

Acetobacter pasteurianus 변이주가 생산하는 다당류의 면역효과(I)

김동석 · 정연봉 · 조덕제 · 류병호
경성대학교 공과대학 식품공학과, *약학대학 약학과
**동서공과대학 식품공학과

Immunopotentiating Effect of Polysaccharide Produced from a Mutant of *Acetobacter pasteurianus* (I)

Dong Seuk Kim, Yeoun Bong Chung*, Duck Jae Cho** and Beung Ho Ryu

Department of Food Science and Technology, *Department of Pharmacy, Kyung Sung University

**Department of Food Science and Technology, Dongseo University

ABSTRACT

Dose-dependent responses indicated by the increase of leukocyte, peritoneal exudate cell and weights of immunorgans revealed the improvement of immunity. In the effect of macrophage on phagocytes, there were not substantial differences in the phagocytic and corrected phagocytic index. The administered group being compared with the controlled group, there were no significant changes in S-GOT, S-GPT, alaline phosphatase, total protein, albumin, globulin, cholesterol, triglyceride, blood urea nitrogen and glucose. Key words: dose-dependent responses, peritoneal exudate cell, phagocytic index, corrected phagocytic index.

서 론

Acetobacter pasteurianus 변이주가 생산하는 다당류의 Sarcoma-180 tumor cell에 대한 항암 실험의 결과 높은 항암 효과를 보이는 반면, 종양 세포에 대한 직접적 세포 독성 작용은 보이지 않고 있다(1). 이러한 항암 작용은 투여한 방어기전을 강화 시키는 다른 항암작용 기전이 있을 것으로 생각되어 체내 면역반응에 미치는 영향을 살펴보는 것은 매우 의의 있는 일이다.

특히, Hamuro 등(2)은 letinan의 투여가 마우스의 T-cell immune adjuvant와 관련한 peritoneal exudate cell(PEC)의 세포 독성 작용을 증대시켜 주며, 또한 lentinan을 투여한 마우스로부터 얻어진 PEC을 sarcoma 180과 혼합하여 마우스에 이식시킨 경우가 sarcoma 180을 단독 이식한 경우보다 종양 증식이 훨씬 억제됨을 밝혔다. 또한 Maeda 등(3)은 흉선을 절제한 마우스를 이용하여 lentinan의 항암 효과에 대한 실험 결과 흉선 의존성 T-림파구의 자극에 의한 흉선 의존성 면역계와 관련이 있음

을 밝혀 내었다.

따라서 본 실험은 전보(1)의 항암결과를 토대로 *Acetobacter pasteurianus* 변이주가 생성한 다당류의 항암작용 기전을 알아보기 위하여 mouse의 체내 면역기능과 혈액의 생화학적 성분에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용한 균주는 본 실험실에서 보관하고 있는 *Acetobacter pasteurianus*를 자외선 조사에 의해 변이시킨 변이주인 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5를 사용하였다.

시 료

본 실험에 사용한 시료는 전보(4)에서 얻은 정제된 건조 분말 다당류를 사용하였으며 투여량은 결과란에 표시하였다. 또한 투여시 외의 시료는 냉장 보관하였다.

본 실험에 사용한 실험 동물은 전보(1)에서와 같이 체중 18~22g의 웅성 ICR mouse를 사용하였으며, 사료는 삼양유지사료사의 항생제 무첨가 mouse 용 pellete를 사용하였으며 물과 사료는 충분히 공급하였다.

혈중 백혈구수에 미치는 영향

시료 투여는 10일간 연속으로 복강내에 투여하였으며 대조군은 멸균 생리 식염수를 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 1일, 2일, 4일 및 7일째 되는 날 각 실험 동물 눈의 정맥총으로부터 heparin 처리된 모세관을 사용하여 80 μ l의 혈액을 취하여 citrate-saline 320 μ l와 잘 섞은 다음 Turk's solution으로 희석하여 hemacytometer를 이용하여 백혈구수를 측정하고 희석배수로 교정하였다(5).

