

군소(*Aplysia kurodai*)에서 추출한 다당 분획물의 면역 조절 효과

박시향¹ · 정세영² · 최영준^{1*}

¹경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

²경희대학교 약학대학 위생약학 및 독성학실

Immune Regulating Effect of Polysaccharide Fraction from Sea Hare (*Aplysia kurodai*)

Sihyang Park¹, Se Young Choung², and Yeung Joon Choi^{1*}

¹Dept. of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

²Dept. of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract

We extracted polysaccharide from the sea hare, *Aplysia kurodai*, purified it partially, and experimented its immune response using the human blood lymphocytes and macrophage cell lines. *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) improved the growth of the T cell (Jurkat) up to 40% by treatment for 48 hours, and decreased the growth of blood cancer, Jiyoye cell line. The APF on RAW 264.7 cell also increased interleukin-12 up to 47%. In contrast, the secretion of interleukin-2 and interferon-gamma by treatment of only APF or APF and concanavalin A on Jurkat for 24 hours and 48 hours didn't influence significantly. These results suggest that the APF has possible immune regulating ability.

Key words: sea hare, *Aplysia kurodai*, polysaccharide, immune regulating

서 론

군소는 무순목 군소과의 연체동물로 학명은 *Aplysia kurodai*이다. 몸의 길이는 약 40 cm 정도로 긴 달걀모양을 하고 있으며, 흑갈색 바탕에 회백색의 얼룩무늬를 가지고 있다. 머리에 더듬이를 갖고 있어 그 모습이 토끼와 닮아 sea hare라고 불린다. 주로 녹조와 갈조를 먹고 살며, 조개류와 같은 연체동물이지만 껍질이 없고 대신 보라색 계열의 특이한 색소를 내뿜어 몸을 보호한다(1).

군소는 고단백 저칼로리 식품이라 성장촉진과 성인병 예방에 도움이 된다고 알려져 있으며(2), 남부 지방을 중심으로 데쳐서 먹기도 한다. 군소에 대한 연구로 Choi와 Han(3)이 군소육의 단백질 및 아미노산 조성에 대해 연구하였고, Kim(2)은 군소 알의 열수 추출물이 항암활성이 있음을 보고하였으며, 이 외에도 군소 내장 추출물로부터 항산화 및 항균효과(4)를 보고한 연구들이 있다. 또한 군소는 신경망이 단순하고 신경세포가 커서 신경계와 관련된 연구에 많이 이용되고 있으며(5,6), 특히 Eric Kandel은 군소의 신경망을 통한 학습과 기억의 메커니즘에 관한 연구로 노벨상을 수상하기도 하였다.

해양생물에 관한 연구로는 해양 식물에 관한 연구에 비해, 해양 동물을 소재로 한 연구나 자원 개발은 아직 미미한 편이다. 해양 동물에 관한 연구로 Schuchter 등(7)은 해양 이끼 벌레류인 *Bryozoa bugula neritina*에서 분리한 bryostatin 1로부터 B16 흑색종의 성장을 억제하는 효과가 있음을 보고하였으며, Specic 등(8)은 수종의 해면동물의 수용성과 유기용매 추출물들의 생리활성 연구에서 halichondrin B 유도체인 E7389가 동물실험에서 난소, 정소, 방광, 췌장암 등에 항암 효과를, *Topsentia* 추출물에서는 용혈효과가, *T. ophir-aphidites* 메탄올 추출물에서는 acetylcholinesterase(AChE) 저해능이 있다고 하였다. 이처럼 해양 동물 유래의 성분으로부터 다양한 생리활성이 인지되어 해양 동물 자원 소재 개발의 필요성이 인지되고 있다.

그중 해양 동물의 면역 조절능에 관한 연구도 진행되고 있으며, Wu 등(9)은 해양 동물에서 EPA를 추출하여 이것을 마우스에 급이하였을 때 EPA가 interleukin-2를 증가시키고 PGE₂의 생성을 억제한다고 보고하였으며, Mohammad 등(10)은 해양 무척추동물인 군소에서 추출한 dolestatin 10의 유도체인 auristatin PE가 만성 백혈병 치료에 도움이 된다고 보고하였다.

