

대식세포주에서 베타-글루칸에 의한 염증성 사이토카인의 발현

김미정 · 유한욱 · 조계형 · 김하원*

서울시립대학교 생명과학과

(Received January 7, 2008; Revised February 7, 2008)

Expression of Inflammatory Cytokines by Beta-glucan in Macrophage Cell Line

Mi Jeong Kim, Han Wook Ryu, Gye Hyung Cho and Ha Won Kim*

Department of Life Sciences, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

Abstract — Immune system can protect host attacking from a variety of microorganism and virus through innate and adaptive immunities. The innate immune system can be activated by recognition of conserved carbohydrates on the cell surface of pathogen resulting in protection, immunity regulation and inflammation. Immunostimulating and anti-tumor β -glucan, major cell wall component of many fungi, could be recognized as pathogen associated molecular pattern (PAMP) by C-type lectin such as pathogen recognition receptor (PRR) of host innate immunity cells. In spite of many studies of basidiomycetes β -glucan on immunostimulation, little is known about the precise mechanism as molecular-level. Among C-type lectins, dectin-1 was cloned and reported as a β -glucan receptor. In this report, we demonstrated induction of cytokine gene transcription by *Ganoderma lucidum* β -glucan in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS) by RT-PCR analysis. The expression of murine dectin-1 (MD-1) on RAW264.7 macrophage by RT-PCR showing both the full length, 757 bp (MD-1 α) and alternative spliced form, 620 bp (MD-1 β). Both MD-1 α and MD-1 β mRNAs were induced by β -glucan both in the absence and presence of LPS. To explore expression of inflammatory cytokines by β -glucan, RAW264.7 cells were treated with β -glucan for 12 hours. As a result, the expressions of IL-1 IL-6, IL-10 and TNF- α were increased by β -glucan treatment in a dose-dependent fashion. From these results, β -glucan induced transcriptions of dectin-1 and immune activating cytokine genes, indicating induction of immune alertness by expressing dectin-1 and secreting inflammatory cytokines.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, β -glucan, dectin-1, inflammatory cytokine

대부분의 병원체에 존재하여 우리의 면역세포와 반응하게 되는 일반적인 병원체 유래 물질의 종류를 일컬어 PAMP (pathogen-associated molecular pattern)라고 한다. 이들은 박테리아, 균류, 몇몇 진핵생물의 세포 표면에 존재하는 물질로 베타-글루칸, mannan, LPS, lipoteichoic acid, peptidoglycan, CpG 등이 바로 그러한 물질이다.¹⁾ 이러한 PAMPs에 대응하여 반응하게 되는 숙주의 물질을 PRR(pattern recognition receptors)이라고 하며, 우리가 가지고 있는 면역세포에 발현된 단백질로써 TLR 계열, CD14, LBP, mannose 수용체, lectin 등이 바로 여기에 해당 된다.¹⁾ 면역반응은 크게, 이들 PAMPs와 PRRs의 상호인지를 통한 자극에 의해 선천성 면역반응이 개시되어 다양한 cytokine이 분비되고, 그 후 B 세포와 T 세포가 활성화되어 궁

극적으로는 세포성 면역까지 활성화 된다.²⁾

Glycobiology는 최근 들어 각광 받고 있는 새로운 분야이다. 많은 종류의 탄수화물성분은 면역세포 표면에 존재하는 다양한 수용체와 결합 또는 인식되어 면역활성화와 염증유발 등이 일어난다. 그 중에서 베타-글루칸은 β -D-glucopyranosyl unit을 기본으로, 다양한 side chain을 갖는 glucose polymer로써 주로 세균, 진균, 식물 등의 세포벽에 존재하고 크기에 따라 다양한 기능 수행하는데, zymosan 같이 분자량이 큰 경우에는 직접적으로 면역세포를 활성화시킴으로써 포식능력 증강, 세포독성 발휘, 항균활성 자극, 염증 매개 물질의 생성 등을 유발한다. 반면, glucan phosphate와 같은 작은 분자량의 베타-글루칸은 면역활성화 등의 생리작용이 미약하다. 베타-글루칸의 주요기능은 방사선에 대한 보호작용, 암 억제, 다양한 병원체의 감염에 대한 방어작용을 한다고 알려져 있다.³⁾ 또한 베타-글루칸은 식물, 세균, 진균 등의 세포벽에는 존재하지만, 포유동물에는 존재하지 않는다. 느타리버섯에서 분리한 β -1,3 glucan인 pleuran