복강 세포수에 미치는 영향

시료 투여는 3일간 연속으로 복강내에 투여하였고 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 1일, 2일 및 4일째 되는 날 실험 동물은頸椎 脫骨法(cervical dislocation)에 의하여 희생시키고 5ml의 생리 식염수로 복강내를 잘 세척한 다음 복수액과 함께 취하여 Turk's solution으로 희석한 후 hemacytometer를 이용하여 복강 세포수를 측정하였다(6).

면역 관련 장기의 무게 변화

시료 투여군은 시료를 대조군은 생리 식염수를 10일간 연속으로 복강내에 투여하고 시료 투여 최종일로부터 8일째 되는 날 실험 동물을 경추 탈골법에 의하여 희생시키고 체중을 측정하고 후 흉선, 비장 및 간을 적출하여 각 장기 무게를 측정하였다.

Macrophage의 식작용에 미치는 영향

시료의 *in vivo*에서의 macrophage의 식작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 carbon clearance test를 실시하였다(7-9). 즉, 시료 투여군은 시료만, 대조군은 생리 식염수만을 10일간 연속으로 복강내에 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 2일째 되는날 먼저 모든 실험 동물의 체중을 측정하고 체중 100g당 16mg의 carbon(Pelikan drawing ink 17 Black, India, Pelikan AG; D-3000, Hannover 1, W. Germany)을 tail vein을 통하여 주사하였다. 주사 후 5분, 15분, 30분 및 40분 후에 각 실험 동물 눈의 정맥총으로부터 혈액 40 μ l를 취하여 0.1% so-

dium carbonate 4ml를 함유한 시험관에 넣고 용혈시킨 후 600nm에서의 흡광도를 측정하였다. 또한 각 실험 동물을 경추 탈골법에 의하여 치사시키고 간과 비장을 적출하여 무게를 측정하고 후 이로부터 phagocytic index(K)와 corrected phagocytic index(α)를 구하였다.

Phagocytic Index(K) =

$$\frac{\text{Log}(10Ab_1) - \text{Log}(10Ab_2)}{T_2 - T_1}$$

여기서, T_1 및 T_2 는 채혈 시간이며, Ab_1 및 Ab_2 는 흡광도를 나타낸다.

$$\text{Corrected Phagocytic Index}(\alpha) = \frac{W_B}{W_S + W_L} \times \sqrt[3]{K}$$

여기서 W_B , W_S 및 W_L 은 체중, 비장 및 간의 무게를 나타낸다.

혈액 생화학적 성분의 분석

대조군과 시료 투여군에 각각 생리 식염수와 시료를 10일간 연속으로 복강내에 투여하고 시료 투여 최종일로부터 2일째 되는 날 각 실험 동물을 ether로 마취시킨 뒤 심장 채혈법에 의하여 혈액을 취하였다. 혈액을 실온에서 약 30분간 방치한 후 원심분리(12,000 \times g, 10min)하여 얻은 혈청을 냉동실에 보관하면서 2일 이내에 혈액 생화학적 성분인 serum protein, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT), cholesterol, triglyceride, glucose, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen(BUN) 및 creatinine을 Multichannel selective stat analyzer(CL-12, Shimazu)를 사용하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험 data는 mean standard error로 나타냈으며, 유의성 검정은 student's t-test로 하였다.

결과 및 고찰

혈중 백혈구수에 미치는 영향

투여한 다당류의 면역 반응에 미치는 영향을 규명하기 위한 직접적인 방법으로 순환 말초 혈액내의 백혈구수에 미치는 영향은 Table 1에서 보는 바와 같다. 약물 투여후 1일, 2일, 4일 및 7일째의 백혈구수는 대조군에 비하여 현저한 증가를 나타내었으며, 그 중 2일째의 50mg/kg 투여시가 59.9%의 최고 증가치를 보였고, 시간이 경과함에 따라 점점 감소하

Table 1. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the number of circulating leucocytes in ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	(cells/mm ³)			
			Day 1	Day 2	Day 4	Day 7
Control	—	12	7,300±240 ^{a)}	7,350±320	7,409±685	7,648±645
Polysaccharide	50	12	10,813±531	11,725±780	9,475±586	8,166±472
	75	12	10,739±840	9,375±650	9,000±725	8,163±871

a) Mean±S. E.

