

분자량에 따른 Chitosan의 *in vitro* 대식세포 활성화

장현주·전향숙*·이서래

이화여자대학교 식품영양학과, *한국식품개발연구원 생물공학연구본부

Macrophage Activation of Chitosan Hydrolysates with Different Molecular Weights *in vitro*

Hyun-Joo Chang, Hyang-Sook Chun* and Su-Rae Lee

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University,

*Food Chemistry and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute

Abstract

This study was performed to investigate the average molecular weight range of chitosan hydrolysates showing maximum effect in macrophage activation. Nitrite production by continuous macrophage cell line J774A.1 was the highest at 10 µg/ml concentration of intact chitosan. Hydrogen peroxide production by J774A.1 showed the high value of 894 µM/mg macrophage protein at 1,000 µg/ml concentration of chitosan hydrolysate fraction 5 and 1,044 µM/mg macrophage protein at 100 µg/ml concentration of the fraction 6. Chitosan hydrolysate fraction 4, fraction 6 and intact chitosan enhanced IL-1 α production, while the others did not. The production of tumor necrosis factor showed the high value at 1,000 µg/ml concentration of chitosan hydrolysate fraction 4, 100 µg/ml concentration of the fraction 5 and fraction 6, and 10 µg/ml concentration of intact chitosan. In conclusion, fractions 4, 5 and 6 of the chitosan hydrolysates with average molecular weight of 24,000~64,000 calculated by HPLC analysis are the most effective in macrophage activation tested in this study.

Key words : chitosan hydrolysate, different molecular weight, macrophage activation

서 론

갑각류 외피에 주로 존재하는 질소함유 다당 chitin의 유도체인 chitosan은 최근 생리 기능을 조절하는 3차 기능을 가진 식품 성분으로 분류되는 새로운 생물자원이다^[1]. 특히 chitin, chitosan 및 그들의 oligosaccharides가 항암 활성을 지닌다는 몇몇의 보고와 함께 그 기전에 대해서 대부분의 연구자들이 *in vivo* 실험을 통해 발암 작용의 촉진 및 전이 단계에 활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있으나 아직 정확한 기전이 알려지지 않고 있다^[2~5]. 본 연구자는 chitosan 및 그 oligosaccharides가 지니는 항암 활성 기전을 알아보기 위해 먼저 암발생 초기 단계와 관련성이 큰 유전자 돌연변이를 억제하는 효과를 실험하여 보고한 바 있

다^[6,7]. Chitosan의 항암 활성은 기존의 항암 활성을 지니는 다른 다당류에서와 같이 숙주 매개 면역 반응에 관여하여 종양에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜줌으로써 효과를 발휘하는 것으로 예상된다. 이러한 사실은 chitin, chitosan 및 그들의 oligosaccharides가 immuno-adjuvant로서 항균, 항종양 활성을 나타내거나, cytotoxic T-lymphocyte, macrophage, natural killer cell과 같은 tumoricidal immunocytes를 활성화시킨다는 연구들이 잘 뒷받침해주고 있다^[8~13].

Chitosan은 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucosamine의 중합체로서 분자량은 금원에 따라 수십만에서 수백만에 이르며, $\beta(1\rightarrow4)$ 결합을 하고 있기 때문에 점도가 높고 물에 녹지 않는 성질을 지니고 있어서 이용하는데 제한성이 있다. 그런 이유로 해서 생리활성에 대한 연구들은 대부분 중합도 5~10 정도의 chitin 및 chitosan oligosaccharides에 대해서만 보고하고 있으나 전 분자량 영역을 대상으로 chitosan의 분자량에 따른 생리활성을 비교해본 연구 보고는 거의 없는 실정

Corresponding author : Hyang-Sook Chun, Food Chemistry and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

이다.

본 연구에서 사용한 대식세포는 골수에서 생산되는 면역세포로서 거의 모든 단계의 면역반응에 관여하고, 활성화된 대식세포는 nitric oxide, hydrogen peroxide, cytokines, cytolytic protease 등을 분비하여 항균(anti-microbe) 및 항종양(anti-tumor) 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으므로^(14,15) 면역 증진 활성, 특히 항암 활성과 관련된 면역 증진능을 살펴보는 것은 큰 의미가 있을 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 대식세포 활성 증진능과 chitosan의 분자량과의 관계를 알아보고자 저분자에서 고분자에 이르는 다양한 분자량 범위의 chitosan 가수분해물을 제조하여 어떠한 분자량 분획이 대식세포 활성 증진에 효과적인지를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

