

Acetobacter pasteurianus 변이주가 생산하는 다당류의 면역효과(II)

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

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

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

Footpad swelling having the relationship with arthus-reaction of antibody-mediated hypersensitivity and delayed type hypersensitivity was recovered to the almost normal level. The methemoglobin induced by aniline showed no significant deviation. PFC/spleen cell and PFC/10⁶ spleen cell were increased slightly, but not in case of RFC. Hemagglutination value was increased slightly, but hemolytic value was not changed significantly. Mice in the administration of the polysaccharide does not show any significant stress factor in the cage for mice administered plasma corticosterone.

Key words : antibody-mediated hypersensitivity, delayed type hypersensitivity, methemoglobin, Hemagglutination value, hemolytic value, plasma corticosterone.

서 론

Acetobacter pasteurianus IFO 13751-5가 생산하는 다당류의 항암효과 및 이들이 면역반응에 미치는 영향을 검토한 결과, 다당류가 *in vivo*에서 높은 항암효과를 나타내는 반면 *in vitro*에서는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으며 혈중 백혈구수 및 복강 세포수가 현저한 증가를 보였고 면역 관련 장기의 중량도 증가하였으나 다당류가 마우스의 macrophage활성에 미치는 영향은 체내의 항상성을 초월하여서까지 마우스의 면역반응을 증가시키지는 않았다(1, 2). 다당류의 항암효과는 종양 세포에 대한 직접적 세포독성 작용이라기보다는 다른 경로 즉, 체내의 방어기능을 증가시켜줌으로써 암의 성장을 억제하는 것으로 생각되어진다. 따라서 보다 상세한 항암작용의 기전을 알아보기 위하여 mouse의 체액성 면역반응과 세포성 면역반응(3, 4)을 검토하기 위하여 Arthus reaction 및 Delayed-type hypersensitivity에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 T-

cell과 B-cell의 상호 작용 및 macrophage가 관여하는 항체 생성 정도를 검토하였으며 이외에 적혈구 응집소가, 용혈소가 및 체액성 면역의 또 하나의 지표가 되어지는 혈중 methemoglobin에 미치는 영향 등을 검토하였다.

재료 및 방법

시 료

본 실험에 사용한 시료는 전보(5)에서와 동일하게 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5가 생성한 다당류를 정제하여 얻은 건조분말 다당류를 사용하였으며 투여량은 결과란에 표시하였다. 또한 시료는 투여시외는 냉장보관하며 사용하였다.

실험동물 및 종양세포

본 실험에 사용한 실험동물 및 종양세포는 전보(1)와 같은 체중 18-22g의 건강한 음성 ICR mouse와 Sarcoma-180 tumor cell을 사용하였다.

항체 매개형 과민 반응 및 지연형 과민 반응에 미치는 영향

항체 매개형 과민 반응(Arthus reaction, AMH) 및 지연형 과민반응(Delayed type hypersensitivity, DTH)에 미치는 영향은 Henningsen 등의 방법(6-9)에 따라 조제한 종양 세포 부유액을 실험 동물의 왼쪽 서혜부에 0.1ml(1.0×10^6 cells/mouse)씩을 피하 이식한 후 24시간 후부터 시료를 10일간 연속으로 복강내에 투여하였으며 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 종양 세포를 이식한 날로부터 2일째 되는 날 BSA 용액과 FCA를 동량씩 섞은 W/O emulsion(BSA : FCA = 1:1)을 실험 동물의 tail base에 0.05ml씩 피하 주사하여 感作(sensitization)시킨 뒤 7일 후 미리 두께를 측정된 실험 동물의足足에 0.03ml의 HBSA를 피하 주사하여 challenge시킨 다음 3시간(AMH) 및 24시간(DTH) 후에 각각足足의 두께를 micrometer로 측정하여 그 증가치를 관찰하였다.

