

영지의 균사체성 β -glucan에 의한 Raw 264.7 대식세포의 Nitric Oxide 생성

한만덕* · 이은숙 · 김영권 · 이준우¹ · 정 훈¹ · 윤경하²

김천대학 치위생과, ¹일양약품 중앙연구소, ²순천향대학교 생물학과

Production of Nitric Oxide in Raw 264.7 Macrophages treated with Ganoderan, the β -Glucan of *Ganoderma lucidum*

Man-Deuk Han*, Eun-sook Lee, Young-Kweon Kim,
June-Woo Lee¹, Hoon Jeong¹ and Kyung-Ha Yoon²

Department of Dental Hygiene, Kimchun College, Kyungbuk, Kimchun 740-200,

¹Biotechnology Lab. Il Yang Pharm. Co., Ltd., Kyunggi 449-900,

²Department of Biology, Soonchunhyang Univ., Chungnam 347-400, Korea

ABSTRACT: Ganoderan (GAN), an immunomodulating β -glucan of *G. lucidum*, induces potent antitumor immunity in tumor-bearing mice. This study was set up to elucidate the ability of macrophage activation of GANs. GAN-treated Raw 264.7 macrophages showed enhanced production of nitric oxide (NO). The ability of GANs to produce NO was based on differences in chemical composition of GANs obtained from the mycelium on various carbon sources and mycelial fractionation. The highest NO production was observed in CW-AS-WS polysaccharide which was extracted from the mycelial wall. GAN-treated Raw 264.7 cells gave a 2- to 5-fold (24 hr) formation of NO levels compared with those treated with medium only. Partial removal of the protein in the extracellular GAN by TCA treatment did appreciably reduce its capacity to secrete NO. The mixture effect of GAN and LPS increased the nitric oxide secretion from RAW 264.7. The cell proliferation of GAN-treated Raw 264.7 cell lines inhibited as compared with its control. Of the culture supernatant of macrophage activated by GAN, the percentage of cytotoxicity against mouse leukemia L1210 cells was slightly dependent on the amount of NO in the culture supernatants of the activated-macrophages. These results indicate that the β -glucan-related polysaccharides of the higher fungus activate macrophage and release nitric oxide. It also suggests that murine macrophages possess certain receptors for β -anomeric glucans and play a critical role of β -glucan-related tumor killing mechanism.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, Macrophage, Nitric oxide, β -glucan

진균류의 (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan계 다당류는 현재 임상에서 암을 치료하는데 면역요법제로 사용되고 있는 생리활성 물질이다(Franz, 1989). 대표적인 예로는 β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 6) glucan을 주요 골격으로 하는 PS-K(Tsugagoshi 등, 1974), β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) glucan인 schizophyllan(Komatsu 등, 1969) 및 lentinan(Chihara 등, 1969) 등이 있다.

항암활성을 나타내는 담자균류의 다당류에 대한 연구는 주로 다당류의 추출조건 및 구조 등에 따른

보체계의 활성화, coagulation system, 면역세포의 증식, 항체생성, phagocytic cell의 수용체 등에 미치는 영향에 대하여 집중되었으나, 항암작용의 생화학적 기전은 완전히 밝혀지지 않았다. 그러나 연구 결과를 종합해 볼 때 항암성 다당류는 대식세포를 중심으로 한 비특이적인 숙주 저항성을 유도하여 면역계 활성화에 의해 암세포 성장을 억제하는 것으로 여겨진다.

체내 이물질에 대해 초기 면역 반응을 담당하는 대식세포는 활성화와 함께 일련의 면역 반응을 유도한다. 대식세포는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 여러

*Corresponding author

가지 자극물(stimuli)에 의해 활성화되는데, 지금까지 보고된 대식세포 활성화 인자로는 그람음성균의 lipopolysaccharide(LPS) 또는 adjuvant(Hibbs 등, 1972), *Mycoplasma* sp.(Loewenstein 등, 1983), lymphokine류(Pissens 등, 1975), interferon(Schultz 등, 1978), tumor-cell membrane(Adams 등, 1981) 등이 있다. 특히 cytokine 가운데 가장 일반적인 대식세포 활성화인자는 IFN- γ 이며, LPS 역시 대식세포를 활성화하여 종양세포나 체내 기생체에 대항할 수 있는 면역활성을 유발시키는 가장 잠재력 있는 활성화물질로 밝혀졌다(Carswell 등, 1975). Cui 등(1994)은 활성화된 대식세포가 암세포를 인식하고 파괴시킬 수 있는 능력이 있다고 보고하였다.