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2210-2480 (팩스) 02-2210-2888
(E-mail) hwkim@uos.ac.kr

은 초산투여에 의한 장염 유발실험에서 급성장염 치료를 위한 연구에 이용되고 결장 내 손상 및 습한 상태를 억제시킨다고 보고되었다. Pleuran을 4주 섭취 후, 점막 손상이 억제되지만, 손상된 결장 부위에서 myeloperoxidase의 증가는 억제하지 못하였지만, pleuran은 myeloperoxidase activity를 눈에 띄게 감소시켜 케양성 장염치료시 면역조절제로 사용가능성을 보여주었다.⁴⁾

PAMPs에 대한 숙주의 반응인자인 PRR의 한 종류인 lectin은 리간드의 종류에 따라, 크게 P-type, C-type, S-type, I-type으로 나뉜다. C-type lectins은 lectin 구조 내 Ca^{2+} 존재하에 탄수화물 인식부위(CRD)를 통하여 병원체 특유의 탄수화물과 반응함으로써 선천성 면역반응을 유도 한다.^{5,6)} 면역세포로 하여금 대부분의 C-type lectins의 CRD 내부에는 보존서열인 EPN(Glu-Pro-Asn) 서열과 QPD(Gln-Pro-Asp) 서열이 있는데, 이 부위는 만노스와 갈락토오스를 포함하는 리간드를 인지하는 데 있어 필수적인 서열들이 된다.⁷⁾ 수지상 세포는 이러한 C-type lectin을 가지고 있어서 병원체 특유의 만노스와 갈락토오스에 대해 특이성을 가지고 있다는 사실이 밝혀졌다.⁸⁾ 이와는 다르게, 마우스의 dectin-1은 베타-글루칸과 같은 탄수화물 리간드와 결합할 때 Ca^{2+} 을 필요로 하지 않을 뿐만 아니라 EPN 혹은 QPD 서열도 가지고 있지 않는 것으로 밝혀졌다.⁹⁾ 이와 같은 사실은 수지상 세포의 dectin-1이 다른 C-type lectin이 인지하게 되는 CRD의 구조와는 많이 다를 것으로 추측하고 있다. 탄수화물인 베타-글루칸을 인지하는 수용체인 dectin-1이 클로닝되었으며,⁹⁾ 분자량은 대략 28,000이며 type II transmembrane protein으로 C-type Lectin의 전형적인 아미노산 서열을 가지고 있다.^{10,11)} Dectin-1의 세포 외부 영역은 완전한 C-type lectin 유사 영역의 형태를 띄며,⁹⁾ 세포 내부 영역에는 lysosomal endosome을 위한 세포 내부적 신호서열로 추정되는 세 개의 연속적인 산성아미노산 잔기를 가지고 있다.¹²⁾ 또한 dectin-1의 구조체 내에는 YXXL 아미노산 서열로 구성된 영역과 유사한 ITAM 서열도 가지고 있어서 활성신호를 핵으로 전달 할 수 있다.¹⁰⁾

본 연구에서는 영지버섯의 베타-글루칸이 대식세포에 작용하는 기전을 구명하기 위하여 대식세포에 베타-글루칸 수용체인 dectin-1이 발현되어있음을 밝힌 후에 베타-글루칸 또는 LPS에 의해 dectin-1의 발현이 증가함도 밝혔다. 또한 염증성 cytokine의 발현을 분석하였으며, 시간경과에 따른 cytokine의 발현 양상도 밝혔기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

베타-글루칸은 인공재배한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)자실체를 증류수로 가열추출하여 농축한 후 3배의 에탄올을 가하여

침전시켜 얻었다. 이를 더욱 정제하기 위하여 침전물을 증류수에 용해시킨후 원심분리하여 불용성분을 제거하고 가용성분을 얻었으며, 다시 5배의 에탄올을 가하여 베타-글루칸을 정제하여 실험에 사용하였다. Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. RT-PCR에 사용된 IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , dectin-1, GAPDH primer와 cDNA 합성에 사용된 oligo(dT)는 Cosmo Co.(Seoul, Korea)에서 제작하여 사용하였다. Cell culture에 사용된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), penicillin-streptomycin과 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco-BRL 제품을 사용하였다(Grand Island, NY, USA). RNA isolation에 사용된 Tri-zol reagent는 Gibco-BRL 제품을 사용하였고, cDNA 합성에 사용한 M-MLV reverse transcriptase(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)는 Promega(USA)제품을 사용하였다. PCR에 사용한 Taq DNA polymerase는 Biotools(Spain) 제품을 사용하였고, deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 Cosmo Co. 제품을 사용하였다.

