

## 잣버섯 균사체로부터 분리한 수용성 단백다당체 Lepidan의 면역 증가 작용

진미림\* · 정규선#

\*숙명여자대학교 약학연구소, #숙명여자대학교 약학대학

(Received August 13, 1999)

## Enhancement of Immune Responses by a Water Soluble Proteoglycan, Lepidan from *Lentinus lepideus*

Mirim Jin\* and Kyu Sun Chung#

\*Research Institutes of Pharmaceutical Science,

#College of Pharmacy, Sookmyung Womens University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — In this study, we investigated the immunopotent activities of lepidan, a water soluble proteoglycan from *Lentinus lepideus*. To examine whether lepidan may affect nonspecific immune responses, we determined the effect on the production of nitric oxide (NO). Lepidan effectively increased the NO production in IFN- $\gamma$  and LPS triggered RAW 264.7 cells. To further demonstrate the evidence that lepidan activates various immune cells, we determined the alkaline phosphatase activity, plaque-forming cell number and secretion of interleukine-4 (IL-4) and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) after lepidan treatment in murine splenocytes. The results showed that lepidan increased alkaline phosphatase activity and the number of plaque-forming cells, which indicates that lepidan can lead B lymphocytes to late stage of differentiation. Also, when the splenocytes were cultured with lepidan for 48 hr, the level of IL-4 and GM-CSF in the supernatant dramatically increased. Taken together, these data suggest that lepidan is a biological response modulator that is able to activate immune responses.

**Keywords** □ Lepidan, nitric oxide, alkaline phosphatase, plaque forming cell, cytokine.

Lepidan은 담자균류인 잣버섯(*Lentinus lepideus*)으로부터 열수 추출과 정제 과정에 의하여 분리된 산성 단백다당체로서 마우스 비장세포에 대하여 증식촉진작용을 나타낸다. 그 작용은 B 임파구에 대하여 나타나는 것으로서 세포내의 전사조절인자인 NF- $\kappa$ B를 특이적으로 활성화 시킴으로서 NF- $\kappa$ B 의존적 제능의 발현을 조절하여 이루어 내는 것으로 보고되었다.<sup>1)</sup> 본 연구에서는 lepidan의 면역강화작용을 보다 폭넓은 각도에서 밝히고자 하였다.

대식세포는 조직, 간, 비장, 임파선 및 혈액 등에 널

리 분포되어 있어서 혈액을 타고 들어오는 미생물을 파괴하는 식균작용뿐만 아니라 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 OH· radical 등을 분비함으로써 표적 세포를 제거하는 기능을 갖고 있으며<sup>2)</sup> 활성화된 대식 세포만이 분비한다고 알려진 nitric oxide는 산소 중간 물질(reactive oxygen intermediates) 등에 내성을 보이는 기생체나 종양세포에도 작용하여 유효한 작용을 나타낸다고 알려졌다.<sup>3-4)</sup> 또한 대식세포는 외부로부터 흡수한 항원을 적절히 변형시켜 세포 표면에 발현하여 T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 함으로써 그 항원에 대한 면역반응을 유도하고 궁극적으로 항체를 만들게 한다. 한편, 체액성 면역을 담당하고 있는 B 임파구의 가장 주된 기능은 항체를 생성하는 것으로 이는 외부 항원과 결합하여 면역 복합체를 형성하고 보체를 활성화하여 항원을

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-715-9498  
E-mail : kschung@sdic.sookmyung.ac.kr

제거한다. 또한 바이러스로 감염된 세포나 변형된 세포들의 세포 표면의 항원을 인지하여 killer cell로 하여금 항체 의존성 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity)를 일으키게 하여 외부 항원에 대해 중요한 방어 작용을 한다. T 임파구는 세포성 면역을 담당함으로써 침입해온 세포나 조직을 직접 파괴하는 기능을 가지며 각종 기생충이나 바이러스에 감염된 세포 및 암세포등에 대하여 그 기능을 발휘한다.

