

고순도 β -1.3/1.6-Glucan이 대식세포 및 자연살해세포와 T 세포면역계에 미치는 영향

권한을¹ · 이민희¹ · 박수정¹ · 이다솜¹ · 김혜숙² · 이정민¹

¹경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

²경희대학교 동서의학대학원 의과학과

Effect of High Purity β -1.3/1.6-Glucan on Macrophages, Natural Killer Cells, and T Cell-Mediated Factors

Hanol Kwon¹, Minhee Lee¹, Soo-Jeung Park¹, Dasom Lee¹, Hyesook Kim², and Jeongmin Lee¹

¹Department of Medical Nutrition and ²Department of Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT The present study investigated the immunomodulatory effects of high-purity β -1.3/1.6-glucan on macrophages, natural killer (NK) cells, and T cell-mediated factors. Effect of high-purity β -1.3/1.6-glucan on cytotoxicity in macrophages was investigated. Using macrophages, cytotoxicity of high-purity β -1.3/1.6-glucan was evaluated by MTT assay. We treated high-purity β -1.3/1.6-glucan at concentrations of 10, 50, 100, 150, 200, and 250 μ g/mL in macrophages. High-purity β -1.3/1.6-glucan did not affect macrophage viability. Phagocytic activity was assessed using zymosan. Activity of high-purity β -1.3/1.6-glucan on macrophages significantly increased as compared with zymosan. We treated high-purity β -1.3/1.6-glucan to murine NK cells co-incubated with YAC-1 cells. High-purity β -1.3/1.6-glucan resulted in significantly increased activity of NK cells as compared with the control. In addition, treatment of macrophages with high-purity β -1.3/1.6-glucan resulted in significantly increased activity of T cell-mediated cytokine (IL-2, IL-12, IFN- γ , and TNF- α) levels and CD4+/CD8+ T cells as compared with the control. In conclusion, high-purity β -1.3/1.6-glucan could enhance the immune response through activation of macrophages, NK cells, and T cell-mediated factors.

Key words: immunomodulatory, cytokine, primary culture, CD4+/CD8+

서 론

면역(immunity)이란 인체 내로 침입하는 미생물, 세균, 바이러스뿐만 아니라 체내 조직이나 불필요한 산물 등을 인식하여 제거하고 항상성을 유지하는 방어 체계이다. 이 방어 체계에는 선천면역(innate immunity)과 후천면역(adaptive immunity)으로 구분된다(1,2). 선천면역은 대식세포(macrophage), 자연살해세포(natural killer cell; NK cell) 등이 외부물질을 인식하여 탐식작용(phagocytosis) 및 제거 작용을 하게 되며 선천면역에 제거되지 못한 외부 물질은 antigen presenting cell(APC)에 의해 전달되어 후천성 면역 반응 활성화하게 된다. 활성화된 T cell, B cell에 의하여 면역글로불린(immunoglobulin) 생성 및 사이토카인(cytokine) 분비를 통하여 제거되지 못한 항원을 파괴한다(3,4).

선천면역 중 대식세포는 면역조절물질에 의해 자극, 활성화되어 IFN(interferon)- γ , TNF(tumor necrosis factor)-

α , nitric oxide(NO) 등을 분비하여 외부 항원을 제거하며, T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 하여 면역반응을 유도하고 B 임파구로 하여금 항체를 만드는 역할도 수행한다(5). 자연살해세포는 virus 및 종양세포에 결합하여 독성 과립들을 통과시켜 직접적인 제거능을 가지고 있다(6). 또한, 자연살해세포는 사이토카인에 의하여 활성화되며 활성화된 자연살해세포는 IFN- γ , TNF- α 등의 사이토카인을 분비하여 항원의 제거 및 또 다른 면역세포의 활성화에 기여한다(7). 후천면역 중 T 세포는 세포를 사멸시키는 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포로 나뉘게 된다. CD4+ T 세포는 Th1(T helper cell 1)과 Th2(T helper cell 2)가 존재하여 다른 기능을 나타내며, Th1 세포는 IL-2, IFN- γ 와 같은 Th1 사이토카인을 생성하여 대식세포를 자극하여 활성화시킨다. Th2 세포는 Th2 사이토카인을 생성하여 B 세포를 활성화시켜 면역글로불린의 생산을 증가하는 역할을 한다. 이때 Th1/Th2 type 사이토카인의 분비는 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지하게 된다(8-10).