는 경향을 나타내었다.

특히 중성호성 백혈구는 비만측동물에서 숫자적으로 가장 많고 생체염증 반응에 따라 백혈구증다증 (leukocytosis)을 유발하며, 면역체의 형성 등으로 생체를 감염으로 부터 방어하여 면역 반응에 관여하는 1차적 작동 세포로서 중요한 기능을 수행하고 있다(10). 이러한 백혈구수의 현저한 증가는 약물을 투여함으로써 면역능이 어느 정도 증가하였음을 짐작할 수 있다.

복강 세포수에 미치는 영향

3일간 연속으로 시료를 투여하고 1일, 2일 및 4일째 되는 날의 복강 세포수를 측정 한 결과 1일째가 최고로 증가하다가 2일, 4일째는 점점 감소하여 대조군과 비슷한 수치를 나타내었다(Table 2). 이러한

복강 세포는 식작용 등에 의하여 생체내의 이물질에 대한 중요한 방어 작용을 수행하고 있으므로 복강 세포수의 증가는 이를 구성하고 있는 세포수의 증가 및 이들의 기능의 증대를 의미한다.

특히 Hamuro 등(2)의 $\beta(1\rightarrow3)$ glucan-type lentinan을 투여한 마우스로 부터 얻어낸 복강 세포가 종양 세포에 대한 세포 독성이 대조군에 비하여 훨씬 증가한다는 사실과, 이 등(11)의 *Lyophyllum decastes*의 배양 균사로 부터 추출한 lyophyllan A를 투여하여 얻어진 복강 세포와 sarcoma 180을 함께 투여한 경우와 sarcoma 180만을 투여한 경우 중 전자의 경우 종양의 평균 무게가 대조군의 3%밖에 되지 않는 높은 항암 효과를 보인 결과와 비교해 볼 때 본 실험에서 복강 세포수의 증가는 좋은 결과라고 생각되어진다.

Table 2. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	(1.0×10 ⁶ cells/ml)		
			Day 1	Day 2	Day 4
Control	—	9	3.35±0.33 ^{a)}	3.14±0.36	3.42±0.50
Polysaccharide	50	9	4.61±0.36	4.01±0.56	3.39±0.86
	75	9	4.02±0.44	3.93±0.37	3.35±0.70

a) Mean±S. E.

면역 관련 장기의 중량 변화

Table 3, 4는 면역 관련 장기의 중량에 미치는 영향에 대한 결과로서 간의 경우 50mg/kg와 75mg/kg 투여시 각각 14.79%와 22.53%, 비장의 경우는 50mg/kg와 75mg/kg 투여시 각각 20.83%와 29.17%, 그리고 흉선의 경우는 50mg/kg와 75mg/kg 투여시 각각 14.08%와 52.11%로 흉선의 경우 그 증가폭이 가장 크며, 모든 장기의 경우에 있어서 투여

량이 증가할수록 장기의 무게도 증가하는 용량 의존성 반응을 보였다.

본 실험에서 흉선의 무게 증가는 T-림파구의 작용이 시료 투여에 의하여 다소 증가되었다고 생각할 수 있겠다. 또한 간과 비장의 무게 증가는 간에는 kuffer cell을 비장에는 splenic macrophage를 함유하고 있으며(12), 이들에 의하여 체내의 이물질에 대한 방어 작용을 담당하고 있다는 사실을 감안할

Table 3. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the immunoorgan Weight of ICR mice(I)

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Body weight(g) ^{a)}		Liver Weight (mg)	Weight Increase (%)
			On 1st day	On 18th day		
Control	—	12	21.15±1.83	24.94±3.79	1,421±174	—
Polysaccharide	50	12	21.98±1.18	26.05±2.31	1,632±293 ^{b)}	14.79
	75	12	21.71±0.91	26.49±2.34	1,743±261 ^{b)}	22.53

a) Mean±S. E.

b) p<0.05

Table 4. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the immunoorgan weight of ICR mice(II).