*Corresponding author. E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-640-3115, Fax: 82-55-640-3111

본 연구에서는 해양 동물 유래의 생리활성을 탐색하여 새로운 기능성 소재를 찾고자 시도하였으며, 해양 동물 중 해양 무척추동물인 군소로부터 새로운 기능성의 다당류 분획물을 추출 분리하였다. 군소에서 추출 분리한 다당 분획물의 생리적 활성을 확인하기 위하여 혈액 림프구 및 대식세포로 군소 유래의 다당 분획물이 이들 세포에 미치는 영향과 사이토카인 생성에 미치는 영향을 알아보고, 면역 조절 효능을 가진 기능성 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료

군소(*Aplysia kurodai*)는 2009년 8월에 경남 통영시 인근 해역에서 채취하여, 끓는 물에서 5분 동안 자숙한 것을 -20°C에서 냉동된 상태로 통영 잠수기 조합에서 구입하였다. 구입한 군소는 내장은 제거하고 육질부분만을 동결 건조하여 파쇄한 후 -20°C의 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 단백질 분해효소로서 Flavourzyme 500MG와 Neutrase는 Novozymes Korea(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DEAE-Sepharose 수지와 Superdex HR-200 칼럼은 GE health care Korea사(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 분자량 측정을 위한 표준단백질과 GAG 및 그 외의 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 실험에 사용된 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), RPMI 1640 및 fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone Co.(Logan, UT, USA)의 제품을 사용하였고, penicillin-streptomycin 혼합용액, lipopolysaccharide(LPS) 등은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 세포증식 측정은 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, Madison, WI, USA)를 구입하여 사용하였다. 배양에 관련된 기기는 NUNC Co.(Langensfeld, Germany)의 제품을 사용하였으며, 사이토카인을 측정하기 위한 키트 시약은 모두 eBioscience Co.(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

최적 조건에 따른 다당류의 추출

군소 육질로부터 다당류를 추출하기 위하여 군소 육질 동결 건조시료 무게의 10배량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)을 첨가하고, 기질에 대하여 단백질 농도비가 1/50이 되도록 Flavourzyme 500MG를 첨가하여 15시간 동안 60°C의 항온 수조에서 흔들며 주면서 가수분해하였다. 이것을 원심분리(3,000×g, 30분)하여 가수분해물의 상등액에 최종 농도가 3%가 되도록 trichloroacetic acid를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리(3,000×g, 30분)하여 침전한 단백질을 제거하였다. 상등액은 40°C 이하에서 상등액의 Brix가 60이 될 때까지 감압 농축하고, 농축물의 5배량의 ethanol을 첨가하여 알코올 불용성 물질을 침전시킨 다음, 원심분리(3,000×g, 30분)하여 상등액을 취해 이것

을 추출 다당류로 사용하였다.

DEAE-Sepharose에 의한 정제

최적 조건으로 추출한 다당류를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 용해시킨 후(50 mg/mL), 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sepharose 칼럼(1.6×15 cm)에 200 μL를 넣고, 칼럼 부피와 동량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)으로 세척한 후, 2 M NaCl을 포함한 같은 완충액을 사용하여 유속 1 mL/min으로 선형 균배하였으며 용출액의 다당류는 254 nm에서 검출하였다. 용출액은 0~70 min에서는 5 mL, 70~120 min에서는 2 mL씩 분획하여 부분 정제한 군소 다당 분획물(*Aplysia kurodai* polysaccharide fraction; APF)을 본 실험에 사용하였다.

세포의 배양

실험에 사용한 T cell(Jurkat)과 B cell(Jiyoye)은 생물자원센터(KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, RAW264.7 cell은 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각 세포주는 T flask에서 배양하였으며 2~3일에 한 번씩 신선한 배지로 교환해주면서 1주일에 2~3회 계대하였고, 배지는 10% FBS 배지를 함유한 RPMI 1640와 DMEM 성장배지를 이용하였다. 세포주는 습도 95%, 5% CO₂, 36.5°C로 조절된 배양기에서 배양하였다.

세포 증식능의 측정

군소에서 추출한 다당류 추출물의 T cell과 B cell에 대한 증식능을 확인하기 위하여 T cell과 B cell을 각각 96 well plate에 2×10³ cells/well의 농도로 90 μL씩 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 시료의 최종 농도가 0.1, 1, 10 및 50 μg/mL가 되도록 조제한 배지를 분주한 세포에 10 μL씩 가하여 일정기간 동안 배양하고 세포 증식률을 측정하였다. 또한 T cell의 분화 후의 세포 증식능을 비교하기 위하여 대조군에는 무시료 처치군을, 비교 대조군과 시험군에는 concanavalin A 50 μg/mL를 처치하여 24시간 동안 배양하고, 시험군에는 군소 다당 분획물의 최종농도가 0.1, 1, 10 및 50 μg/mL이 되도록 시료를 더 가하고 배양하였다. 3시간과 6시간 후 세포의 증식률을 측정하였다. 세포 증식률은 모두 Promega사에서 구입한 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 이용하여 측정하였다.