담자균류에 의한 면역증가 효과는 Yashiyuki 등이 *Grifola frondosa*로부터 분리된(1→3)-D-glucan인 grifolan을 대식세포에 처리시 대식세포가 활성화되었을 때 분비되는 IL-6, IL-1 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인의 수준이 증가됨을 보고하였으며<sup>5)</sup> 최근까지 활발한 연구가 진행되고 있는 lentinan은 사이토카인의 분비유도 및 면역세포들의 사이토카인에 대한 반응성을 증가시키며<sup>6)</sup> *in vitro*에서 대식세포와 함께 배양시에는 IL-1과 IL-6의 분비가 증가됨이 알려졌다.<sup>7)</sup> 또한 담자균류로부터 B 임파구에 대한 세포분화인자 성분의 분리는 *Yadomae* 등에 의해 연구 발표되었으며 *Peziza vesiculosa*로부터 분리된 vesiculogen이 B 세포의 DNA 합성을 촉진할 뿐만 아니라 면역적혈구, 말적혈구에 대하여 용혈반 형성 세포의 수를 증가 시킴을 확인하므로써 B 임파구 증식 및 분화에 작용하고 있음을 밝혔다.<sup>8,9)</sup> 그러므로 본 연구에서는 대식세포 및 임파구의 활성화 지표에 대한 lepidan의 작용을 조사함으로써 면역 강화 작용을 규명하였다.

### 실험방법

#### 대식세포에 의한 Nitric oxide 생성에 미치는 영향

활성화된 대식세포만이 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Tayeh 등<sup>10-11)</sup>의 방법에 따라 마우스 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 측정하였다. 시약 및 재료로는 RAW 264.7, recombinant mouse interferon-gamma(IFN- $\gamma$ ), Griess reagent, sodium nitrite(Sigma Chem. Co., U.S.A.), lipopolysaccharide(LPS, Gibco Co., U.S.A.) PBS (pH 7.2), 10% FBS 첨가 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 24-well plate(Falcon Co., U.S.A.) 과 ELISA titer plate(Nunclone, Denmark)를 사용하였다. 세포배양용 dish에 배양한 RAW 264.7 세포

를 1% trypsin(Gibco)으로 처리하여 떼어낸 후 serum free DMEM으로 300×g에서 5분간 3회 원심분리 세척한 후 2×10<sup>5</sup> cells/ml로 조정하여 24-well plate에 분주하였다. PBS 20  $\mu$ l에 최종 농도가 INF- $\gamma$  10 U/ml, IFN- $\gamma$  10 U/ml와 LPS 1  $\mu$ g/ml, lepidan 50, 100  $\mu$ g/ml과 IFN- $\gamma$  10 U/ml 및 LPS 1  $\mu$ g/ml이 되도록 혼합 첨가하여 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간동안 배양하였다. 400×g에서 30분간 원심분리하여 상정액 100  $\mu$ l 만을 취하여 ELISA titer plate에 옮긴 후 100  $\mu$ l Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치한후 ELISA reader (Flow Lab., U.K.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로 부터 nitric oxide의 대사체인 nitrite의 농도를 계산하였다.

