

Rhanella aquatilis 유래 당단백질의 면역세포에 미치는 영향

박혜지, 김광현*
동의대학교 생명응용학과

Received: July 11, 2014 / Revised: August 8, 2014 / Accepted: August 11, 2014

Effect on Immune Cells of Proteoglycan Originating from *Rhanella aquatilis*

Hae-Gi Park and Kwang-Hyeon Kim*

Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Republic of Korea

So as to evaluate its use as an immune stimulator in humans, the toxicity and action against immune cells by an anti-yeast substance (AYS), a bacterial proteoglycan, were investigated. The AYS did not possess hemolytic activity with human red blood cells (hRBC). Nor did it exhibit cytotoxicity against human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC). In addition, the AYS did not induce hPBMC proliferation, but it did agglutinate hPBMCs *in vitro*. Moreover, hPBMC induced inflammatory cytokines such as IL-6, IL-5, IFN- γ and TNF- α with the AYS during culture. Compared with alum, the AYS as an adjuvant has an increased antibody production rate against bovine serum albumin (BSA) in mice.

Keywords: *Rhanella aquatilis*, proteoglycan, leuko-agglutinin, inflammatory cytokine, antibody production

예방접종(vaccination)은 감염 균을 퇴치하는 가장 효과적인 방법 중에 하나다. 최근 재조합 단백질을 항원으로 한 백신의 사용이 증가함에 따라 안전하고 효과적인 면역보조제의 필요성이 증대되고 있으나, 지난 10년간 면역보조제에 관한 활발한 연구[2, 4, 6, 11]가 이루어졌음에도 불구하고 여전히 알루미늄염을 기초로 한 면역보조제에 상당 부분을 의지하고 있다. 알루미늄염은 주로 $Al(OH)_3$ 또는 $AlPO_4$ 형태로 사용되는데 일반적으로 단백질 항원을 흡착하여 천천히 방출함으로써 면역증강효과를 나타내는 것으로 생각되었다. 또한 최근에 알루미늄염이 수지상세포(dendritic cell)를 활성화시키고[7] interleukin(IL)-1 β 와 IL-18과 같은 사이토카인 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[13]. 한편 알루미늄염은 여러 백신에 널리 사용되고 있어 매우 안전한 것으로 생각되고 있지만 알려지 반응을 유발하고 신경독성도 있는 것으로 추정되고 있으며[12], 또한 항체가 매개된 체액성 면역반응은 강하게 유도하나 세포성 면역반응은 거의 유도하지 못한다는 단점이 있다[13]. 따라서 현재 유럽 및 미국에

서 승인을 받아 백신에 사용되고 있는 면역보조제로는 MF59, AS03, AS04 등이 개발되어 있다[9, 13].

일반적으로 뛰어난 면역자극 능력으로 세균에서 파생된 물질들이 보조제의 주요한 역할을 한다고 알려져 있으며[13], 특히 Gram (-) 세균의 세포벽 펩티드글리칸 또는 지질다당류는 그들 자신이 면역성은 강하지 않지만 공동 조절되는 항원에 대한 면역 반응을 강화시킨다. 이점에 착안하여 일종의 세균성 proteoglycan (anti-yeast substance; AYS)은 Gram (-)균인 *Rhanella aquatilis* AY2000 균이 생산하는 고분자 물질[10]로서 1) 정상세포에 대한 독성시험과 또한 2) *in vitro*에서 인체 PBMC (human peripheral blood mononuclear cells; hPBMC)에 대한 자극과 관련된 반응 및 3) *in vivo*에서 소의 혈청단백질(bovine serum albumin; BSA)에 대한 항체생성에 대한 AYS의 증강효과를 검토하였다.

