

영지의 β -glucan성 다당류에 의해 활성화된 흰쥐 간내 Kupffer 세포의 NO, TNF- α 및 TGF- β 형성

한만덕* · 이준우¹ · 정 훈¹ · 김용석¹ · 나수정 · 윤경하²
김천대학 치위생과, ¹일양약품 중앙연구소, ²순천향대학교 생명과학부

Nitric Oxide, TNF- α and TGF- β Formation of Rat Kupffer Cell Activated by the β -Glucan from *Ganoderma lucidum*. Han, Man-Deuk*, June-Woo Lee¹, Hoon Jeong¹, Yong-Seok Kim¹, Su-Jung Ra, and Kyung-Ha Yoon². Department of Dental Hygiene, Kim-cheon College, Kim-cheon 740-200, Korea, ¹Biotechnology Lab, Il Yang Pharm. Co., Ltd., Kyunggi 449-900, Korea, ²Division of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 347-400, Korea - Ganoderan (GAN), an immunomodulating β -glucan from mushroom *Ganoderma lucidum*, was evaluated for its ability to induce formation of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor (TGF- β) from rat Kupffer cell *in vitro*. Hepatic macrophages activated by GAN significantly elevated concentration of NO and TNF- α in cultured medium, but not significantly elevated that of TGF- β . GAN-activated Kupffer cells secrete 14.9 μ M ($p < 0.01$) of NO and 2619.5 μ g/ml ($p < 0.01$) of TNF- α after 36 hr of incubation at 37°C. The results revealed that GAN enhanced 4-fold production of NO and 19 fold formation of TNF- α compared to the control. The proliferation of GAN-activated Kupffer cells was inhibited as compared with its negative control. Comparing the activity among glucans derived from microorganisms, highly branched zymosan, glucomannan from *Saccharomyces cerevisiae*, significantly increased TNF- α and NO production. These results indicate that the β -glucan from *G. lucidum* activates rat Kupffer cell and secretes NO and TNF- α . It also suggest that rat Kupffer cell posses certain receptor for β -anomeric glucan.

Key words: β -glucan, Kupffer cell, nitric oxide, tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β

대식세포는 비특이적 면역반응으로 숙주에 침입한 이물질을 1차적으로 방어하는 세포이다[6]. 대식세포의 주요 면역반응은 반응중간 대사물질 및 cytokine 생성, 그리고 phagocytosis 경로 등이 있다. 반응 중간대사물질로는 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 및 singlet oxygen 등과 같은 반응 산소 대사산물(reactive oxygen intermediates, ROI)[2, 11]과 반응 질소대사산물(reactive nitrogen intermediate, RNI)[19]을 형성하며, cytokine으로는 TNF[16], interferon- α/β 및 IL-1[26]과 같은 물질을 분비하여 면역과정을 증대하거나 직접적으로 관여한다.

특히 간의 sinusoid에 존재하는 Kupffer cell은 생체내 대식세포의 원동력이며[23] 체내 이물질을 제거하는 중요한 역할을 한다. Kupffer cell의 nitric oxide(NO) 형성에 관한 연구는 Billiar 등에 의해 보고되었다[4]. 그들은 고농도의 lipopolysaccharide(LPS, 10 μ g/ml)로 Kupffer cell를 활성화시킬 때 생물학적 활성물질인 NO가 생성

되는 것을 확인하였다. 특히 Kupffer cell은 다른 비실질 간세포(nonparenchymal cell)인 미세혈관의 내피(sinusoidal microvascular endothelial)세포와 밀접한 관계를 가지고 있어 Kupffer cell에서 생성된 NO는 내독소에 의한 간 손상(예, endotoxemia) 뿐만 아니라 간섬유화 억제 또는 간세포내 혈관확장 등을 통하여 간암의 전이를 억제시킨다는 보고가 있다[10, 27]. TNF- α 는 항암 활성을 증대하는 cytokine으로서 종양 괴사 작용 이외에 호중구 기능조절, myeloid cell 분화 촉진, osteoblast 활성화, class I 및 II의 MHC Ag발현의 변경, B cell 증식, angiogenesis의 유도 및 대식세포활성 기능이 있다[3]. 특히 TNF- α 는 정상세포와는 무관하게 종양, salmonellosis, 그리고 바이러스에 감염된 세포를 인지하여 살해시킬 수 있는 능력이 있다[21, 7]. TGF- β 는 림프구, 혈소판, 대식세포에서 분비되는 분자량이 25,000의 monopeptide성 cytokine으로 주로 염증과 조직 손상을 상처 치유와 관련된 섬유화 유도에 관여하는 cytokine이다[8]. Kupffer cell에서의 TGF- β 생성에 관한 연구는 아직까지 많은 연구가 이루어지지 않았으나 Roland에 의하면 TGF- β 는 여러 cytokine과 함께 Kupffer cell에서 생

*Corresponding author
Tel. 82-547-420-4161, Fax. 82-547-420-4060
E-mail: mdhanpro@chollian.net

성되는 것으로 보고되었다[23].