Cytokine의 생성량 측정

Interleukin-12(IL-12)의 생성량 측정: 대식세포주인 RAW264.7 cell을 통하여 IL-12의 생성량을 측정하였다. RAW264.7 cell line을 24 well plate에 분주한 후, 24시간 동안 배양하여 세포가 바닥에 잘 부착되도록 하였다. 배지를 제거한 후 시료의 최종농도가 0.1, 1, 10 및 50 μg/mL이 되도록 조제한 배지 1 mL을 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하고, 그 상등액을 취해 IL-12의 생성량을 측정하였다. IL-12의

생성량은 Mouse Interleukin-12 ELISA Ready-SET-Go kit(Cat. 88-7126-22, eBioscience Co.)으로 측정하였다. IL-12의 함량 비교는 대조군에 대비한 백분율로 나타내었다.

Interleukin-2(IL-2)의 생성량 측정: 인간 백혈세포인 Jurkat을 통하여 IL-2의 생성량을 측정하였다. Jurkat cell line을 24 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 900 μ L를 분주하였다. 24시간 동안 안정화시킨 후 최종농도가 0.1, 1, 10 및 50 μ g/mL이 되도록 조제한 배지를 100 μ L를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 후 배양 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 그 상등액을 취해 IL-2의 생성량을 측정하였다. IL-2의 생성량은 Mouse Interleukin-2 ELISA Ready-SET-Go kit(Cat. 14-7128-67, eBioscience Co.)으로 측정하였다. IL-2의 함량비교는 대조군에 대한 시험군의 생성량을 백분율로 비교하여 나타내었다.

또한 T cell의 분화 후의 IL-2의 생성량을 비교하기 위하여 대조군에는 무시료 처치군을 비교 대조군으로는 concanavalin A 5 μ g/mL를 처치하였으며, 시험군에는 5 μ g/mL의 concanavalin A와 함께 군소 다당 추출물을 0.1, 1, 10 및 50 μ g/mL이 되도록 조제한 배지를 100 μ L씩을 세포 분주 24시간 후 세포에 처리하였다. 24시간 배양한 후 배양 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 그 상등액을 취해 IL-2의 생성량을 측정하였다. IL-2의 생성량은 위와 같은 방법으로 하였으며, IL-2의 함량비교는 concanavalin A만을 처리한 비교 대조군에 대한 시험군의 생성량을 백분율로 비교하여 나타내었다.

Interferon-gamma(IFN- γ)의 생성량 측정: 인간 백혈세포인 Jurkat을 통하여 IFN- γ 의 생성량을 측정하였다. Jurkat cell line을 24 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 900 μ L를 분주하였다. 24시간 동안 안정화시킨 후 최종농도가 0.1, 1, 10 및 50 μ g/mL이 되도록 조제한 배지 100 μ L를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하고, 상등액을 취해 IFN- γ 의 생성량을 측정하였다. IFN- γ 의 생성량은 Human Interferon-gamma ELISA Ready-SET-Go kit(Cat. 14-7318-67, eBioscience Co.)으로 측정하였다. IFN- γ 의 함량비교는 대조군에 대한 시험군의 생성량을 백분율로 비교하여 나타내었다.

또한 T cell의 분화 후의 IFN- γ 의 생성량을 비교하기 위하여 대조군에는 무시료 처치군을, 비교 대조군으로는 concanavalin A 5 μ g/mL를 처리하였으며, 시험군에는 5 μ g/mL의 concanavalin A와 함께 군소 다당 추출물을 0.1, 1, 10 및 50 μ g/mL이 되도록 조제한 배지를 100 μ L씩을 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하고, 상등액을 취해 IFN- γ 의 생성량을 측정하였다. IFN- γ 의 생성량은 위와 동일한 방법으로 측정하였으며, IFN- γ 의 함량 비교는 concanavalin A만

을 처리한 비교 대조군에 대한 시험군의 생성량을 백분율로 비교하여 나타내었다.

통계처리

통계 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고, 대조군에 대한 통계적 유의성은 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 각 실험군 평균값 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

군소에서 추출한 다당류로부터 DEAE-Sephrose 상에서 부분 정제된 polysaccharide fraction은 전보(11,12)에서 보고한 바와 같이, 기본 형태를 구성하는 이당류 단위가 전체 구성물 중 55% 이상을 차지하고 있었으며, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, fucose, glucose, galactose, 미량의 mannose와 xylose로 구성되어 있었다. 이 중에서 N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine이 70% 이상을 차지하며, 단백질 핵의 threonine 잔기에 O-연결된 GlcUA(2S)-GlcNS와 GlcUA-GlcNS(6S) 구조를 가지고 있는 복합 다당체로 나타났다. 이것을 시료로 하여 면역조절능에 미치는 영향을 알아보았다.