Treatment	Dose (mg/kg)	Spleen weight ^{a)} (mg)	Wt. increase (%)	Thymus Weight ^{a)} (mg)	Wt. increase (%)
Control	—	242±46.79	—	71.2±11.63	—
Polysaccharide	50	294±55.19 ^{o)}	20.83	81.1±28.14 ^{b)}	14.08
	75	311±65.82 ^{b)}	29.17	108.3±18.96 ^{o)}	52.11

a) Mean±S. E.

b) p<0.05

c) p<0.01

때 이들의 증가는 macrophage수의 증가 뿐만 아니라 macrophage기능의 증가에 기인한 것이라 생각되어진다.

Macrophage의 식작용에 미치는 영향

일반적으로 실험 동물의 정맥내로 carbon suspension이 주입되었을 때 이들의 축적 및 제거는 90% 정도가 간내의 kuffer cell에서 담당하고, 나머지 10% 정도는 비장내의 splenic macrophage가 담당한다. 이러한 macrophage는 미생물의 침입에 대한 방어 기구나 노폐 혈구의 처리외에도 항암 효과 및 항체 생산 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다(8). 세망내피계의 식작용을 측정할 결

과는 Table 5에서 보는 바와 같이 대조군과 약물 투여군에서 phagocytic index 및 corrected phagocytic index 모두 별 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 정상 마우스에서 생체의 항상성 유지 기능을 초월해서까지 macrophage의 식작용을 증강시키지는 않는다는 것을 알 수 있었다.

혈액 생화학적 성분의 분석

Table 6에서 보는 바와 같이 투여한 약물의 간 독성을 알아 보기 위하여 S-GOT, S-GPT 및 alkaline phosphatase들의 효소 활성을 측정해 본 결과로 투여한 약물이 마우스의 간에 어떤 손상을 주지 않았다는 것을 알 수 있다.

Table 5. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the carbon clearance activity in ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Phagocytic Index ^{a)}	Corrected Phagocytic Index ^{a)}
Control	—	7	0.0314±0.005	5.0701±0.2808
Polysaccharide	50	7	0.0353±0.002	4.7607±0.1146
	75	7	0.0319±0.010	4.7801±0.5380

a) Mean±S. E.

Table 6. Enzyme activities in serum of the ICR mice administred polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	S-GOT ^{a)} (U/L)	S-GPT ^{a)} (U/L)	Alkaline Phosphatase ^{a)} (U/L)
Control	—	7	32.14±8.09	23.21±5.36	50.70±17.53
Polysaccharide	50	7	38.00±9.69 ^{b)}	26.85±5.97 ^{c)}	44.75±23.16 ^{b)}
	75	7	32.96±2.84 ^{b)}	28.21±3.75 ^{c)}	49.50±15.03 ^{b)}

a) Mean±S. E.

b) p<0.05

c) p<0.01

Table 7은 시료 투여에 다른 마우스 혈청 중의 단백질의 변화를 측정된 실험 결과로서 투여한 약물이 체액성 면역 반응을 어느 정도 증가시켰음에도 불구하고 총단백질과 albumin 및 globulin은 약물 투여군에서 농도의 증가에 관계없이 대조군과 별 다른 차이를 나타내지 않았다.

혈청 중의 지질 성분에 미치는 영향의 변화를 측정된 결과 Table 8에서와 같이 대조군에 비하여 약물 투여군에서 cholesterol은 다소 저하시켰으나 triglyceride의 경우에는 대조군과 약물 투여군이 비슷한 수준을 나타내었다. 이러한 실험 결과는 투여한 약물이 마우스의 *in vivo*에서 지질 대사에 대한 어떤 영향을 주지 않는다고 생각 되어진다.

또한 혈청 중의 BUN 및 glucose에 대한 결과는

Table 9와같이 대조군과 약물 투여군에서 별 차이가 없으므로 과혈당증은 나타나지 않음을 알 수 있었다.

이상 혈액 생화학적 성분의 결과로 미루어 보아 생체가 독성 물질에 노출되었을 때, 간효소 활성의 지표인 S-GOT, S-GPT 및 alkaline phosphatase 등의 수치가 증가할 뿐만 아니라 과혈당증에 의하여 BUN 및 glucose가 상승되고 지질 대사에도 심한 장애를 일으키는 형상 등과 비교해 볼 때 본 실험에서 투여한 약물이 정상적인 마우스의 체내에서는 생체의 항상성 유지 기능을 초월하지도 않고 어떤 이상 반응을 보이지 않고 일반적으로 사용되어지고 있는 화학요법제 등의 독성과 비교해 볼 때 비교적 안전한 항암제로서의 개발 가능성이 있다고 생각되어진다.