지금까지 대식세포의 활성화인자로 연구된 주요 물질로는 그람음성균의 LPS, *Mycoplasma* sp., lymphokine, interferon, tumor-cell membrane 등이 있다[1]. 그러나 LPS는 독성이 강하여 의약품으로 이용되기 어렵고, 여러 cytokine들은 그 제조과정이 복잡하여 개발이 지연되고 있다. 그러나 담자균류의 항암성 다당류는 간세포에 독성이 나타나지 않는 물질로서 간장질환 치료제로 이용 가능성이 높은 물질이다[18]. 따라서 본 연구는 간세포에 독성이 없는 영지의 β -glucan 다당류(ganoderan) [12-14]를 이용하여 Kupffer cell의 활성정도를 확인하고자 한다. Kupffer cell의 활성지표로는 산화질소(NO)와 TNF- α 및 TGF- β 와 같은 cytokine을 대상으로 측정하였다.

재료 및 방법

시약

RPMI 1640 및 fetal calf serum은 Gibco(Grand Island, N. Y)사의 것을 사용하였으며, gentamicin, cefotaxime, LPS(*E. coli* 011: 4B), IFN- γ , NaNO₂ 등은 Sigma사(St. Louis, M.O)의 제품을 사용하였다. mTNF- α ELISA kit는 Genzyme(Factor-Test-X, Boston, MA), TGF- β 의 항체는 Promega사의 제품을 사용하였다. Kupffer cell 활성화인자로 사용한 양성대조물질 yeast's zymosan A와 β -glucan(from *Pleurotus ostreatus*)은 Sigma사에서 구입하였다.

실험동물

Wistar계 웅성 흰쥐는 180~220 g의 것을 삼육축산으로부터 구입하여 사용하였다. 마우스의 사육조건으로 실험동물실 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55~60%로 유지하였으며, 마우스용 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

실험균주 및 배지

본 실험에서 Kupffer cell의 활성물질로 사용한 β -glucan성 다당류(GAN)는 담자균류인 영지(*G. lucidum*)의 균사체에서 분리하였다. 영지균사체의 보존용 배지는 potato dextrose agar배지를 사용하였으며, 배양용 배지는 2% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.5% K₂HPO₄, 0.001% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O이 포함된 배지(IYSM)를 사용하였다.

균사체 배양 및 β -glucan성 다당류 분리 및 분자량 측정

IYSM 배지를 발효조(Marubishi, MD300)에 넣고, pH 4.5로 조정된 후 1.5기압에서 20분간 고압 멸균하였

다. 여기에 potato dextrose broth에서 전 배양한 *G. lucidum* 균사체를 10%(v/v) 접종하였다. 이때 working volume은 3L이며, 교반속도는 300 rpm, 통기량은 1 vvm으로 하여 27 $^{\circ}$ C에서 6일간 배양하였다. 배양중 pH 조정액은 0.5N NaOH, 소포제로는 silicone resin을 사용하였다. 균사체 배양물에 NaOH를 가해 최종 농도가 2N이 되게 조정된 다음 실온에서 24시간 방치 한 후, 빙초산으로 중화(pH 7.0)시켜 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 한외여과막(membrane, MW 10,000)을 이용하여 10 kD 이상의 다당류를 얻었으며, 이후 1500배 물을 첨가하여 한외여과를 행한 후 동결 건조하여 Ganoderan(GAN, β -glucanic polysaccharide obtained from *G. lucidum*)을 얻었다. GAN의 분자량을 확인하기 위하여 column chromatography는 Sepharose CL-4B로 충전시킨 column(1.6 \times 52 cm)에 시료 10 mg을 1 ml의 0.3N NaOH를 용해시켜 200 μ l를 loading하였다. 이 때의 유속은 1 ml/10 min이었고, fraction volume은 2 ml로 하였다. 용출된 분획들은 phenol-sulfuric acid method를 이용하여 당을 측정하였으며, 여러 가지의 표준 dextran을 이용하여 분자량을 결정하였다.

간세포의 분리

Rat의 간세포분리는 Seglen 방법[24]을 변형하여 수행하였다. 즉 rat(200~250 g, S-D, 웅성)를 pentobarbital(Ca. 40 mg/kg)과 heparin(5000 IU/ml)을 주사시킨 후 무균적으로 복강을 열고, Ca²⁺ free buffer(NaCl 142 mM, KCl 67 mM, NaOH 6 mM, HEPES 10 mM, pH7.5)를 portal vein을 통해 5 ml/min의 속도로 흘려 보냈다. 이때 inferior vena cava를 가위로 절개하여 혈액이 흘러나오게 하고, 점차 pumping 속도를 15 ml/min까지 증가시켜 150 ml을 흘려 보내면서 남아 있는 혈액을 씻어 내었다. 이후 collagenase(0.01%)와 CaCl₂ 5 mM가 함유된 buffer(NaCl 68 mM, KCl 67 mM, NaOH 7 mM, HEPES 100 mM, pH 7.6)를 10 ml/min 속도로 perfusion시켜 10분간 순환시켰다. 간조직의 Glisson capsule이 깨지면서 세포액이 흘러나오기 시작하면 perfusion을 중단시킨다. 간을 분리하여 1.5% bovine serum albumin이 포함된 100 ml의 Ca²⁺ free buffer에 옮긴 다음 세절하여 nylon mesh로 여과하여 간세포를 분리하였다.