T cell(Jurkat)의 증식능

면역반응은 외부 이물질이 몸속에 유입이 되면 T cell은 세포성 면역 반응을 일으키고, B cell은 항체를 생성하여 체액성 면역 반응을 일으킨다(13). 군소 다당 추출물이 T cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Jurkat cell로 T cell의 증식능을 측정하였다. T cell에 무처리 대조군과 군소 다당 분획물을 최종농도가 0.1, 1, 10, 50 μ g/mL이 되도록 처리한 후 1일과 2일 동안 배양한 후 세포의 증식률을 알아보았다(Table 1). 24시간 배양 시 군소 다당 분획물 0.1 μ g/mL에서는 17.8%의 증가율을, 10 μ g/mL의 농도에서는 26.2%의 증가율을, 50 μ g/mL의 농도에서는 36.4%로 농도가 증가함에 따라 유의적인 증식률의 증가를 확인할 수 있었다. 48시간 배양 시에도 세포의 증식률은 농도에 따라 증가하였으며, 50 μ g/mL의 농도에서 45.7%의 높은 증식률의 증가를 확인하여 군소 다당 추출물이 T cell의 증식을 유도함을 알 수 있었다.

Table 1. T cell (Jurkat) proliferation by treatment of *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) for 24 hours and 48 hours

Samplec	Cell proliferation (%)	
	24 hours	48 hours
Control	100.0 \pm 4.2 ¹⁾	100.0 \pm 3.3
APF 0.1 μ g/mL	117.8 \pm 10.3**	125.7 \pm 9.4**
1 μ g/mL	126.2 \pm 3.7**	132.6 \pm 11.0**
10 μ g/mL	126.2 \pm 4.7**	136.1 \pm 12.7**
50 μ g/mL	136.4 \pm 10.1**	145.7 \pm 6.0**

¹⁾Average \pm standard deviation. ** $p < 0.01$; compared with control group.

Table 2. T cell (Jurkat) proliferation by treatment of concanavalin A and *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) for 3 hours and 6 hours

Sample	Cell proliferation (%)	
	3 hours	6 hours
Control	100.0±4.3	100.0±2.1
Con-A	120.2±12.6	134.5±1.6
Con-A+APF 0.1 µg/mL	128.2±9.4	140.5±7.7
Con-A+APF 1 µg/mL	126.9±11.9	140.2±3.0*
Con-A+APF 10 µg/mL	135.1±17.4	142.5±0.7***
Con-A+APF 50 µg/mL	137.3±18.9	143.3±2.8**

Con-A: concanavalin A. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; compared with Con-A treatment group.

또한 T cell을 자극하는 concanavalin A를 시료 처리 전 24시간 동안 처리한 후, 군소 다당 분획물과 함께 세포에 처리하여 T cell의 증식능을 확인해 보았다(Table 2). Table 2에서처럼 concanavalin A 처리군은 미처리군에 비해 3시간 처리군과 6시간 처리군 모두에서 높은 유의적인 증가를 보였다. 또한 concanavalin A만을 처리한 군과 concanavalin A와 같이 시료를 처리한 군의 경우에는 3시간 처리군의 경우 농도 증가에 따라 증식률의 증가를 보였으나 유의성은 나타나지 않았으며, 6시간 처리하였을 때에는 모든 농도에서 40%가 넘는 높은 유의적 증가를 보여주었다. 이러한 결과는 별불가사리 추출물의 비장세포 활성화 효과 실험과 유사하였으며(14), 제주 손바닥 선인장의 초음파 추출물을 이용한 Jurkat cell 증식능 실험에서(15), 6일째 T cell의 41% 증진 효과와 군소 다당 분획물 6시간 배양과 근접한 수치로 군소 다당 분획물의 빠른 증식능 유도를 확인할 수 있었다.

IL-12의 생성

IL-12는 대식세포 혹은 B cell에서 분비되어 cytotoxic T cell의 분화를 촉진하고 NK cell을 활성화하여 외부 이물질을 사멸하는 역할을 한다고 알려져 있다(16). RAW264.7 cell에 대한 군소 다당 분획물의 IL-12의 생성량을 비교해 본 결과(Fig. 1), LPS만을 처리한 비교 대조군은 미처리 대조군

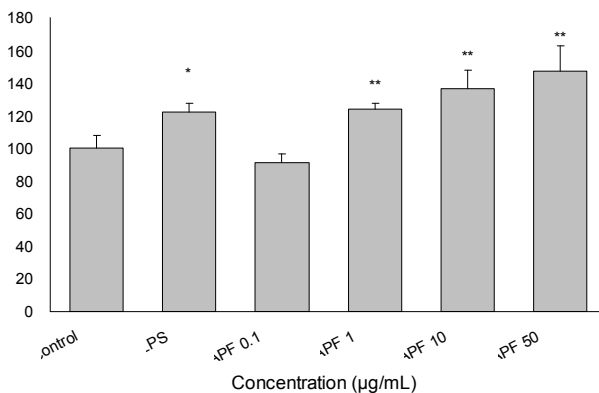


Fig. 1. IL-12 production by treatment of *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) on RAW 264.7 cell line for 24 hours. LPS: lipopolysaccharide. *p<0.05, **p<0.01; compared with control group.