용혈반 형성 세포수(Plaque Forming Cells, PFC)에 미치는 영향

대조군에는 생리 식염수를, 시료 투여군에는 시료를 8일간 연속으로 복강내에 주사하였으며, 시료 투여 최종일로부터 2일 후에 Alsever's 용액으로 희석하여 조제한 2% SRBC(Sheep Red Blood Cell) 현탁액 0.2ml(8×10^7 cells/mouse)씩 복강내에 주사하여 SRBC에 대한 immunization을 행하였다. Immunization시킨 4일 후에 실험 동물을 치사시키고 즉시 비장을 적출하여 병냉의 Balanced Salt Solution(BSS) 2ml와 함께 조심스럽게 균질화(Potter El-vehjem type)한 뒤 BSS 8ml를 취하여 200mesh 체로 여과하고 원심분리($600 \times g$, 15min)한 후 침전을 BSS 4ml에 부유시킨 다음 BSS를 첨가하여 전체를 8ml로 하고 비장 세포수를 hemacytometer로 측정하였다. 시험관에 건조보체를 BSS로 1:6으로 희석시킨 후 12.5% SRBC와 동량으로 혼합한 complement-SRBC 200 μ l, BSS 250 μ l 및 비장 세포 부유액 50 μ l를 넣어 37°C로 가온한 후, 잘 혼합하여 microchamber에 50 μ l씩 기포가 발생하지 않게 넣어 주고 microchamber를 wax:vaseline(1:1)용액으로 밀봉하여 CO₂ incubator에서 37°C, 1시간 배양하여 형성된 용혈반(hemolytic plaque)수를 간접 광선하에서 측정하고 1×10^6 개의 비장 세포 중의 용혈반 형성 세포수(PFC/ 10^6 spleen cell) 및 비장 세포 전체 중의 용혈반 형성 세포수(PFC/spleen

cell)를 계산하였으며, 모든 실험은 무균적으로 실시하였다(10).

비장 세포의 Rosette형성 세포수에 미치는 영향

비장 세포의 rosette forming cell(RFC)검정은 Boch 등의 방법(11)에 따라 PFC실험에서 얻은 비장 세포 부유액 0.25ml(5×10^6 cells/ml)와 SRBC부유액 0.25ml(5×10^7 cells/ml)를 혼합하여 원심분리($200 \times g$, 10min)하여 4°C에서 2시간 방치하였다. 여기에 0.3% methylene blue 1방울을 가하고 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후 이 재부유액 1방울을 hemacytometer에 떨어 뜨리고 현미경하에서 관찰하였다. 이때 비장 세포에 SRBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cell (\%)} = \frac{\text{Number of rosette forming cells}}{\text{Total cell counted} \times \text{Viability}} \times 100$$

적혈구 응집소가 및 용혈소가의 측정

적혈구 응집소가(Hemagglutination titer : HA titer)의 측정은 PFC와 동일한 방법으로 처리한 실험 동물의 경동맥으로부터 혈액을 채취하고 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 각각의 비동화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 혈청 0.025ml와 HBSS에 부유한 0.5% SRBC 0.025ml를 잘 혼합한 후 37°C에서 18시간 방치하여 적혈구의 응집 유형을 관찰 판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다(12).

적혈구 용혈소가(Hemolysin titer : HY titer)의 측정은 HA titer와 동일한 방법으로 희석한 혈청 0.025ml와 HBSS로 부유한 0.5% SRBC 0.025ml를 잘 혼합한 다음 HBSS로 20배 희석한 guinea pig complement 0.025ml씩을 가한 후 37°C에서 1시간 방치하여 용혈여부를 관찰하였다. 이때 완전 용혈을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 용혈소가로 판독하였다(13).

Methemoglobin함량에 미치는 영향

시료 투여군에 시료를, 대조군에는 생리식염수를 5일간 연속으로 복강내에 투여하고 5일째 되는 날 aniline(0.7mM/kg)을 같이 투여하여 methemoglobin을 유도한 후 30분, 60분, 90분, 120분, 150분 및 180분에 각 실험 동물 눈의 정맥총으로부터 hep-

arin 처리된 모세관으로 혈액을 채취하여 KCN을 함유한 0.01M Tris buffer solution으로 약 1,500배 희석하고 CO gas로 포화시켜서 420nm에서의 흡광도 (A_1)를 측정하였다. 여기에 약 10mg의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 를 가하여 잘 섞은 후 15분간 방치하여 420nm에서 흡광도(A_2)를 재측정하여 이로부터 다음 식에 따라 methemoglobin의 함량(%)을 계산하였다(14).

$$\text{Methemoglobin}(\%) = \frac{(A_2 - A_1) \epsilon_{420}^{\text{COHb}}}{A_2 (\epsilon_{420}^{\text{COHb}} - \epsilon_{420}^{\text{CNMetHb}})} \times 100$$

마우스의 경우 420nm에서의 COHb과 CNMetHb에 대한 철해모글로빈의 1몰당 몰흡광도(ϵ)가 각각 1.952와 1.130이다.