Kupffer cells의 분리, 배양 및 시료의 투여

간세포들로부터 Kupffer cell의 분리는 Rymsa 등이 사용한 방법[22]을 변형하여 수행하였다. 앞서 분리된 간세포에서 Kupffer cell과 endothelial cells를 분리하기 위하여 세포액을 1.5% bovine serum albumin이 포함된 Ca²⁺ free buffer에 넣고 8 $^{\circ}$ C에서 3회 반복 원심분리

(50×g, 2분)하여 세척하였다. Nonparenchymal 조직 (endothelial cell과 Kupffer cell)을 함유하는 상층액과 cell debris를 다시 10분간 300×g로 원심분리하였다. Pellet는 RPMI 1640 medium(+2 mM L-glutamine, 100 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml cefotaxime, 5 µg/ml amphotericin B)으로 재 현탁시킨 후 37°C, 5% CO₂/95% air에서 30분간 배양시켜 uncoated culture flask에 넣었다. 이때 culture flask의 표면에 부착되는 것이 Kupffer cell이고 부착되지 않는 것은 endothelial cell로 부착된 Kupffer cell을 실험에 이용하였다. Kupffer cell은 실험 시작전 48시간 동안 배양하였으며 Kupffer cell의 생존율은 trypan blue 염색액 0.9 ml과 0.1 ml의 세포액을 섞어 haemocytometer를 이용하여 측정하고 85%이상의 생존율이 있을 때 실험에 이용하였다.

48시간 동안 전 배양된 세포를 RPM 1640 배양액으로 4×10⁵ cells/ml되게 희석한 후 96-multiwell plate에 각각 분주하였다. 이를 5% CO₂ incubator에 넣어 37°C에서 2시간 동안 배양하여 간세포를 바닥에 부착시킨 후 상층액을 제거하고 각각의 well에 신선한 RPMI 1640 배지를 180 µl씩 넣었다. β-glucan과 관련된 여러 시료는 농도별로 조제하여 multiwell당 20 µl씩 투여하여 대식 세포의 활성을 유도하였다.

NO의 측정

대식세포에 의해 형성되는 NO의 정량은 Ding 등[9]의 방법에 따라 실행하였으며, 세부적인 실험과정은 한 등의 방법[12]과 동일하게 시행하였다. 간략하면 100 µl의 배양액과 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylene dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 섞고 실온에서 방치한 후, ELISA reader를 이용해 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하여 얻었다.

TNF-α의 측정

Kupffer cell 배양물내의 TNF-α 정량은 multiple antibody sandwich 원리(Genzyme, Cat No. Factor-Test-X)를 이용한 solid-phase ELISA 방법을 통하여 측정하였다. 즉 4×10⁵ cells/ml로 조정된 Kupffer cell 배지에 여러 활성화인자들을 가하고 36시간 동안 배양한 후 배양 상층액을 수확하여 원심분리를 하였다. 원심분리를 통해 얻어진 상층액은 즉시 채취하여 -70°C에서 동결 보관한 후 실험에 이용하였다. 정량법을 간략하면, monoclonal anti-mTNF-α가 pre-coated되어 있는 96-well microtiter plate에 50 µl의 dilution buffer를 넣고 여러 자극물로 활성화된 Kupffer cell 배양상층액을 50 µl를 가하여 test sample내에 존재하는 TNF-α와 결합시켰다. 시료를 첨가한 후 37°C에서 3시간 30분 동안 반응시

킨 후, washing buffer로 4회 수세하여 결합되지 않은 물질을 제거시켰다. 다시 peroxidase-conjugated polyclonal anti-mTNF-α(HRP-conjugate)를 첨가하여 이미 결합된 mTNF-α와 결합시켰다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 결합하지 않은 물질을 제거하기 위하여 microplate를 4회 수세하고, 기질액을 가하여 peroxidase와 촉매반응을 유도시켜 발색시켰다. 효소의 반응을 정지시키기 위하여 100 µl의 반응 정지액을 넣었다. 반응 정지후 30분 이내에 ELISA reader(Bio-Tek instrument, Inc. Ceres UV. HDi)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료속의 mTNF-α 양은 표준 mTNF-α의 농도에 따라 얻어진 흡광도를 plotting하여 산출하였다.