#### 비장내 면역세포에 대한 작용

**실험동물** - C3H 생쥐(20~25 g, ♂)는 서울대학교 동물사육장으로부터 구입하였으며 물과 사료(삼양사)는 제한하지 않았다.

**Alkaline phosphatase activity의 측정** - 분화된 B 임파구에서 발현되는 alkaline phosphatase를 Ohno<sup>12)</sup> 등의 방법에 따라 실시하였다. 시약 및 재료로는 10% FBS 첨가 RPMI 1640 세포 배양용 배지, tissue culture 24-well plate, lipopolysaccharide, lymphocyte separation medium(Nycomed Pharma., Norway), p-nitrophenylphosphate in 50 mM sodium carbonate buffer는 50 mM NaHCO<sub>3</sub> 용액 50 ml에 채워 0.1 N NaOH 용액 7.6 ml를 가한 후 탈 이온수를 100 ml까지 채워서 만든 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0) 용액에 ml당 p-nitrophenyl phosphate 0.1 mg 및 MgCl<sub>2</sub>를 10<sup>-3</sup>M 되도록 가하여 기질 용액으로 사용하였다. 앞서 보고한 바와같이 1) splenocyte (C3H, ♂, 20-25 g)를 분리한 후 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 부유한 후 24 well plate에 well당 1 ml씩 분주하고 lepidan 50, 200, 500 및 LPS 50  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 최종 부피가 2 ml이 되도록 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 다음 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액은 버리고 남은 세포 침전물에 p-nitrophenyl phosphate in 50 mM sodium carbonate buffer 1 ml을 가한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH 용액

500  $\mu$ 를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Alkaline phosphatase activity:

$$\text{p-nitrophenol(mol/10}^6 \text{ lymphocytes/60 mins)} = 1.15 \times \text{O.D at 405 nm}$$

### 비장세포 부유액중의 cytokine 의 동정

**A. ELISA에 의한 mIL-4의 측정** - 비장세포 부유액 중의 마우스 IL-4의 측정은 마우스 ELISA IL-4 Kit(Endogen, U.S.A.)를 사용하여 실시하였다. 상기에 서와 같은 방법으로 C3H마우스의 비장세포 부유액을 제조한 뒤 최종농도가 500  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 lepidan을 처리하고 1, 2일 후에 그 상정액을 100  $\mu$ 씩 취하여 그 부유액중의 IL-4를 측정하였다. Ag(IL-4)이 미리 coating된 96-well plate에 reagent를 50  $\mu$ 를 가한 후 희석된 standard와 위에 준비한 상정액을 50  $\mu$ 씩 가하였다. 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간동안 배양하였다. 다시 5회 세척하여 준 후 미리 제조된 TMB substrate 용액을 각각의 well에 가하여서 상온(20~25°C), 암실하에서 30분동안 반응하여 발색하도록 하였다. 각각의 well에 stop 용액을 가하여서 반응을 종결시킨뒤 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**B. ELISA에 의한 mGM-CSF의 측정** - 비장세포 부유액중의 마우스 GM-CSF의 측정은 마우스 ELISA GM-CSF Kit(Endogen, U.S.A.)를 사용하여 실시하였다. 상기에서와 같은 방법으로 비장세포 부유액을 제조한 뒤 최종농도가 200, 500  $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 lepidan을 처리한 뒤 1, 2일 후에 그 상정액을 100  $\mu$ 씩 취하여 그 부유액중의 GM-CSF를 측정하였다. Ag(GM-CSF)이 미리 coating 된 96-well plate의 각각의 well에 reagent를 50  $\mu$ 씩 가한 후 희석된 standard와 위에서 준비한 상정액을 50  $\mu$ 씩 가하였다. 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간동안 배양하였다. 다시 5회 세척한 후 미리 제조된 TMB substrate 용액을 각각의 well에 가하여서 상온(20~25°C), 암실하에서 30분동안 배양하여 발색하도록 하였다. 각각의 well에 stop 용액을 가하여서 반응을 종결시킨 뒤 ELISA 를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 마우스의 용혈반 형성세포수(Plaque-forming cell, PFC)의 측정

