 살해 세포(LAKs)로 분화시킨 후, YAC-1 림프종 세포를 표적 세포로 하여 LAKs의 활성을 측정하였다. 작동 세포와 표적 세포를 10:1 비율로 혼합한 뒤, LP를 농도별로 0.25, 0.5, 1 mg/mL 첨가하여 48시간 배양한 후, 표적 세포에 대한 lysis 정도를 측정 한 결과 대조군( $5.50 \pm 0.28$ )에 비해 LP를 첨가한 경우 농도 의존적으로  $16.57 \pm 2.07$ ,  $23.20 \pm 4.70$ ,  $43.87 \pm 2.72$  수준의 유의적인 LAKs의 활성을 보였다(Table 1). 다시마를 비롯한 천연물 유래의 면역 조절제는 대식 세포, NK 세포 및 T 림프구의 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 이들 세포로부터 분비되어 나오는 사이토카인 분비를

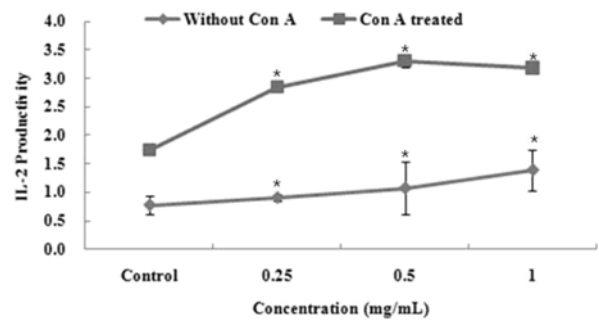
**Table 1. Effects of LP on the killing activity of anti-C57-induced CTLs and YAC-1-induced LAKs**

Conc. (mg/mL)	Killing activity <sup>b)</sup>	
	CTLs	LAKs
Control	25.00 $\pm$ 0.28	5.50 $\pm$ 0.28
0.25	26.42 $\pm$ 2.07	16.57 $\pm$ 2.07*
0.50	31.33 $\pm$ 4.34*	23.20 $\pm$ 4.70*
1.00	32.29 $\pm$ 1.03*	43.87 $\pm$ 2.72*

Values are mean $\pm$ SE (*n*=3).

\*Significantly different from control at *p*<0.05.

<sup>b)</sup>Killing activity (%)=[(Experimental-Effector spontaneous-Target spontaneous)/(Target maximum-Target spontaneous)] $\times$ 100.



**Fig. 5. Effects of LP on the cytokine productivity of splenocytes stimulated with Con A.** 100  $\mu$ L of the splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) was cultured with LP for 48 hr, and IL-2 productivity was measured by the EIA assay. Significance was determined using the Student's *t*-test versus the control group (\**p*<0.05).

촉진시켜, 면역 체계의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(25). 이와 관련하여 Hwang 과 Shin(26)은 감식초 유래 고분자 정제 다당이 임파구 및 NK 세포 등 면역 관련 세포의 활성 인자로 작용할 가능성을 보고하였다. Vetvicka 과 Yvin(27)은 해양 식물 유래의 다당인  $\beta$ -1,3-glucan이 고분자 다당체인 lentinan보다 마우스 비장 세포에서 세포독성능 측정을 통하여 측정 한 결과 NK 세포 활성을 증가시켰음을 보고하였다. 이는 다시마 유래 다당인 LP가 면역 세포를 자극하여 림프구의 비특이적 세포 독성을 유도하는 것으로 사료된다.

**IL-2의 생산량에 미치는 영향**

비장세포 증식 활성 효과와 T 세포가 분비하는 cytokine 양과의 관계를 알아보고자 T 보조 세포가 분비하는 cytokine인 IL-2를 측정하였다. 비장 세포에 Con A로 전처리한 후 LP를 농도별로 첨가한 경우와 비장 세포에 LP만을 농도별로 첨가한 경우 모두 농도 의존적으로 IL-2의 분비량이 증가함을 확인하였다. Fig. 5에 나타난 것과 같이, 비장 세포에 Con A를 전처리하여 T 림프구를 자극한 뒤 LP를 첨가한 경우, 대조군( $1.74 \pm 0.16$ )에 비해 LP를 1 mg/mL 첨가한 경우  $3.19 \pm 0.35$  수준으로 유의적인 증가를 보였다. 비장 세포에 LP만을 첨가하여 IL-2 분비량을 측정 한 경우 또한 대조군( $0.77 \pm 0.04$ )에 비해 LP를 1 mg/mL 첨가한 경우  $1.39 \pm 0.08$  수준으로 유의적인 증가를 보였다. IL-2는 T 림프구, B 림프구 및 NK 세포와 같은 림프구의 분화와 증식에 관여하는 cytokine이며(28), IL-2의 분비량은 활성화된 T 림프구를 반영하는 지표로서 IL-2의 분비가 많으면 림프구의 증식이 증가된다(29). LP의 첨가로 인해 마우스 비장 세포에서 분비되는 IL-2의 생산

량이 증가된 것으로 보아, 다시마 유래 다당인 LP가 마우스 비장 세포의 면역 세포를 자극하여 세포성 면역에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이는 선행 연구 결과에서 LP를 처리한 경우 CD4+ T 림프구의 활성이 증가한 것과 일치한다(18).