세포배양

RAW264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation(56°C 증탕에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 μ m membrane filter로 여과 후 사용하였다. RAW264.7 세포는 부착해서 자라며 10 ml 배지를 넣은 100 mm culture dish에서 배양하였다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 5 ml을 넣고 원심분리(1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

RNA 분리

Total RNA는 6 well plate에 RAW264.7 cells을 배양하여 LPS, PB, 베타-글루칸을 처리하고 Tri-zol reagent를 사용하여 분리하였다. RAW264.7 cells을 1 ml의 Tri-zol을 각각의 6 well plate에 처리하고 여러 번 pipetting하여 cells을 lysis 시키고 1.5 ml eppendorp tube(eppen. tube)에 옮겼다. 0.25 ml의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 첨가하여 15초간 흔들어 주고 ice 상에서 10분간 incubation 하고, 12,000 \times g, 4°C, 15분간 원심분리 하였다. Supernatant만 새로운 eppen. tube에 옮겨 담고, RNA를 침전시키기 위해서 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 넣고 부드럽게 흔들어 주었다. 그 후 -20°C에서 30분간 incubated 하고, 12,000 \times g, 4°C, 20분간 원심분리 하였다. Supernatant를 제거하고 남아 있는 RNA pellet을 75% ethanol을 1 ml 첨가하

여 washing 하고 8,000×g, 4°C, 15분간 원심분리 하였다. Supernatant를 제거하고 남아 있는 RNA pellet을 공기 중에서 10분간 말려주고 RNase-free water(DEPC-water)에 녹였고 -80°C에서 보관하였다. 베타-글루칸을 처리하여 발현하는 유전자의 정량은 2단계 RT-PCR로 수행하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA의 증폭

mRNA의 증폭은 Two step RT-PCR을 하였고 M-MLV-RT를 사용하여 RNA를 reverse transcription하여 cDNA를 합성하였다. Final volume을 20 µl로 하고 0.5 µg/µl oligo(dT), ddH₂O, 2.5 mM dNTP, 5×reaction buffer(75 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, pH 9.0), 70°C에서 10분간 denature시킨 총 RNA, M-MLV-RT(200 units)를 첨가하여 42°C에서 1시간 동안 역전사시켰다. PCR program은 IL-1β, IL-6, TNF-α는 27 cycles, dectin-1은 30 cycles, GAPDH는 25 cycles을 실행하였다. Denaturation temperature 94°C, 30초, annealing temperature는 55°C~65°C, 30초, polymerization temperature는 72°C, 1분간 하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% 또는 2% agarose gel에 전기영동하였으며, 전기영동 결과 나온 band의 강도는 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했으며 GAPDH는 control로 사용하였다.

Table I - Primers of cytokine genes used for RT-PCR analysis

cDNA	Direction	Sequence (5'→3')
IL-1β	Forward	GCA ACT GTT CCT GAA CT
	Reverse	TTA GGA AGA CAC AGA TTC
IL-6	Forward	ATG AAG TTC CTC TCT GCA AG
	Reverse	GGT TTG CCG AGT ACA TCT CA
IL-10	Forward	CTG GAC AAC ATA CTG CTA ACC GAC
	Reverse	ATT CAT TCA TGG CCT TGT AGA CAC C
TNF-α	Forward	CGG GAT CCA TGA GCA CAG AAA GCA
	Reverse	CCC AAG CTT TCA CAG AGC AAT GAC TC
Dectin-1	Forward	GCC CTG TGA AGC AAT GAA ATA TC
	Reverse	CAC ATA CAT TTA CAG TTC CTT CTC ACA G
GAPDH	Forward	AGC CTC GTC CCG TAG ACA A
	Reverse	CAC GAC ATA CTC AGC ACC GG

PCR에 사용된 primer는 합성하여 사용하였고 sequence는 Table I과 같다.