활성화된 대식세포는 표적세포 살해 뿐만 아니라, 세포독성능이 있는 TNF(Ichinose 등, 1988), IL-1(Suttles 등, 1990), ROI(Halliwell 등, 1984), NO(Moncada와 Higgs, 1993) 및 cytolytic protease(Johnson 등, 1983) 등과 같은 분자를 분비한다. 이러한 물질들은 반응중간 대사물질 경로, cytokine 및 phagocytosis 기전을 통해 생성된다(Roitt 등, 1985). 반응 중간 대사 물질적 경로는 superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 및 singlet oxygen 등과 같은 반응 산소 대사산물(reactive oxygen intermediates, ROI)(Halliwell 등, 1984)과 반응 질소대사산물(reactive nitrogen intermediate, RNI)(Moncada와 Higgs 1993)을 유리시켜 체내의 항균 및 항암작용을 갖는다. 대식세포에 의한 반응 질소 대사산물(RNI)의 생성은 최근에 밝혀진 경로로 NO가 대표적인 산물이다. L-arginine 의존성 대사산물인 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 는 활성화된 대식세포로부터 생성되며, 이는 암세포의 미토콘드리아 호흡계를 차단한다는 Hibbs 등(Hibbs 등, 1987)의 발표이래, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*와 같은 세포 기생성 병원 미생물을 살해시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Chan 등, 1992). NO생성의 생화학적 경로는 L-arginine 의존성으로 유도성 효소인 nitric oxide synthetase에 의해 L-citrulline과 NO로 전환된다(Marletta 등, 1993). L-arginine 반응대사산물인 NO는 단

시간 존재하는 반응 중간산물로서 숙주 방어와 면역학적 반응시 대식세포와 polymorphonuclear neutrophil(PMN)에서 다량으로 생성된다(Moncada와 Higgs 1993). 세포독성에 대한 NO의 생화학적 기전은 미토콘드리아의 호흡계에 중심적인 역할을 하는 효소와 DNA 합성에 관여하는 주요한 효소들에 존재하는 iron을 포함하는 잔기들과 NO가 결합하여 효소적 반응을 저지시키는 것으로 보고있다. NO에 의한 종양세포의 살해 기전에 관한 연구로, Higuchi 등(1990)은 L-arginine으로부터 유래된 대식세포의 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 는 P815세포에 대한 cytolytic 효과가 있는 것으로 발표하였다. 즉, 활성화된 대식세포는 NO_2^- 를 발생시키며, NaNO_2 가 P815 암 세포주에 대하여 가장 강력한 세포독성을 보였고, 배지내 L-arginine이 고갈되면 NO_2^- 의 생성과 P815에 대한 세포독성도 저하한다고 하였다. 이와 같은 실험 결과는 활성화된 대식세포에 의한 표적 암세포 살해에 L-arginine 의존성 NO_2^- 가 관여하며, 기타 암세포, 세균, 바이러스, 기생충 등과 같은 병원성 이물질을 제거할 수 있는 생화학적 경로임이 밝혀졌다.

Han 등(1995a)은 항암성 다당류를 다량으로 얻기 위하여 영지 균사체를 여러 탄소원에 따라 배양하고 알칼리 가용성 다당류들을 추출하여 물리적 및 화학적 특성에 대하여 보고한 바 있다. 또한 영지 균사체를 구성하는 다당류 가운데 생리 활성이 높은 다당류를 얻기 위하여 균사체를 분획하여 그 조성 및 생리적 활성을 보고한 바 있다(Han 등, 1995b). 본 연구는 Han 등이 영지로부터 추출한 시료 가운데 체내 면역을 증강시켜 세균, 바이러스 및 암세포 등을 생장을 억제시킬 수 있는 생리활성 물질을 검색하기 위하여, 대식세포 활성화능이 우수한 다당류의 조건을 확인하고자 Raw 264.7 대식세포에 대하여 NO의 생성능과 대식세포의 성장 및 암세포주에 대한 세포독성을 확인하였다.

재료 및 방법

시 약

RPMI 1640, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지, 및 fetal calf serum은

GIBCO(Grand Island, N. Y)사로부터 구입했고, streptomycin 및 penicillin, LPS(*E. coli* 0127: B8), IFN- γ , NaNO₂, 그리고 대조 다당류로 사용한 laminarin, β -glucan, zymosan 등은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