우선 세포독성시험의 일환으로 인체 적혈구 세포(human red blood cell; hRBC)에 대한 AYS의 용혈성 시험을 Muller와 Bock가 기술한 방법[8]에 따라 행하였다. 즉, 건강한 지원자의 혈액(3 ml)을 취하고 미리 항응고제(Na_2 -EDTA; 3 mg)가 함유된 멸균 tube에 넣고 상온에서 잘 혼합하여 원심분리(1000 g, 5 min)를 행하였다. 그 후 혈장이 함유된 상층액은 제거하고, 적혈구가 함유된 침전물에 saline 함유인 산완충액(PBS: 3 ml)을 넣은 후 원심분리하여 적혈구를 3회

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-1533, Fax: +82-51-890-1532

E-mail: kimh@deu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

세척시켜서 사용하였다. 먼저 96-well microplate의 각 well에 PBS (100 μ l)를 넣은 후 알맞게 희석된 시료 AYS (100 μ l)를 첫 번째 well에 주입하고, 잘 혼합한 후 혼합액 (100 μ l)을 취하여 PBS (100 μ l)가 함유된 각 well에 주입하여 단계별로 희석(500 μ g/ml부터 2배씩 단계희석)하였다. 단계별로 희석된 각 well에 PBS (100 μ l)를 더 첨가한 후 상기에서 기술한 바와 같이 조제한 RBC (20 μ l)를 첨가하여 반응(37°C, 24 h)시키고, 96-well microplate를 원심분리(상온, 750 g, 3 min)한 후 상층액(100 μ l)을 취하여 EtOH/HCl (39/1) 혼합액 (2 ml)을 가하여 잘 섞은 후에 흡광도(398 nm)를 측정하였다. 이때 RBC에 대한 hemolysis의 백분율을 산출하기 위해 양성 대조군(Hemolysis 0%)은 RBC (20 μ l)에 PBS (200 μ l)를 혼합하고, 음성 대조군(Hemolysis 100%)은 RBC (20 μ l)에 증류수(200 μ l)를 혼합하여 시료와 동일한 방법으로 측정된 결과를 기준으로 산출하였다. 모든 실험은 2반복으로 행한 후 평균값으로 산출하였다. 그 결과 AYS를 500 μ g/ml 농도까지 처리하여도 hRBC는 전혀 용혈되지 않았다(Fig. 1).

또한 AYS에 대한 hPBMC의 반응은 Ciapetti 등이 기술한 MTT법[3]으로 측정하였다. 즉, 먼저 건강한 지원자의 정맥에서 혈액을 채혈하고, 미리 heparin으로 처리된 Acuspin tube에 옮긴 후 Ficoll-Hisopaque (Sigma)를 이용하여 hPBMC를 분리하였다. 이와는 별도로 AYS (20 μ g/ml)를 제조하고, 제조된 AYS는 96-well microplate의 첫 번째 well (100 μ l)에 넣고 RPMI 1640 배지로 2배씩 단계별로 희석하였다. 그 후 각 well에 분리한 hPBMC (1×10^5 cells/well)를 넣고, CO₂ incubator에서 배양 (37°C, 3-7 days)하면서 현미경으로 배양된 세포를 관찰(Magnification; 100)하였다. 이때 AYS의 hPBMC에 대한 응집활성은 hPBMC의 응집이 관찰되는 가장 낮은 AYS의 농도로 나타내었고, 대조 군으로 PHA (10 μ g/

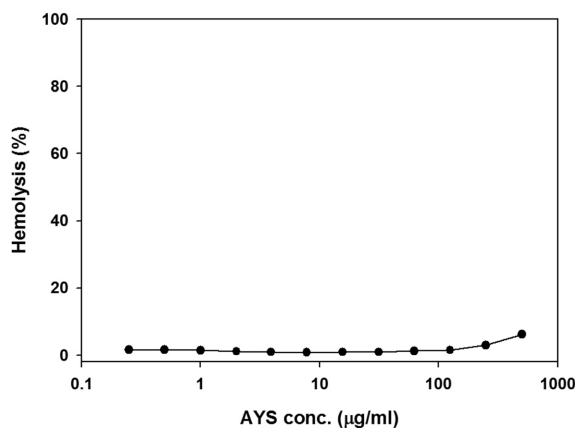


Fig. 1. Hemolysis of hRBC by the AYS. Positive control was expressed as hemolysis (0%) by hRBC (20 μ l) treated in PBS (200 μ l), and negative control was expressed as hemolysis (100%) by hRBC (20 μ l) treated in sterilized distilled water (200 μ l).