결 과

대식세포에서 Dectin-1의 발현

마우스의 대식세포주인 RAW264.7 cell에서 베타-글루칸 수용체인 dectin-1의 발현을 알아보기 위해서 영지버섯에서 분리한 베타-글루칸으로 12시간 처리한 다음, mRNA를 분리하여 cDNA를 합성하고 마우스 dectin-1 primer를 사용하여 RT-PCR을 통해 확인하였다. RAW264.7 세포에서는 full length form 757 bp의 dectin-1α와 alternative form 650 bp의 dectin-1β 두 가지의 isoform을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). Dectin-1α와 dectin-1β는 모두 베타-글루칸의 수용체로서 작용할 수 있다. α-Form과 β-form의 차이점은 dectin-1α는 full length form으로 C-type lectin-like domain(CRD), stalk region, transmembrane region(TM), cytoplasmic tail인 ITAM(immunoreceptot tyrosine-base activation motif)을 가지고 있고, dectin-1β는 full length form에서 stalk region 부분만 splicing된 형태로 존재한다(Fig. 1B). 두 가지 isoform은 모두 ITAM motif를 통해 면역반응을 일으켜서 신호를 전달할 수 있다.

베타-글루칸에 의한 Dectin-1의 발현 증가

베타-글루칸을 농도별로 처리하고 LPS를 positive control로 사용하여 dectin-1의 발현과 TLR-2, -4, -6을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. LPS를 100 ng/ml, 베타-글루칸을 100 µg/ml(β 100)과 300 µg/ml(β 300)을 처리하고 12시간 후에 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하고 RT-PCR을 수행하였다. LPS는 그람 음성세균의 외막에 존재하는 성분으로써 대식세포를 강력하게 활성화시켜 endotoxic shock을 유발할 수 있다. LPS를 단독으로 처리했을 경우 dectin-1의 발현이 증가하지 않았지만 β 100과 β 300은 증가함을 확인할 수 있었고 LPS와 베타-글루칸 100 µg/ml과 300 µg/ml을 같이 처리한 경우 베타-글루칸을 단독으로 처리했을 경우 보다 증가함을 확인하였다(Fig. 2).

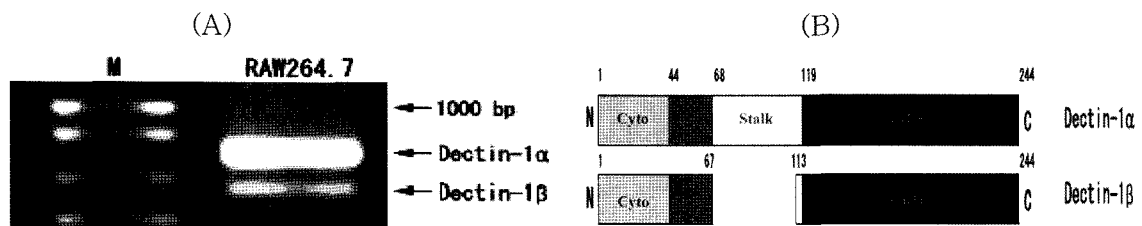


Fig. 1 - Expression of dectin-1 mRNA by *Ganoderma lucidum* β-glucan on RAW264.7 macrophage cell line. (A) Dectin-1 mRNA was expressed without treatment with β-glucan on RAW264.7 cells. Dectin-1α is the full length form and dectin-1β is the alternatively spliced form. (B) Domains of dectin-1α and dectin-1β.