검색시료의 조제

본 실험에 사용한 시료는 *G. lucidum* IY009의 균사체를 여러 조건에 따라 배양하고 추출하여 조제하였다. 균사체의 배양용 배지는 yeast extract 5g, K₂HPO₄ 0.01g, KH₂PO₄ 5g, MgSO₄·7H₂O 1g을 물 1l에 녹여 기본 배지(IYSM)로 삼았으며 여기에 탄소원으로 포도당(GLU), 과당(FRU), 말토오스(MAL), 갈락토오스(GAL), 유당(LAC), 서당(SUC), 가용성 녹말(STA)을 각각 20g씩 첨가하여 실험배지로 사용하였다. 균사체의 배양은 용량 500 ml 삼각 플라스크 속에 100 ml의 배지를 넣고 pH를 0.1N HCl을 사용하여 5.5로 조정하고 다음 15 lb/15분간 고압 멸균하였다. 여기에 potato dextrose broth에서 전 배양한 *G. lucidum* IY 009 균사체를 homogenizer(Nihonseiki Kaisha AM-10)에서 수초간 균질화 시킨 후 균주를 10 ml 씩 접종하여 27°C에서 6일간 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 6일간 배양된 균사체액에 NaOH를 가해 최종 농도가 2.0N 되게 조정하고 24시간 방치한 후, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 acetic acid로 중화시킨 후, 3배량의 에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치했다. 에탄올에 침전된 다당류는 원심분리(3000×g)하여 침전물을 수확하고, 이에 소량의 증류수로 용해시켜 투석 백(Sigma Co.)에 넣은 후 흐르는 물에서 1주일간 투석하였다. 투석된 다당류는 원심분리(5000×g)하여 수용성(WS)인 상등액과 비수용성(WI)인 침전물을 분획화 한 후, 각각을 동결건조하여 G-GLU, G-SUC 등과 같은 탄소원에 따른 영지의 GAN를 얻었다(Han 등, 1995a). 또한 균사체의 분획에 따른 다당류는 Han 등(1995b)의 방법에 따라 GAN을 분리하였다.

Raw 264.7 세포

Raw 264.7 대식세포주는 원광대학교 의과대학

미생물학교실로부터 분양받아 nitrogen tank에 보관하고, 실험에 사용할 세포는 10% FCS, 40 mM glutamin, streptomycin 및 penicillin(100 μ g/100U), 그리고 0.37%의 CaCO₃를 함유한 DMEM 배지에서 계대배양하여 사용하였다.

L1210 암세포주 배양

마우스 leukemia cell인 L1210은 5% fetal calf serum, gentamicin(20 mg/l), 10 mM β -mercaptoethanol(5 ml/l)이 함유된 RPMI 1640배지에서 배양하였다. T-25 flask에서 배양된 세포는 5×10^3 cells/ml로 96 well에 분주하고, 검색시료를 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂하에서 48시간 동안 배양한 후 세포 독성을 측정하였다.

대식세포 활성화

Raw 264.7세포는 Costar petri-dish에 2×10^6 cells/ml 세포가 되도록 분주하고 37°C, 5%의 CO₂하에서 전 배양하였다. 배양된 대식세포 가운데 비부착성 세포를 제거하고, 실험전 37°C로 유지된 신선한 DMEM 배지로 수세한 다음 수확하였다. 수확된 대식세포는 tryphan blue로 염색하여 95%의 세포 생존율을 가질 때 실험에 활용하였다. 세포수는 hemocytometer를 이용하여 2×10^6 cells/ml로 조정하고 96 well에 200 μ l씩 분주(4×10^5 cells/well)하여 37°C, 5% CO₂하에서 90분간 배양하였다. 90분 후 비부착성 대식세포를 제거하고, 다시 신선한 180 μ l의 DMEM배지를 각각의 well에 분주하였다. 시험하고자 하는 시료(GAN의 경우 10 μ g)를 포함한 배지 20 μ l를 각각 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂하에서 24시간 동안 배양한 후 대식세포의 활성화 정도를 측정하였다.

NO의 측정

대식세포가 생성하는 NO는 6-8초간 존재하며 그후 자발적으로 산화되어 NO₂⁻와 NO₃⁻ 상태로 전환되어 측정된다. 따라서 생성되는 reactive nitrogen intermediate(RNI)양은 NO₃⁻를 환원 요소로 전환시켜야 정확하지만 보통 NO₂⁻가 대부분이기 때문에 이를 발색시켜 Ding 등(Ding 등, 1988)의 방법에 따라 간접적으로 정량한다. 간략하

면, 100 μ l의 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide/0.1% naphthylene diamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4)를 섞고 실온에서 방치한 후, ELISA reader(Bio-Tek instrument, Inc. Ceres UV. HDI)를 이용해 540 nm에서 측정하였다. NO_2^- 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성하여 얻었다.

세포증식능력 측정

활성화된 Raw 264.7 cells의 증식 및 L1210에 대한 세포독성은 MTT방법(Mosmann 등, 1985)을 변형하여 측정하였다. 배양된 세포를 포함한 microplate는 원심 분리하여 배양액 20 μ l를 남기고 상등액을 버리고, 각 well에 10 μ l MTT solution (5 mg/ml)을 넣어서 37°C에서 4시간 방치하였다. 배양액을 버리고 100 μ l DMSO(100%)을 넣어서 soluble debris가 완전히 녹을 때까지 microplate reader(Ceres UV900 Hbi, U.S.A.)에서 5분간 진탕한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 시료의 흡광도 평균 및 표준 편차를 구한 다음 대조군에 대한 각 시료 OD 백분율을 구하여 결과를 판정하였다.