면역반응이 상호 간의 불균형이 발생하면 질병이 유발되므로 인체 내에서 상호보완적인 조절에 의하여 유지되어야 건강을 유지할 수 있다. 그에 따라 면역조절 능력은 질병의

Received 28 June 2016; Accepted 16 August 2016

Corresponding author: Jeongmin Lee, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Korea
E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

예방 및 치료에 중요시되는 요인이 되며, 면역 조절제의 부작용 및 문제점이 제시되는바 최근에는 안전성이 보고된 천연물을 대상으로 하는 면역조절 효능 연구가 여러 방향으로 진행되고 있다(11). 이러한 천연물 중에 β -1.3-glucan은 고분자 다당류 물질로 미생물의 발효에 의해 생산되며, 화장품 보습제, 식품첨가제, 건강보조 식품 등으로 이용되고 있다. 최근 버섯류에 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며, 버섯의 종류에 따라 다양한 형태가 존재한다고 보고되었으며, 항암, 고혈압 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(12, 13). 그러나 미생물 균체의 세포벽에 함유된 경우 불순물도 많이 포함하고 있고, 또한 물에 불용성이기 때문에 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구에서는 *Aspergillus pullulans*를 이용하여 수용성의 고순도 β -glucan인 β -1.3/1.6-glucan 생산하여 대식세포 및 자연살해세포와 T 세포 면역계의 영향을 관찰하여 면역조절 효과에 대한 기능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 고순도 β -glucan은 선일바이오(주)(Jangheung, Korea)에서 *Aspergillus pullulans*를 이용하여 균주 배양 후 원심분리 하여 균체를 제거하고, 농축(불순물 제거)과 주정침지(β -glucan 회수) 하여 동결건조 한 수용성의 β -1.3/1.6-glucan을 제공받아 D.W를 용매로 하여 사용하였다.

β -1.3/1.6-Glucan 함량 및 ratio 분석

Total glucan의 함량은 β -glucan을 37% 염산과 섞어 45분간 반응시키고 증류수를 첨가하여 교반하였다. 그 후 100°C 항온수조에 2시간 반응시키고 실온에서 2 M KOH와 200 mM 초산완충액(pH 5.0)으로 불순물을 세척하며 섞어 주어 1,500×g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상층액에 exo-(1.3/1.4/1.6)- β -glucanase와 β -glucosidase 효소혼합액을 첨가한 후 교반하여 40°C 항온수조에서 60분간 반응시켜 glucose oxidase/peroxidase 혼합액을 넣어 흡광도 510 nm에서 측정하여 계산하였다.

β -1.3/1.6-Glucan 함량은 β -1.3/1.6-glucan에 2 M 수산화칼륨과 교반한 후 1.2 M 초산완충액(pH 3.8)을 첨가하여 Glucazme™을 넣어 냉온조에서 교반하여 항온수조에서 16시간 반응시켰다. 그 후 증류수를 첨가하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하고 glucose oxidase/peroxidase 혼합액을 넣어 40°C 항온수조에서 20분간 반응시켜 510 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

세포 배양

본 연구에서 사용된 YAC-1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받

았다. 10% fetal bovine serum(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mmol/L glutamine(HyClone Laboratories), 100 mg/L penicillin-streptomycin(HyClone Laboratories)을 첨가한 RPMI 1640(HyClone Laboratories)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건인 incubator에서 배양하였다.

대식세포 분리

대식세포의 분리를 위하여 희생 3일 전 Balb/c mouse에 2 mL의 thioglycollate medium을 복강에 주사하였다. 3일 후 마우스의 복강에서 serum free media를 주입 후 대식세포를 분리하였다.

자연살해세포 분리

자연살해세포의 분리를 위해 마우스에서 분리한 비장을 10% fetal bovine serum(FBS), 2 mmol/L glutamine, 100 mg/L penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640으로 세척하고 0.45 μ m cell strainer를 사용하여 세포 부유액을 만들었다. Red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 만든 비장 세포 부유액을 mouse NK cell enrichment kit(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, Canada)을 사용하여 자연살해세포를 분리하였다.

Cell viability 측정

분리한 대식세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM(HyClone Laboratories) 배지에 분주하여 안정화시킨 후, 고순도 β -1.3/1.6-glucan을 10, 50, 100, 150, 200, 250 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 3-(4,5-Methyl-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 20 μ L 처리하여 3~4시간 37°C에 배양하였다. 배지와 MTT 시약을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 시약 200 μ L를 가하여 560 nm에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

복강대식세포 활성 측정

분리한 대식세포를 96 well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 DMEM 배양액에 분주하여 안정화시킨 후 Cytoselect 96-well phagocytosis assay kit(Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 대식세포의 탐식능을 측정하였다. 대식세포의 활성화를 위하여 kit에 포함된 zymosan 입자를 사용하여 고순도 β -1.3/1.6-glucan을 10, 75, 150, 250 μ g/mL의 농도별로 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

YAC-1에 대한 자연살해세포 활성 측정

분리한 자연살해세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/

well의 농도로 RPMI-1640 배양액에 분주하여 effector 세포로 이용하였다. YAC-1 세포는 target 세포로 이용하였으며, effector 세포와 5:1로 co-culture 하여 고순도 β -1.3/1.6-glucan을 10, 75, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별로 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양하여 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)를 cytotox 96 non radioactive cytotoxicity assay kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정하여 계산하고 YAC-1 세포의 사멸 정도를 NK cell activity(%)로 나타내었다.