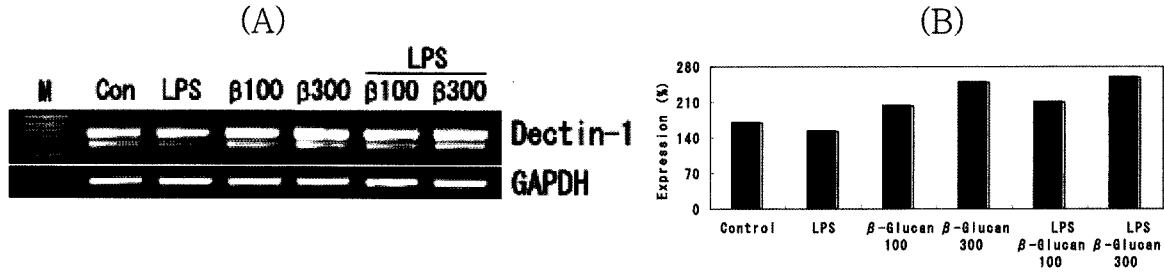


Fig. 2 – Induction of dectin-1 by β-glucan and LPS in RAW264.7 cell line. The cell line was treated with LPS (100 ng/ml) and/or β-glucan (100 and 300 μg/ml) for 12 hrs. After the RNA isolation, RT-PCR was carried out for detection of dectin-1 mRNA expression in 1% agarose gel (A) and gel densitometry analysis by using gel-pro analyzer (B). GAPDH was used as control.

베타-글루칸에 의한 Cytokine의 발현

RAW 세포주에 베타-글루칸을 100 μg/ml과 300 μg/ml을 가하여 12시간 동안 배양한 후에 mRNA를 분리하여 cDNA를 만든 후에 IL-1β, IL-6, IL-10, TGF-β, TNF-α 등의 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 100 ng/ml의 LPS 존재하에서도 베타-글루칸 100 μg/ml과 300 μg/ml을 가하여 동일한 실험을 수행하였다. RAW 세포주에 베타-글루칸 100 μg/ml과 300 μg/ml 처리하였을 때 IL-1β의 발현은 각각 4.3배와 5.8배 증가하였다. IL-6의 발현은 16.6배와 20.4배 증가하였다. IL-6는 대조군에서는 거의 발현하지 않지만 베타-글루칸에 의해서는 IL-6가 유도되었기 때문에 높은 수치를 나타낸 것이다. IL-10의 경우는 베타-글루칸 100 μg/ml과 300 μg/ml 처리에 의하여 각각 1.9배와 5.0배 증가하였다. TGF-β의 발현유도는 오차 범위내에서 차이가 나지 않았다. 그러나 TNF-α의 발현은 베타-글루칸 100 μg/ml과 300 μg/ml 처리에 의하여 1.3배와 1.4배 증가하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 RAW 대식세포주에 발현된 dectin-1에 베타-글루칸이 결합하여 dectin-1의 세포질에 있는 ITAM을 통한 활성화신호가 핵으로 전달되어 다양한 cytokine의 발현이 증가된 것으로 여겨진다. Fig. 3의 결과는 베타-글루칸을 12시간 처리하였을 때의 결과이

므로 시간 경과에 따른 다양한 cytokine의 발현양상을 연구해 볼 필요가 있었다. 따라서 시간 경과에 대한 cytokine의 발현 패턴을 분석하였다.

시간별 Cytokine의 발현 양상

RAW 세포주에 베타-글루칸을 처리한 후에 1, 12, 24, 48시간 후에 IL-1β, IL-10, IL-6, TNF-α의 발현 양상을 RT-PCR로 분석하였다. 베타-글루칸을 처리한 후에 IL-1과 IL-6의 발현은 명확하게 12시간 후에 최대의 피크를 나타낸 후에 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. RAW 세포주에 베타-글루칸을 처리하였을 때 12시간 후에 IL-1은 대조군에 비하여 22배 증가하였으며, 24시간 후에는 13배 증가하였다. IL-6의 발현은 12시간 후에는 대조군의 12배로 증가하였으며, 24시간 후에는 5배 증가를 나타내어 12시간 후에 최대로 발현되었다. IL-10의 발현은 12시간 후에 거의 최대로 발현되었으며, 24시간과 48시간에도 거의 비슷한 수준으로 지속적으로 발현이 유지되었다. TNF-α의 경우는 12시간 후에 최대를 나타내었으나 미약하게 증가하는 양상을 나타내었다. 12시간 이후에도 서서히 감소하였으며, 48시간 후에는 대조군의 수준으로 복구하였다(Fig. 4).

