

Agrobacterium sp. R259 KCTC 10197BP로부터 생산된 β -1, 3-glucan의 면역 활성 효능

심정현 · 최원아* · 상병찬** · 윤도영#

한국생명공학연구원 세포생물학연구실, *(주)더멋진 바이오텍, **충남대학교 낙농학과
(Received October 24, 2002; Revised November 20, 2002)

Immune Stimulating Efficacy of Insoluble β -1, 3-glucan from *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP

Jung-Hyun Shim, Won-A Choi*, Byung-Chan Sang** and Do-Young Yoon#

Laboratory of Cellular Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Yuseong, P. O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea

*DMJ Biotech Corp., Sinsung Dong 100, Taejeon 305-345, Korea

**Department of Dairy Science, Chung-Nam National University, 220 Kung-Dong, Taejeon 305-764, Korea

Abstract — β -1, 3-glucans are well known to enhance the immune reactions, resulting in antitumor, antibacterial, antiviral, anticoagulatory and wound healing activities. β -1, 3-glucans have various activities depending on molecular weight, degree of branching, conformation, water-solubility and intermolecular association. However, the β -1, 3-glucans linked backbone structure is essential and β -D-glucopyranosyl units are required for immunopotentiating activities. In this study, we tested the immunopharmacological activities of insoluble β -1, 3-glucan from *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP and confirmed the following activities : (1) IFN- γ production in PBMCs in the presence or in the absence of PHA, LPS, IL-18, and IL-12; (2) the induction of various cytokines in the spleen and thymus; (3) the adjuvant effect on the antibody production; (4) the cytotoxic and antitumor effects on cell lines and ICR mice. These results strongly suggest that β -1, 3-glucan from *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP possesses various immunopharmacological activities.

Keywords □ β -1, 3-glucan, immunopharmacological activities, antitumor effect

Glucan이란 포도당이 수십-수백 개가 연결된 고분자로서 α 와 β -glucan으로 나누어진다. 밀가루의 전분이나 텍스트린 등은 α -glucan이고, β -glucan은 β -(1, 3), β -(1, 4), β -(1, 6) 등이 있다.

β -1, 4-glucan으로는 종이의 구성물질인 셀룰로오스를 들 수 있는데 3-glucan이라고 모두 면역활성 효능이 있는 것은 아니며 오직 β -1, 3-glucan만이 항암, 면역증강 작용을 나타낸다고 보고 되어 있다.¹⁾ 미생물의 발효로 생산되는 신 기능 β -1, 3-glucan은 포도당 분자간에 β -1, 3-결합을 이루는 고분자 물질이며, 1966년 일본 오사카대학교의 Tokuya Harada 교수에 의하여 처음 발견되었고, 용액에 열을 가할 경우 젤이 형성되는 β -1, 3-glucan은 커드란(curdlan)으로 불리어진다.²⁾

β -1,3-glucan은 사람과 동물 안에서 체액성, 세포성 면역을 자

극하여^{3,4)} 면역체계를 증폭하고 면역 조절물질로서 작용을 한다.⁵⁾ β -glucan의 항암 효과는 암세포를 직접 죽이는 것이 아니고 대식 세포나,⁶⁾ T 세포, NK 세포 등을 활성화시켜 저하되었던 몸의 면역력을 회복시키는 기작으로 암의 증식을 억제한다는 것이다. 즉, 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon)의 생성을 촉진시키고, 활성 β -glucan은 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인(cytokine)을 생산시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 활동을 지원하여 세포조직 면역기능을 활성화시켜, 면역 담당 세포의 신생을 촉진시키며 암의 화학요법과 방사선 요법으로 저하된 백혈구를 회복시키는 역할을 한다.⁷⁾

대부분의 β -1, 3-glucan이 항암,⁸⁻¹³⁾ 항 세균성, 항 바이러스성의 활성이 뛰어나고,¹⁴⁾ 상처 치료 효과와 피부재생 효과가 탁월해 항 염증 및 피부의 노화방지 효과가 확인되었으며, 이밖에 도혈압 및 혈당 강하작용¹⁵⁾ 등의 다양한 약리학적 효능이 있다.

#본 고문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-860-4218 (팩스) 042-860-4593
(E-mail) dyoon@kribb.re.kr

따라서 본 연구는 *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP가 생산하는 β -1, 3-glucan의 면역활성 효능을 검증하기 위하여, β -1, 3-glucan이 인체말초단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear cells; PBMCs)의 IFN- γ 에 미치는 영향, 마우스와 rat 조직(흉선과 비장)에서 사이토카인 발현양상, 항체생성의 보조 효과, 세포의 증식효과와 항암 효과 등을 검증하여 이의 이용을 위한 기초 및 응용 자료를 제공하고자 하였다.