Plasma corticosterone의 측정

대조군에는 생리 식염수를, 시료 투여군에는 약물을 10일간 연속으로 복강내에 투여하였다. 시료 투여 최종일로부터 2일째 되는 날, 각 실험 동물로부터 혈액을 heparin 처리한 시험관에 취하여 원심분리(3,000rpm, 10min)한 뒤 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장 300 μl 에 증류수 700 μl 를 가한 후 3 μl 의 isooctane으로 잘 씻어 준 후 다시 4ml의 CHCl_3 를 가하여 수회 진탕 혼합한 다음 원심분리(2,500rpm, 5min)하여 CHCl_3 층을 취하였다. 여기에 증류수 500 μl 및 0.1N- NaOH 500 μl 를 가한 후 잘 흔들어 준 다음 원심분리(2,500rpm, 5min)하여 3ml의 CHCl_3 층을 분리하였다. 여기에 미리 형광도를 측정 한 H_2SO_4 -EtOH 용액 3ml를 가하여 진탕 혼합한 다음 원심분리(2,500rpm, 5min)하여 CHCl_3 층은 버리고 처음 형광도를 측정 한 지 90분 후 H_2SO_4 -EtOH 층의 형광도를 470nm와 518nm에서 측정하였다(15-18).

통계 처리

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

결과 및 고찰

항체 매개형 및 지연형 과민 반응에 미치는 영향

Positive 대조군의 경우 족척의 두께가 AMH의 경우 10.30, DTH의 경우 6.52였으나, sarcoma 180을 이식함으로써 각각 5.44 및 3.98로 45.76% 및 38.96% 정도 감소되어졌다. 그러나 sarcoma 180을 이식하고 난 뒤 약물을 50mg/kg과 75mg/kg을 투여한 경우 그 증가폭이 AMH의 경우 8.89와 8.65, DTH의 경우는 5.77과 5.82로 거의 정상 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다(Table 1).

본 실험 결과에서는 항체 매개형 과민 반응 및 지연형 과민 반응은 항암 실험에서 높은 항암 효과를 보인 다당류가 마우스의 생체내에서 체액성 면역과 관련되어진 보체계를 활성화시켜 주고, 한편으로 생체 면역 반응에서 주요한 역할을 하는 흉선과 관련하여 흉선 의존성 T-림파구의 작용을 특이적으로 활성화시켜 준 것으로 생각되어진다(3, 4). 따라서 본 실험에서 시료로 사용한 다당류의 *in vivo*에서의 항암 효과는 세포 매개형 면역 반응에 의한 것임을 간접적으로 시사해 준다.

용혈반 형성 세포수에 미치는 영향

용혈반 형성 세포수는 흉선 의존성 항원인 SRBC의 항체 생산 정도를 보는 체액성 면역 반응으로서 이들 비장의 항체 생성은 T-cell과 B-cell의 상호 작용 및 macrophage가 관여하고 이들의 활성화 정도를 짐작할 수 있다. Table 2에서 나타낸 바와 같

Table 1. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on the antibody mediated hypersensitivity and delayed type hypersensitivity in sarcoma 180 tumor bearing ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Footped thickness(10^{-1}mm) ^{a)}	
			AMH	DTH
Negative control	—	9	7.32 \pm 1.02	4.50 \pm 1.33
Positive control	—	9	10.30 \pm 0.96	6.52 \pm 0.67
S-180 control	—	9	5.44 \pm 1.88	3.98 \pm 1.16
S-180polysaccharide	50	9	8.89 \pm 1.25 ^{b)}	5.77 \pm 1.89 ^{b)}
	75	9	8.65 \pm 1.23 ^{b)}	5.82 \pm 1.72 ^{b)}

a) Mean \pm S. E.

b) $p < 0.01$

Table 2. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on hemolytic plaque forming cells in the spleen of ICR mice immunized with SRBC.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	SRBC	Spleen cell ($\times 10^7$)	PFC/ 10^6 Spleen cell ^{a)}	PFC/Spleen cell ($\times 10^3$) ^{b)}
Control	—	7	8×10^7	33.7	845.7 ± 169	285 ± 57
Polysaccharide	50	7	8×10^7	37.1	1002.7 ± 140^c	372 ± 52^c
	75	7	8×10^7	34.8	1204.1 ± 187^b	419 ± 65^b

a) Mean \pm S. E.

b) $p < 0.05$

c) $p < 0.01$

이 immunity antigenic target cell로서 SRBC를 이용하여 다당류가 마우스의 PFC에 미치는 영향에 대한 결과 대조군에 비하여 50mg/kg과 75mg/kg의 투여군에서 PFC/spleen cell의 경우는 각각 30.5%와 47.02% 이었고, PFC/ 10^6 spleen cell의 경우는 각각 18.56%와 42.38%로서 다소 증가를 볼 수 있었다.