에 비해 20%가 넘는 유의적인 생성량 증가를 볼 수 있었으며, 군소 다당 분획물 처리군의 농도가 증가함에 따라 IL-12의 생성량도 증가함을 확인할 수 있었다. LPS 1 µg/mL에 대한 생성량과 군소 다당 분획물 1 µg/mL의 생성량이 대조군에 비하여 약 20% 이상의 증가하였으며, 군소 50 µg/mL에서는 47.4%의 높은 증가율이 인지되어 군소 다당 추출물의 면역 조절 효과가 IL-12의 생성 유도과 관련이 있는 것으로 여겨진다. Kim 등(17)은 대식세포에 젓산균을 처리하여 젓산균이 면역조절에 미치는 연구에서 IL-12의 생성량이 150 µg/mL에서 최고 260.8 pg/mL의 생성량을 보여 주었다. 군소의 IL-12의 생성량과 직접 비교할 수 없지만 비슷한 경향을 보여 주었다.

IL-2의 생성량

Jurkat cell에 군소 다당 추출물을 처리하였을 때 IL-2의 생성능은 Fig. 2에 나타내었다. Concanavalin A의 경우는 24시간과 48시간 배양 시 모두 유의적인 생성량의 증가를 확인할 수 있었으나, 군소 다당 분획물을 처리한 모든 시험군에서는 유의적인 생성량의 증가를 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 24시간 처리뿐만 아니라 48시간 처리 시에도 같은 결과였다. 그리고 Jurkat cell을 concanavalin A로 자극하여 IL-2의 생성 변화를 확인하였을 때에도(Fig. 3) concanavalin A 미처리군에 비해 concanavalin A 처리군은 24시간 및 48시간 배양 처리 시 유의적인 증가를 보여주었으나, concanavalin A와 함께 시료를 처리한 대조군과 비교하였을 때 군소 다당 분획물에 의한 IL-2의 생성량 증가는 인지할 수 없었다. 24시간 및 48시간의 처리 시에도 T cell의 IL-2의 생성량에는 큰 영향을 미치지 못하였다. IL-2는 1975년 bone-marrow-derived T lymphocyte의 성장촉진 능력을 가지는 물질로 최초로 밝혀진 사이토카인이다(13,18). IL-2는 다양한 세포에 영향을 주지만 T cell growth factor라고 불릴 정도로 가장 중요한 역할은 T cell에 대한 것으로 CD4+ T cell과 CD8+ T cell의 증식을 촉진시키는 것이다(16). 또한

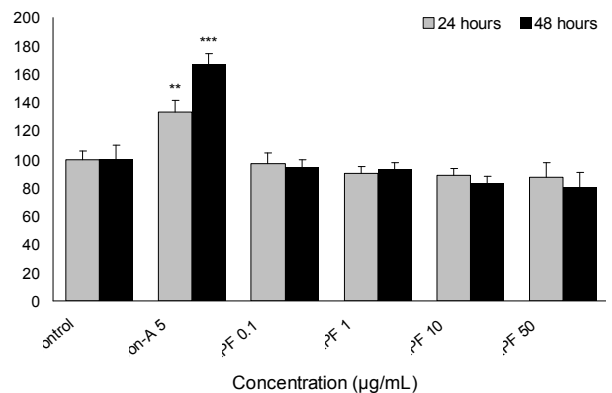


Fig 2. IL-2 production by treatment of *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) on Jurkat cell for 24 hours and 48 hours. Con-A: concanavalin A. **p<0.01, ***p<0.001; compared with control group.

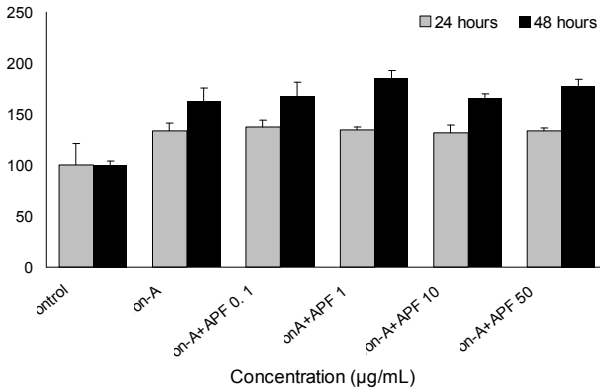


Fig. 3. IL-2 production by treatment of concanavalin A and *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) on Jurkat cell for 24 hours and 48 hours. Con-A: concanavalin A.

natural killer cell의 성장 촉진에도 관여하며, B cell의 항체 생성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(18). 연구의 결과로 미루어 Jurkat cell의 증식을 증가시킨 것은 IL-2에 의한 영향은 아닌것 같다.