여섯 가지 분획의 chitosan 가수분해물은 산가수분해법 및 한외여과법에 의해 전보⁽⁷⁾와 같이 제조되었다. Chitosan 가수분해물과 oligosaccharide인 chitohexaose는 phosphate buffered saline (pH 7.2)에, intact chitosan은 0.5% acetic acid에 용해시키고 0.2 μm filter로 제균한 후 각각 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 조정하여 사용하였다. [3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), scopolletin, horseradish peroxidase, *E. coli* lipopolysaccharide, phorbol myristic acetate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

대식세포 배양

사용된 세포주는 J774A.1 (monocyte ; macrophage, mouse)로서 한국 세포주 은행(KCLB, 서울)으로부터 분양받아 사용하였다. J774A.1 (2×10^5 cells/ml)을 10% heat-inactivated fetal calf serum과 10,000 U/ml의 streptomycin/penicillin이 함유된 DMEM이 담긴 96-well에 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 humidified 5% CO₂ incubator에서 37°C에서 48시간 동안 배양하여 실험에 이용하였다.

분자량 측정

제조된 6가지 분획의 chitosan 가수분해물의 평균분자량을 측정하기 위해 HPLC를 이용하여 분석하였고 Millennium 2101을 이용하여 분자량과 그 분산도를 계

산하였다. 이 때 분자량의 marker로는 pullulan (standards: 0.58×10^4 , 1.22×10^4 , 2.37×10^4 , 4.8×10^4 , 1.0×10^5 , 1.86×10^5 , 3.8×10^5 , 8.53×10^5)을 사용하였으며 분석 조건은 다음과 같다. Column, Ultrahydrogel 250, 500, 1000(Waters Co., USA); eluent, 0.1 M acetic acid/0.1 M NaCl; flow rate 1.0 ml/min.

Nitrite 분비능

J774A.1(2×10^5 cells/ml)의 배양액 중의 nitrite 분비활성을 microplate assay⁽¹⁴⁾를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 세포를 배양한 후, 상동액 50 μl를 취하여 같은 용량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H₂PO₄)을 넣고, 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 때 nitrite 분비능을 나타내는 발색정도는 ELISA reader(Molecular Device, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며, J774A.1의 생존율에 미치는 시료의 영향을 알아보고자 MTT assay⁽¹⁶⁾를 하였다.

Hydrogen peroxide 분비능

Hydrogen peroxide 분비 정도는 microplate fluorometer(Fluoroskan Ascent, Life Sciences International Co.)를 이용하여 측정하였다⁽¹⁷⁾. 즉, J774A.1 (2×10^5 cells/ml) 및 시료를 96-well plate에 넣어 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 원심분리하고 37°C의 0.9% NaCl 용액으로 세포를 여러 차례 세척하였다. 30 μM scopolletin, 1 mM NaN₃, 1 purpargallin-unit/m의 horseradish peroxidase, 100 ng/ml의 phorbol myristic acetate를 함유한 반응액을 각 well당 100 μl씩 첨가하였다. 그 다음 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 형광의 감소도를 측정하여 반응성 산소종 생성능을 계산하였다. 각 well에 assay 초기에 부착된 cell protein은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 등의 방법으로 측정하였다⁽¹⁸⁾.

Interleukin-1α 및 tumor necrosis factor 분비능

반응성 질소종 분비능 측정시와 동일한 절차로 J774A.1과 시료를 96-well plate에 넣어 48시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 배양한 후 상정액을 취해 대식세포가 분비하는 interleukin-1α (IL-1α)과 tumor necrosis factor (TNF)의 농도는 ELISA kit (Genzyme, Cambridge, USA)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Chitosan 가수분해물의 분자량 측정

천연상태의 chitosan은 분자량이 수십만에서 수백만가량인 고분자이나 가수분해에 의해 oligomer에 이르는 다양한 크기의 산물을 얻을 수 있으며 크기가 다른 사슬의 접합체이기 때문에 평균분자량 또는 평균중합도의 개념이 필요하다. 이러한 분자량의 차이는 고유한 생리활성의 발현을 다르게 할 것으로 추측되므로, 전보에서와 같이 산기수분해 및 한외여과법을 이용하여 얻은 6가지 분획의 점도를 측정하였고⁷⁾, 더 정확한 평균분자량 및 분자량 분산도를 알기 위해 HPLC를 이용하여 분석하였다.