결 과

탄소원에 따라 배양된 균사체에서 수획된 다당류의 NO 생성능

영지 균사체를 여러 탄소원에 따라 배양하고 균사체로부터 각각 추출된 GAN을 Raw 264.7세포 배양액에 10 μ g/ml씩 투여하였을 때, Fig. 1과 같이 7~22 μ M의 NO를 생성하였다. 탄소원에 따라 수획된 다당류들은 일반적으로 비수용성(WI) GAN은 수용성(WS)보다 NO의 생성을 더 촉진시켰다. 그러나 대식세포로부터 가장 많은 NO의 생성을 유도시킨 것은 G-SUC(WS)로써 22 μ M의 NO를 생성시켰다. G-SUC(WS)는 sucrose에서 배양된 균사체의 알칼리 가용성(AS)이며, 수용성(WS)인 다당류로 평균 분자량은 30 kD이며, 총 탄수화물은 87%, 단백질은 3.4%로 구성되어 있다. 총 탄수화물의 구성당은 48%의 glucose와 22%의 mannose로 구성된 glucomannan성 GAN이다(Han 등, 1995a).

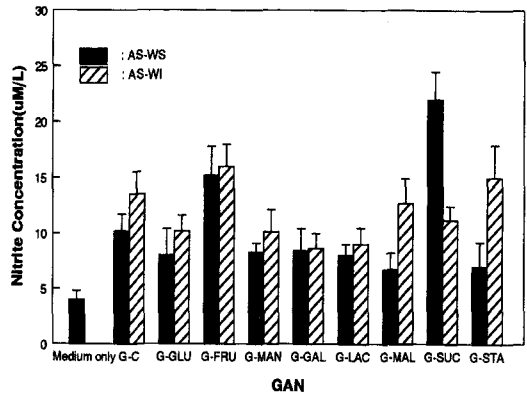


Fig. 1. Nitric oxide formation (μ M/L) of Raw 264.7 macrophage activated by GANs. These GANs were obtained from the mycelium of *G. lucidum* cultured in various carbon sources. Raw 264.7 cells were cultured for 24hr in DMEM with 10 μ g/ml of GAN. The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Each bar represents the mean \pm S. D of three independent experiments done in duplicate. Abbreviations: G-GLU; Ganoderan obtained from glucose medium, GAL; galactose, FRU; fructose, LAC; lactose, MAL; maltose, MAN; mannose, SUC; sucrose, and STA: soluble starch medium. AI; alkali soluble, WI; alkali insoluble WS; water soluble, and WI; water insoluble polysaccharide.

균사체 분획에 따라 분리된 다당류의 NO생성능

영지의 세포분획성 다당류가 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 CW-AS-WS, CYTO-WI, EXO-WI(non-TCA) 등의 순으로 NO 생성을 촉진시켰다. CW-AS-WS는 균사체의 세포벽 성분이며 알칼리 가용성 및 수용성의 다당류로서 4%의 단백질과 88%의 탄수화물로 구성되어 있으며, 탄수화물은 44%의 glucose와 4.7%의 mannose 등의 구성당으로 이루어졌다(Han 등, 1995b). 특히 세포외성(EXO) GAN의 경우, TCA를 처리하지 않은 EXO(non-TCA)는 TCA를 처리한 것(EXO-TCA)보다 약 1.5배의 NO생성의 증가를 보였다. TCA를 처리한 EXO는 단백질의 함량이 4%이며, 처리하지 않은 EXO는 8%인 다당류로 볼 때, 다당류에 단백질의 적절한 함량은 대식세포의 NO 생성기전에 영향을 주었다. 대조 다당류로 사용한 효모의 zymosan A로 활성화된 대식세포는

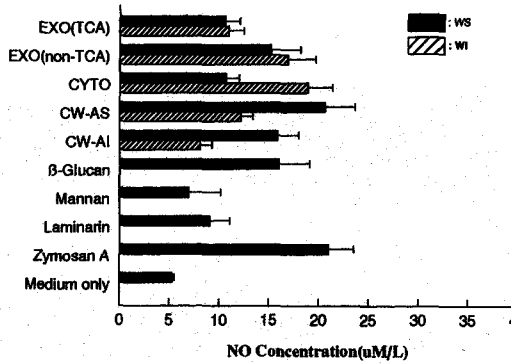


Fig. 2. Nitric oxide formation ($\mu\text{M/l}$) of Raw 264.7 macrophage activated by GANs. These GANs were obtained from the mycelial fractions of *G. lucidum*. Raw 264.7 cells were cultured for 24hr in DMEM with $10 \mu\text{g/ml}$ of GAN and other stimuli. The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Each bar represents the mean \pm S.D of three independent experiments done in duplicate. Abbreviations: TCA; polysaccharide treated with TCA, non-TCA; not treated with TCA. EXO; extracellular, CW; cell wall, and CYTO; cytoplasmic polysaccharide. AI; alkali soluble, AI; alkali insoluble, WS; water soluble, and WI; water insoluble polysaccharide.