IFN-γ의 생성

IFN-γ는 Th1 cell, Tc cell 및 NK cell에서 분비되어, B cell의 항체 생성을 유도하며, Th2 cell의 증식을 유도하고 대식세포가 병원균을 제거하게 하는 등의 작용을 한다고 알려져 있다(18). 군소 다당 분획물이 IFN-γ의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 T cell에 군소 다당 분획물을 24시간 및 48시간 동안 농도별로 처리하고, IFN-γ의 생성량을 측정해 보았다(Fig. 4). 그 결과 양성 대조군으로 실시한 concanavalin A 처리군의 IFN-γ 생성량은 유의적인 생성량 증가를 확인할 수 있었으나, 군소 다당 분획물의 경우에는 24시간 및 48시간 처리군 모두에서 유의적인 생성량 증가를 확인할 수 없었다. 그리고 Jurkat cell을 분화시킨 후 IFN-γ의 생성량을 비교하기 위하여, 군소 다당 분획물과 함께 concanavalin A를 처리하여 24시간 및 48시간 동안 배양하여 IFN-γ의 생성량 변화를 비교해 보았다(Fig. 5). 대

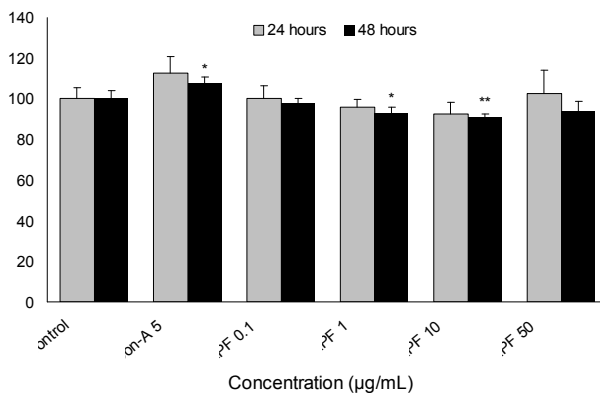


Fig. 4. IFN-γ production by treatment of *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) on Jurkat cell for 24 and 48 hours. Con-A: concanavalin A. *p<0.05, **p<0.01; compared with control group.

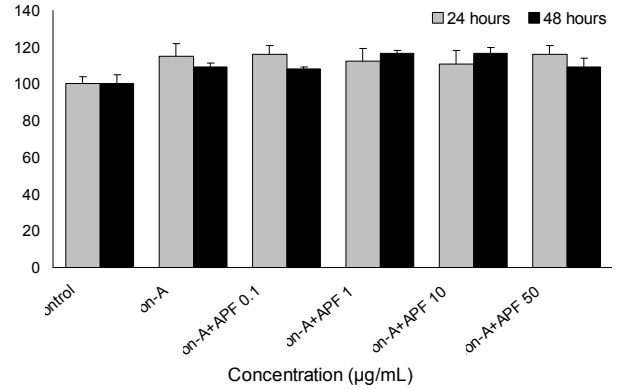


Fig. 5. IFN-γ production by treatment of concanavalin A and *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF) on Jurkat cell for 24 hours and 48 hours. Con-A: concanavalin A.

조군에 비하여 concanavalin A만을 처리한 군에서는 IFN-γ의 유의적 생성량 증가가 나타났으나, concanavalin A와 군소 다당 분획물을 같이 처리하였을 때 concanavalin A만을 처리한 군과 비교 시 군소 다당 분획물에 의한 유의적인 증가는 확인할 수가 없었다. 이러한 결과는 24시간 및 48시간 처리 시에도 마찬가지였다. 이처럼 군소 다당 분획물은 T cell에 대하여 IFN-γ 생성에는 어떤 영향을 미치지 못하는 듯하였다. Wang 등(19)은 영지버섯에서 추출한 다당류의 면역조절능과 항종양 효능실험에서 대식세포에서의 IL-1β, TNF-α, IL-6의 생성능 증가와 T cell의 IFN-γ 생성능이 증가하였다고 보고하여, 군소에서 추출 분리한 다당류와는 다른 결과를 보여주었다.