ml)가 사용되었다. 또한 hPBMC의 증식(proliferation)은 일정 시간 배양시킨 후 MTT 법[3]으로 세포 량을 측정하고, 다음 식에 의해 Stimulating Index (SI)로 나타내었다.

$$SI = (A_{540} \text{ of PBMC stimulated}) / (A_{540} \text{ of PBMC unstimulated})$$

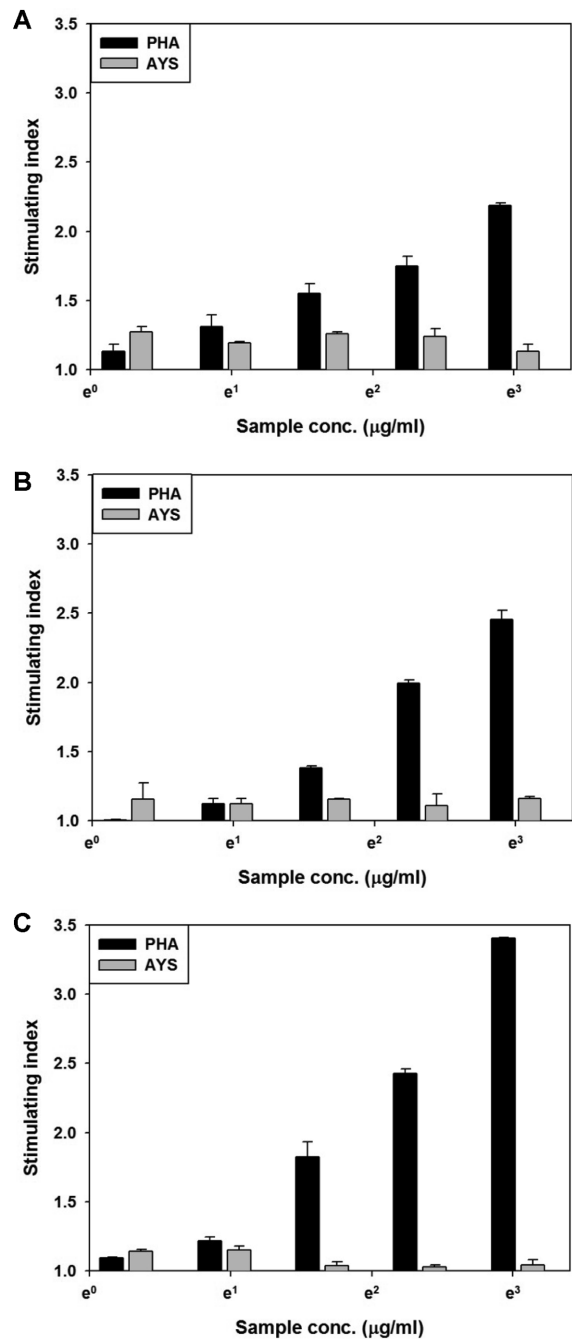


Fig. 2. Relative stimulating index of hPBMC by the AYS. Stimulating Index was expressed by A_{540} of stimulated cell/ A_{540} of unstimulated cell. Symbols: Proliferation of hPBMC treated with AYS for 3 days (A), 5 days (B) and 7 days (C).

그 결과 PHA가 10 µg/ml로 처리된 hPBMC는 배양 3일까지는 변화가 없었지만 배양 5일에는 1.77배, 배양 7일에는 2.05배까지 세포가 증식되었으나, AYS가 100 µg/ml 이하로 처리된 hPBMC의 경우에는 7일 동안 배양에서 세포증식이나 억제현상이 전혀 나타내지 않았다(Fig. 2). 한편 AYS의 hPBMC에 대한 응집활성을 측정한 결과는 3일과 5일 배양에서 SI = 10 µg/ml, 7일 배양에서 SI = 5 µg/ml을 나타내었고, PHA의 경우는 3일 배양에서 SI = 2.5 µg/ml, 5일과 7일 배양에서 SI = 1.25 µg/ml를 나타내었다(Table 1). 따라서 AYS는 hPBMC 증식에는 영향을 주지 않았지만, PHA는 hPBMC 증식을 유도하였다. 이는 AYS와 PHA는 hPBMC에 대한 응집효과는 동일하게 나타났지만, AYS는 hPBMC에 대한 증식효과가 없다는 점에서 차이가 있다.