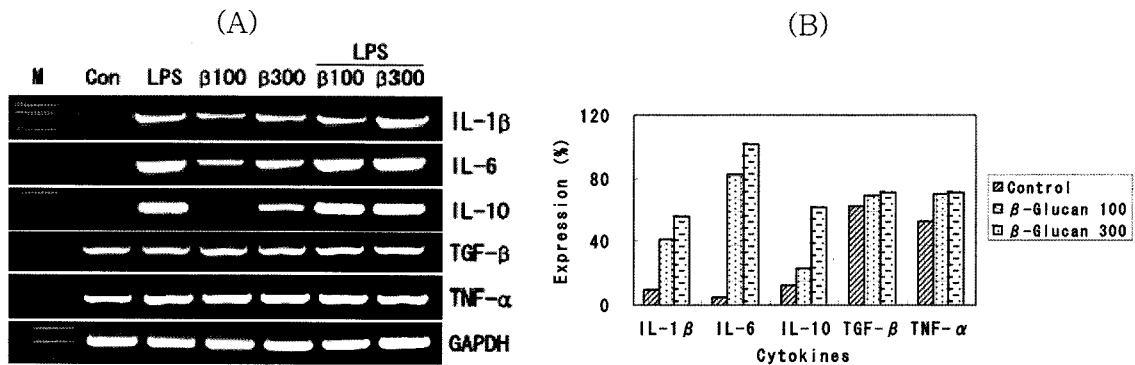


Fig. 3 – Expression of cytokine mRNA by β-glucan treatment in the absence or presence of LPS in RAW264.7 cell line. The cells were treated with LPS (100 ng/ml) and/or β-glucan (100 and 300 μg/ml) for 12 hrs. After the RNA isolation, RT-PCR was carried out for detection of cytokine mRNA expression in 1% agarose gel (A) and gel densitometry analysis by using gel-pro analyzer (B). GAPDH was used as control.

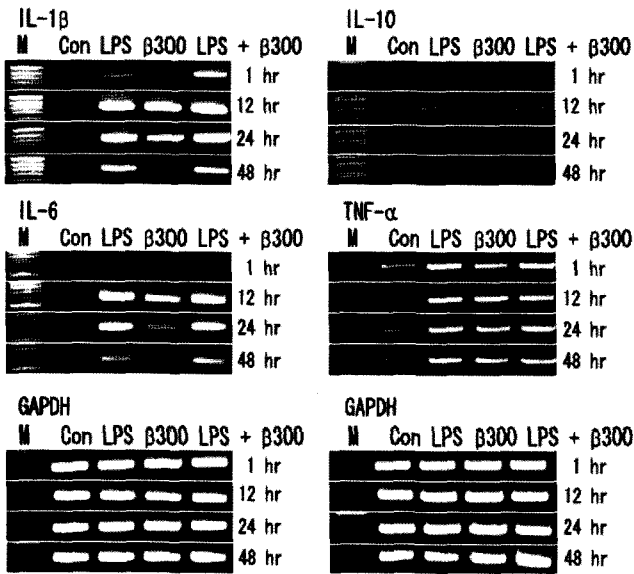


Fig. 4 – Kinetics of cytokine mRNA expression by treatment with LPS and/or β -glucan in RAW264.7 cell line. The cells were treated with LPS (100 ng/ml) and/or β -glucan (300 μ g/ml) for 1, 12, 24 and 48 hrs. After the RNA isolation, RT-PCR was carried out for detection of cytokine mRNA expression. GAPDH was used as control.

고 찰

그 동안 다당류는 면역세포의 활성을 유도하며 면역조절인자로서의 기능이 있는 것으로 보고되어왔다. 다양한 동물실험에서 면역증강작용과 항암작용이 나타났지만 분자생물학적인 기전은 밝혀지지 못하였다. 최근에 균류 유래의 베타-글루칸과 결합하는 수용체인 dectin-1이 클로닝됨으로써 dectin-1을 통한 신호전달 기전이 밝혀지게 되었다. 본 연구에서는 영지버섯에서 분리한 베타-글루칸을 dectin-1을 발현하고 있는 대식세포에 처리하였을 때 다양한 cytokine의 유전자가 전사됨을 밝혔으며, 이러한 유전자의 발현은 베타-글루칸의 농도에 비례하였으며, 시간경과별로 분석하였을 때 12시간에 최대로 발현하다가 24시간 또는 48시간 후에는 정상 수준으로 복귀하였음을 밝혔다.