## 요 약

*Laminaria japonica*의 polysaccharides(LP)가 마우스 비장 세포에서 현저한 면역 증강 활성을 보였다. Balb/c 마우스 비장 세포를 mitogen인 Con A, T cell growth factor인 IL-2 및 alloantigen인 anti-C57로 자극한 뒤, LP를 농도별(0.25, 0.5, 1 mg/mL)로 첨가하여 마우스 비장 세포의 증식 활성을 측정된 결과, 비장 세포 증식능이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이러한 결과를 근거로 항원 특이적인 세포 독성 T 림프구(CTLs)의 활성과 IL-2에 의해 야기되는 비특이적인 림포카인 활성 살해 세포(LAKs)의 세포 독성능을 측정하였다. 작동 세포와 표적 세포의 비율을 10:1로 혼합한 뒤, LP를 농도별로 첨가하여 세포 용해 시 발생하는 LDH를 측정된 결과, 동종 항원 반응 비장 세포의 살해 세포 작용이 유의적으로 증가하였으며, LAKs의 활성 또한 유의적으로 증가함을 확인하였다. 그리고 T 림프구의 활성에 직접적으로 관여하는 IL-2의 생산능을 측정된 결과, LP를 첨가한 경우 농도 의존적으로 IL-2의 생산량이 증가됨을 확인하였다. 이상의 결과로, 참다시마에서 획득한 LP가 마우스 비장 세포의 T 림프구 및 NK 세포의 증식에 영향을 미치는 면역 증강 활성을 가지고 있음을 입증하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단(과제번호-F00014) 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Fahey TJ, Myers WP. Documented hyperparathyroidism of thirty-six years' duration. *Cancer* 35: 803-807 (1975)
2. Oettgen HF. Biological agents in cancer therapy; cytokines, monoclonal antibodies, and vaccines. *J. Cancer Res. Clin.* 116: 116-119 (1990)
3. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yermeev W, Moroz AM. Influence of the mouse Bcq, Tbc-1, and Xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of Bacille Colmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clin. Exp. Immunol.* 104: 37-43 (1996)
4. Oldham RK. Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* 70: 789-796 (1983)
5. Bergelson LD. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunol. Today* 16: 483-486 (1995)
6. Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, Kim HM. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology* 40: 39-48 (1998)
7. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effect of five berbal plants. *J. Ethnopharmacol.* 72: 167-172 (2000)
8. Maeda YY, Watanabe ST, Chihara G, Rokutanda M. T-cell mediated vascular dilatation and hemorrhage induced by antitumor polysaccharides. *Int. J. Immunopharmacol.* 6: 493-501 (1984)
9. Sugawara I, Lee KC, Wong M. Schizophyllan(SPG)-treated macrophages and antitumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. *Cancer Immunol. Immun.* 16: 137-144 (1984)
10. Akiyama J, Kawamura T, Gotohda E, Yamada Y, Hosokawa M, Kodama T, Kobayashi H. Immunotherapy of transplanted KMT-17 tumor in WKA rats by combination of cyclophosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. *Cancer Res.* 37: 3042-3045 (1977)
11. Yun YS, Lee YS, Jo SK, Jung IS. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from *Panax ginseng* as an immunomodulator. *Planta. Med.* 59: 521-524 (1993)
12. Elyakova LA, Zvyagintseva TN. A study of the laminarins of some Far-Eastern, brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 34: 241-248 (1974)
13. Lahaye M. Marine algae as sources of fibers contents in some sea vegetable. *J. Sci. Food Agr.* 54: 587-594 (1991)
14. Kim YY, Lee KW, Kim GB, Cho YJ. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonica* by heating hydrolysis. *J. Korean Fish. Soc.* 33: 393-398 (2000)
15. Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 595-600 (1989)
16. Oh CK, Oh MC, Kim SH, Rhim SB, Kim SH. Antimutagenic and antimicrobial effect of ethanol extracts from sea-mustard and sea tangle. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 90-94 (1998)
17. Nakashima H, Kido N, Kobayashi N, Motoki M, Neushul M, Yamamoto N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. *Antimicrob. Agents Ch.* 31: 1524-1528 (1987)
18. Kim KH, Kim YW, Kim HB, Lee BJ, Lee DS. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol. Lett.* 28: 439-446 (2006)
19. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098-2102 (1999)
20. Ha JC, Kim YH, Woo WH, Nam SY. Promotion of nonspecific cytotoxic T lymphocyte activity by bo-yang-hwan-oh-tang. *Korean J. Pharmacogn.* 32: 226-232 (2001)
21. Diefenbach A, Rauler DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.* 188: 9-21 (2002)
22. Cho SH, Yang KM, Bae BS, Im SA, Yu RN. Effect of sea tangle intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 952-959 (1998)
23. Lee IA, Popov AM, Sanina NM, Kostetsky EY, Novikova OD, Reunov AV, Nagorskaya VP, Shnyrov VL. Morphological and immunological characterization of immunostimulatory complexes based on glycolipids from *Laminaria japonica*. *Biochim. Biophys. Acta* 51: 263-272 (2004)
24. Shida K, Suzuki T, Kiyoshima SJ, Shimada S, Nanno M. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 997-1003 (2006)
25. Agarwal BB, Traquina PR, Eessalu TE. Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. *J. Biol. Chem.* 261: 13652-13656 (1986)
26. Hwang YC, Shin KS. Characterization of immuno-stimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40: 220-227 (2008)
27. Vetricka V, Yvin JC. Effects of marine  $\beta$ -1,3 glucan on immune reactions. *Int. J. Immunopharmacol.* 4: 721-730 (2004)
28. Yagoob P, Carder PC. The effect of fatty acids on lymphocyte functions. *Int. J. Biochem.* 12: 1705-1709 (1993)
29. Calder PC, Bond JA, Bevan SJ, Newsholme EA. Unsaturated fatty acids inhibit interleukin-2 production by concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Proc. Nutr. Soc.* 50: 171-175 (1991)