실험방법

재료 및 시약 - polymyxin B, PHA, LPS 등의 대부분의 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 외 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

β -1, 3-glucan 생산 - 본 연구에 이용된 β -1, 3-glucan은 *Agrobacterium* sp. R259(Korean Culture Type Collection, Taejeon, Korea; KCTC 10197BP)로부터 생산된 것이다. 종 배양 배지는 sucrose 20 g/l, yeast extract 5 g/l, 그리고, peptone 5 g/l, pH 7.0으로 이루어졌다. 발효배양액은 리터 당 다음 조성을 포함한다: 140 g sucrose, 4.42 g NH₄Cl, 1.44 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O 10 ml의 미량원소용액(5 g FeSO₄ · 7H₂O, 2 g MnSO₄ · H₂O, 1 g CoCl₂ · 6H₂O, 1 g ZnCl₂ per liter of 0.1 N HCl). 발효는 직경이 53.3 cm, 높이가 145.6 cm인 300 l 발효조(한국발효기, 인천)를 이용하여 수행하였다. 발효기는 총 3개의 6 blade disk-turbine impellers를 장착하고 있으며, 용존 산소 측정기 그리고 pH 조절기를 장착하고 있다. 300 l 발효조에서의 작업은 다음과 같이 수행하였다. 종배양 배지(1600 ml)에 균주를 접종하여 30°C에서 17시간 동안 진탕 배양기에서 배양한 뒤, 그 배양액을 14.4 l의 발효배지를 함유한 30 l 발효조에 옮겼다. 30 l 발효조에서 배양액을 pH 7.0으로 조절하여 하루동안 세포를 배양한 후, 발효액 144 l를 포함한 주 발효조로 발효액 전부를 전가하였다. 300 l 발효조에서 발효하는 동안 세포 성장단계에서는 배양액의 pH를 4 N NaOH/KOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절하였고, 질소원이 고갈되는 시점에서 배양액의 pH를 3 N HCl을 사용하여 pH를 5.5로 떨어뜨렸다. 통기량과 교반속도는 전 발효과정을 통하여 0.5 vvm(air volume per working volume per minute), 200 rpm으로 유지하였다.

β -1, 3-glucan 분리 - 배양이 끝난 발효액을 적절한 농도로 희석하여 5000 rpm, 15°C, 15분 동안 원심 분리하여 얻은 침전물에 3 N NaOH를 가해 녹인 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 3 N HCl을 처리하여 중화한 후 원심 분리하여 얻은 침전물에 증류수를 가해 다시 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 침전물은 3회 반복하여 원심분리에 의해 염을 제거한 후 동결 건조하여 다당을 얻었다.

인체말초단핵세포(PBMCs)의 IFN- γ 의 측정 - 인체 PBMCs

와 세포는 각각 5×10^6 cells/ml의 농도로 96 well plate에 100 μ l 씩 넣고, endotoxin에 의한 오염을 중화시키기 위해 10 μ g/ml의 polymyxin B를 처리하였다. PHA(1 μ g/ml), LPS(5 μ g/ml), IL-18(50 ng/ml), 과 β -1, 3-glucan(30, 60 μ g/ml)씩 처리하여 24시간 배양하여 OptEIA human IFN- γ ELISA kit(Pharmingen, USA)을 이용하여 측정하였다.

약물 투여 - 구강투여 실험에서는 7주령의 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 두 군으로 나누어 정상 식이 군과 글루칸 식이 군으로 두었다. 1주일 적응기간 동안에는 일반 식이와 물을 제한 없이 공급하였으며, 실험기간 3주 동안에는 하루에 3시간 2회 동안, 정상 식이 군은 AIN 76A 식이로 공급하였고, β -1, 3-glucan 식이 군은 전체 식이의 1%와 5%의 β -1, 3-glucan을 전체 3주 동안 공급하였다(Table I). 3주 후에 쥐를 희생하여 비장과 흉선을 적출 하였다. 복강주사 실험에서는 마우스 4마리의 복강에 3일 동안 β -1, 3-glucan 500 μ g를 주사하고, 2마리는 24시간 후 흉선과 비장을 적출 하였으며, 나머지 2마리는 LPS 10 μ g를 주사하고 12시간 후 diethyl ether(Junsei, Japan)에 마취시켜 흉선과 비장을 적출하였다.

조직에서 사이토카인 측정 - 적출한 흉선과 비장을 Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction방법에¹⁶⁾ 의해 분리하였다. RNA 7 μ g과 p(dT)₁₅ primer(100 ng/ μ l, Roche)

Table I - Composition of the control and glucan diets(g/kg)

Constituents	Control diet	β -1, 3-glucan 1% diet	β -1, 3-glucan 5% diet
Casein ¹	250	250	250
Corn oil ²	50	50	50
Cellulose ³	50	50	50
Sucrose ⁴	600	590	550
Glucan ⁵	0	10	50
Choline chloride ⁶	4	4	4
Mineral mix ⁷	10	10	10
Vitamin mix ⁸	36	36	36

¹Kyungdong, Sungbookgu, Seoul, Korea.