B 임파구의 분화능력을 검색하기 위하여 면역 적혈구(sheep red blood cell)에 대한 항체생성능을 Cunningham<sup>13)</sup> 등의 방법을 개량하여 실시하였다. 실험동물은 4~5주령의 C3H 마우스(♂, 20~25 g)을 정상군, lepidan을 투여한 정상시료군으로 나누었으며 실험군마다 3마리씩 사용하였다. 시약 및 재료는 PBS (pH 7.2) lymphocyte separation medium, DEAE dextran(Sigma Chemical Co., U.S.A.) Bacto agar (Difco Co., U.S.A), Asever's 용액은 glucose 20.5 g, NaCl 4.2 g 및 sodium citrate 8.0 g을 3차 증류수 1l에 용해시킨 후 여과(0.45  $\mu\text{m}$  Green Cross Manufacture Co. Korea)하였다. 면역적혈구(SRBC, Korea Media, Korea)는 항원으로서 사용하였으며 동량의 Asever's 용액(pH 6.1)을 가하여 4°C에 보존하면서 7주일 이내의 것을 사용직전에 PBS용액으로 3회 세척하였다. Guinea pig complement(Sigma), tissue culture plate(100 mm, Nunc Co., Germany) microscopic cover glass(4.5×50 mm, Fisher Co., U.S.A.)을 사용하였다. 정상군에는 생리식염수를, 시료 투여군에는 lepidan 50 mg/kg/day를 1일 1회씩 5일간 연속 복강 투여하였다. 최종시료 투여일로부터 7일 후에  $1 \times 10^7$  SRBC 를 복강내에 투여, 면역시켰다. 비장세포 부유액의 제조는 C3H마우스를 경구탈출법에 의하여 처사시킨 후 비장세포 부유액을 lymphocyte separation medium으로 상기에서와 같이 분리하여  $1 \times 10^7$  cells/ml로 부유하였다. 50% SRBC의 제조는 Asever's 용액에 현탁된 SRBC를 PBS 용액으로 3회 원심세척하고 50% SRBC가 되도록 PBS용액에 부유시켰다. Agar용액의 제조는 PBS용액에 0.5% agar와 0.05% dextran이 되도록 가하여 완전히 녹인 후 47°C에 유지시켰다. 배양혼합액의 제조시 50% SRBC 부유액 25  $\mu$ l, complement 25  $\mu$ l, agar 용액 350  $\mu$ l와 비장세포 부유액 150  $\mu$ l( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 즉시 혼합한 다음 tissue culture plate에 혼합액 150  $\mu$ 씩을 가하고 microscopic cover glass를 덮었다. 상기의 agar plate 를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양후 생성된 용혈반 형성세포(plaque-forming cell, PFC)수를 측정하였으며 100만개의 비장세포 중 용혈반 형성세포수(PFC/10<sup>6</sup> cells)를 다음식에 따라 계산하였다.

$PFC/10^6$  spleen cells =  $N \times 10^6$  C.Vm.A

$PFC/\text{total spleen cells} = (PFC/10^6 \text{ spleen cells}) \times C \times Vt/10^6$

A :  $150(\text{Volume of spleen cell suspension})/550$   
(Volume of total mixture)

N : Number of plaques observed in one cover glass

C : Count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension

Vm : Volume of mixture filled into one cover glass (ml)

Vt : Volume of total spleen cell suspension (ml)

### 실험 결과 및 고찰

대식세포가 nitric oxid를 생성하는데는 반드시 helper T 임파구로부터 유래하는 IFN- $\gamma$ 에 의하여 priming 되고 그람음성 세균에서 분리된 LPS에 의하여 triggering 되어야 한다고 보고되었다. 마우스 단핵구 기원의 RAW 264.7 세포주를 이용하여 nitric oxid의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrite의 농도로 측정하였을 때 IFN- $\gamma$  10 U/ml 만을 처리했을 때는 대조군과 차이를 보이지 않았으며, IFN- $\gamma$  10 U/ml와 LPS 1  $\mu$ g/ml을 함께 처리한 경우에 이보다 11배 정도, lepidan을 이와 함께 처리한 경우에 nitric oxide 분비량이 그 2배 정도 증가하였다(Fig. 1). 이는 lepidan이 대식세포의 활성화에 직접 관여할 수 있음을 나타내며 NO 형성 효소인 inducible nitric oxide synthase(i-NOS)의 발현을 조절하는 프로모터에는 NF- $\kappa$ B 결합 부위가 존재하며 i-NOS의 전사를 조절한다는 것은 이미 잘 알려져 있다.<sup>14)</sup> 이미 본 연구실에서 lepidan이 비장세포에 대하여 증식촉진작용이 있으며 그 중 주로 영향을 받는 세포가 B 임파구였으며 그 작용은 NF- $\kappa$ B와 같은 전사조절인자의 활성화에 의한 것임을 밝힌 바 있다. 그러므로 lepidan에 의한 B 임파구 활성화 작용을 밝히기 위하여 임파구 분화시 세포표면에 발현 되는 alkaline phosphatase 활성을 측정할 결과 lepidan 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 그 활성이 약 10 배 증가하였으며 양성대조군인 LPS는 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 약 5배의 증가를 나타내었다. Alkaline phosphatase(Apase)는 B 세포에 대하여 특이적인 세포분화인자를 처리하였을 때 B 세포