이러한 결과는 *Lentinus edodes*로부터 추출한 다당류인 lentinan을 투여한 정상 마우스에서는 SRBC에 대한 면역 반응이 증강되어졌으나, 흉선을 절제하여 T-cell이 결여된 마우스에서는 별다른 효과가 없다는 보고(19)와 비교해 볼 때 본 실험에서의 항체 생성의 증가는 helper T-cell의 활성화에 기인한 것으로 생각되어진다.

Rosette형성 세포수에 미치는 영향

다당류를 50mg/kg을 투여한 경우는 대조군의 15.39%에 비하여 18.02%로 다소 증가를 보였으나 75 mg/kg의 경우는 14.67%로 오히려 대조군에 비하여 다소 저하되어졌다(Table 3).

이러한 실험 결과는 cyclophosphamide를 투여한 마우스에서 비장 세포의 rosette 형성능이 저하된다는 김 등(20)의 보고와 cyclophosphamide가 주로 T-cell에 작용한다는 Aisenberg 등(21)의 보고 및 effect T-cell이 rosette 형성 세포라는 Wybran 등(22)의 보고와 비교해 볼 때 본 실험에서 시료로 사용한 다당류가 마우스의 effect T-cell을 억제하지는 않았으며, 또한 effect T-cell을 활성화시키지도 않았음을 알 수 있었다.

적혈구 응집소가 및 용혈소가의 영향

적혈구의 응집 및 용혈 반응은 感作 항원(sensitized antigen)에 대한 특이 항체(specific antibody)의 직접 또는 간접적인 항원-항체 반응으로

Table 3. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on erythrocyte(E) rosette of spleen cells in ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Rosette forming cell ^{a)} (%)
Control	—	7	15.39 ± 1.53
Polysaccharide	50	7	18.09 ± 2.09
	75	7	14.67 ± 1.36

a) Mean \pm S. E.

서 SRBC에 대한 항체 생성 능력을 정량적으로 판별할 수 있는 하나의 체액성 면역 반응(23)으로서 Table 4에서 보는 바와 같이 적혈구 응집소가의 경우에 있어서는 대조군이 3.58인데 비하여 50mg/kg과 75mg/kg의 경우 4.58과 4.42로 각각 27.93%와 23.45%로 다소 증가를 나타내었으나 적혈구 용혈소가의 경우는 별 차이를 나타내지 않았다. 따라서 이러한 결과는 실험에 사용한 다당류가 마우스의 *in vivo*에서 SRBC로 감작되어진 항원에 대하여 다소의 항체 생성 반응에 관여함을 알 수 있으므로 PFC 반응의 결과와 비교해 볼 때 좋은 결과라고 생각되어진다.

Methemoglobin함량에 미치는 영향

Table 5에서 나타낸 바와 같이 aniline을 사용하여 methemoglobin을 유발시킨 후 다당류를 투여하여 마우스의 methemoglobin 형성에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 대조군에 비하여 약물 투여군이 다소 감소하기는 하였으나 뚜렷한 감소는 보이지 않았다. 이러한 결과들은 정상적인 마우스의 적혈구에서도 다소의 methemoglobin이 존재하며 또한 intracellular reductive system에 의하여 methemoglobin의 축적을 방지하고 있다(24)는 사실에 기인한 것으로 생각된다.

Table 4. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on hemagglutination and hemolysin titer (antibody production) of ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	HA titer ^{a)} (log ₂)	HY titer ^{a)} (log ₂)
Control	—	7	3.58±0.30	1.48±0.12
Polysaccharide	50	7	4.58±0.15 ^{c)}	1.58±0.10 ^{b)}
	75	7	4.42±0.15 ^{c)}	1.52±0.16 ^{b)}

a) Mean±S. E.

b) Non significance

c) p<0.05

Table 5. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on Met-Hb content in ICR mice treated with aniline.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Methemoglobin(%) ^{a)}					
			30min	60min	90min	120min	150min	180min
Control	—	7	12.99±0.58	6.07±0.71	5.45±0.47	3.81±0.46	1.85±0.21	1.24±0.28
Polysaccharide	50	7	9.60±0.61	7.05±0.49	5.42±0.32	3.72±0.37	1.50±0.32	0.86±0.34
	75	7	9.45±0.64	7.50±0.43	5.66±0.29	2.60±0.41	1.32±0.29	1.09±0.31