²Deasang, Co. Ltd. Seoul, Korea.

³Sigma, St. Louis, MO., USA.

⁴Cheiljedang Ltd, Seoul, Korea.

⁵DMJ Biotech Corp. Taejeon, Korea.

⁶Dyets, Bethlehem, Pennsylvania, USA.

⁷AIN-76 Mineral mix was provided as following(g/kg): calcium phosphate, dibasic, 500; sodium chloride, 74; potassium citrate · H₂O, 220; potassium sulfate, 52; magnesium oxide, 24; manganous carbonate, 3.5; ferric citrate, 6; zinc carbonate, 1.6; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite, 0.01; chromiumK sulfate · 12H₂O, 0.55; sucrose, finely powdered, 118.03; Dyets, Bethlehem, Pennsylvania, USA.

⁸AIN-76A Vitamin mix was provided as following(g/kg): thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; niacin, 3; calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; biotin, 0.02; Vit. B12 (0.1%), 1; Vit. A palmitate (500,000 IU/g), 0.8; Vit. D3 (400,000 IU/g), 0.25; Vit. E acetate (500 IU/g), 10; menadione sodium bisulfite, 0.08; sucrose, finely powdered, 981.15; Dyets, Bethlehem, Pennsylvania, USA.

4 μl, Reverse transcriptase(50 U/μl, Stratagene) 1.5 μl, 10X Reaction Buffer 6.5 μl, 100mM dNTP(Roche) 3 μl 37°C에서 1 시간 30분, 95°C에서 5분간 반응시켰다.

Primer 선정 - GAPDH, mouse IL-1β, IL-2는 Colle 등이 보고한 primer를¹⁷⁾ 사용하였으며, 다른 mouse primer는

IL-3 sense primer(S) : 5'-CTC-TGC-AAG-AGA-CTT-CCA-TC-3'

Anti-sense primer(AS) : 5'-GCC-GAG-TAG-ATC-TCA-AAG-TG-3'

IL-10 (S): 5'-CTA-TGC-TGC-CTG-CTC-TTA-CT-3'

(AS): 5'-TCA-AAT-GCT-CCT-TGA-TTT-CT-3'

TNF-α (S): 5'-ATG-AGC-ACA-GAA-AGC-ATG-A-3'

(AS): 5'-ACA-GAG-CAA-TGA-CTC-CAA-AG-3'

IL-1Ra (S): 5'-CTT-CTG-TTT-CAT-TCA-GAG-GC-3'

(AS) : 5'-GAT-GCC-CAA-GAA-CAC-ACT-AT-3'

Ra primer는 Petitprez 등에 의해 보고된 IL-6와 TGF-β primer,¹⁵⁾ Vandebriel 등에 보고된 IL-2, IL-10과 IFN-γ primer와¹⁶⁾ Ceire 등에 보고된 IL-4를²⁰⁾ 사용하여 중합연쇄반응을 하였다. 유전자의 증폭을 위한 혼합액의 조성은 cDNA 4 μl, 10 pmole sense primer, anti-sense primer, 0.2 mM dNTP, 10X reaction Buffer:(10 mM Tris-Cl, 50 mM KCl₂, 0.001% gelatin, pH 8.3), 1 unit Taq DNA polymerase 및 3차 멸균수를 혼합하여 50 μl 채운 후 유전자의 증폭을 위해 최적의 온도 조건은 94°C에서 10분 1cycle, 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분 30초 30cycle, 72°C 10분 1cycle을 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)을 이용하여 PCR을 수행하였다.

항체생성의 보조 효과 측정 - E6과 E7는 pET28a vector (Novagen, USA)를 이용하여 *E. coli* 내에서 발현되도록 제조하였다.²¹⁾ 제조한 E6 및 E7의 순수한 단백질 20 μg과 β-1, 3-glucan 250 μg, 물 또는 MPL+TDM Adjuvant(Sigma, USA) 혼합물 200 μl를 만들어 0, 7, 14 및 21일에 주사한 마우스에서 25 일째 심장 혈관에서 혈액을 얻어 실온에서 2시간 방치 후 원심 분리하여 혈청을 수거하였다.

in vitro에서 항암 효과 측정 - 본 실험에 사용되어진 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection Rockville, MD)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 있어서 정상 세포군은 사람의 각질세포 HaCaT과 섬유 아세포 NIH/3T3세포를 사용하였으며, 암 세포군은 자궁암 세포군인 HPV 16(+) CaSki, HPV 18(-) HeLa, 복강암 세포군인 Sarcoma 180을 이용하였다. 정상 세포군과 암 세포군을 10% heat inactivated FBS(HyClone[®], Loga¹, UT)가 포함된 DMEM배지에서 1 × 10⁵ cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 β-1, 3-glucan을 40 μg/ml 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서

48시간 배양한 후 MTS(Promega Co., USA) assay를 했다.

in vivo에서 항암 효과 측정 - 복강암 세포 Sarcoma 180을 10% heat inactivated FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 배양한 후 PBS에 희석시켜 5 × 10⁶/200 μl/mouse를 ICR 마우스에 주사하였다. 24시간 후 β-1, 3-glucan을 각각 250 μg/mouse씩 복강에 7일 동안 주사기로 투여하고, 일주일에 한번씩 생존여부를 확인하였다.