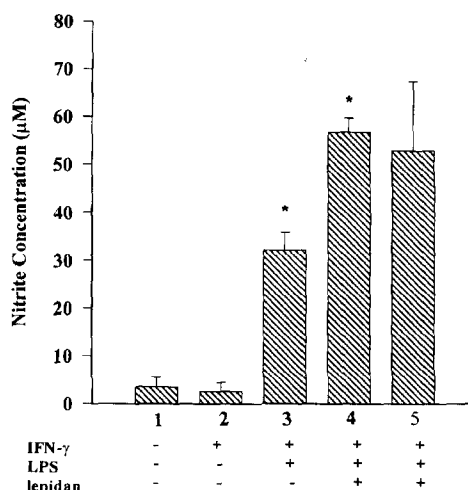


Fig. 1 - Effects of lepidan on nitrite production in RAW 264.7 cells. Macrophages were stimulated with IFN- $\gamma$  (10 U/ml) alone, IFN- $\gamma$ +LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence (50  $\mu$ g/ml; 4, 100  $\mu$ g/ml; 5) or absence of lepidan. Stable metabolite of nitrite in the medium was measured by the Griess reagent. \*, indicates  $p < 0.05$  compared with IFN- $\gamma$  alone. Values are mean  $\pm$  standard error of triple determinations.

의 증식 지표로 나타나는 세포막의 표지(membrane marker)로 알려졌지만 이 Apase의 존재는 B 임파구의 분화와 더욱 밀접하게 관련되어 있어 B 임파구의 thymidine uptake의 최고치 후에 발현이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 즉, B 임파구의 증식만을 촉진하는 인자는(예를 들어 *Salmonella thyphimurium* mitogen) Apase의 발현을 증가시킬 수 없다는 보고가 있다.<sup>15-17)</sup> 그러므로 Apase는 세포의 분화를 나타내는 B 임파구의 후기 표지라고 할 수 있다(Table I). 또한 *in vivo*에서 형질세포의 생성 정도를 측정하기 위하여 plaque-forming cell assay를 실시하였을 때 대조군에 비하여 4배 정도 plaque 형성이 증가되어 나타났다(Table II). 그러므로 lepidan은 B 임파구에 대하여 분화를 촉진하며 항체를 생성하는 형질세포로의 성숙을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 비장세포 부유액중에 존재하는 중요 사이토카인으로서 IL-4를 측정하였는데 IL-4는 B 임파구의 성장, 분화 및 증식인자이며 항체 분비에 필수적이며 isotype 선택과 기생체에 대하여 작용하는 IgE의 발현 및 Ig G<sub>1</sub>의 형성을 촉진하는 것으로 알려졌고 최근에는 세포성 면역에 관여하는 작용 기전이 밝혀지고 있다.<sup>18)</sup> IL-4는 활성화된 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 휴지기 상태의 T 세포를 자

**Table I** – Effect of lepidan on the alkaline phosphatase activity of C3H murine spleen cells

Group	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Enzyme activity <sup>1)</sup>	Stimulation index <sup>2)</sup>
Control	--	$0.10 \pm 0.1$	1.00
LPS	50	$1.04 \pm 0.11$	10.4
ConA	2	$0.29 \pm 0.03$	2.9
lepidan	50	$0.42 \pm 0.05$	4.2
	200	$0.66 \pm 0.11$	6.6
	500	$1.36 \pm 0.04$	13.6

<sup>1)</sup> p-Nitrophenol  $\mu\text{mol/l} \times 10^6$  lymphocytes/60 min =  $1.15 \times \text{O.D.}$  at 405 nm.