또한 AYS (20 µg/ml)로 처리된 hPBMC의 배양액을 취하여 염증관련 cytokine의 양을 Bio-Plex system (Bio-red사)으로 측정하였다. 그 결과 IL-6는 AYS나 PHA를 처리한 hPBMC가 미처리 hPBMC에 비해 약 25배 정도로 많은 양을 분비하였고, IFN-γ도 AYS나 PHA의 미처리 hPBMC에 비해 각각 약 1.5배 정도로 많은 양을 분비시켰다. 또한 TNF-α는 PHA로 처리된 hPBMC는 미처리 hPBMC에 비해 약 32배 정도, AYS로 처리된 hPBMC는 미처리 hPBMC에 비해 약 3배 정도 많이 분비하였다. 한편 IL-5는 미처리 hPBMC에서는 거의 측정이 되지 않았으나, AYS 처리 hPBMC에서는 0.03 pg/ml, PHA 처리 hPBMC에서는 0.54 pg/ml로 다른 cytokine에 비해 극히 소량만이 분비되었다(Table 2).

Table 1. Agglutination activity of hPBMC treated with the AYS.

Incubation time (day)	Agglutination activity (µg/ml)	
	AYS	PHA
3	10.0	2.50
5	10.0	1.25
7	5.0	1.25

Agglutination of hPBMC treated with the AYS was observed under the microscope during culture at 37°C. The agglutination activity was expressed as the lowest concentration of the AYS.

Table 2. Inflammatory cytokine by hPBMC treated with the AYS.

Treatment	Cytokine (pg/ml)			
	IL-5	IL-6	IFN-γ	TNF-α
None	ND	265.60 ± 65.26	33.38 ± 7.02	1.30 ± 0.02
PHA	0.54 ± 0.06	6,912.60 ± 302.06	51.44 ± 8.44	32.09 ± 1.03
AYS	0.03 ± 0.03	6,701.00 ± 474.16	50.24 ± 10.03	3.20 ± 0.27

The inflammatory cytokine was measured after hPBMC was cultured in RPMI medium for 24 h at 37°C. The AYS and PHA was used 20 µg/ml, respectively.

일반적으로 IL-2, IFN-γ와 TNF-α 생성은 Th1 세포와 관련되어 있으며, IL-4, IL-5와 IL-6의 생성은 Th2 세포와 관련되어 있다고 알려져 있다[5]. 따라서 AYS는 hPBMC를 자극하여 염증관련 cytokine, 특히 IFN-γ의 증가는 세포성 면역에도 관련이 있음을 시사하고 있어, AYS는 체액성 면역에는 물론 alum의 문제점인 세포성 면역에도 작용할 가능성을 시사하고 있다.

생체 내에서 AYS가 항체생산을 유도하는 보조제로서 가능성을 확인하기 위해 BALB/c 생쥐에 항원 BSA과 AYS를 혼합하여 복강에 1차 주사하고, 10일 간격으로 BSA 만을 3회 더 주사한 후 생쥐의 혈액을 채취하여 생성된 항 BSA의 양을 간접-효소항체법(ELISA 법) [1]으로 측정하였다. 그 결과 보조제로 alum을 사용한 생쥐군 보다 AYS를 보조제로 사용한 생쥐군의 혈액에서 항 BSA 생성이 더욱 증가되었다(Fig. 3). 특히 AYS를 보조제로 사용한 생쥐에서 전체 IgG와 IgG1 및 IgG2b의 함량 모두가 alum을 보조제로 사용한 생