다양한 생물체에서 베타-글루칸을 분리하여 면역활성이 보고 되어왔다. *Candida albicans*에서 분리한 1,3- β -D-glucan은 입자 형태와 수용성 형태로 나뉘는데, 이들은 백혈구의 활성화에 차이를 보이며 cDNA microarray를 한 결과, 발현이 증가된 유전자는 대부분이 proinflammatory property를 갖는 유전자로, 각 형태별로 특이한 유전자도 나타났다. 각 글루칸이 서로 다른 활성화 기전을 통해 특이적인 생물학적 활성을 나타냄을 시사하고 있다.¹³⁾ *Laminaria digitata*에서 분리한 글루칸인 phycaraine은 식세포활성을 증가시키고, IL-1, IL-6, TNF- α 의 생성 및 분비를 증가시킬 뿐만 아니라 phycaraine은 보체 제3수용체(CR3)를 통한 NK 세포에 의한 암세포 사멸작용을 증가시켰다. Phycaraine은

유방암세포의 성장도 억제하였다.¹⁴⁾ 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분리한 베타-글루칸은 복강유래 대식세포에서 B7 계열의 발현을 조절하였다. 베타-글루칸은 대식세포에서 B7 co-stimulatory molecule의 발현을 증가시키는데, 이는 APC에서 T-lymphocyte(CD28⁺)로 2차신호를 전달하는데 기여하였다. B7-H1의 발현 증가는 T-lymphocyte로 동시에 억제성 신호를 제공하고 베타-글루칸은 T 세포의 활성화 및 억제에 모두 관여함을 보여주었다.¹⁵⁾

영지에서 추출한 베타-글루칸을 대식세포주에 처리하였을 때, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 의 유전자발현이 자극되었다. TNF- α 의 발현으로 보아 항암활성과 연관이 있는 것으로 가정할 수 있다. 또한 이 실험결과와 관련지어 볼 때, 최근 연구된 결과로부터 알아낸 사실에 근거하면, 입과구에서 TNF- α 와 IFN- γ 의 발현 증가현상으로 영지에서 추출한 베타-글루칸의 항암효과에 대한 작용기전을 설명할 수 있다. 또한 최근의 다른 연구결과에 의하면, 영지에서 추출한 베타-글루칸은 호중구에서 anti-apoptosis 효과를 나타내는 것은 일차적으로 GM-CSF의 발현에 기초한다고 알려졌다.¹⁶⁾

최근까지 알려진 연구에 의하면, 영지에서 추출한 베타-글루칸은 선천성면역과 후천성면역 둘 다를 증진시킨다고 한다. 후천성면역은 Th1 반응의 생산에 의해 개시되어 진다. 선천성면역이 일어나는 동안, toll-like receptor(TLR)는 많은 병원성 미생물의 성분과 다양한 반응을 나타낸다. 면역반응은 TLRs가 일차적으로 전사인자인 NF- κ B의 활성을 통해 일어난다. TLR이 자극을 받으면 adaptor protein인 MyD88에 결합한 후 serine-threonine kinase인 IRAK과 결합하여 활성 신호를 전달한다.¹⁶⁾ 그런 반면, 최근 연구결과에 의하면, 이러한 신호전달 체계가 영지에서 추출한 베타-글루칸이 대식세포의 TLR-4에 결합함에 의해서도 수행되어 진다는 사실을 밝혀졌다.¹⁷⁾ Adaptor protein인 MyD88을 통한 신호전달경로는 두 가지로 PI3K/Akt와 MEK1을 통해 NF- κ B, ERK, Jun/Fos를 활성화시키는 MyD88-dependent pathway와 I κ B/TBK1, IRF3를 통한 MyD88-independent pathway가 알려져 있다.¹⁸⁾ TNF- α 는 면역세포의 기능이나 세포의 증식, 분화, 사멸에 영향을 미치는 스트레스 반응의 결정적인 매개체이다. 이는 caspase를 활성화시킴으로 사멸을 유도할 수도 있지만, NF- κ B와 AP-1과 같은 전사인자를 통한 메커니즘에 의해 사멸을 억제함으로써 염증 반응을 진행시킬 수도 있다.