고분자화합물의 분자량은 측정하는 방법에 따라 수평균 분자량(number-average molecular weight : Mn), 중량평균 분자량(weight-average molecular weight : Mw), 정점평균 분자량(peak-average molecular weight : Mp), Z평균 분자량(Z-average molecular weight : Mz) 및 점도평균 분자량(viscosity-average molecular weight : Mv) 등이 있으며, 일반적으로 크기의 순서는 Mn < Mp < Mv < Mw < Mz와 같이 나타난다. 본 연구에서는 HPLC chromatogram상의 위치에 따라 여러 가지 평균분자량을 계산하였으며, 산출된 각 분획의 평균분자량 및 분자량분산도는 Table 1과 같다. 그 결과, 계산된 4가지 평균 분자량간에 약간의 차이를 나타냈으나, 크기의 순서는 이론치와 일치하였다. 5종류의 평균분자량 중에서 중량 평균 분자량이 널리 통용되는 분자량으로서, 각 분획의 Mw를 비교하면 분획-1(CH-1), 분획-4(CH-4) 및 분획-5(CH-5)는 한외여과법의 분자량 범위와 정확하게 일치하였고, chitosan 가수분해

물 분획-2(CH-2), 분획-3(CH-3) 및 분획-6(CH-6)은 약간 벗어났다. 한편, intact chitosan의 분자량은 약 100만으로서 일반적으로 알려진 분자량 수준과 같았으며, 가수분해물중 가장 고분자 분획인 CH-6보다 10배 이상 더 큼을 알 수 있었다. 이와 같이 intact chitosan 및 그 가수분해물의 분자량 추정은 기존의 용이한 측정방법인 점도법에 의한 계산으로는 잘 적용이 되지 않았으므로 HPLC 분석을 통해 시도하였는데, 한외여과막의 molecular weight cut-off와 HPLC chromatogram의 Mw은 대체적으로 비슷한 수치임을 알 수 있었다. 그 결과를 보면, CH-1의 Mw는 870, CH-2는 6,600, CH-3은 12,800, CH-4는 24,400, CH-5는 42,000, CH-6은 63,800 그리고 intact chitosan은 990,000였다.

한편, 수평균분자량에 대한 중량평균 분자량의 비율로서 불균질성(heterogeneity)의 척도를 나타내는 분자량분산도(polydispersity)는 CH-2를 제외한 기타 가수분해물 분획 및 intact chitosan에서는 1.39~1.75로서 비슷한 수준을 나타냈으며, CH-2는 3.01로서 특정 분자량에 대한 분자 사슬의 분율이 다른 분획보다 낮음을 알 수 있었다.

반응성 질소종 분비능

활성화된 대식세포의 여러가지 분비물 중에서 반응성 질소종(reactive nitrogen intermediates : RNI)은 비교적 최근에 알려진 물질로서 면역작용에 의한 항미생물, 항암작용의 기전중에서 높은 화학적 반응성을 나타내는 물질로 인식되고 있다¹⁴⁾. 즉 대식세포가 세균을 흡식하게 되면 TNF와 γ-interferon 등의 자극으로 nitric oxide synthetase가 산소와 결합하여 L-arginine을

Table 1. Molecular weight distribution of chitosan and its hydrolysates

Treatment (concn : 0.2%)	Molecular weight range	Mn ¹⁾	Mp ²⁾	Mw ³⁾	Mz ⁴⁾	Polydispersity ⁵⁾
CH-1 ⁶⁾	< 1,000	628	475	866	1723	1.39
CH-2 ⁶⁾	1,000~3,000	2,197	6,724	6,620	11,830	3.01
CH-3 ⁶⁾	3,000~10,000	7,322	8,996	12,820	18,980	1.75
CH-4 ⁶⁾	10,000~30,000	14,430	19,040	24,370	34,740	1.69
CH-5 ⁶⁾	30,000~100,000	29,370	37,290	41,970	55,800	1.43
CH-6 ⁶⁾	>100,000	44,730	53,520	63,760	86,700	1.43
Chitosan	-	563,000	795,200	989,900	1,629,000	1.65

¹⁾Number-average molecular weight

²⁾Peak-average molecular weight

³⁾Weight-average molecular weight

⁴⁾Z-average molecular weight

⁵⁾Mw/Mn : polydispersity, rough measure of the degree of heterogeneity

⁶⁾CH-1, chitosan hydrolysate fraction 1 ; CH-2, chitosan hydrolysate fraction 2 ;

⁷⁾CH-3, chitosan hydrolysate fraction 3 ; CH-4, chitosan hydrolysate fraction 4 ;

⁸⁾CH-5, chitosan hydrolysate fraction 5 ; CH-6, chitosan hydrolysate fraction 6 ;

Table 2. Nitrite production by continuous macrophage cell line(J774A.1) treated with chitosan hydrolysates, intact chitosan and chitohexaose