TGF-β의 측정

활성화된 Kupffer cell의 배양물에 존재하는 TGF-β의 양은 antibody sandwich 방법[14]으로 수행하였다. 간략하면 anti-TGF-β mAb를 4°C에서 14~18시간 동안 96 microplate well에 coating하였다. Blocking buffer로 37°C에서 35분간 coating된 well을 blocking시킨 후 TGF-β의 양을 1000 pg/ml부터 연속 희석하여 500, 250, 125, 62, 31, 15.6, 0 pg/ml이 되도록 하여 표준곡선을 준비하였다. 나머지 well에 sample을 acid로 활성화시켜 측정 가능한 농도로 희석한 후, 각 well당 100 µl씩 넣어 상온에서 90분 동안 항원-항체반응을 시켰다. 반응액에 HRP (horse radish peroxidase)로 conjugation된 2차 antibody를 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 효소 기질과 TMB용액을 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Kupffer cell 증식 측정

활성화된 Kupffer cell의 증식은 MTT 방법[20]을 변형하여 측정하였다. 96 well에 배양된 세포 상층액 버리고 각 well에 10 µl MTT solution(5 mg/ml)을 넣어서 37°C에서 4시간 방치하였다. 배양액을 버리고 100 µl DMSO(100%)을 넣어서 soluble debris가 완전히 녹을 때까지 microplate reader(Ceres UV900 HDi, U.S.A.)에서 5분간 shaking한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 처리

실험의 결과는 2회의 반복실험을 통해 얻은 수치를 통계처리하여 means±S.E.를 구했고, 유의성의 확인은 Student's t-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

Ganoderan(GAN)의 분자량

G. lucidum 균사체로부터 얻은 β-glucan성 다당류,

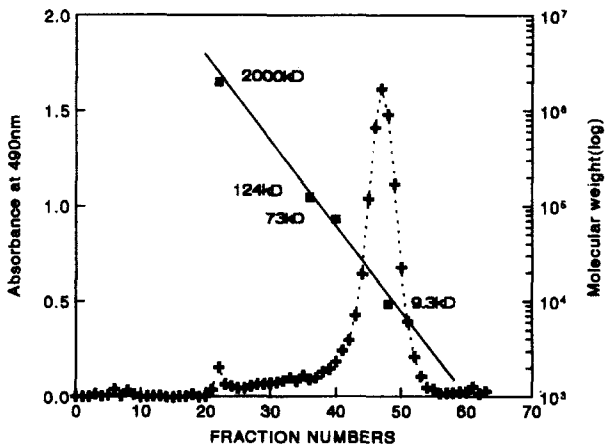


Fig. 1. Gel filtration patterns of ganoderan (GAN). The GAN was obtained from the mycelium of *G. lucidum* by alkali extraction method. The volume of each fraction was 2 ml. The elutes were checked by measuring absorbance at 490 nm after phenol-sulfuric acid reaction for carbohydrates.

GAN이 Kupffer cell의 활성을 알아보기 전 이들의 평균 분자량을 확인하였다. Sepharose CL-4B를 이용하여 column chromatography를 실행한 결과 Fig. 1과 같은 chromatogram을 얻었으며 이때 표준 분자량이 2,000, 124, 73 그리고 9.3 kD를 갖는 dextran을 사용하여 분자량을 산출하였다. GAN은 분획 번호 45~50에서 최대 피크를 보였으며 이들의 평균 분자량은 약 10 kD이었다.

Nitric oxide 형성

지금까지 보고에 의하면 복강 대식세포 및 Raw 264.7과 같은 대식세포는 IFN- γ 와 LPS 등에 의해 활성화되어 배지내에 소량의 NO를 생성하는 것으로 알려졌으나 [27], 본 실험 결과 담자균류에서 유래된 β -glucan성 다당류 역시 간세포내 Kupffer cell을 자극하여 NO의 생성을 촉진하였다. 각각의 β -glucan성 다당류를 Kupffer cell 배양액에 25 μ g/ml 및 5 μ g/ml의 두 농도로 투여하였을 때 Fig. 2와 같이 2.7~14.9 μ M의 NO를 생성하였다. NO의 생성 정도는 GAN, zymosan A, 그리고 β -glucan(Sigma Co. product, from *Pleurotus ostreatus*)순이었다. 특히 GAN으로 활성화된 NO의 양(14.1 μ M)은 지금까지 알려진 대식세포 활성화물질인 LPS(14.9 μ M)보다 약간 낮았지만, 상대적으로 다른 다당류보다 높은 활성을 보였다. GAN의 평균 분자량은 약 1만의 β -linkage를 갖는 glucan이다. 효모로부터 추출된 zymosan A는 25 μ g/ml의 농도로 투여했을 때 12.6 μ M의 NO생성을 유도하였는데 이는 효모의 세포벽 성분 역시 Kupffer cell로부터 NO를 형성시킨다는 것을 나타낸다. 이같은 결과를 종합하면 Kupffer cell을 활성화하여 NO의 형성이 우수한 다당류의 조건은 다음과 같다. 즉 첫째,

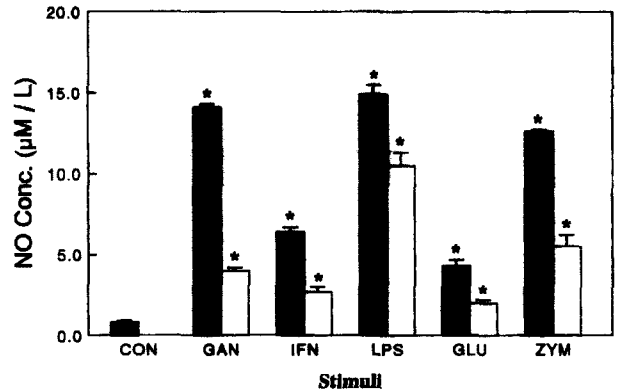


Fig. 2. Nitric oxide secretion of Kupffer cells activated by stimuli. GAN was obtained by alkali extraction method from the mycelium of *G. lucidum*.