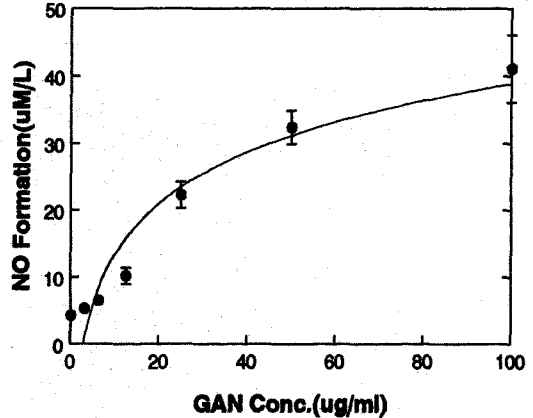


Fig. 3. Nitric oxide production ($\mu\text{M/l}$) of Raw 264.7 macrophage on the concentration of CW-AS-WS. This GAN was obtained from the mycelial wall of *G. lucidum*. Raw 264.7 cells were cultured for 24hr in DMEM with GAN. The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Values are representative of three independent experiments done in duplicate.

22 $\mu\text{M/l}$ 의 NO를 생성하는 것으로 보아 균류 효모의 세포벽 성분 역시 대식세포 활성화인자였다.

GAN 농도에 따른 NO 생성능

영지 균사체의 세포분획성 다당류 가운데 CW-AS-WS는 Raw 264.7세포에서 NO생성을 가장 많이 촉진시켰다. CW-AS-WS는 영지 균사체의 세포벽 구성다당류인 알칼리 가용성 및 수용성인 다당류이다. 이를 Raw 264.7 세포의 배양액에 농도를 달리 하였을 때, Fig. 3와 같이 NO의 생성이 농도의존적이었다. GAN의 투여 농도 $3.1 \mu\text{g/ml}$ 에서 $2.73 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었으며, $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $41.1 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었다.

GAN과 대식세포 활성화물질의 혼합에 따른 NO의 생성능

Raw 264.7 대식세포 활성화에 있어 LPS 및 cytokine인 IFN- γ 와 대식세포의 활성화능이 우수한 CW-

AS-WS의 혼합 효과를 알아본 결과 Fig. 4와 같다. 여러 stimuli로 활성화된 Raw 264.7로부터 생성된 NO를 측정된 결과, CW-AS-WS를 단독으로 처리할 경우 $15.5 \mu\text{M}$ 의 NO를 생성하였으나, IFN-

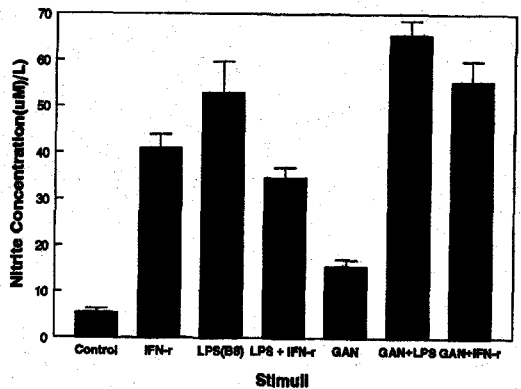


Fig. 4. Production of nitric oxide from Raw 264.7 cells on the mixture of GAN (CW), IFN- γ and LPS. Raw 264.7 cells were cultured for 24 hr in DMEM with $10 \mu\text{g/ml}$ of GAN, $10 \mu\text{g}$ of LPS and 10 units of IFN- γ . The supernatants were collected and assayed for nitrite production. Each bar represents the mean \pm S.D of three independent experiments done in duplicate.

γ 와 혼합하여 배양된 Raw 264.7세포에서는 55.4 μ M, 그리고 LPS와 혼합하여 활성화된 Raw 264.7 세포는 65.5 μ M의 NO 생성을 증가시켰다. 즉 LPS와 IFN- γ 의 단일 활성인자를 첨가한 세포보다 CW-AS-WS를 혼합할 경우 약 15 μ M의 NO 생성을 증가시켰다.

Raw 264.7세포의 증식에 미치는 GAN의 영향

Raw 264.7세포를 여러 자극물로 활성화시킨 후 세포 증식에 미치는 효과를 알아보았다. 자극되지 않은 대조배지(DMEM only)에서 24시간 배양된 세포의 증식을 100으로 하고 GAN으로 활성화된 시험군의 세포증식을 측정된 결과, 세포증식 억제율은 Fig. 5와 같다. G-LAC-WI로 활성화된 Raw 264.7세포의 경우 52%까지 세포증식이 억제되었다. 세포분획성 GAN 역시 Fig. 6과 같이 CYTO-WI, CW-AS-WS, CW-AI-WI등과 같은 분획에서는 대조군 대비 대식세포 증식은 30~40% 정도 억제되었다. 대조물질인 β -glucan, zymosan등과 같

은 다른 생물 유래성 다당류 역시 대식세포의 증식이 대조 배지보다 증식이 크게 억제되었으며, 위상차 현미경으로 관찰한 바 대식세포의 형태는 매우 큰 불규칙한 장방형으로 나타났다.