혈액암 세포인 Jiyoye에 대한 세포 증식능

군소 다당 분획물의 인간 유래의 혈액암 세포인 Jiyoye cell에 대한 증식능은 Table 3에 나타내었다. 배양시간이 길어질수록, 군소 다당 추출물의 농도가 증가할수록 세포 증식률이 감소함을 알 수 있었으며, 이러한 결과로 군소 다당 분획물의 혈액암에 대한 항암효과를 기대할 수 있었다. 이러한 결과는 Mohammad 등(10)이 군소에서 추출한 cytotoxic peptide인 dolastatin 10의 유도체인 bryostatin 1이 B cell 만성 림프구 백혈병 셀라인의 증식을 억제하였다는 보고와 일치하는 결과를 보여 주었다. 또한 이끼벌레 *Bugula neritina*에서 분리한 bryostatin 1이 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 B16흑색종 세포의 성장 억제능을 보고하여 해양 동물 유래

Table 3. Jiyoye cell proliferation of *Aplysia kurodai* polysaccharide fraction (APF)

Sample	Cell proliferation (%)		
	1 day	3 days	5 days
Control	100.0±6.4	100.0±14.5	100.0±5.0
APF 0.1 µg/mL	97.7±5.3	74.5±9.7*	76.7±4.8**
1 µg/mL	101.0±4.9	72.7±3.3**	75.7±5.0**
10 µg/mL	96.7±3.2	69.8±3.7**	72.3±6.7**
50 µg/mL	94.3±9.5	68.5±6.3**	60.0±14.8**

*p<0.05, **p<0.01; compared with control group.

의 항암 치료제 발견의 가능성을 제시하였다.

이상과 같은 결과로 군소에서 추출 분리한 군소 다당 분획물은 T cell(Jurkat) line의 증식능에 대하여 농도가 증가함에 따라 증식능이 증가하는 효과를 보여주었다. 그리고 백혈병 세포인 Jiyoye cell에 대하여 세포 성장을 억제하는 효과를 나타내어 혈액암 억제에 도움을 줄 수 있을 것으로 여겨진다. 또한 혈액세포가 사이토카인 생성에 미치는 영향을 측정된 결과에서는 T cell에 대하여는 IL-2와 IFN- γ 생성에 유의적인 영향을 미치지 못하는 못하였으나, 대식세포에 대하여는 IL-12 생성을 유도하였다. Kim 등(20)은 상황버섯에서 추출한 polysaccharide-protein complex(PPC)가 대식세포에 대하여 NO생성을 유도하고 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 유도하였고, 종양세포인 YAC-1 lymphoma의 사멸을 유도하였으나 T cell에 대하여는 유의적인 영향을 미치지 못하였다는 보고와 군소 다당 추출물의 면역 조절능과 유사한 결과를 보여주었다.

그동안 면역 활성을 증진하는 물질에 관한 연구로는 버섯 유래의 다당류로부터 면역 증진능에 관한 연구들이 많았으며(19,20), 이외에도 마황과 복분자 추출물로부터(21), 오미자 및 블루베리와 같은 식물성 물질로부터 면역 증진능이 보고되어 있다(22,23). 최근에는 해양 생물의 면역 활성에 관한 연구로 Schupp 등(24)은 광 주위의 twilight zone 해수에서 채취한 해양 생물로부터 추출한 추출물의 HL-60 cell에 대한 증식 저해능과 자살 유도 물질로 *Suberia sp.*, Thor-ectodae 및 Acroporidae 등을 보고하였는데, 본 연구에서는 해양 동물인 군소로부터 추출 분리한 다당류에서부터 면역 활성 증진능을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 면역력 저하로 인해 암과 같은 각종 질병의 발병과 이로 인한 사망률이 증가하고 있는 이때 새로운 면역 증강 물질 개발 소재로 해양 동물을 이용한 소재 개발의 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 군소 유래의 다당 분획물의 구조를 동정하고, 이 물질의 항암 기전에 관한 더 많은 연구도 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

요 약

본 실험에서는 군소로부터 다당류를 추출 정제한 다당 분획물을 혈액 림프구와 대식 세포주를 사용하여 면역 조절 효과를 실험해 보았다. 군소부터 추출 분획한 다당류는 48시간 동안 처리 시 Jurkat cell의 증식률을 40% 이상 증가시켰으며, 혈액암 세포종인 Jiyoye cell에 대하여는 그 성장률이 농도에 따라 감소하였다. 그렇지만 Jurkat cell에 24시간과 48시간 동안 군소 다당 분획물을 처리하였을 때 IL-2와 IFN- γ 생성량의 유의적인 증가는 확인할 수 없었다. 그러나 RAW264.7 cell line에 대하여는 IL-12의 경우는 47% 이상 증가하여, 군소 다당 분획물의 면역 조절 효과의 가능성을 보여주었다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 지식경제부 산업원천기술개발사업(10037262)에 의해 수행된 것임.