Kupffer cells(4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with 25 (dark bar) or 5 μ g/ml (blank bar) of glucans, 10IU/ml (dark bar) or 1IU/ml (blank bar) of IFN- γ and 1 μ g (dark bar) or 0.1 μ g/ml (blank bar) of LPS, respectively. The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Each bar represents the mean \pm S.E of two independent experiments done in triplicate. The significance of differences as compared with the control. * $P < 0.01$. Abbs: GAN; ganoderan, IFN- γ ; mouse interferon gamma, LPS: lipopolysaccharide (*E. coli* 011: 4B).

선상의 다당류보다는 β -linkage로 이루어진 분지된 polymer, 둘째 순수한 glucose로 구성된 다당류보다는 glucan에 이중의 다당류(mannose, galactose)가 함유된 다당류(예, GAN 및 zymosan), 셋째 완전한 수용성 glucan보다는 비수용성 glucan일수록 Kupffer cell을 활성화하여 NO의 생성을 증가시켰다.

GAN의 농도에 따른 Kupffer cell의 NO 생성

여러 β -glucan성 다당류로 Kupffer cell을 활성화 시킨 결과 *G. lucidum* 균사체로부터 얻은 GAN은 NO의 분

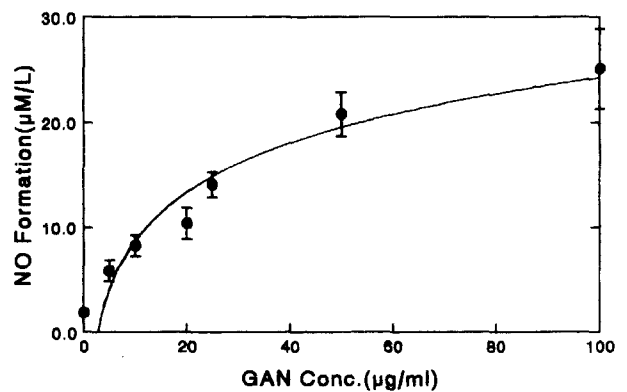


Fig. 3. Nitric oxide formation of Kupffer cell on GAN concentration. Kupffer cells (4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with GAN from 0 μ g/ml to 100 μ g/ml. The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Each closed circle represents the mean \pm S. E.

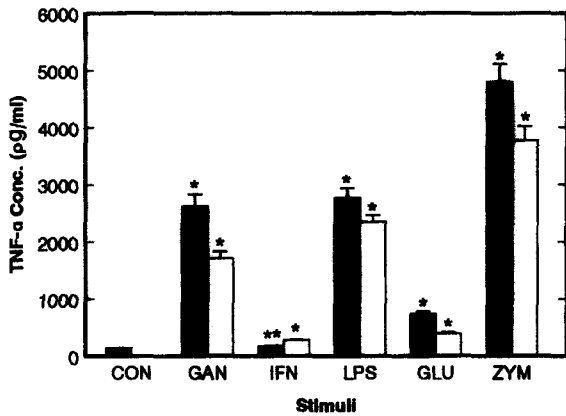


Fig. 4. TNF- α secretion of Kupffer cell activated by stimuli. Kupffer cells (4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with 25 (dark bar) or 5 μ g/ml (blank bar) of polysaccharides, 10 IU/ml (dark bar) or 1 IU/ml (blank bar) of IFN- γ and 1 μ g (dark bar) or 0.1 μ g/ml (blank bar) of LPS, respectively. TNF- α concentration was measured by ELISA kit. Each bar represents the mean \pm S.E. of two independent experiments done in triplicate. The significance of differences as compared with the control. *P<0.01. **P<0.05.

비를 상대적으로 많이 유도하였다. GAN을 농도별로 Kupffer cell에 처리하였을 때, Fig. 3에서와 같이 10 μ g/ml 농도에서는 8.3 μ M의 NO가 생성되었으며, 50 μ g/ml의 농도에서는 20 μ M의 NO를 생성시켜 농도에 비례하여 증가되었다.

TNF- α 생성

Monokine인 TNF는 여러 면역 활성을 중재하는 단백질로서 활성화된 대식세포에 의해 주로 분비된다. 지금까지 대식세포로부터 TNF의 생성을 유도하기 위하여 IFN- γ 및 LPS를 사용하여 왔으나 본 연구에서는 간세포의 Kupffer cell이 β -glucan에 의해서 촉진되는지에 대하여 알아보기 위해 ELISA를 통하여 TNF- α 의 양을 정량하였다. IFN와 LPS와 같은 대식세포 활성화인자와 함께 β -glucan을 Kupffer cell에 처리하고 TNF의 양을 측정 한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군(medium only)에서는 138.9 pg/ml의 TNF- α 가 정량 되었으나, GAN(25 μ g/ml)에서는 2619.5 pg/ml의 TNF- α 가 생성 되어 약 19배의 생성 증가를 나타내었다. LPS역시 대조군에 비해 20배의 TNF- α 생성 증가를 보였다. 그러나 IFN- γ 로 활성화된 Kupffer cell은 NO의 생성과 마찬가지로 대조군에 비해 큰 증가를 보이지 않았으나 LPS는 가장 높은 생성 효과를 보였다. 대조군으로 사용한 Sigma 사의 β -glucan(from *Pleurotus ostreatus*)은 25 μ g/ml의 농도에서 739.4 pg/ml의 TNF- α 을 생성하여 낮은 활성을 보였다.