GAN으로 활성화된 Raw 264.7세포 배양액의 L1210 암세포 독성

GAN으로 활성화된 Raw 264.7세포 배양액을 마우스 leukemia세포인 L1210 세포에 10%(v/v) 가하여, 48시간 배양한 후 세포 독성을 측정된 결과 Fig. 7과 같다. 각각의 시료로 활성화된 Raw 264.7 세포 배양액은 *in vitro*에서 L1210에 대하여 12~37%의 세포독성을 나타내었다. 특히 LPS와 IFN- γ 로 활성화된 대식세포 배양액이 37%와 32%의 세포독성을 나타냈는데 IFN- γ 의 경우, 암세포에 직접적인 작용으로 기인했을 가능성도 있다. CW-AS-WS 및 CW-AI-WS의 분획으로 활성화된 Raw 264.7세포 배양액은 L1210에 약 20~32% 정도의 세포독성

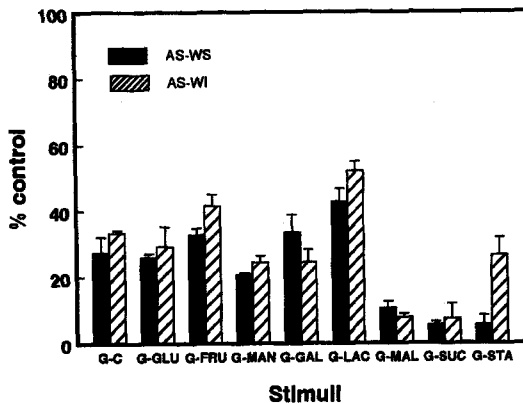


Fig. 5. Inhibition rate (%) of cell proliferation of Raw 264.7 cells upon the stimulation with GANs. These GANs were obtained from *G. lucidum* cultured in various carbon sources. The Raw 264.7 cells (2×10^6) were cultured with the medium containing 10 μ g/ml of GANs for 24 hr. After removal of the supernatants, cell proliferation was determined by MTT method. Each bar represents the mean \pm S.D of three 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% response).

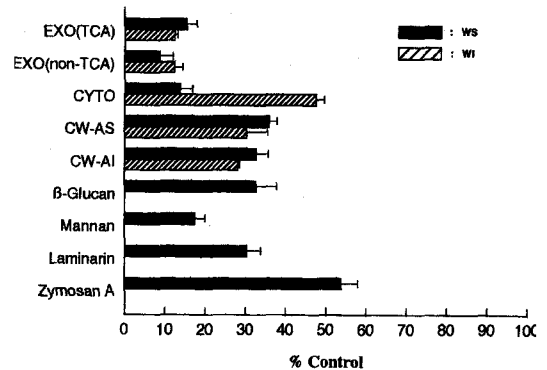


Fig. 6. Inhibition rate (%) of cell proliferation of Raw 264.7 cells upon the stimulation with GANs. These GANs were obtained from the mycelial fraction of *G. lucidum*. The Raw 264.7 cells (2×10^6) were cultured with 10 μ g/ml of GANs, 10 μ g/ml of β -glucan-related polysaccharides, 10 μ g/ml of LPS, and 10 U/ml of IFN- γ for 24 hr. After removal of the supernatants, cell proliferation was determined by MTT method. Each bar represents the mean \pm S.D of three 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).

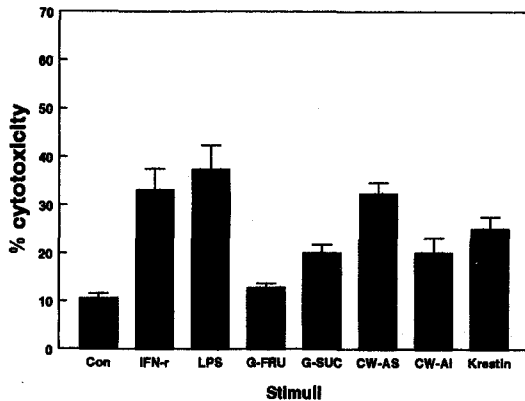


Fig. 7. The effect of GAN-activated Raw 264.7 cell secretory products on the cytotoxicity of L 1210. The Raw 264.7 cells (2×10^6) were cultured for 24 hr in medium containing 10 μ g of GANs, 10 μ g of β -glucan-related compounds, 10 μ g of LPS, 10 unit of IFN- γ and 10 μ g of Krestin per ml. The Raw 264.7 supernatant was collected and 10% (v/v) of the supernatants was added to the culture medium of L1210 (5×10^3 cells/ml in RPMI 1640). After culture for 48 hr, the cytotoxicity against tumor target cells was determined by MTT method. Each bar represents the mean \pm S.D of three independent experiments done in duplicate.