a) Mean±S. E

Plasma corticosterone의 영향

본 실험 과정에서 실험 동물의 사육 조건 및 시료의 투여에 따른 마우스의 stress 정도를 측정하기 위하여 마우스의 plasma corticosterone 농도를 측정 한 결과는 약물 투여군과 대조군에서는 별 차이가 나타나지 않았다(Table 6). 이러한 결과는 Fraker (25)의 polybrominated biphenyls(PBB)를 투여한 경우 대조군에 비하여 plasma corticosterone이 현저히 증가할 뿐만 아니라, PBB가 임파구 형성에 영향을 미침으로써 면역 독성을 나타낸다고 보고하였다. 본 실험에서 plasma corticosterone이 대조군과 약물 투여군에서 별 차이를 나타내지 않은 것은 투여한 약물이 체내 면역 반응에 따른 장애를 가져오지 않을 뿐만 아니라 실험 과정 중의 기술적인 조작

에서도 마우스의 circadian rhythms에 따른 악영향을 미치지 않았음을 알 수 있는 좋은 결과라 할 수 있다.

요 약

항체 유도 염증 반응인 항체 매개형 과민 반응과 지연형 과민 반응은 축적 두께가 다당류에 의해 거의 정상 수준까지 회복되었다. Anilline으로 유도한 methemoglobin의 함량도 거의 차이가 없었다. PFC/spleen cell과 PFC/10⁶ spleen cell의 경우 다소 증가를 나타내었으나, PFC는 뚜렷한 증가나 감소를 나타내지 않았으며, 적혈구 응집소는 다소 증가하였으나 적혈구 용혈소는 거의 차이가 없었다. 마우스의 plasma corticosterone의 농도는 사육실 및 다당류 투여에 따른 stress 요소는 거의 없었다.

참고 문헌

1. 김동석, 류병호(1991), 한국식품과학회지, **23**, 405.
2. 김동석, 정연봉, 류병호(1992), 한국생물공학회지, **7(1)**, 39.
3. C. D. Klassen, M. D. Amdur and J. D. Doull

Table 6. Effect of polysaccharide of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 on plasma corticosterone concentration in ICR mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice	Plasma corticosterone ^{a)} (μg/d)
Control	—	7	12.26±0.97
Polysaccharide	50	7	15.68±1.26
	75	7	13.56±1.34

a) Mean±S. E.

- (1980), *Toxicology* 3rd Ed., p. 245, Macmillan Publishing Company, New York.
4. B. Benacerraf and E. R. Unanue(1980), *Textbook of Immunology*, p. 109, Williams & Wilkins, Baltimore/London.
 5. 김동석, 류병호(1991), *한국식품과학회지*, **23**, 291.
 6. G. M. Henningsen, L. D. Koller, J. H. Exon (1984), *J. Immunol. Methods*, **70**, 153.
 7. R. G. Titus and J. M. Chiller(1981), *J. Immunol. Methods*, **45**, 65.
 8. Y. Katsura, K. Nakano, Y. Kabara and I. Uesaka(1977), *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, **53**, 152.
 9. N. H. Ruddle(1978), *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, **57**, 560.
 10. A. Cunningham(1973), *Allergy*, **17**, 5.
 11. J. F. Bach and M. Darderne(1972), *Cell immunol.*, **3**, 1.
 12. R. R. A. Coombs and M. L. Fiset(1954), *Brit. J. Exp. Path.*, **35**, 472.
 13. A. B. Stavitsky(1954), *J. Immunol.*, **72**, 360.
 14. F. L. Rodkey, T. A. Hill, L. L. Pitts and R. F. Robertson(1979), *Clin. Chem.*, **25**, 1388.
 15. M. L. Sweat (1954) *Anal. Chem.*, **26**, 773.
 16. D. Glick, D. Von Redlick and S. Levine (1964), *Endocrinology*, **72**, 653.
 17. M. Martin and A. Martin(1968), *Endocrinology*, **28**, 137.
 18. P. DePasouale-Jardieu and P. Fraker(1979), *J. Nutr.*, **109**, 1847.
 19. Y. Y. Maeda and G. Chihara(1973), *Int. J. Cancer*, **11**, 153.
 20. K. Y. Kim and T. Y. Ha(1979), *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **14**, 71.
 21. A. C. Aisenberg and C. Davis(1968), *J. Exp. Med.*, **128**, 35.
 22. J. Wybran, A. Govaerts and T. Appelboom (1978), *J. Immunol.*, **121**, 1184.
 23. I. M. Roitt, J. Brostoff and D. K. Male(1985), *Immunology*, p. 25. 1, Grower Medical Publishing, London.
 24. O. Bodansky(1951), *Pharmacol. Revs.*, **3**, 144.
 25. P. J. Fraker(1980), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 1.