실험 결과 및 고찰

인체말초단핵세포의 IFN-γ에 미치는 영향 - 인체말초단핵세포를 분리해서 β-1, 3-glucan과 PHA, LPS(lipopolysaccharide), IL-18을 24시간 처리하여 β-1, 3-glucan이 인체말초단핵세포의 IFN-γ에 미치는 영향을 측정하였다. β-1, 3-glucan만을 처리하였을 때는 IFN-γ를 약하게 방출하였고, LPS와 IL-18을 함께 처리했을 경우에는 LPS, IL-18만을 처리하였을 때 보다 더 많은 IFN-γ를 방출하였다(Fig. 1). 특히적으로 PHA와 함께 처리하였을 때 PHA만을 처리하였을 때 보다 10배 이상 높게 IFN-γ를 방출하였다. 결론적으로 β-1, 3-glucan만 처리하여도 IFN-γ가 방출되지만 mitogen과 함께 처리하면 더 많은 IFN-γ를 방출되었으며 그 중에서 LPS보다 PHA에서 훨씬 더 많은 효과가 있었고 사이토카인 IL-18도 함께 처리한 경우 IFN-γ가 많이 방출되었다. LPS는 endotoxic하며 동물숙주의 면역계를 자극하고 세균에 의한 동식물체의 감염과정에서 독성인자로서 작용한다.²²⁾ 세균자신에 대한 LPS의 생리적 역할은 잘 알려져 있지 않으나, Mg⁺⁺와 같은 2가의 양이온들을 결합하여 세포 내로 전달해 주거나,²³⁾ 수소성

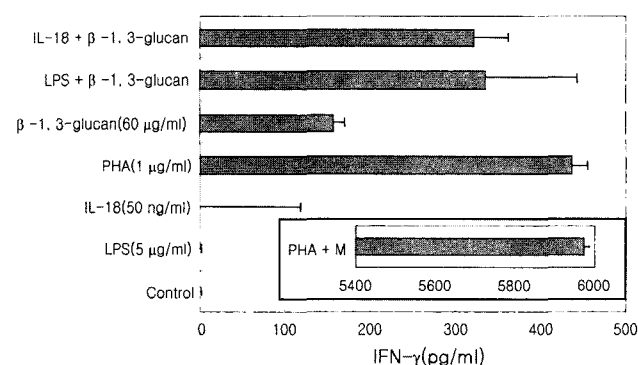


Fig. 1 - The effect of β-1, 3-glucan on IFN-γ production in PBMCs in the presence or absence of costimulator. Polymyxin B(10 μg/ml) was added to the cells to neutralize endotoxin. The concentrations of the reagents used were as follows; PHA(1 μg/ml), β-1, 3-glucan(30, 60 μg/ml). PBMCs(5 × 10⁷/ml/well) were given with PHA and β-1, 3-glucan, and incubated at 37°C for 24h in a humidified 5% CO₂ incubator. Subsequently, the culture supernatants were collected and IFN-γ concentrations were measured as described in materials and methods.

항생제와 같은 물질들을 배척하여 세포를 보호하는 permeation barrier로서²⁴⁾ phage의 receptor로 알려져 있다.²⁵⁾ 본 연구에서는 β -1, 3-glucan의 positive 대조군으로 LPS를 사용하였다. β -1, 3-glucan을 처리하여 IFN- γ 의 다량 방출은 세포로 하여금 2'-5' oligoadenylate synthetase와 같은 효소를 합성하게 하는데, 이들 효소는 바이러스의 RNA 혹은 DNA의 복제를 방해하여 바이러스 복제를 억제하는 역할을 할 뿐만 아니라, NK 세포가 특이 면역반응이 시작되기 전에 바이러스에 감염된 세포를 감염 초기에 죽이는 NK세포의 용해 능(*lytic potential*)을 증가시킬 것이다. IFN- γ 의 다량 방출은 Class I MHC 분자의 발현을 증가시키며 Class II MHC 분자의 발현을 억제하는데 대부분의 세포용해성

(cytolytic) T림프구는 Class I MHC 분자에 결합된 외래 항원을 인식하여 CTL-매개 사멸의 효율을 증가시킴으로써 세포성 면역 반응의 실행단계를 증대시킬 뿐만 아니라 동시에 class II MHC-제한적 보조 T 림프구의 활성화를 억제함으로써 면역반응의 인식 단계를 저해할 것이라 사료된다.²⁶⁾