Treatment	Treated dose($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Nitrite($\mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cells}$)	Lipopolysaccharide ¹⁾ -induced nitrite($\mu\text{M}/2 \times 10^5 \text{ cells}$)
PBS ²⁾		1.9 \pm 0.71 ³⁾	49.4 \pm 1.70
Acetate		0.6 \pm 0.35	44.8 \pm 0.85
Chitohexaose	1	1.7 \pm 0.26	39.2 \pm 2.13
	10	3.0 \pm 0.22	40.0 \pm 1.84
	100	9.1 \pm 0.74	42.8 \pm 1.72
	1000	27.7 \pm 1.06	52.4 \pm 0.42
CH-1 ⁴⁾	1	6.1 \pm 0.64	45.2 \pm 0.35
	10	7.7 \pm 0.83	44.0 \pm 1.46
	100	26.4 \pm 0.93	45.9 \pm 1.15
	1000	20.1 \pm 1.16	41.5 \pm 1.88
CH-2 ⁴⁾	1	7.2 \pm 0.73	41.0 \pm 1.12
	10	9.9 \pm 1.42	44.2 \pm 1.80
	100	34.8 \pm 1.35	50.7 \pm 1.88
	1000	3.4 \pm 0.80	62.1 \pm 0.58
CH-3 ⁴⁾	1	7.6 \pm 0.92	43.4 \pm 2.58
	10	20.9 \pm 1.55	39.5 \pm 2.00
	100	28.6 \pm 0.58	42.4 \pm 1.93
	1000	9.2 \pm 1.24	54.5 \pm 1.38
CH-4 ⁴⁾	1	6.2 \pm 0.69	47.9 \pm 0.62
	10	12.6 \pm 1.06	46.4 \pm 2.39
	100	15.6 \pm 0.70	20.5 \pm 0.35
	1000	17.1 \pm 3.15	27.2 \pm 1.97
CH-5 ⁴⁾	1	6.4 \pm 0.82	42.9 \pm 0.96
	10	22.3 \pm 0.80	37.8 \pm 0.62
	100	22.7 \pm 0.69	20.6 \pm 0.12
	1000	21.5 \pm 0.92	27.8 \pm 0.93
CH-6 ⁴⁾	1	3.0 \pm 0.56	43.4 \pm 2.23
	10	25.8 \pm 1.02	28.1 \pm 1.17
	100	18.8 \pm 0.43	13.7 \pm 0.62
	1000	4.7 \pm 0.46	26.8 \pm 1.32
Chitosan	1	1.2 \pm 0.57	43.0 \pm 2.73
	10	35.0 \pm 3.04	43.0 \pm 0.93
	100	2.9 \pm 2.40	27.2 \pm 1.52
	1000	6.7 \pm 0.70	31.8 \pm 1.62

¹⁾Treated dose of lipopolysaccharide was 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.²⁾Phosphate buffered saline(pH 7.2)³⁾Mean \pm standard deviation⁴⁾CH-1, chitosan hydrolysate fraction 1 ; CH-2, chitosan hydrolysate fraction 2 ; CH-3, chitosan hydrolysate fraction 3 ; CH-4, chitosan hydrolysate fraction 4 ; CH-5, chitosan hydrolysate fraction 5 ; CH-6, chitosan hydrolysate fraction 6

산화시켜 nitric oxide를 생성시킨다. 이렇게 생긴 nitric oxide는 미생물과 암세포에 대하여 독작용을 나타내는 것으로 알려져 있다^(19, 20). 그러나 nitric oxide는 반응성이 강하여 짧은 시간에 nitrite(NO_2^-)나 nitrate(NO_3^-)로 전환되거나 친화력이 있는 SH, heme 등에 부착되므로 nitric oxide 생성량을 측정하기 위해서 Griess 반응을 이용하여 안정된 대사산물인 nitrite나 nitrate로 측정한다. 따라서 반응성 질소종 분비능에 미치는 chitosan 가수분해물의 영향을 상징액 중의 nitrite 농도 측정을 통해 살펴보았다.

대식세포가 생성하는 nitrite의 농도는 Table 2에서와 같이 negative control인 PBS가 1.85 $\mu\text{M}/\text{assay}$, acetate

가 0.64 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 였으며, 시료를 첨가하였을 때는 0~35 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 의 농도로서, 모든 시료가 반응성 질소종 분비능을 나타냈다. CH-1에서 CH-5까지는 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시험농도 중에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 한 시료내에서 최고의 값을 보였고 CH-6과 intact chitosan은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 최고의 값을 나타내어 고분자 분획으로 갈수록 낮은 시험농도에서 최고의 값을 나타내는 경향을 보였다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 가수분해물 간에 차이를 나타내지 않았으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 7.7~25.8 μM 로서 고분자 분획으로 갈수록 증가하는 경향을 나타냈다. 시험농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 각 시료들을 비교해보면, CH-1에서 CH-6까지 26.4, 34.8, 28.6, 15.6,