본 연구에서 대식세포에는 dectin-1이 발현되어있으며, 베타-글루칸 처리에 의하여 dectin-1의 발현이 유도된다는 것이 밝혀졌다. 더욱이 베타-글루칸의 용량을 증가시키면 dectin-1의 발현도 증가되어 용량의존적 발현임을 암시하고 있었다. 베타-글루칸에 의하여 다양한 cytokine이 분비되지만 특히 IL-1과 IL-6의 발현은 매우 급격하게 증가하여 대표적으로 증가하는 cytokine으로 여겨진다. 시간별로 cytokine이 발현되는 양상은 주로 12시간

후에 최대의 피크를 나타내다가 점차 감소하여 24시간 또는 48 시간 후에는 정상수준으로 복귀하였다. 이러한 사실은 면역촉진을 위하여 베타-글루칸을 복용하였을 때는 일시적으로 면역을 증가시키고 다시 정상으로 복귀되어 과도한 면역증강은 없음을 나타낸다. 이러한 연구결과는 영지버섯의 베타-글루칸에 의한 항암 작용의 기전을 연구하는데 기초가 될 것으로 여겨진다.

결 론

본 연구에서는 영지의 베타-글루칸이 LPS 부재 또는 존재하에서 cytokine 유전자를 전사시킴을 RT-PCR 분석으로 증명하였다. 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포주는 마우스 dectin-1알파형(757 bp, MD-1 α)와 alternative splice된 dectin-1 베타형(620 bp, MD-1 β)이 모두 발현됨을 증명하였다. Dectin-1 알파형과 dectin-1 베타형의 mRNA는 LPS 부재 또는 존재하에서 베타-글루칸에 의하여 유도되었다. RAW264.7 세포주에 베타-글루칸을 12시간 동안 처리하였을 때 IL-1, IL-6, IL-10 및 TNF- α 의 발현이 베타-글루칸의 용량에 따라 증가되었다. 이러한 결과로부터 베타-글루칸은 dectin-1과 면역촉진성 cytokine 유전자의 전사를 촉진하였으며, 이것은 베타-글루칸에 의하여 dectin-1 발현과 염증성 cytokine을 분비함으로써 면역 경계상태로 진입함으로 나타낸다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 서울시립대학교 학술연구조성비(to HW Kim)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J. : Immunobiology. 6th ed., Garland Science Publishing, pp. 823, New York (2005).
- McKenna, K., Beignon, A. and Bhardwaj, N. : Plasmacytoid dendritic cells: Linking innate and adaptive immunity. *J. Virology* **79**(1), 17 (2005).
- Brown, G. D. and Gordon, S. : Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* **19**, 311 (2003).
- Nosal'ova, V., Bobek, P., Cerna, S., Galbavy, S. and Stvrtna, S. : Effects of pleuran (β -glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol. Res.* **50**, 575 (2001).
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. and Adema, G. J. : C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77 (2002).
- Cambi, A. and Figdor, C. G. : Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 539 (2003).
- Drickamer, K. : Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* **360**, 183 (1992).
- Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K. and Weis, W. I. : Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**(5549), 2163 (2001).
- Ariizumi, K., Shen, G., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R. III, Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P. R. and Takashima, A. : Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **275**, 20157 (2000).
- Brown, G. D. and Gordon, S. : Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**(6851), 36 (2001).
- Willment, J. A., Gordon, S. and Brown, G. D. : Characterization of the β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* **276**, 43818 (2001).
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liemot, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguat, V. and van Kooyk, Y. : The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* **168**, 2118 (2002).
- Ishibashi, K., Miura, N. N., Adachi, Y., Ogura, N., Tamura, H., Tanaka, S. and Ohno, N. : DNA array analysis of altered gene expression in human leukocytes stimulated with soluble and particulate forms of *Candida* cell wall β -glucan. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 387 (2004).
- Vetvicka, V. and Yvin, J. : Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 721 (2004).
- Hunter, Jr., K. W., duPre, S. and Redelman, D. : Microparticulate β -glucan upregulate the expression of B7.1, B7.2, B7-H1, but not B7-DC on cultured murine peritoneal macrophages. *Immunol. Lett.* **93**, 71 (2004).
- Chen, H. S., Tsai, Y. F., Lin, S., Lin, C. C., Khoo, K. H., Lin, C. H. and Wong, C. H. : Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorg. Med. Chem.* **12**(21), 5595 (2004).
- Lin, Y. L., Liang, Y. C., Lee, S. S. and Chiang, B. L. : Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* **78**(2), 533 (2005).
- Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., Sizemore, N. and Hwang, D. H. : Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **278**, 37041 (2003).