문 헌

1. Kwon OK, Min DK, Lee JR, Lee JS, Je JG, Choe BL. 2001. *Korean mollusks with color illustration*. Hangeul press, Busan, Korea.
2. Kim WS. 2008. The study on anticancer activity from sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *PhD Dissertation*. Jeju National University, Jeju, Korea.
3. Choi YJ, Han SY. 1985. Protein and amino acid compositions in echiurid and sea hare muscles. *Korean Soc Fisheries Aquatic Sci* 18: 550-556.
4. Shin MO. 2010. The antioxidative and antimicrobial effects of internal organs of *Aplysia kurodai* fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1433-1438.
5. Kim CH, Seo HJ, Hwang EY, Kim EJ, Go HJ, Kim IH, Seo JK, Moon JM, Huh MD, Park NG. 2001. Purification of myomodulin A and myomodulin E from the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *J Korean Soc Fish* 34: 279-284.
6. Antonov I, Kandel ER, Hawkins RD. 2010. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity and metaplasticity during intermediate-term memory formation in *Aplysia*. *J Neurosci* 30: 5781-5791.
7. Schuchter LM, Esa AH, May WS, Laulis MK, Pettit GR, Hess AD. 1991. Successful treatment of murine melanoma with bryostatin 1. *Cancer Res* 51: 682-687.
8. Specic K, Kaufenstein S, Mebs D, Turk T. 2010. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Mar Drugs* 8: 1550-1566.
9. Wu D, Meydani SN, Meydant M, Hayek MG, Huth P, Nicolsi RJ. 1996. Immunologic effects of marine- and plant-derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates. *Am J Clin Nutr* 63: 273-280.
10. Mohammad RM, Varterasian ML, Almatchy VP, Hannoudi GN, Pettit GR, Al-Katib A. 1998. Successful treatment of human chronic lymphocytic leukemia xenografts with combination biological agents auristatin PE and bryostatin 1. *Clin Cancer Res* 4: 1337-1343.
11. Yoon BY, Choi BD, Choi YJ. 2010. Extraction of glycosaminoglycan from sea hare, *Aplysia kurodai*, and its functional properties 1. optimum extraction of polysaccharide and purification of glycosaminoglycan. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1640-1646.
12. Yoon BY, Choi BD, Bae DW, Choi YJ. 2010. Extraction of glycosaminoglycan from sea hare, *Aplysia kurodai* and its functional properties 2. structural properties of purified glycosaminoglycan. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1647-1653.
13. Suh SH, Suh YS. 2007. Function of cytokines in immunological memory. <http://bric.postech.ac.kr/myboard/read.php?Board=review0&id=1650>. ISSN 1598-8767.
14. Chae SY, Kim MJ, Kim DS, Park JE, Jo SK, Yee ST. 2007. Effect of *Asterina pectiniifera* extracts on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 269-275.
15. Kwon MC, Han JG, Jeong HS, Qadir SA, Choi YB, Ko JR, Lee HY. 2008. Enhancement of immune activities of *Opuntia ficus-indica* L. var. Miller by ultrasonification extraction process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 1-8.

16. Pzaki L, Leonard WJ. 2002. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 277: 29355-29358.
17. Kim DW, Cho SB, Yun CH, Jeong HY, Chung WT, Choi CW, Lee HJ, Nam IS, Suh GH, Lee SS, Lee BS. 2007. Induction of cytokines and nitric oxide in murine macrophages stimulated with enzymatically digested *Lactobacillus* strains. *J Microbiol* 45: 373-378.
18. Smith KA, Lachman LB, Oppenheim JJ, Favata MF. 1980. The functional relationship of the interleukins. *J Exp Med* 151: 1551-1556.
19. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiano MS, Ho CK. 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokine released from activated macrophages and T lymphocytes. *Intl J Cancer* 70: 699-705.
20. Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK, Lee KW, Jeong SC, Choi YH. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinuslinteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1218-1226.
21. Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee YY. 2005. Enhancement of immune activities of *Ephedrae* herba and *Rubi* fructus at low temperature extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 81-86.
22. Kim CH, Kwon MC, Kim HS, Bae GJ, Ahn JH, Choi GP, Choi YB, Ko JR, Lee HY. 2007. Enhancement of immune activities of *Kadsura japonica* Dunal. through conventional fermentation process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 162-169.
23. Wang YP, Cheng ML, Zhang BF, Mu M, Zhou MY, Wu J, Li CX. 2010. Effect of blueberry on hepatic and immunological functions in mice. *Hepatobiliary Pancreat Disint* 9: 164-168.
24. Schupp PJ, Kohlert-Schupp C, Whitefield S, Engemann A, Rohde S, Hemscheidt T, Pezzuto JM, Kondratyuk TP, Park EJ, Marler L, Rostama B, Wright AD. 2009. Cancer chemopreventive and anticancer evaluation of extracts and fractions from marine macro- and micro-organisms collected from twilight zone waters around guam. *Nat Prod Commun* 4: 1717-1728.

(2011년 1월 24일 접수; 2011년 2월 18일 채택)