22.7, 18.8 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 였으며, 가수분해물 중에서 CH-2의 nitrite 분비능이 가장 컸다. 각 시료에서 최고의 활성을 나타낸 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 수치가 고분자 분획보다 저분자 분획쪽에서 더 높게 나타난 이유는 MTT assay를 통한 생존율 시험에서 고분자 분획(CH-4, 5, 6)을 첨가한 세포의 생존율이 더 낮았기 때문인 것으로 사료된다(결과 미제시). 또한, intact chitosan의 경우는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /일 때, 35.0 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 의 최고 농도를 나타냈고, chitohexose도 최고 27.7 μM (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 nitrite가 분비됨을 볼 수 있었다.

한편, 반응성 질소종 생성능을 지니는 것으로 알려진 *E. coli* lipopolysaccharide(LPS)⁽²¹⁾를 chitosan 가수분해물과 함께 처리한 후 nitrite 생성 증진능을 살펴본 결과, chitosan 가수분해물없이 LPS만 첨가한 경우에 PBS와 acetate는 각각 49.4 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 및 44.8 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 였다. 이들과 비교했을 때, chitosan 가수분해물, intact chitosan 및 chitohexose 모두 LPS를 첨가한 정도만큼만의 nitrite 분비 정도가 증가한 것으로 보아, LPS가 chitosan 가수분해물의 nitrite 생성능에 영향을 주지 않는 것으로 보이며, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 CH-2가 다른 시료에 비해 LPS를 첨가하였을 때 nitrite 생성능이 약간 증가하였다. 그리고 대식세포의 생존율이 낮았던 시료와 그 농도 범위에서는 오히려 negative control인 PBS나 acetate값보다도 더 낮은 값을 나타내었다.

반응성 산소종 분비능

세균과 같은 이물질을 대식세포가 탐식하게 되면 탐식포막에 있는 효소에 의하여 산소가 superoxide anion으로 환원되고 계속하여 hydroxyl group, singlet oxygen 및 hydrogen peroxide를 생성하게 된다. 이들은 반응성 산소종(reactive oxygen species)이라 하며 세균이나 암세포에 대하여 독작용을 나타낸다⁽¹⁴⁾. 반응성 질소종과 더불어 대식세포가 활성화되어 분비되는 대표적 화학물질인 반응성 산소종 중에서 hydrogen peroxide 분비능을 알아본 결과는 Fig. 1과 같다. Assay system에 phorbol myristic acetate(PMA)가 첨가되어 유도된 반응성 산소종 분비능은 chitosan 가수분해물과 chitohexose에서 모두 나타났다. 각 시료별 hydrogen peroxide 생성량($\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein)을 살펴본 결과, CH-1은 423.8~699.6 μM , CH-2는 89.1~478.8 μM , CH-3는 84.0~387.8 μM , CH-4는 211.3~596.7 μM 을 분비하였고, 이들 중에서는 CH-1의 분비능이 큼을 알 수 있었다. 반면, CH-5는 1~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위에서 용량-반응 비례 관계를 뚜렷히 나타내었으며

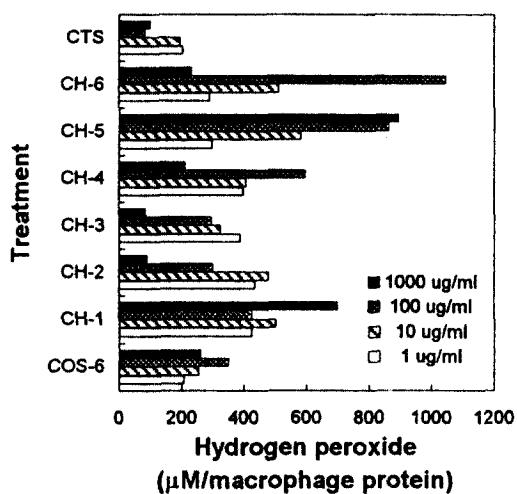


Fig. 1. Hydrogen peroxide production by continuous macrophage cell line J774A.1 treated with chitosan hydrolysates, intact chitosan and chitohexose. Values of PBS and acetate treatments(negative controls) were 239.9 \pm 59.9 and 248.3 \pm 19.3 $\mu\text{M}/\text{mg}$ macroparg protein, respectively.