Table 7. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the serum protein of the ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Total protein ^{a)} (g/dl)	Albumin ^{a)} (g/dl)	Globulin ^{a)} (g/dl)	A/G ratio ^{a)}
Control	—	7	6.14±0.31	3.11±0.22	3.03±0.29	1.87±0.36
Polysaccharide	50	7	6.03±0.58 ^{b)}	3.11±0.13	2.92±0.41	2.24±0.25
	75	7	6.45±0.26±	3.42±0.23	3.03±0.33	2.16±0.25

a) Mean±S.E.

b) p<0.01

Table 8. Clinico-chemical values in ICR mice administred polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. no mice	Cholesterol ^{a)} (mg/dl)	Triglyceride ^{a)} (mg/dl)
Control	—	7	59.47± 8.16	75.42± 3.98
Polysaccharide	50	7	51.70±10.55 ^{b)}	77.91±12.04
	75	7	52.96± 9.96 ^{b)}	79.53± 8.56

a) Mean±S. E.

b) p<0.01

Table 9. Clinico-chemical values in ICR mice administered polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	BUN ^{a)} (mg/dl)	Glucose ^{a)} (mg/dl)	Creatinine ^{a)} (mg/dl)
Control	—	7	19.13±3.83	151.31±26.41	0.40±0.12
Polysaccharide	50	7	12.38±4.04	155.58±9.06 ^{b)}	0.43±0.07
	75	7	20.04±3.77 ^{b)}	136.37±14.84	0.44±0.04

a) Mean ± S. E.

b) p < 0.05

요 약

다당류의 ICR 마우스에서 백혈구수와 복강 세포수가 현저히 증가하였고, 면역 관련 장기의 무게도 용량에 따라 증가하는 용량 의존성 반응을 보였고, macrophage의 식작용에 미치는 영향은 phagocytic index와 corrected phagocytic index에서 거의 차이가 없었다. 다당류가 마우스의 혈액 중에 효소 활성 및 일반 생화학적 성분에 미치는 영향을 조사해 본 결과 S-GOT, S-GPT, alkaline phosphatase, total protein, albumin, globulin, cholesterol, triglyceride, blood urea nitrogen 및 glucose는 대조군에 비하여 비슷한 수준을 나타내었다.

참고 문헌

1. D.S. Kim and B.H. Ryu (1991), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 405.
2. J. Hamuro, M. Rollinghoff, and H. Wagner (1990), *Immunology*, **39**, 551.
3. Y. Y. Maeda and G. Chihara(1973), *Int J.*

Cancer, **11**, 153.

4. D.S. Kim and B.H. Ryu(1991), *Korean J. Food sci. Technol.*, **23**, 291.
5. B.M. Miturka and H.M. Rawnsley(1981), Clinical biochemical and hematological reference values in experimental animals and humans, Massion, 2nd ed., Masson N. Y., **31**.
6. D.M. Weir (1979), Handbook of experimental immunology, Vol.2, Cellular Immunology, Alden Press, Oxford **30**. 1.
7. B. Benacerraf, G. Biozzi, A. Cuendet and B. N. Halpern (1955), *J. Physiol*, **128**, 1.
8. B. N. Halpern, B. Benacerraf and G. biozzi (1954), *Brit. J. Expt. Pathol.*, **34**, 426.
9. G. Bozzi, B. Benacerraf and B. N. Halpern (1954), *Bril. J. Exp. Pathol.*, **34**, 441.
10. A.C. Guyton(1986), Textbook of Medical physiology, 7th Ed. Saunders Company, **51**.
11. C.O.Lee, E.C. Choi and B. K. Kim(1987), *Yakhak Hoeji*, **3192**, 70.
12. I. M. Roitt(1977), Essential Immunology, 3rd Ed. Blackwell Scien. Publ, Oxford, 151.