T cell mediated 사이토카인 분비량 측정

분리한 대식세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 DMEM 배양액에 분주하여 안정화시킨 후 고순도 β -1.3/1.6-glucan을 10, 75, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별로 처리하였다. 배양한 후 생성된 IL-2, TNF- α , IL-12, IFN- γ 양을 Douset Sandwich ELISA mouse kit(R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)을 이용하여 측정하였다.

Flow cytometry CD4+/CD8+ 측정

분리한 splenocyte를 24 well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 RPMI-1640 배양액에 분주하여 고순도 β -1.3/1.6-glucan, PC 비교 대조군을 10, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 CD4+, CD8+ (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) Flow cytometry용 anti-body를 세포수에 맞추어 처리한 후 ice 상태에서 30분간 shaking 한 후 CytoFLEX(Beckman Coulter Inc., South Kraemer Boulevard, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 시행하였으며 얻어진 결과는 SPSS 22.0 software(IBM, cambridge, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군 간 평균 차이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

β -1.3/1.6-Glucan 함량 및 ratio

β -1.3/1.6-Glucan 함량을 측정한 결과 73.926 ± 0.48 mg/g으로 나왔다. 이는 순도 $73.926 \pm 0.48\%$ 로 나타낼 수 있으며, 현재 시판되어 사용되는 β -glucan의 순도가 약 50~60% 내외임을 고려할 때 고순도임을 확인할 수 있었다. 이로 인하여 β -glucan 생성 시 미생물 균체의 세포벽에 함유된 경우 불순물이 많이 포함되어 순도의 저하가 발생하는

문제점을 보완하여 불순물의 함량을 낮추어 β -glucan의 순도를 높이고, 또한 물에 불용성인 문제점을 보완하여 수용성의 β -glucan을 생산하여 함량별 효능이 상대적으로 우수할 것이라 예상된다(data not shown). 또한, β -1.3/1.6-glucan의 ratio를 측정한 결과 94.94%로 나왔다. 이는 현재 시판되어 사용되는 β -1.3/1.6-glucan의 ratio가 70~80% 내외임을 고려할 때 β -1.3/1.6-glucan의 ratio가 약 10% 이상 상회하는 우의를 보임으로써 생리활성 효능이 상대적으로 우수할 것이라 예상된다(data not shown).

고순도 β -1.3/1.6-glucan의 세포독성

고순도 β -1.3/1.6-glucan의 적정농도를 결정하기 위해 primary culture 한 대식세포에 10~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 처리한 후 세포의 생존율을 측정하였다. 실험 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $90.13 \pm 1.53\%$ 의 생존율을 보여 유의적으로 감소하였으나 이전 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도와 이후 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 다시 증가하여 유의적으로 control군과 차이가 없었으므로 실험적인 오차로 인하여 유의적인 차이를 보인 것으로 예상되며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 독성이 없으므로 판단할 수 있다. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $90.33 \pm 3.51\%$ 의 생존율을 보여 유의적으로 감소하였으나 90~100% 이상의 세포생존율을 보여 고순도 β -1.3/1.6-glucan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도까지 실험농도로 설정하였지만, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포생존율이 유의적으로 감소하는 것에 대하여 세포독성으로 인하여 감소한 것이라는 생각을 배제하지 않고 고순도 β -1.3/1.6-glucan 10~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 설정하여 실험을 진행하였다.

대식세포의 활성능 측정

대식세포는 면역반응 세포 중 하나로 혈액, 비장, 간, 임파선 등에 널리 분포되어 있으며, 체내의 조직에 대부분 존재하여 외부 항원을 직접 탐식하여 분해, 사멸, 제거하는 phag-

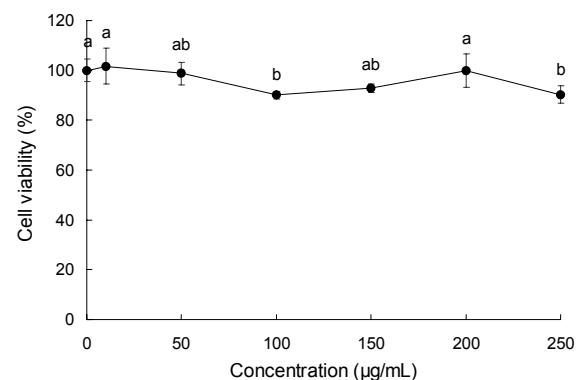


Fig. 1. Cell viability of primary cultured macrophage, determined by MTT reagent, with treatment of high purity β -1.3/1.6-glucan at various concentrations. All data are expressed as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

ocytosis 기능을 가짐으로 면역반응에 매우 중요한 역할을 담당하는 세포이다(14,15). 또한, T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 하여 면역반응을 유도하고 B 임파구로 하여금 항체를 만드는 중요한 역할도 수행하는 세포이다(5). 본 연구에서는 대식세포를 활성화시키는 zymosan과 함께 고순도 β-1.3/1.6-glucan의 처리가 대식세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