COS-6, chitohexose; CH-1, chitosan hydrolysate fraction 1 ; CH-2, chitosan hydrolysate fraction 2 ; CH-3, chitosan hydrolysate fraction 3 ; CH-4, chitosan hydrolysate fraction 4 ; CH-5, chitosan hydrolysate fraction 5 ; CH-6, chitosan hydrolysate fraction 6 ; CTS, intact chitosan

296.0~894.3 μM 의 산소종을 분비하였다. CH-6은 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 288.7, 510.3, 1044.4 μM 로 증가하였으나 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 오히려 감소되었다. 모든 분획중에서 CH-6이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 1044.4 μM 의 산소종을 분비하여 최고의 활성을 나타냈다.

Intact chitosan 및 chitohexose는 각각 82.2~201.8 μM 및 207.0~349.9 μM 의 hydrogen peroxide 분비능을 나타냈는데, intact chitosan은 nitrite 분비능이 커던 것과 비교할 때, hydrogen peroxide 분비능은 다른 시료에 비해 상대적으로 매우 작았음을 알 수 있었다. Murine candidiasis를 유발하여 chitin 및 chitosan의 방어효과를 조사한 연구에서 *Candida albicans*를 정맥으로 접종했을 때 chitin이 더 효과적이었으나, 복강으로 접종했을 때 chitosan이 mouse peritoneal exudate cells의 수와 이들의 반응성 산소종 생성량을 증가시키는데 효과적이었음을 보고하였다⁽⁸⁾. 그러나 본 연구에서는 intact chitosan과 chitosan 가수분해물을 비교했을 때, intact chitosan은 hydrogen peroxide 생성능이 거의 없었고, 반면에 chitosan 가수분해물의 고분자 분획(CH-4, 5, 6)이 효과가 더 컸다. 또한, mouse에 *Listeria monocytogenes*를 감염시켜 chitin oligosaccharide인 N-

acetylchitohexaose의 방어효과를 조사한 연구에서 복장으로 시료를 주입한 후 macrophage의 hydrogen peroxide 생성량이 시료를 주입하지 않았을 때보다 유의적으로 증가했다고 보고하였다⁽¹⁰⁾. 본 연구에서는 chitosan 가수분해물에 초점을 맞추었으므로 chitin oligosaccharide를 사용하지 않고 chitosan oligosaccharide인 chitohexaose를 사용했는데 chitosan 가수분해물에 비해 반응성 산소종 분비능이 매우 적었으나 intact chitosan에 비해서는 더 커다. Chitin 및 chitosan의 효과와 관련지어 세균을 감염시켜 방어효과를 연구한 보고들은 주로 N-acetylglucosamine 특히 N-acetylchitohexaose가 효과가 크다고 보고하였으나 본 연구에서 나타난 바와 같이 chitosan 가수분해물의 효과도 크므로 이에 대한 비교 연구가 앞으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Interleukin-1 α 및 tumor necrosis factor 분비능

Interleukin-1(IL-1)은 17 KDa의 단백질로서 T cell의 생산을 증가시키고 B cell의 활성화 및 항체 생산을 증가시키는 등 생체내 여러 면역기능 조절에 관여하고 있는 면역 조절물질 중의 하나이다. IL-1은 등전점에 따라 IL-1 α (pI 5.0)와 IL-1 β (pI 7.0)의 2종류로 분류하고 있으며 여러 종류의 세포에서 분비되나 특히 활성화된 대식세포에서 많이 분비되는 cytokine으로 알

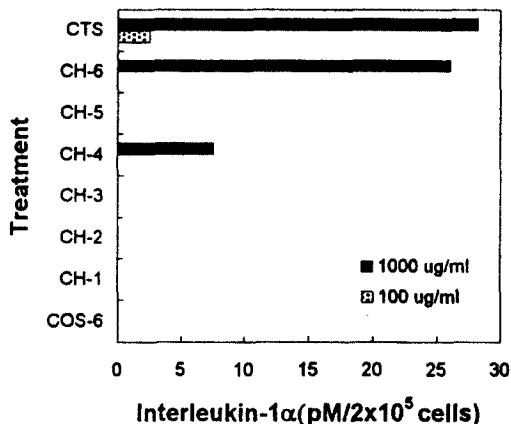


Fig. 2. Interleukin-1 α production by continuous macrophage cell line J774A.1 treated with chitosan hydrolysates, intact chitosan and chitohexaose. Interleukin-1 α was not detected both in the PBS and acetate treatments(negative controls).