마우스와 rat 조직에서 사이토카인의 발현양상 - 마우스에 β -1, 3-glucan투여와 LPS 투여구 및 무 투여구에 따른 house keeping gene GAPDH, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1Ra, IL-2, IL-10 사이토카인 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 RT-PCR 을 수행하고 전기 영동 상에서 나타난 바와 같이 β -1, 3-glucan 의 투여는 GAPDH의 유전자의 발현이 마우스의 흉선과 비장조

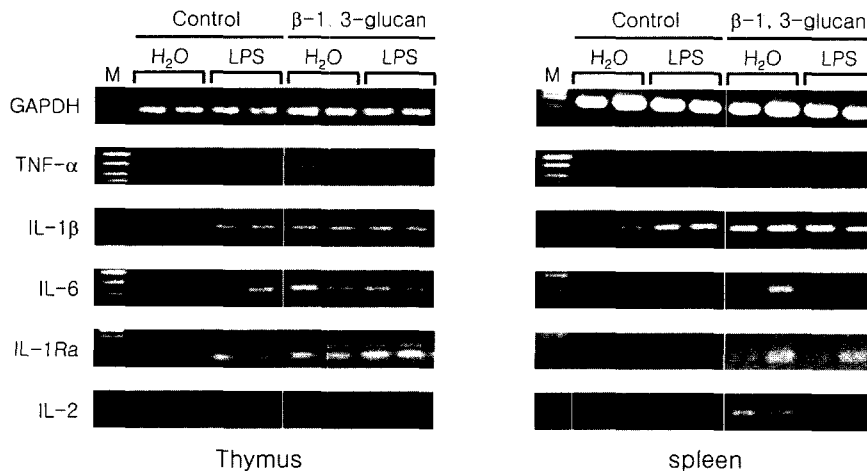


Fig. 2 - Expression of GAPDH, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1Ra, and IL-2 mRNAs in thymus and spleen of Balb/c mice treated with β -1, 3-glucan in the presence or absence of LPS. Balb/c mice were injected 3 times with β -1, 3-glucan(500 μ g/mouse) and treated with or without LPS. Total RNAs extracted from thymus and spleen were performed by RT-PCR and PCR products were electrophoresed on 1.5% RNA agarose gel.

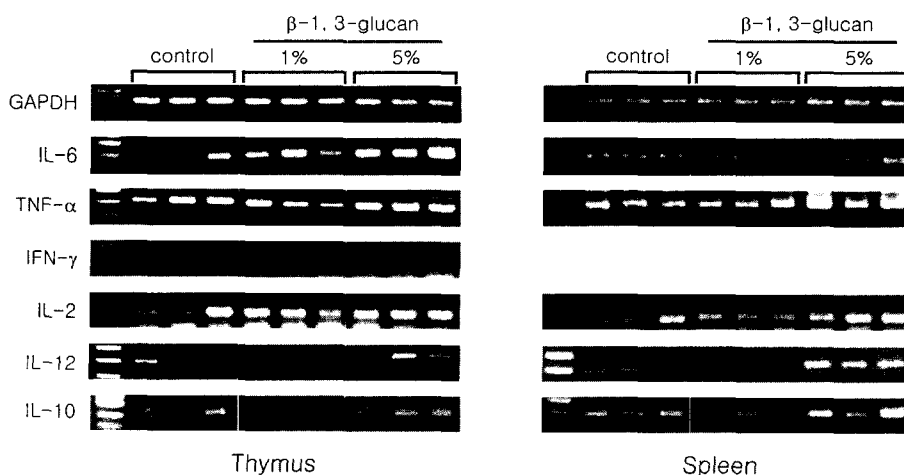


Fig. 3 - Expression of GAPDH, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, and IL-12 mRNA in thymus and spleen of rat treated with β -1, 3-glucan. Total RNAs extracted from thymus and spleen were performed by RT-PCR and PCR products were electrophoresed on 1.5% RNA agarose gel.

직에서 모두 같은 양의 단일 밴드로 나타난 것으로 보아 GAPDH의 발현이 동일함을 확인하였다(Fig. 2). Pro-inflammatory 사이토카인 TNF-α는 비장에서는 잘 발현이 되지 않았다. 한편 흉선에서는 β-1, 3-glucan에서는 positive control LPS보다 진한 밴드가 나타난 것으로 보아 TNF-α가 많이 발현되었다고 사료되었다. 또한, IL-1β, IL-6는 흉선과 비장에서 모두에서 많이 발현되었다. 항염증성 사이토카인 IL-1Ra과 IL-2도 마찬가지로 흉선과 비장에서 많이 발현된 것으로 사료되었다(Fig. 2). Rat에 β-1, 3-glucan을 구강 투여하여 GAPDH와 TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-2, IL-12 IL-10 사이토카인 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하고 전기영동을 한 결과 β-1, 3-glucan을 처리한 모든 흉선과 비장에서 사이토카인이 증가하였다(Fig. 3). 본 연구에서 β-1, 3-glucan을 처리한 결과 여러 가지 사이토카인의 생성을 유도하였다. 이렇게 생성된 여러 가지 사이토카인들은 면역계를 구성하는 세포에 작용하여 면역세포의 분화와 특이적인 기능을 담당할 것이다. 이것들을 하나의 네트워크로서 연결하고 있다. Th1 세포에서 분비된 IFN-γ는 대식세포를 활성화한다. 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1의 분비에 의해 세균의 탐식, 살균작용을 할 것으로 사료되며, 특히 TNF-α는 종양세포에 대해, 증식을 억제하고, 면역계의 T세포를 증식할 것으로 사료된다. IL-12, IL-18의 분비에 의해 NK세포를 활성화하여 세균감염을 방어할 것이라 사료되며, IL-4는 B세포에 작용하고 면역글로블린의 클래스 스위치를 유도, 또한 직접 형질세포에 작용하여 IgE의 생산을 촉진하며, IL-6은 B세포의 형질세포로의 최종분화를 촉진할 것으로 사료된다.²⁶⁾