대식세포를 활성화시켜 탐식작용을 자극하는 zymosan을 처리한 군에서의 탐식작용 활성을 100%로 비교하였을 때 정상군의 25.33±4.08%보다 유의적으로 증가한 것으로 보아 zymosan이 정상적으로 작용하여 대식세포를 활성화시켰음을 확인하였다. 고순도 β-1.3/1.6-glucan 75, 150 µg/mL 농도에서는 각 115.04±7.06%, 108.17±3.67%로 zymosan만 처리한 군에 비해 유의적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 반면 10 µg/mL 농도와 250 µg/mL 농도에서는 zymosan만 처리한 군과 유의적으로 차이가 없었다(Fig. 2). 250 µg/mL의 농도에서 유의적으로 감소하는 것에 대해 첫째는 과 activation으로 인하여 세포활성이 감소하는 측면과 두 번째는 250 µg/mL의 농도에서 세포생존율의 감소로 인하여 활성이 유의적으로 감소하였을 것이라 예상하였다. 그러나 고순도 β-1.3/1.6-glucan 75, 150 µg/mL 농도에서 대식세포의 활성을 증가시키므로 선천면역계에 영향을 줄 것이라 예상되며 그로 인하여 면역계에 여러 방향으로 추가적인 효능이 나타날 것으로 사료된다.

YAC-1에 대한 자연살해세포 활성 측정

자연살해세포는 과거에 항원을 인식한 적이 없는 상태에서도 활성화되어 반응하기 때문에 선천면역에서 virus에 감염된 세포, 종양세포, 또는 비정상적인 세포를 인지하여 사멸시키는 역할을 하며 IL-2, IL-12, IL-15 등의 대식세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 자극되어 활성화되며 IFN-

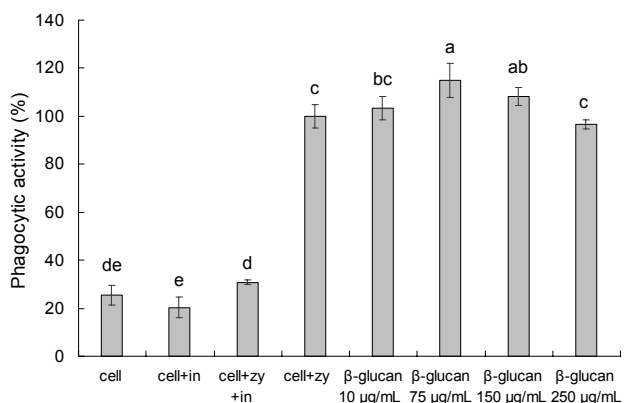


Fig. 2. Effect of high purity β-1.3/1.6-glucan on phagocytic activity in peritoneal macrophage. Cell, cell only; cell+in, cell+zymosan inhibitor; cell+zy+in, cell+zymosan+zymosan inhibitor; cell+zy; cell+zymosan. All data are expressed as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at *P*<0.05.

γ 등의 분비를 증가시킨다(16-18). 또한, 자연살해세포는 MHC class I 발현의 변화를 인식하여 감염되지 않는 정상 세포에 공격을 막음으로 감염된 세포와 결합하여 선택적으로 세포사멸을 유도시킨다(19,20). 자연살해세포가 제거할 수 있는 대상은 다양하게 알려졌지만 자연살해세포의 활성화에 이용되고 있는 세포는 mouse의 경우 Moloney virus-induced lymphoma 세포주인 YAC-1 세포가 가장 널리 알려져 있다(21). 본 연구에서는 Moloney virus-induced lymphoma 세포주인 YAC-1 세포를 target cell로, 자연살해세포를 effector cell로 설정하고 co-culture 하여 고순도 β-1.3/1.6-glucan의 처리가 자연살해세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

고순도 β-1.3/1.6-glucan을 처리하지 않은 control군에서는 자연살해세포에 대한 YAC-1 세포의 사멸 정도가 10.00±0.50%였다. 반면 고순도 β-1.3/1.6-glucan을 처리한 군들은 control군과 비교하여 모두 유의적으로 높아졌음을 확인하였다. 고순도 β-1.3/1.6-glucan 10, 75, 150, 250 µg/mL의 농도 각각 46.21±5.00%, 60.00±5.06%, 95.46±3.94%, 72.27±0.91%의 활성을 보였다(Fig. 3). 250 µg/mL의 농도에서 감소하는 것에 대해 첫째는 과 activation으로 인하여 세포활성이 감소하는 측면과 두 번째는 250 µg/mL의 농도에서 세포생존율의 감소로 인하여 활성이 감소하였을 것이라 예상하였다. 그러나 고순도 β-1.3/1.6-glucan은 10, 75, 150 µg/mL의 농도에서 자연살해세포 활성을 도움으로써 virus에 감염된 세포, 종양세포, 비정상적인 세포의 제거하는 역할에 기여할 것이라 예상된다.