을 보였다. 활성화된 Raw 264.7세포의 배양액의 L1210에 대한 세포독성은 배지내의 NO 생성량이 증가된 경우에 더 높은 것으로 보아 NO의 량에 세포독성이 의존적이었다.

고 찰

대식세포는 면역 반응의 초기 반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, LPS 및 IFN- γ 과 같은 물질에 의하여 특이적 활성화가 유도된다. 대식세포의 활성화는 보통 priming signal 및 triggering signal 방식에 의해 일어나며 동종의 많은 암세포에 대해 cytotoxicity 및 cytostasis의 기능을 갖는 것으로 보고되었다(Marletta, 1993; Cui 등, 1994). 본 연구는 BRM으로써 이용 가능성이 높은 영지의 β -glucan계 다당류인 GAN의 대식세포 활성화 여부를 확인하고자 혈관 확장, 신경전달, 및 숙주방어와 같은 다양한 기능을 갖는 NO의 생성정도와 동종 암세포에 대한 NO의 역할에 관하여 알아보았다.

IFN- γ 와 LPS 등의 물질들은 대식세포를 활성화하여 배지 내에 NO $_2^-$ 를 생성하는 것으로 알려졌다(Chen 등, 1993), 담자균류의 β -glucan성 다당류 역시 대식세포를 활성화시켜 NO생성을 촉진하였다. 영지 균사체를 여러 탄소원에 따라 배양하고, 배양 균사체로부터 각각 수확된 GAN을 Raw 264.7세포 배양액에 10 μ g/ml씩 투여하였을 때 대조군보다 약 2~5배의 NO(7~22 μ M/l)를 생성하였다. 탄소원에 따라 수확된 GAN 가운데 가장 많은 NO의 생성을 유도시킨 것은 G-SUC(AS-WS)로 22 μ M의 NO를 생성시켰다. G-SUC(AS-WS)는 약 30 kD 정도의 다당류로 87%의 탄수화물과 3.4%의 단백질로 구성되어 있으며, 총 탄수화물 가운데 48%의 glucose와 22%의 mannose로 구성된 glucomannan성의 GAN이다. 일반적으로 비수용성(WI)은 수용성(WS) 다당류보다 NO의 생성을 더 촉진시켰는데, 이는 β -glucan성 다당류들이 비수용성인 점을 고려해 볼 때 분자량이 상대적으로 크고 단백질을 포함한 heteropolysaccharide들이 대식세포로부터 NO의 생성을 증가시켰다. 영지의 세포분획성 GAN 역시 대식세포를 활성화시켜 NO 생성을 증가시켰으며, 일반적으로 비수용성 다당류가 NO의 생성을 증가시켰다. 그러나 CW-AS-WS는 상대적으로 더 많은 NO의 생성을 촉진하였다. CW-AS-WS는 균사체의 세포벽성 성분으로 알칼리 가용성이며, 수용성 다당류이다. De Vries와 Wessels (1973)에 의하면 치마머섯 균사체는 최외각 부분이 β -glucan이며, 그 안쪽은 알칼리 가용성의 glucan, 그리고 세포질 막에 인접한 내층은 β -glucan이 chitin microfibril과 결합하여 존재한다고 보고하였다. 따라서 영지 균사체의 다당류 가운데 대식세포의 활성화가 우수한 다당류를 얻기 위해서는 균체의 세포벽성 알칼리 가용성 다당류를 추출하는 것이 유효하다고 사료된다. 특히 세포외성(EXO) GAN의 경우, TCA를 처리하지 않은 EXO-non TCA는 TCA를 처리한 EXO 다당류보다 약 3배의 NO생성을 증가시킨 것으로 보아, 대식세포 활성화가 우수한 β -glucan성 다당류의 조건으로 어느 정도의 가용성을 부여해 주는 단백질이 존재하는 것이 요구되었다. 또한 순수한 glucose의 polymer보다는 heteropolysaccharides의 구조와 상대적으로 고분

자인 다당류일수록 대식세포로부터 NO의 생성이 촉진되는 것으로 사료된다.

대식세포의 활성인자인 그람음성균의 LPS 및 lymphokine인 IFN- γ 를 항암효과가 우수한 CW-AS와 혼합하여 Raw 264.7세포를 활성화했을 때 NO의 생성은 보다 증가하였다. 이는 LPS, IFN- γ 및 영지의 β -glucan성 다당류가 대식세포에 미치는 signal의 차이에 의한 것으로 본다. Lei와 Morrison(1988)은 B lymphocyte, T lymphocyte 및 대식세포에 LPS-binding protein이 존재하며, 특히 대식세포는 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan, mannose 및 glucose 수용체가 있다고 보고하였다. Ross 등(1987) 역시, 대식세포에는 3개의 수용체(mannose, complementary receptor type 3, 및 β -glucan 수용체)가 존재한다고 보고하였다. 따라서 여러 자극물의 혼합에 의한 NO생성의 상승작용은 수용체간의 결합 및 signal의 차이에 의한 것으로 본다.