항체생성의 보조 효과 - 사이토카인 IL-6, IFN-γ 및 IL-10의 발현 증가를 확인한 결과 β-1, 3-glucan이 B 세포를 활성화하여 항체를 생성하는데 보조 효과가 있는 것으로 예상되어 이 실험을 시행하였다. Negative control 3차증류수를 처리한 경우는 거의 역가가 0로 나타났지만, 항원 E6 및 E7자체만을 함께 처리한 경

우의 역가는 1,600, 2,400이고, positive control로 MPL+TDM adjuvant와 항원 E6 및 E7을 처리한 경우에는 140, 800, 22,400으로 나타났다. β-1, 3-glucan과 항원 E6 및 E7을 함께 처리했을 때의 역가는 5120, 4480정도로 나타났다(Fig. 4, Table II). β-1, 3-glucan을 처리한 마우스의 항체 역가는 E6 및 E7자체만 처리한 것보다는 더 높게 나온 것을 확인 할 수 있었다. 그러나, 시중에 판매되고 있는 MPL+TDM의 보조제 보다 효과가 좋지는 않았지만, negative control보다 역가가 높은 것으로 보아 β-1, 3-glucan이 항체생성의 보조 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

In vitro에서 세포의 증식효과와 항암 효과 - 물질의 독성 또는 세포의 증식 효과를 알아보기 위해 정상 세포인 사람 각질 세포 HaCaT과 섬유아 세포 NIH3T3를 사용하였고, 항암 효과를 알아보기 위해 HPV(+) 18 HeLa, HPV(+) 16 CaSki와 복강암 Sarcoma 180 세포에 β-1, 3-glucan을 처리하여 MTS assay로 반응을 시키고, ELISA Reader로 발색정도를 측정하여 control 100을 기준으로 하여 환산한 결과, HaCaT과 NIH3T3 세포에서는 세포 생존율이 증가된 것으로 나타났다(Fig. 5). 자궁경부암과 복수암 세포에 항암 효과가 있는지 알아보기 위하여 자궁경부암 세포 HPV(+) 18 HeLa, HPV(+) 16 CaSki과 복수암세포

Table II - The comparison of β-1, 3-glucans as adjuvant for Ab production against E6 and E7 antigens.

β-1, 3-glucans	E6 Ab Titer	E7 Ab Titer
Normal	-	-
DW	1600X	2400X
β-1, 3-glucan	5120X	4480X
MPL+TDM	140800X	22400X

E6 (20 μg/mouse) or E7 (20 μg/mouse) and β-1, 3-glucan (250 μg/mouse), MPL+TDM (100 μl/mouse) or saline were i.p. administered to ICR mice on day 0, 7, 14 and 21. Blood was obtained by cardiopuncture on day 25. IgG antibody levels in sera were measured by ELISA.

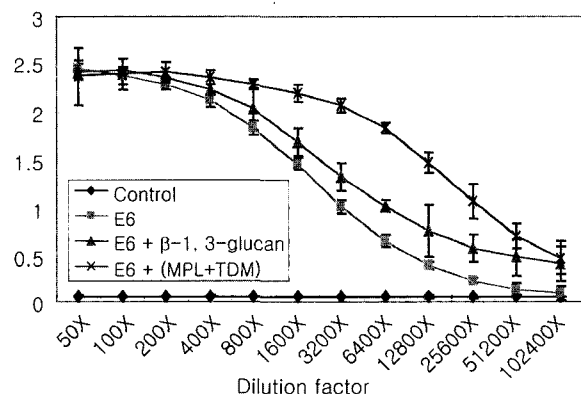
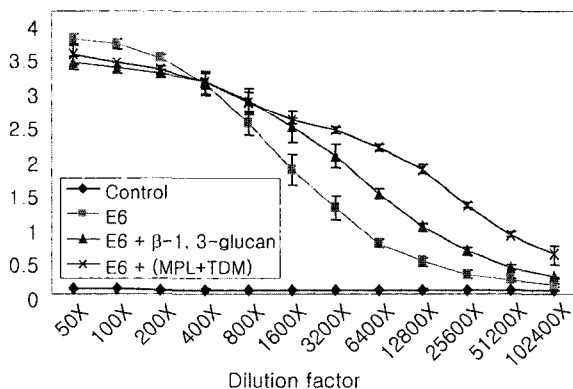