T cell mediated 사이토카인분비량 측정

사이토카인에는 interleukin(IL), interferon(IFN), tumor necrosis factor(TNF) 등이 있는데, 면역반응에 관여하는 대식세포와 자연살해세포, Helper T-cell과 같은 면역세포들로부터 생성되며 자체활성이나 또 다른 면역세포들

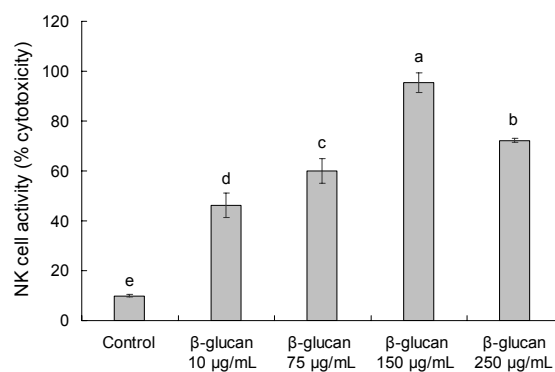


Fig. 3. Effect of high purity β-1.3/1.6-glucan on natural killer cell cytotoxicity against Yac-1 cell in primary splenocyte. Effector cell (natural killer cell) : Target cell (YAC-1 cell)=5:1. All data are expressed as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at *P*<0.05.

의 성장, 분화에 관여 또는 표적세포의 사멸을 유도하여 면역반응을 조절하는 중요한 활성화 인자이다(22,23). 이중 대표적인 사이토카인은 TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-12이며, 특히 대식세포와 자연살해세포, helper T cell 등의 면역세포를 활성화시켜 선천면역뿐 아니라 적응면역계에도 영향을 미친다(24,25). 본 연구에서는 고순도 β -1.3/1.6-glucan의 처리가 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 확인하였다.

TNF- α 의 분비량 측정 결과 Fig. 4A에서 나타난 바와 같이 control군 57.56 ± 3.12 pg/mL에 비하여 10, 75, 150, 250 μ g/mL 농도 모두에서 각각 148.22 ± 8.51 pg/mL, 181.56 ± 8.51 pg/mL, 207.11 ± 1.34 pg/mL, 200.39 ± 10.31 pg/mL로 유의적으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. IL-2의 분비량 측정 결과 Fig. 4B에서 나타난 바와 같이 control군 16.20 ± 0.44 pg/mL보다 10, 75, 150, 250 μ g/mL 농도 모두에서 각각 51.37 ± 3.00 pg/mL, 63.14 ± 3.00 pg/mL, 66.28 ± 0.47 pg/mL, 65.86 ± 3.44 pg/mL로 유의적으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. IL-12의 분비량 측정 결과 Fig. 4C에서 나타난 바와 같이 control군 34.26 ± 1.44 pg/mL보다 10, 75, 150, 250 μ g/mL 농도 모두에서 각각 76.10 ± 3.92 pg/mL, 91.48 ± 3.93 pg/mL, 103.28 ± 0.62 pg/mL, 100.18 ± 4.76 pg/mL로 유의적으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. IFN- γ 의 분비량 측정 결과 Fig. 4D에서 나타난 바와 같이 control군 5.79 ± 0.43 pg/mL보다

10, 75, 150, 250 μ g/mL 농도 모두에서 각각 11.49 ± 0.66 pg/mL, 14.08 ± 0.66 pg/mL, 14.78 ± 0.10 pg/mL, 14.68 ± 0.76 pg/mL로 유의적으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. 그러므로 고순도 β -1.3/1.6-glucan은 여러 사이토카인의 분비 증가를 유도함으로써 여러 면역세포의 활성화, 특히 대식세포와 자연살해세포 및 T 세포를 조절하여 선천면역 및 후천면역계에 영향을 미칠 것이라고 예상된다.