GAN의 농도에 따른 Kupffer cell의 TNF- α 생성

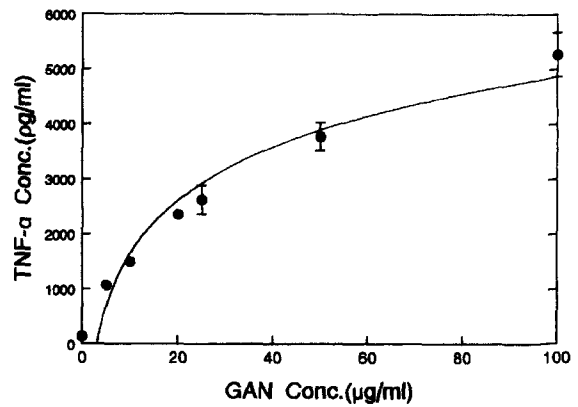


Fig. 5. TNF- α secretion of Kupffer cell on the GAN concentration.

Kupffer cells (4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with GAN from 0 μ g/ml to 100 μ g/ml. The supernatants were collected and assayed for TNF- α production. Each closed circle represents the mean \pm S.E. of two independent experiments done in duplicate.

여러 β -glucan성 다당류로 Kupffer cell을 활성화 시킨 결과 *G. lucidum* 균사체로부터 얻은 GAN이 TNF- α 의 분비를 상대적으로 많이 유도하였다. GAN을 농도별로 Kupffer cell에 처리하고 36시간 동안 배양하여 배지 내 TNF- α 의 농도를 측정 한 결과 Fig. 5와 같다. GAN의 농도가 10 μ g/ml의 농도에서는 1492.9 pg/ml의 TNF- α 가 생성되었으며 농도에 따라 증가하여 100 μ g/ml의 GAN 농도에서는 5265.5 pg/ml의 TNF- α 를 생성시켜 농도에 의존적으로 나타났다. 이같은 결과를 NO의 생성과 비교해 볼 때, NO의 생성을 증가시킨 물질은 TNF- α 의 생성 역시 증가시켰다. 이는 NO와 TNF- α 의 생성 기전이 유사한 receptor의 공유, 유사한 발생 기전, 또는 유전자 발현기전의 동질성에 의한 것으로 여겨진다. 특히 NO 및 TNF- α 의 생성증가는 GAN의 농도에 의존적으로 증가하는 것으로 보아 receptor에 수용되어 생성되는 것으로 여겨진다. 이를 뒷받침 해줄 수 있는 연구로는 대식세포막에 mannose 및 N-acetylglucosamine 그리고 glucose에 대한 수용체가 존재하는 것이 확인된 바 있다[27, 16]. 따라서 고등균류의 세포벽 성분인 β -1,3 glucan은 대식세포의 표면 수용체와 결합할 수 있고 일련의 활성과정을 유발시킬 수 있을 뿐만 아니라 대식세포내로 함입되어 NO 및 TNF- α 의 양적 증가를 유발시키는 것으로 여겨진다.

TGF- β 생성

β -glucan성 다당류인 GAN으로 활성화된 Kupffer cell의 TGF- β 생성능을 확인하기 위해 ELISA로 정량하였다. IFN과 LPS와 같은 대식세포 활성화인자와 β -glucan성 다당류를 Kupffer cell에 처리하여 활성화시킨 후

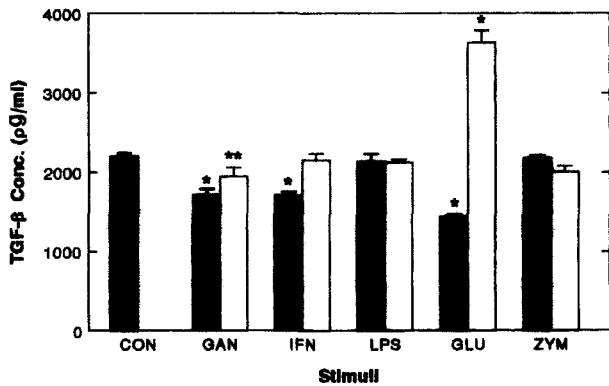


Fig. 6. TGF-β concentration in the culture of Kupffer cells activated by stimuli. Kupffer cells (4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with 25 (dark bar) or 5 μg/ml (blank bar) of glucans, 10 IU/ml (dark bar) or 1 IU/ml (blank bar) of IFN-γ and 1 μg (dark bar) or 0.1 μg/ml (blank bar) of LPS, respectively. TGF-β concentration was measured by ELISA. Each bar represents the mean ± S.E of two independent experiments done in triplicate. The significance of differences as compared with the control, *P < 0.01. **P < 0.05.