Results are means  $\pm$  S. E from three independent experiments

<sup>2)</sup> Stimulation index =  $\frac{\text{Enzyme activity of treated group}}{\text{Enzyme activity of control group}}$

**Table II** – Effect of lepidan on the hemolytic plaque-forming cells in the spleen of normal C3H mice immunized with SRBC

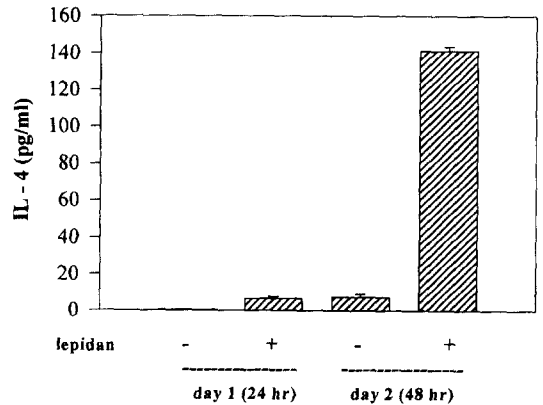
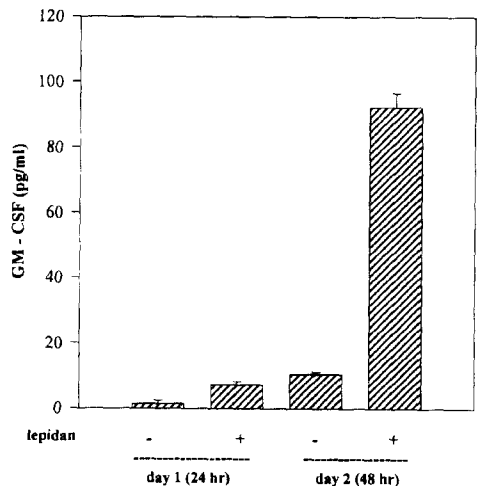
	Control group	Treated group
Spleen index <sup>1)</sup>	1.00	1.24
Spleen cells ( $1 \times 10^6$ )	$32.4 \pm 2.70$	$35.8 \pm 3.10$
PFC/total spleen cells ( $1 \times 10^3$ )	$33.5 \pm 2.40$	$134.9 \pm 5.20^{**}$
Stimulation index	1.00	4.06

<sup>1)</sup> Spleen index =  $\frac{\text{Spleen weight/body weight of treated mice}}{\text{Spleen weight/body weight of control mice}}$

<sup>2)</sup> Stimulation index =  $\frac{\text{PFC of total spleen cells in treated group}}{\text{PFC of total spleen cells in control group}}$

\*\*  $P < 0.05$  (Student's t-test)

극하여 세포독성 T 임파구로 분화하는데 기여하고 기존의 T 임파구에 대하여는 perforin 활성을 상승시키며 임포카인 활성화 세포(Lymphokine-activated killer: LAK)를 자극하여 세포 용혈능(lysis)을 증가시키는데 관여하는 등, 그 영향범위가 B, T 임파구 및 대식세포에까지 이르는 다양한 형태의 면역세포의 성장 분화를 촉진시키는 인자로 알려져 있다.<sup>19)</sup>  $5 \times 10^6$  cells/ $\text{m}^2$ 의 비장세포를 lepidan 500  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 48시간동안의 IL-4 농도를 측정한 결과 143 pg/ml이었으며(Fig. 2) 동일 조건으로 처리한 배양액중의 GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating factor)의 양은 101 pg/ml이었다(Fig. 3). IL-4를 주로 분비하는 세포가 CD4<sup>+</sup> helper T 임파구 또는 말초기관의 T 임파구임을 생각한다면 lepidan에 의한 T 임파구에 대한 lepidan의 작용 또한 앞으로 더 세밀하게 조사하여야 할 과제로 남는다. 과립구 및 대식 세포 전구체와