COS-6, chitohexaose ; CH-1, chitosan hydrolysate fraction 1 ; CH-2, chitosan hydrolysate fraction 2 ; CH-3, chitosan hydrolysate fraction 3 ; CH-4, chitosan hydrolysate fraction 4 ; CH-5, chitosan hydrolysate fraction 5 ; CH-6, chitosan hydrolysate fraction 6 ; CTS, intact chitosan

려져 있다⁽²⁰⁾. 따라서 chitosan 가수분해물이 대식세포 활성 증진효과를 나타내는 한 지표로써 상징액 중의 IL-1 α 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 IL-1 α 가 분비된 시료는 CH-4, CH-6 및 intact chitosan이었고, 다른 시료들은 IL-1 α 분비능을 나타내지 않았다. 즉, CH-4의 1000 μ g/ml 농도에서 7.60 pM, CH-6도 1000 μ g/ml 농도에서 26.05 pM, intact chitosan은 100 μ g/ml에서 2.49 pM, 1000 μ g/ml에서 28.25 pM을 나타냈다. 이상으로 보아 반응성 산소종의 경우와 유사하게 CH-4 이상의 고분자 분획이 대식세포의 IL-1 분비능을 더 증진시킬 수 있었다.

Tumor necrosis factor는 염증 및 암 등의 질환에서 면역이나 대사의 조절에 중요한 역할을 담당하는 내인성 매개인자이다. 대식세포는 외부에서 침입한 세균 등에 의해 활성화되면 다량의 TNF를 분비하는 것으로 알려져 있다. TNF의 항암작용도 대부분 TNF 자체의 독성에 의해서라기 보다 TNF에 의해 주화되고(chemotaxis), 활성화된 대식세포, cytotoxic-T cell 및 natural killer cell 등이 생산하는 nitric oxide나 hydrogen peroxide들이 암세포를 죽임으로써 나타내는 것으로 추측되고 있다⁽²²⁾.

따라서 대식세포가 분비하는 TNF를 측정한 결과는

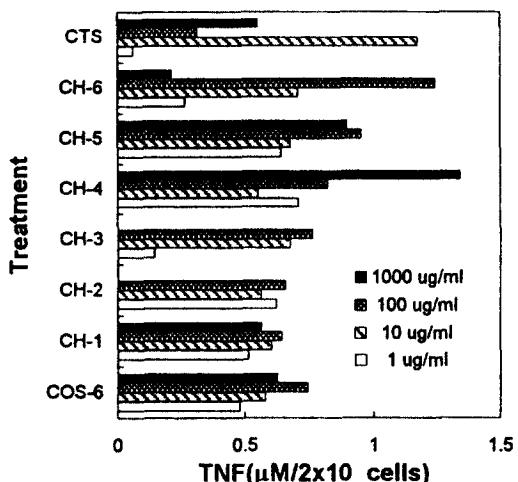


Fig. 3. Tumor necrosis factor production by continuous macrophage cell line J774A.1 treated with chitosan hydrolysates, intact chitosan and chitohexaose. Tumor necrosis factor was not detected both in the PBS and acetate treatments(negative controls).

COS-6, chitohexaose ; CH-1, chitosan hydrolysate fraction 1 ; CH-2, chitosan hydrolysate fraction 2 ; CH-3, chitosan hydrolysate fraction 3 ; CH-4, chitosan hydrolysate fraction 4 ; CH-5, chitosan hydrolysate fraction 5 ; CH-6, chitosan hydrolysate fraction 6 ; CTS, intact chitosan

Fig. 3과 같으며, 모든 시료가 TNF 분비를 증진시킬 수 있었다. 측정된 농도범위는 59.5 nM에서부터 최고 1341.6 nM이었다. CH-1, CH-2, CH-3에서 보다는 CH-4, CH-5, CH-6에서 전반적으로 TNF 분비능이 커졌으며, 그 농도는 CH-4의 경우 549~1341.6 nM, CH-5는 637.9~952.1 nM, CH-6는 213.3~1243.8 nM의 범위였다. CH-4를 첨가했을 때 1000 µg/ml에서 1341.6 nM의 TNF가 분비되어 가장 높은 수치를 나타냈으며 CH-5는 100 µg/ml에서 952.1 nM, CH-6은 100 µg/ml에서 1243.8 nM을 보였다. Intact chitosan의 경우, nitrite, IL-1 분비능 실험에서와 같이 10 µg/ml에서 두드러지게 수치가 증가하여 1172.5 nM를 나타냈다.