배지로 분비된 TGF-β의 양은 Fig. 6과 같이 대조군 (medium only)에서는 2194.6 pg/ml의 TGF-β가 측정되었으나, GAN(25 μg/ml)으로 활성화된 세포는 1711.0 pg/ml이 생성되어 음성 대조군보다 약 12% 감소하였다. LPS는 대조군에 비해 거의 유사한 TGF-β생성을 보였으며 IFN-γ는 10 IU/ml에서는 1705.6 pg/ml으로 대조군보다 약 13%의 농도가 감소하였으나 1 IU/ml에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. Sigma사의 β-glucan (from *Pleurotus ostreatus*)은 25 μg/ml의 농도에서 1439.6 pg/ml의 TGF-β를 생성하였다. 따라서 Kupffer cell의 TGF-β 생성은 자극물의 종류에 따라 그리고 농도에 따라 차이가 나는 것으로 나타내었다.

Kupffer cell growth 측정

여러 자극물로 활성화된 Kupffer cell의 세포증식 정도를 확인하기 위해 36시간 동안 배양한 후 MTT 방법으로 측정하였다. Kupffer cell의 세포증식은 시료를 가하지 않은 대조군 (medium only)의 생장률을 100%로 하고, GAN 및 그 외 다당류와 함께 배양된 Kupffer cell들의 세포증식을 확인한 결과 Fig. 7과 같이 25 μg/ml의 투여군에서는 대조군보다 약 12%의 세포증식이 감소한 88.1%였으며, 5 μg/ml의 시료 투여군에서는 8%가 감소한 92%였다. 특히 LPS의 경우 낮은 농도에서도 세포증식이 억제되었으며, 자극물의 투여 농도가 높을 수록 Kupffer cell의 세포증식은 억제되었다. 이같은 결과는 독성을 나타내지 않는 GAN이 Kupffer cell을 자극하여 면역 활성을 증대하는 TNF-α 및 NO의 발현을 촉진시키는 반면, collagen의 합성을 시발시키는 TGF-β의 발

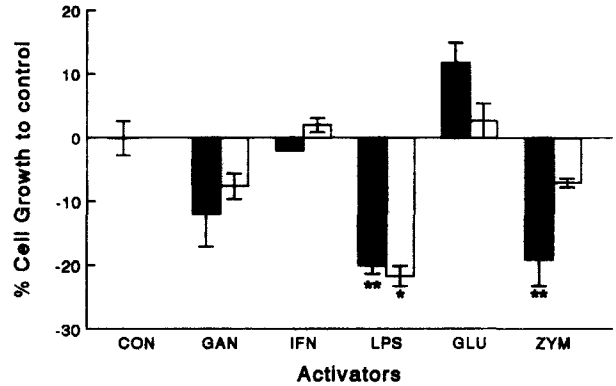


Fig. 7. Inhibition rate (%) of cell proliferation of Kupffer cells upon the stimuli. Kupffer cells (4×10^5 cells/ml) were cultured for 36 h in RPMI 1640 with 25 (dark bar) or 5 μg/ml (blank bar) of glucans, 10 IU/ml (dark bar) or 1 IU/ml (blank bar) of IFN-γ and 1 μg (dark bar) or 0.1 μg/ml (blank bar) of LPS, respectively. After 36 h culture, the cell proliferation was determined by MTT method. Each bar represents the mean ± S.E of two independent experiments done in duplicate. Inhibition was calculated in the percentage of viability in the corresponding control cultures which no stimuli had been added (100% viability). The significance of differences as compared with the control, *P < 0.01. **P < 0.05.

현은 억제하는 것으로 여겨지며, 이때 Kupffer cell의 증식이 저하되는 것은 β-glucan이 세포 증식 (proliferation) 보다는 세포 분화 (differentiation) 쪽으로 유도시키는 것으로 사료된다.

요 약

항암 및 간보호작용이 있는 영지의 β-glucan성 다당류 (GAN)와 몇 가지 미생물 유래 다당류를 이용하여 흰쥐의 간내 Kupffer cell을 활성화시킨 후 산화질소(NO), 종양괴사인자-α(TNF-α) 및 transforming growth factor-β(TGF-β)의 형성을 확인하였다. GAN로 활성화된 Kupffer cell은 GAN의 농도에 의존적으로 NO와 TNF-α를 형성하였으나, TGF-β의 생성은 촉진하지 않았다. 즉, GAN과 함께 37℃에서 36시간 동안 배양된 Kupffer cell은 14.9 μM(p<0.01)의 NO와 2619.5 pg/ml(p<0.01)의 TNF-α를 생성시켜, 대조군보다 4배의 NO와 19배의 TNF-α를 증가시켰다. 양성 대조물질로 사용된 다당류 가운데 효모의 zymosan 역시 상대적으로 높은 Kupffer cell활성을 보였다. 또한 여러 자극물들에 의해 활성화된 Kupffer cell은 NO와 TNF-α의 생성이 많을 경우 대조군에 비해 증식이 현저하게 낮았으나, TGF-β의 생성이 많으면 증식이 증가하였다. 이러한 결과로 보아 영지의 β-glucan은 간장(liver)의 대식세포인 Kupffer cell을 활성화시켜 산화질소 및 TNF-α의 형성을 촉진시키는 물질이었다.