CD4+/CD8+ T 세포 발현에 미치는 영향

후천면역 중 T 세포는 세포를 사멸시키는 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포로 나뉘게 된다. CD4+ T 세포는 Th1과 Th2가 존재하여 다른 기능을 나타내며, Th1 세포는 IL-2, IFN- γ 와 같은 Th1 사이토카인을 생성하여 대식세포를 자극하여 활성화시킨다. Th2 세포는 Th2 사이토카인을 생성하여 B 세포를 활성화시켜 면역글로불린의 생산을 증가시키는 역할을 한다. 이때 Th1/Th2 type 사이토카인의 분비는 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지하게 된다(8-10). T 세포 중 CD4+는 T helper 세포로 불리며 APCs (antigen presenting cells)에 속하는 대식세포, 수지상세포들의 활성화를 조절하고, 특히 B 세포의 활성화를 도와 항체 생성에 영향을 주는 역할을 한다(26). 또 다른 CD8+ T 세포는 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)로 자연살해세포와 함께 virus에 감염된 세포나 종양세포, 비정상적인 세포를 직접 공격하여 파괴하는 세포이다(27).

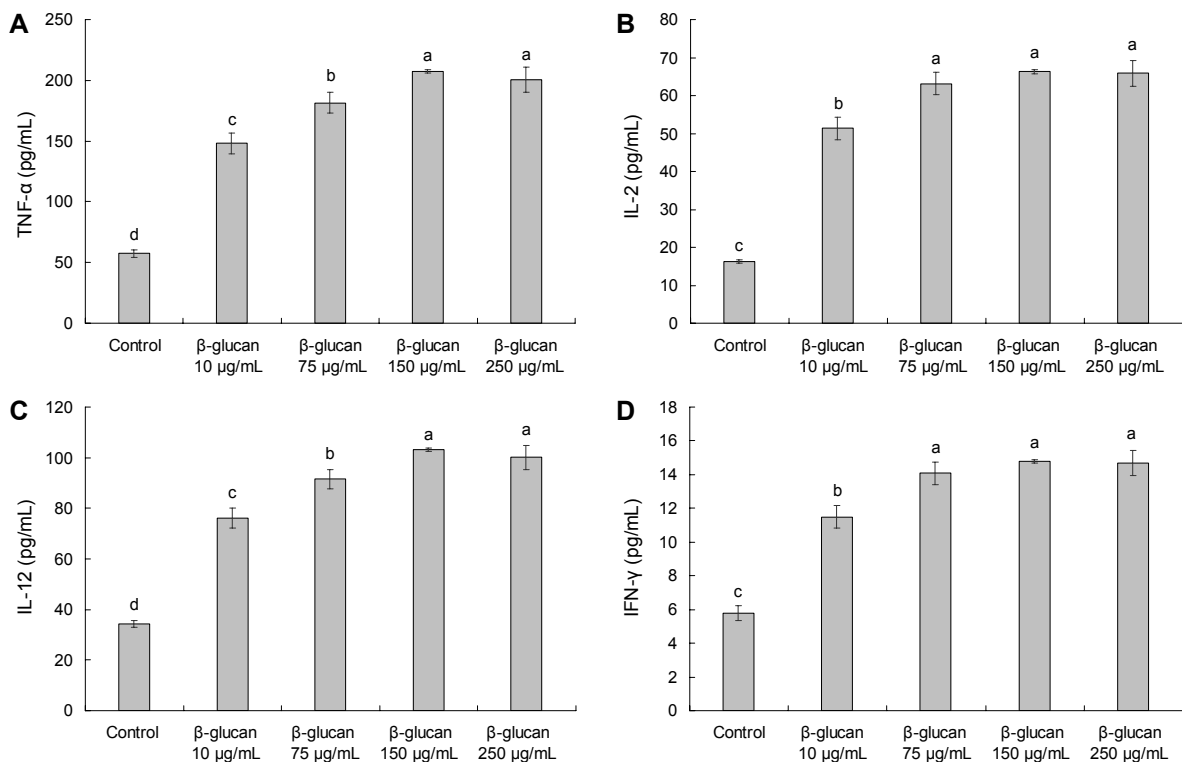


Fig. 4. Effect of high purity β -1.3/1.6-glucan on T cell mediated cytokine secretion in peritoneal macrophage. (A) TNF- α , (B) IL-2, (C) IL-12, (D) IFN- γ . All data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