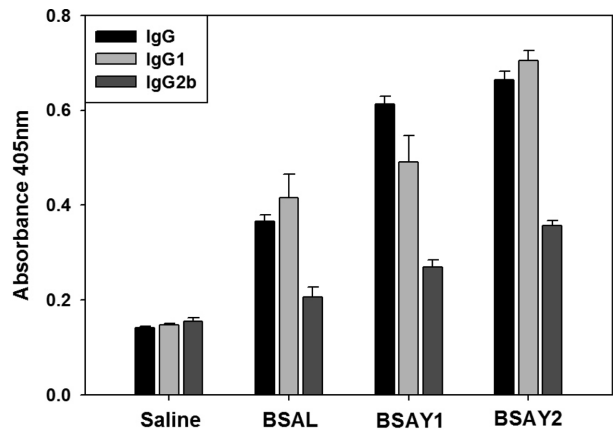


Fig. 3. Production of BSA-specific total IgG, IgG1 and IgG2b by the AYS. Groups of two male Balb/c mice were immunized with BSA (100 µg) dissolved in saline containing alum (200 µg) or AYS (100 or 200 µg). Sera were collected at 2 weeks after the last immunization. BSA-specific total IgG, IgG1 and IgG2b antibodies in the sera were measured by indirect ELISA as described in the text. The values are presented as mean ± S.E. (n = 5). Symbols: BSAL; BSA (100 µg) with Alum (200 µg), BSAY1; BSA (100 µg) with AYS (100 µg), BSAY2; BSA (100 µg) with AYS (200 µg).

쥐에 비해 훨씬 더 증가되었다 (Fig. 3).

결론적으로 AYS는 *in vitro*에서 적혈구나 백혈구에 세포 독성이나 세포증식을 나타내지 않았으나, 백혈구를 응집시켰으며 염증성 사이토카인 생산을 유도하였다. 또한 생쥐를 이용한 BSA에 대한 항체생산에서 보조제로 alum보다 AYS를 투여한 생쥐에 항 BSA의 양이 더욱 증가되었다.

요약

인체 면역증강제로 활용 가능성을 조사하기 위해 *R. aquatilis* AY2000 균이 생산하는 당단백질인 AYS의 면역세포에 대한 독성과 면역증강 효과를 조사하였다. 그 결과 AYS는 적혈구에 대한 용혈작용과 hPBMC에 대한 증식 또는 사멸효과는 나타내지 않았으나, 배양 중인 hPBMC를 응집시키는 효과를 나타내었다. 또한 AYS는 *in vitro*에서 hPBMC에 작용하여 염증성 cytokine인 IL-6, IFN- γ , TNF- α 와 IL-5 생성을 유도하였고, 생쥐에서 AYS는 alum에 비해 항-BSA의 생산력을 더욱 증가시켰다.

Acknowledgments

This work was supported by Dong-eui University Grant (2013AA081).

References

1. Alan J, Robin T. 1982. *Immunochemistry in practice*. pp. 257-260. 2nd Ed. Blackwell Scientific Publications, London.
2. Alexander BD, Erik BL, Ernesto OO. 2011. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol. Lett.* **203**: 97-105.
3. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. 1993. *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* **14**: 359-364.
4. Higgins D, Marshall JD, Traquinia P, Van Nest G, Livingston BD. 2007. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines* **6**: 747-759.
5. Khajuria A, Gupta A, Malik F, Singh S, Singh J, Gupta BD, et al. 2007. A new vaccine adjuvant (BOS 2000) a potent enhancer mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with HBsAg. *Vaccine* **25**: 4586-4594.
6. Lingnau K, Riedl K, von Gabain A. 2007. IC31 and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* **6**: 741-746.
7. Mbow ML, de Gregorio E, Ulmer JB. 2011. Alum's adjuvant action: grease is the word. *Nat. Med.* **17**: 415-416.
8. Muller BW, Bock T. 1994. A novel assay to determine the hemolytic activity of drug incorporated in colloidal carriers systems. *Pharm. Res.* **11**: 589-591.
9. O'Hagan DT, Ott GS, de Gregorio E, Seubert A. 2012. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* **30**: 4341.
10. Park HJ, Kang MJ, Lee JH, Kim KH. 2011. Action pattern of anti-yeast substance originated from *Rhanella aquatilis* strain AY2000. *Korean J. Microbiol.* **47**: 163-166.
11. Schijns VE, Lavelle EC. 2011. Trends in vaccine adjuvants. *Expert. Rev. Vaccines* **10**: 539.
12. Tomljenovic L, Shaw CA. 2012. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. *Lupus* **21**: 223-230.
13. Wang W, Singh M. 2011. Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *World J. Vaccines* **1**: 33-78.