**Fig. 2** – Effect of lepidan on the secretion of IL-4. The level of IL-4 in the supernatant of cultured murine splenocytes was detected by ELISA kit (Endogen, Inc) after treatment of lepidan (500  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hr and 48 hr, respectively. Values are the mean  $\pm$  standard error of triple determinations.**Fig. 3** – Effect of lepidan on the secretion of GM-CSF. The level of GM-CSF in the supernatant of cultured murine splenocytes were detected by ELISA kit (Endogen, Inc.) after treatment of lepidan for 24 hr and 48 hr, respectively. Values are the mean  $\pm$  standard error of triple determinations.

활성형 대식세포의 증식에 관여하는 GM-CSF의 분비도 증가함을 확인하였는데 GM-CSF의 분비는 그 프로모터의 NF- $\kappa$ B 결합에 의하여 활성화 됨이 알려져<sup>20)</sup> 있으므로 이는 lepidan에 의한 NF- $\kappa$ B 활성의 직접적 결과로 생각된다. 담자균류로부터 분리된 단백질분해효소들은 BRM의 독특한 부류이다. LPS와 같은 세균의 다당체가 숙주에 대하여 발열, shock등의 독작용을 나

타내는데 비해 일반적으로 담자균류로부터 분리된 성분은 생물학적으로 유효한 농도에서 독작용을 나타내지 않는다는 것은 잘 알려져 있다. Suzuki 등에 의한 담암부위에서 lentinan과 LPS의 비교에 관한 연구에서 보고된 바와 같이 LPS에 의해 유도된 대부분의 혈관 반응이 Schwartzman 반응을 나타내는데 비하여 lentinan에 의한 담암부위의 반응은 주로 임파구에 의존적으로 진행된다고 설명하고 있다.<sup>21-22)</sup> lepidan은 B 임파구에 직접 작용하여 휴지기 상태의 세포를 항체를 분비할 수 있는 형질 세포로 증식시키고 분화시킬 수 있는 성분이며 대식 세포에도 작용하여 활성화시키는 작용을 나타내고 있으며 T 임파구와의 상호 작용을 통하여 중요 사이토카인의 분비를 유도할 수 있었다.