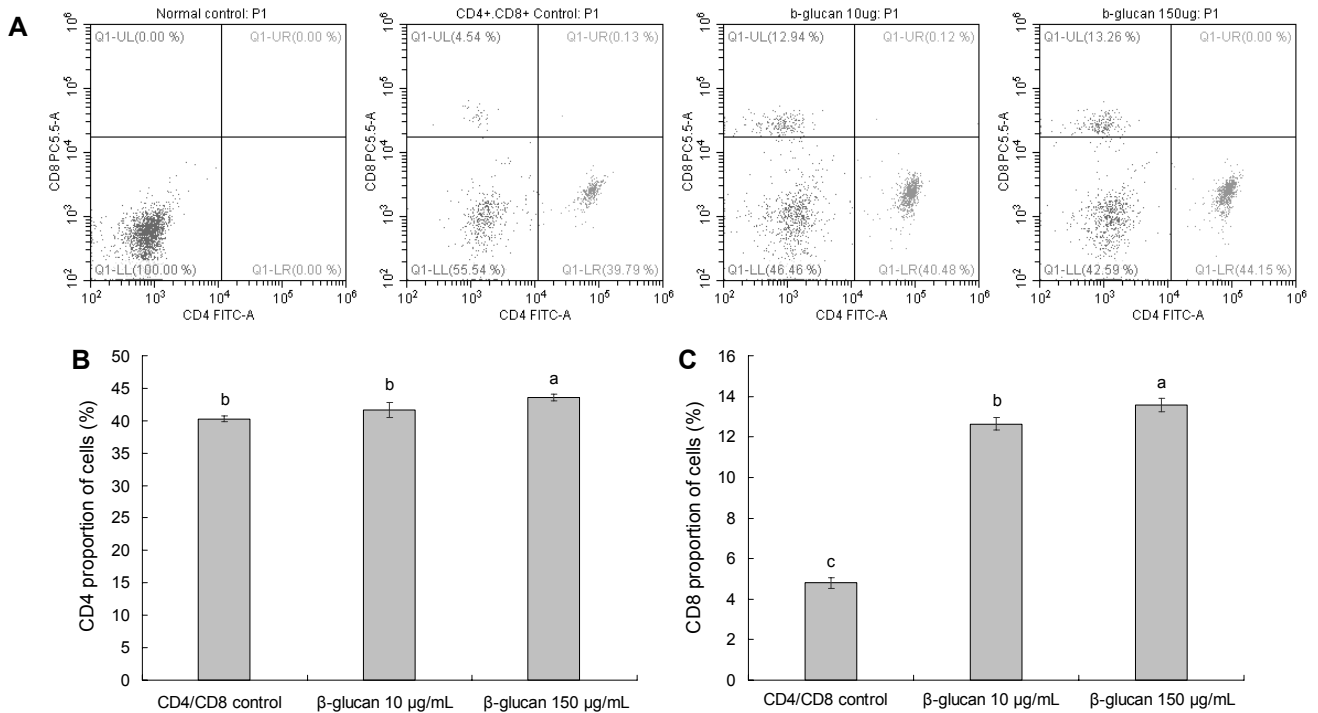


Fig. 5. Effect of high purity β-1.3/1.6-glucan on the proportion of CD4+ and CD8+ T cells in splenocyte. All data are expressed as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 세포 비율을 관찰하고자 실험을 진행하였다. 위의 실험들에서 250 μg/mL의 농도에서 유의적으로 세포를 감소하는 것에 대해 첫째는 과 activation으로 인하여 세포활성이 감소하는 측면과 두 번째는 250 μg/mL의 농도에서 세포생존율의 감소로 인하여 활성이 유의적으로 감소하였을 것이라 예상하였던 바 250 μg/mL의 농도를 제외하였으며, 효능이 가장 낮은 10 μg/mL의 농도와 효능이 가장 높은 150 μg/mL의 농도를 선택하여 실험한 결과 Fig. 5와 같다. CD4+ T 세포의 경우 control군에서 CD4+ T 세포는 40.29±0.50%였으나 고순도 β-1.3/1.6-glucan을 10 μg/mL 농도로 처리한 군에서는 41.62±1.14%로 유의적인 차이가 없었으나 150 μg/mL 농도로 처리한 군에서는 43.63±0.53%로 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. CD8+ T 세포의 경우 control군에서 CD8+ T 세포는 4.80±0.26%였으나 고순도 β-1.3/1.6-glucan을 처리한 군들은 10 μg/mL, 150 μg/mL 농도로 각각 12.64±0.30%, 13.59±0.33%로 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다.

본 연구에서는 고순도 β-1.3/1.6-glucan이 면역관련 세포의 활성, 특히 선천면역계에 중요한 대식세포와 자연살해세포의 활성능을 측정하여 확인한 결과 선천면역계 면역세포의 활성에 도움을 주는 것을 확인하였다. 이러한 세포의 활성능의 증가로 인하여 병원균이나 virus에 감염된 숙주를 초기에 제거함으로써 면역계를 조절하는 데 도움을 줄 것으로 생각한다. 또한, 적응면역계에 중요한 역할을 하게 되는