이상으로 보아, chitosan 가수분해물의 대식세포 증진 활성을 반응성 질소종, 반응성 산소종, interleukin-1 및 tumor necrosis factor 분비능을 종합했을 때, CH-4, CH-5, CH-6 및 intact chitosan이 비교적 저분자량 분획 보다 대식세포 활성 증진능이 더 커졌다. 대식세포 활성 증진효과를 나타내는 chitosan 가수분해물의 분자량 범위는 HPLC로 측정했을 때 약 24,000~64,000였고, 적어도 24,000은 되어야 분자량에 따른 점성 및 세포를 자극하는 특성으로 인한 면역 증진활성을 나타내는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 현재까지 알려진 chitosan 및 그 유도체들의 항암 및 면역활성은 6당체나 7당체가 가장 높다는 연구결과^(2-4, 9-10)와는 일치하지 않은 것이다. 이는 chitosan의 용해성, 항원성, 점도, 독성 등의 측면에서 주로 oligomer와 같은 저분자 chitosan에만 연구가 국한되어 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다. 또한 chitosan 가수분해물은 intact chitosan과 달리 점도가 낮고 염의 형태로서 물에 녹는 성질을 띠기 때문에 앞으로 면역 증진 활성이나 항암 활성 등의 생리 활성을 연구하는데 더 용이하고, 응용 가능성이 높을 것으로 보이나, chitosan 가수분해물의 활성 검증 및 안전성에 대한 in vivo 연구와 더불어 작용 기작에 대한 후속연구가 추진되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

제법질 기원의 chitosan을 산기수분해 및 한외여과법으로 재조한 후, 그들의 분자량에 따른 대식세포 활성 증진능을 측정하였다. Continuous macrophage cell line J774A.1을 이용한 nitrite 분비능을 비교한 결과, intact chitosan의 농도가 10 µg/ml 때 최고의 분비능을 나타냈다. 대식세포의 hydrogen peroxide 분비능은 chitosan 가수분해물 분획 5의 1000 µg/ml 농도에서

894 µM/mg macrophage protein을 나타냈으며 chitosan 가수분해물 분획 6의 100 µg/ml 농도에서는 1044 µM/mg macrophage protein의 최고 분비능을 나타냈다. 또한 IL-1α 분비능은 분획 4, 분획 6 및 intact chitosan에서만 나타났고, tumor necrosis factor의 경우도 chitosan 가수분해물 분획 4, 분획 5, 분획 6 및 intact chitosan에서 분비능이 커졌다. 결론적으로 chitosan 가수분해물 중에서 HPLC법으로 측정한 분자량이 24,000~64,000인 chitosan 가수분해물 분획 4, 분획 5 및 분획 6이 반응성 질소종 분비능을 제외한 대식세포 활성 증진능이 가장 큰 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 농림기술개발사업의 일환으로 수행된 결과의 일부이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- Arai, S. Studies of functional foods in Japan-state of art. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 9-15 (1996)
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. Microbiol. Immunol. 34: 413-426 (1990)
- Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P. Chitin and Chitosan. Elsevier, New York, USA (1989)
- Brin, C.J., Sandford, P.A. and Zikakis, J.P. Advances in Chitin and Chitosan. Elsevier, New York, USA (1992)
- Sirica, A.E. and Woodman, R.L. Selective aggregation of L1210 leukemia cells by the polycation chitosan. J. Natl. Cancer Inst. 47: 377-388 (1971)
- Chun, H.S., Chang, H.J. and Lee, J.M. In vitro Antimutagenic activity of chitosan and its bio-antimutagenic characteristics. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1059-1064 (1996)
- Chang, H.J., Chun, H.S. and Lee, S.R. Antimutagenic activity in vitro of chitosan hydrolysates. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 1065-1070 (1996)
- Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. Microbiol. Immunol. 28: 903-912 (1984)
- Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. Microbiol. Immunol. 30: 777-787 (1986)
- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. Microbiol. Immunol. 33: 357-367 (1989)
- Suzuki, K., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.

- Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: The role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacial effect. *Microbiol. Immunol.* 31: 375-379 (1987)
12. Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avallone, B. and Balsamo, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 15: 1215-1220 (1994)
13. Maeda, M., Murakami, H., Ohta, H. and Tajima, M. Stimulation of IgM production in human-human hybridoma HB4C5 cells by chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 427-431 (1992)
14. Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 141: 2407-2412 (1988)
15. Krahenbuhl, J.L. and Remington, J.S. The role of activated macrophages in specific and nonspecific cytostasis of tumor cells. *J. Immunol.* 113: 507-516 (1974)
16. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
17. Harpe, J.D.L. and Nathan, C.F. A semi-automated micro-assay for H_2O_2 release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Methods* 78: 323-336 (1985)
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
19. Stuehr, D.J., Kwon, N.S. and Gross, S.S. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161: 420-426 (1988)
20. Ben-Efraim, S. and Bonta, I.L. Modulation of antitumor activity of macrophages by regulation of eicosanoids and cytokine production. *Int. J. Immunopharmacol.* 16: 397-399 (1994)
21. Stuehr, D.J. and Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophage produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7738-7742 (1985)
22. Urban, J.L., Shepard, H.M., Rothstein, J.L. and Sugarman, B.J. Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 5233-5237 (1986)

(1999년 1월 21일 접수)