REFERENCES

1. Adams, D. O. and T. A. Hamilton. 1984. The biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 283–318.
2. Adamson, I. Y. and D. H. Bowden. 1988. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to induction of pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **130**: 377–383.
3. Agarwal, S., B. E. Drysdale, and H. S. Shin. 1988. Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involved ADP-ribosylation. *J. Immunol.* **140**: 4187–4192.
4. Billiar, T. R., R. D. Curran, F. K. Ferrari, D. Z. Williams, and R. L. Simmons. 1990. Kupffer cell: Hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J. Sur. Res.* **48**: 349–353.
5. Chun, Q. C., J. Assreuy, D. Xu, I. Charles, F. Y. Liew, and S. Moncada. 1993. Repeated induction of nitric oxide synthetase and leishmanicidal activity in murine macrophage. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1385–1388.
6. Decker, K. 1990. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192**: 245–261.
7. Decker, T., M. J. Lohmann-Matthes, and G. Gifford. 1987. Cell associated tumor necrosis factor(TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophage. *J. Immunol.* **138**: 957–962.
8. Derynck, R., J. A. Jarrett, and E. A. Chen. 1985. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**: 701.
9. Ding, A. J., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **144**: 2407–2413.
10. Furchgott, R. F. and P. M. Vanhoutte. 1989. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **139**: 19–30.
11. Halliwell, B. and J. M. C. Cuttidge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical J.* **219**: 1–14.
12. Han, M. D., E. S. Lee, Y. K. Kim, J. W. Lee, H. Jeong, and K. H. Yoon. 1998. Production of nitric oxide in Raw 264.7 macrophages treated with Ganoderan, the β -glucan of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **26**(2): 246–255.
13. Han, M. D., H. Jeong, J. W. Lee, S. J. Back, S. U. Kim, and K. H. Yoon. 1995. The composition and bioactivities of Ganoderan by mycelial fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* **23**(4): 285–297.
14. Han, M. D., J. W. Lee, H. Jeong, S. K. Chung, S. Y. Lee, and K. H. Yoon. 1995. The effects of carbon sources on antitumor and anticomplementary activities of Ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Mycol.* **23**(3): 209–225.
15. Hornbeck, P. 1994. *Current Protocol in Immunology*, Unit 2.1. R. Coico (ed.). John Willey & Sons, Inc.
16. Ichinose, Y., O. Bakouche, T. Y. Tsao, and I. J. Fildler. 1988. Tumor necrosis factor and IL-1 associated with plasma membrane of activated human monocytes lyse monokine-sensitive but not monokine-resistant tumor cells whereas viable activated monocytes lyse both. *J. Immunol.* **141**: 512–518.
17. Konopski, Z., R. Seljelid, and T. Eskeland. 1994. IFN- γ inhibits internationalization of soluble aminated β -1,3-D-glucan by macrophages and thereby down-regulation the glucan induced release of TNF- α and IL-1. *Scan. J. Immunol.* **40**: 57–63.
18. Lee, K. H., J. O. Lee, J. W. Lee, H. Jeong, M. D. Han, J. H. Jeong, and D. W. Oh. 1994. Pharmacological, toxicological studies of antitumor polysaccharides obtained from *G. lucidum* IY009. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(2): 182–189.
19. Moncada, S. and A. Higgs. 1993. The arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* **329**(27): 2002–2012.
20. Mosmann, T. 1985. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63.
21. Nakano, Y., K. Onozuka, Y. Terada, H. Shinomiya, and M. Nakano. 1990. Protective effect of recombinant tumor necrosis factor- α in murine salmonellosis. *J. Immunol.* **144**: 1935–1941.
22. Rymsa, B., C. Micael, and W. Bores. 1990. Reaction of NO with O₂⁻. Implication for the action of endothelial derived relaxation factor (EDRF). *Free Rad. Res. Commun.* **10**: 221–226.
23. Roland, C. R., J. A. Goss, M. J. Mangino, D. Hafenrichter, and M. W. Flye. 1994. Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products: A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , and nitric oxide. *Annals of Surgery* **219**(4): 389–399.
24. Seglen, P. O. 1973. Preparation of isolated rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp. Cell Res.* **82**: 391–398.
25. Sung, J., R. S. Nelson, and S. C. Silverstein. 1983. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* **96**: 160–166.
26. Suttles, J., J. G. Giri, and S. B. Mizel. 1990. IL-1 secretion by macrophages. Enhancement of IL-1 secretion and processing by calcium ionophores. *J. Immunol.* **144**: 175–182.
27. Williams, D. A., E. R. Sherwood, R. B. McNamee, E. L. Jones, and N. R. Di Luzio. 1985. Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease. *Hepatology* **5**(2): 198–206.

(Received October 22, 1998)