T 세포면역계의 영향을 주는 사이토카인의 분비 및 CD4+ / CD8+ T 세포를 측정된 결과 사이토카인과 CD4+ / CD8+ T 세포를 조절함으로써 더 나아가 B 세포면역계에 영향을 미쳐 항체의 생성에 도움을 주어 병원균이나 virus에 감염된 숙주를 제거하고 추후 감염에도 빠른 면역계 항상성 유지에 큰 도움을 줄 것으로 생각한다. 따라서 추후 면역 조절제로서 기능성 식품의 상업화에 기초 자료가 되어 국내 기능성 소재로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다

요 약

본 연구에서는 고순도 β-1.3/1.6-glucan이 선천면역계에 중요한 역할을 하는 대식세포와 자연살해세포의 활성화와 적응면역계에서 중요한 역할을 하는 T 세포 면역계에 대한 면역조절 효과를 살펴보고자 대식세포의 활성능, 자연살해세포의 활성능, 그리고 T 세포 면역계에 조절작용을 하는 사이토카인, CD4+ / CD8+ T 세포에 미치는 영향을 관찰하였다. 마우스 복강에서 불리한 대식세포를 이용하여 세포독성을 확인한 결과 고순도 β-1.3/1.6-glucan 10~200 μg/mL의 농도에서 독성이 나타나지 않았다. 또한, 고순도 β-1.3/1.6-glucan은 대식세포의 활성능, 자연살해세포의 활성능에 도움을 주어 활성능을 증가시켜 외부로부터 침입한 미생물, 감염된 세포나 종양세포 등을 효과적으로 제거할 수 있을 것이라 예상할 수 있었다. 마지막으로 T 세포 면역계에 조절작용을 하는 사이토카인과 CD4+ / CD8+ 를 확인

한 결과 고순도 β -1.3/1.6-glucan이 사이토카인들의 분비량 및 CD4+/CD8+를 증가시켜 T 세포 면역계에 조절뿐 아니라 B 세포 면역계의 조절에 도움을 줄 것이라 예상할 수 있었다. 결론적으로 고순도 β -1.3/1.6-glucan은 선천면역뿐 아니라 적응면역에서 영향을 미칠 것이라 생각하며 면역조절에 긍정적인 변화를 보였으므로 추후 면역 조절제로서 기능성 식품의 상업화에 기초 자료가 되어 국내 기능성 소재로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 산업통상 자원부 지역 주력산업 육성사업으로 연구비지원(KIAT, R0004118)으로 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Willoughby DA. 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298.
- Greenberg S, Grinstein S. 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 136-145.
- Son EH, Yoon YH, Pyo SN. 1999. Immunomodulating activity of alginate. *J Appl Pharmacol* 7: 377-384.
- Nathan CF, Hibbs Jr JB. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70.
- Cerwenka A, Lanier LL. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1: 41-49.
- James GL. 1995. *Methods in immunotoxicology*. Wiley-Liss, Inc., Hoboken, NJ, USA. Vol 2, p 15.
- Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann H, von Boehmer H. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335: 229-233.
- Shedlock DJ, Shen H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337-339.
- Powrie F, Coffman RL. 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 270-274.
- Tong H, Song X, Sun X, Sun G, Du F. 2011. Immunomodulatory and antitumor activities of grape seed proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 21: 11543-11547.
- Baba T, Ogawa T, Okahashi N, Yakushiji T, Koga T, Morimoto M, Hamada S. 1986. Purification and characterisation of the extracellular D-glucosyltransferase from serotype c *Streptococcus mutans*. *Carbohydr Res* 158: 147-155.
- Manzi P, Pizzoferrato L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem* 68: 315-318.
- Ghosh DK, Stuehr DJ. 1995. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 34: 801-807.
- Chen J, Tsang LL, Ho LS, Rowlands DK, Gao JY, Ng CP, Chung YW, Chan HC. 2004. Modulation of human enteric epithelial barrier and ion transport function by Peyer's patch lymphocytes. *World J Gastroenterol* 10: 1594-1599.
- Pedersen BK, Ullum H. 1994. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 26: 140-146.
- Whiteside TL, Herberman RB. 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7: 704-710.
- Yoshikai Y, Nishimura H. 2000. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2: 381-389.
- Lanier LL. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16: 359-393.
- Chattopadhyay SK, Sengupta DN, Fredrickson TN, Morse HC 3rd, Hartley JW. 1991. Characteristics and contributions of defective, ecotropic, and mink cell focus-inducing viruses involved in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *J Virol* 65: 4232-4241.
- Wright SC, Bonavida B. 1983. YAC-1 variant clones selected for resistance to natural killer cytotoxic factors are also resistant to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1688-1692.
- Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. 2012. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91: 299-309.
- Biswas P, Poli G, Kinter AL, Justement JS, Stanley SK, Maury WJ, Bressler P, Orenstein JM, Fauci AS. 1992. Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J Exp Med* 176: 739-750.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2001. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 311: 44-49.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
- Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4 (+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196: 851-857.
- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10: 29-37.