Fig. 4 - The adjuvant effects of β-1, 3-glucan on antibody titers against E6 and E7 antigens. A; E6(20 μg/mouse) or B; E7(20 μg/mouse) and β-1, 3-glucan (250 μg/mouse), MPL+TDM(100 μl/mouse) or saline were i.p. administered to ICR mice on day 0, 7, 14 and 21. Blood was obtained by cardiopuncture on day 25. IgG antibody levels in sera were measured by ELISA.

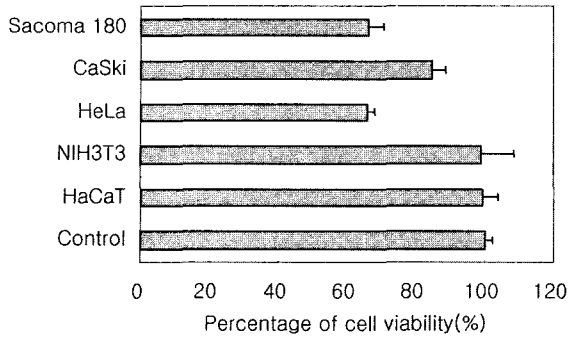


Fig. 5 – The effect of β -1, 3-glucan on the viability of various cells. HaCaT, NIH3T3, HeLa, CaSki, and Sarcoma 180 cells (1×10^5 cells/well) were preincubated at 37°C for 24h in a humidified 5% CO_2 . β -1, 3-glucan (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were given into HaCaT, NIH3T3, HeLa, CaSki, and Sarcoma 180 for 48h, respectively.

Table III – Antitumor activity of β -1, 3-glucan against Sarcoma 180 ascites tumor in ICR mice.

β -1, 3-glucans	No. of survivors / total			
	< 3 week	< 4 week	< 7 week	< 9 week
DW(100 μl)	0/7	-	-	-
β -1, 3-glucan (250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)	1/7	1/7	1/7	1/7

Sarcoma 180 tumor cells (5×10^6 cells/mouse) were inoculated into ICR mice on day 0. β -1, 3-glucan, or H_2O were i.p. administered to the same mice on 7 times (1-7day). For 9 weeks after tumor inoculation, survival rate was checked and the values in the Table represent number of survivors.

Sarcoma 180에 β -1, 3-glucan을 처리한 결과 자궁경부암과 복수 암에서 15~35%가 감소된 것으로 보아 항암 효과가 있는 것으로 사료되었다(Fig. 5).

In vivo에서의 항암 효과 – *in vivo*에서의 항암 효과를 조사하기 위하여 Sarcoma 180을 마우스의 복강에 투입하여 암을 생성시키고, β -1, 3-glucan과 negative control로 물을 7일 동안 투여한 후 생존율을 확인한 결과, 물을 처리한 것은 3주가 되면서 모두 폐사 하였으나, β -1, 3-glucan을 처리한 것은 1마리가 9주 까지 생존하였다(Table III). β -1, 3-glucan을 처리한 경우 항암 효과는 생존율로 확인 할 수 있어 β -1, 3-glucan이 항암 효과가 있음을 임상실험에서 확인할 수 있었다. 이는 모든 β -1, 3-glucan이 암세포를 주입 전 또는 후에 β -1, 3-glucan을 복강 주사, 정맥 주사와 구강 투여를 할 경우에 항암 효과를 나타낸다고 보고한 결과와 일치하였다. β -1, 3-glucan을 복강암의 치료를 위한 화학요법의 약으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다. 마우스의 복강암에 β -1, 3-glucan의 투여가 항암 효과를 나타내는 것은 사이토카인의 분비량과 관계가 있다. β -1, 3-glucan은 사이토카인을 생산시켜서 T 임파구와 B 임파구의 항원 특이적인 면역반응을 활성화하여, IL-2와 IFN- γ 의 사이토카인에 의해 세포 용해성

T세포를 활성화 시켜서 대식세포의 세포 용해기능을 증가 시켜 세포를 파괴시키는 작용을 하는 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6가 작용하는 것으로 생각된다. 이러한 사이토카인에 의해 iNOS가 증가해서 NO합성을 하여 apoptosis를 유도하고, 사이토카인을 생산시켜서 면역 담당세포의 신생을 촉진시키며 암의 화학요법과 방사선 요법으로 저하된 백혈구를 회복시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.²⁶⁾