## 결 론

1. Lepidan의 대식세포에 대한 nitric oxide 생성능에 관한 효과를 측정하였을 때 IFN- $\gamma$ 와 LPS로 활성화된 대식세포의 nitric oxide생성을 약 2배 정도 증가시켰다.

2. Lepidan은 비장세포의 alkaline phosphatase 및 용혈반 형성 세포수를 증가시켰으므로 B 임파구의 분화와 항체 생성세포 증가 작용을 나타내었다.

3. Lepidan은 비장세포층의 IL-4와 GM-CSF의 분비를 증가시켰다.

## 감사의 글

본 연구비용의 일부는 숙명여자대학교 교비연구비로부터 제공받았기에 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Jin, M., Kim, S., and Kim, B. K. :Induction of B cell proliferation and NF- $\kappa$ B activation by a water soluble glycan from *Lentinus lepideus*. *Int. J. Immunopharmac.* **18**, 439 (1996).
- Johnston, R. B., Keele, B. B., Misra, H. P. and Rajagopalan, K.V. : The role of superoxide anion generation in phagocytic bacterial activity. *J. Clin. Invest.* **55**, 1357 (1975).
- Jan, A. M., Marielle, E. B., Peter, H. N., Pieter, S. H. and Ralph, V. F. : INF- $\gamma$ -induced arginine-dependent toxoplasmatic activity in murine peri-toneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **148**, 568 (1992).
- Henry, Y., C. Ducrocq, J. C. Drapier, C. Pellat and A. Guissani. : Nitric oxide, a biological effector. *Eur. J. Biophys.* **20**, 1 (1991).
- Adach, Y., Okazaki M., Ohno, N., Yadomae, T. : Enhancement of cytokine production by macrophage stimulated with (1  $\rightarrow$  3)  $\beta$ -D glucan grifolan (GRN) isolated from *Grifolium frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1554 (1994).
- Suzuki, M., Higuch, S., Taki, Y., Taki, S., Miwa, K., Hamuro, J. : Induction of endogenous lymphokine-activated killer activity by combined administration of lentinan and IL-2. *Int. J. Immunopharmac.* **12**, 613 (1990).
- Adach, Y., Ohno, N., Ohshawa M., Oikawa, S. and Yadomae, T. : Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked(1  $\rightarrow$  3)  $\beta$ -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 988 (1989).
- Yadomae, T., Suzuki, I., Kumazawa, Y. and Miyazaki, T. : B lymphocyte mitogen extracted from a fungus *Peziza vesiculosa*. *Microbiol. Immunol.* **23**, 997 (1979).
- Yadomae, T., Suzuki, I., Yonekubo, H., Nunomura, K. and Miyazaki, T. : Examination of the mitogenic activity of materials from fungi on murine lymphocyte *in vitro*. *Microbiol. & Immunol.* **23**, 815 (1979).
- Tayeh, M. A. and Marletta, M. A. : Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19654 (1989).
- Green L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131 (1982).
- Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. : Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**, 593 (1986).
- Cunningham, A. J. : Antibody formation studied at the single cell level, Plaque assay for antibody producing cells. *Prog. Allergy.* **17**, 5 (1973).
- Xie, Q., Kashiwabara Y., and Nathan C. : Role of

- transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705 (1994).
- 15) Garcia, R. C., Plaza, A., Diaz, E. F., Kreisler, M. and Martinez, A. C. : Alkaline phosphatase activity as a membrane marker for activated B cells. *J. Immunol.* **129**, 52 (1982).
16. Culvenor, J. G., Harris, A.W., Mandel, T. E., Whitelaw, A. and Ferber, E. : Alkaline phosphatase in hematopoietic tumor cell lines of the mouse, high activity in cells of the B lymphoid lineage. *J. Immunol.* **126**, 1974 (1981).
17. Burg, D. L. and Feldbush, T. L. : Late events in B cell activation, expression of membrane alkaline phosphatase activity. *J. Immunol.* **142**, 381 (1989).
- 18) Jeppson, J. D. Patel, H. R., Sakata, N., Domenico, J., Terada, N., and Gelfand, E. W. : Requirement for dual signals by anti CD-40 and IL-4 for the induction of NF- $\kappa$ B, IL-6, and IgE in human B lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 1738 (1998).
- 19) Lui, C. C., Joag, S. V., and Young, J. D. : Induction of perforin and serine esterase in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J. Immunol.* **144**, 1196 (1990).
- 20) Bloom M., Toll, A. T., Kok, P. T., Koenderman, L., Ross, D. and Verhoeven, A. J. : Granulocyte-macrophage stimulating factor, interleukin-3 (IL-3) and IL-5 greatly enhance the interaction of human eosinophils with opsonized particles by changing the affinity of complement receptor type 3. *Blood* **83**, 2978 (1994).
- 21) Hamuro, J. and Chihara, G. : In Immune modulation Agent and their mechanisms, pp 409-437 *Marcel Dekker, New York* (1984).
- 22) Suzuki, M., Tokatsuki, F., Maeda, Y. Y., Hamuro, J., and Chihara, G. Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS. *Int. J. Immunopharmac.* **16**, 463 (1994).