감사의 말씀

본 연구는 제 9차 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업으로 수행된 결과이며, 본 연구에 사용된 β -1, 3-glucan을 공급해 준 (주) 더멋진 바이오텍(Taejon, Korea)에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Bohn, J. A. and Bemiller, J. N. : (1 \rightarrow 3)- β -glucan as biological response modifier : a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*. **28**, 3 (1995).
- 2) Hamada, H., Sato, M., Ozawa, M., Ohi, Y. and Muramatsu, T. : Transmembrane control of laminin, lectin receptors and surface villi in teratocarcinoma-derived endodermal cells. *Exp. Cell Res.* **154**, 299 (1984).
- 3) Jamas, S., Easson, D., J., Ostroff, G. R. and Onderdonk, A. B. : PGG-glucans. A novel class of Macrophage-activating Immunomodulators. *Accs Symp. Ser.* **469**, 44 (1991).
- 4) Williams, D. L. : Overview of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation*. **6**, 247 (1997).
- 5) Doita, M., Rasmussen, L. T., Seljelid, R. and Lisky, P. E. : Effects of soluble aminated β -1, 3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function. *J. Leukocyte Biology*. **49**, 342 (1991).
- 6) Artursson, P., Edman, P. and Ericsson, J. L. E. : Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. *Scand. J. Immunol.* **25**, 245 (1987).
- 7) Petersen, R. D., Reinhold, W. and Tyborczyk, J. : Cytokines in cosmetology. *Cosmetics and Toiletries Magazine*. **112**, 165 (1997).
- 8) Kasai, S., Fujimoto, S., Kazuo, N., Baba, H. and Kunimoto, T. : Antitumor activity of polymorphonuclear leukocytes activated by a β -1, 3-D-Glucan. *J. Pharmacobio. DYN.* **14**, 519(1991).
- 9) Krause, J. and Franz, G. : Immunomodulating effects of polysaccharides from medicinal plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **319**, 299 (1992).
- 10) Miura, T., Niura, N. N., Ohno, N., Adach, I., Shimada, S. and Yadomae, T. : Failure in antitumor activity by overdose of an immunomodulating β -glucan preparation, sonifilan. *Biol.*

- Pharm. Bull.* **23**, 243 (2000).
- 11) Mura, T., Ohno, N., Minra, N. N., Shimada, S. and Yadomae, T. : Inactivation of a particle β -glucan by proteins in plasma and serum. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 1103 (1997).
 - 12) Oino, N., Niura, N. N., Chiba, N., Adachi, Y. and Yadomae, T. : Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical *schizophyllan* in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1142 (1995).
 - 13) Wagner, H., Stuppner, H., Schafer, W. and Zenk, M. : Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochemistry*. **27**, 119 (1988).
 - 14) Adrian, J., Puren, G., Fantuzzi and Dinarello, C. A. : Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 2256 (1999).
 - 15) Chang, S. T. and Miles, P. G. : Historical record of the early cultivation of *lentinus* in china. *The Mushroom J.* **7**, 31 (1987).
 - 16) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. **162**, 156 (1987).
 - 17) Colle, J. H., Pierre, B. F., Singer, M., Hevin, B. and Milon, G. : Quantitation of messenger RNA by competitive RT-PCR: a simplified read out assay. *J. Immunological Method.* **210**, 175 (1997).
 - 18) Petitprez, K., Khalife, J., Cetre, C., Fontaine, J., Lafitte, S., Capron, A. and Grzych, J. M. : Cytokine mRNA expression in lymphoid organs associated with the expression of IgA response in the rat. *Scand. J. Immunol.* **49**, 14 (1999).
 - 19) Vandebriel, R. J., Spiekstra, S. W., Hudspith, B. N., Meredith, C. and Loveren, H. V. : In vitro exposure effects of cyclosporin A and bis (tri-n-butyltin)oxide on lymphocyte proliferation, cytokine(receptor) mRNA expression, and cell surface marker expression in rat thymocytes and splenocytes. *Toxicology*. **135**, 49 (1999).
 - 20) Cetre, C., Cocude, C., Poerrot, C., Godin, C. and Capron, A. : In vivo expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. **20**, 135 (1998).
 - 21) Cho, Y. C., Cho, O., Lee, K., Park, S. and Yoon, D. : Development of screening systems for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res.* **47**, 199 (2000).
 - 22) Raetz, C. R. : Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 129 (1990).
 - 23) Ferris, F. G. and Beveridge, T. J. : Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol.* **32**, 52(1986).
 - 24) Labis, H., Barnickel, H. B., Naumann, E. T. R. and Giesbrecht, P. : High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane. *J. Bacteriol.* **162**, 9 (1985).
 - 25) Lam, J. S., Graham, J. L., Dasgupta, T. and Beveridge, T. J. : Ultrastructural examination of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* strains and their isogenic rough mutants by freeze-substitution. *J. Bacteriol.* **174**, 7159 (1992).
 - 26) Goldsby, R. A., Kindt, T. J. and Osborne, B. A. : *Kuby Immunology* 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, p. 303(2000).