Darroch 등(1994)은 *Saccharomyces cerevisiae*의 생리식염수 추출물인 고분자의 glycoprotein을 이용하여 *in vitro*에서 체액성 및 세포성 면역 반응을 조사한 결과, 항원 의존성 lymphocyte의 활성을 유도시켜 lymphocyte의 증식을 촉진한다고 하였고, Shin 등(1985) 역시 영지의 성분이 면역세포 분열을 유도한다고 보고하였다. 그러나 본 연구 결과, 활성물질로 자극받아 NO의 생성이 활발한 Raw 264.7대식세포의 경우, 그 증식율은 현저하게 감소하였다. 즉 대조배지(DMEM only)에서 24시간 동안 증식한 세포를 100으로 하고 GAN으로 활성화된 배지의 세포증식을 측정할 결과, 그 억제율은 5~50% 정도까지 나타났다. 이는 영지의 다당류가 대식세포의 증식보다는 분화를 촉진하는 활성 물질로 작용하며, 그 결과 NO와 같은 면역 중간 대사 산물과 면역 세포간 물질(cytokine)의 분비를 다량 생산함으로써 증식율은 저하되는 것으로 여겨진다. 실제로 LPS, IFN- γ 와 같은 활성 물질로 자극 받은 대식세포는 세포 증식이 억제되었으며, 위상차현미경으로 관찰한 바 매우 큰 불규칙한 장방형의 형태를 나타내었다.

항암성 다당류는 암세포에 대해 직접적 세포독성이 거의 없기 때문에 *in vitro*에서 활성정도를 단시일내 검색하기는 매우 어렵다. 따라서 면역 세포를

생리 활성물질로 자극하고, 면역세포로부터 유도된 물질을 이용하여 표적 암세포의 세포독성을 측정하는 방법이 제시될 수 있다. Higuchi 등(1990)의 연구에 의하면 표적 암세포들에 대한 활성화된 대식세포의 세포독성능은 NO의 감수성에 따라 달라질 수 있다고 하였으며, Meltzers(1981)는 활성화된 mouse 대식세포는 priming signal 및 triggering signal과 같은 두 가지 방식에 의해 동종의 암세포에 대해 cytolysis 및 cytostasis의 기능을 갖는다고 보고하였다. 또한 Somers 등(1983)에 의하면 활성화된 대식세포는 정상세포에는 무관하나 넓은 범주의 암세포를 살해할 수 있는 능력을 갖는다고 발표하였다. 이와 같은 연구 결과를 기초로 하여 GAN으로 Raw 264.7세포를 활성화시키고, 세포 배양액을 L1210배양액에 10%(v/v) 가하여 L1210세포에 미치는 세포독성을 알아본 결과, 약 12~37%의 세포독성 효과가 있었다. 특히 LPS와 IFN- γ 로 활성화된 대식세포 배양액이 37%와 32%의 세포독성을 나타냈는데 IFN- γ 의 경우, 암세포 독성에 직접적으로 작용했을 가능성도 있다. L1210의 세포독성은 활성화된 대식세포의 배양액 내에 NO의 양이 증가된 경우에 더 높게 나타나 L1210의 세포독성은 NO와 직접적인 관계가 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 영지의 β -glucan성 다당류(GAN)는 solid phase antigen으로서 대식세포 활성화에 직접적 영향을 주며, 활성화된 대식세포는 NO를 포함한 ROI, IL-1, prostaglandin E₂ 그리고 TNF- α 등과 같은 cytokine 및 반응 중간 대사산물의 생성을 촉진하고, 이와 같은 반응 물질에 의해 일련의 면역 반응(항체생성, T세포 및 B세포 분열, 염증반응 등)을 증진시켜 암세포를 포함한 체내 이물질에 대한 직접적인 세포독성과 성장 억제, 식균작용 등과 같은 면역반응을 유도시키는 것으로 사료된다. 따라서 미생물 유래 항암성 다당류에 의한 마우스 육종 암세포의 성장을 저지하는 기전은 다당류가 갖는 대식세포의 활성 유무에 큰 상관 관계가 있을 수 있고, 그 활성 정도에 따라 항암활성능을 규명할 수 있는 결정적 단서가 될 수 있다. 특히 고분자성 다당류가 항암효과를 더 높게 나타내는 이유로 대식세포가 인식할 수 있는 비특이적 항원성의 기회를 많이 부여해 면역반응의 증가를 촉진할 수 있으며

로 이와 같은 해석을 뒷받침 해준다.

적 요

영지균사체로부터 기능적인 면역활성 물질을 얻고자, 여러 조건으로 추출된 β -glucan성 다당류(GAN)의 Raw 264.7 대식세포 활성화 정도를 알아보았다.

GAN으로 자극된 Raw 264.7 대식세포는 대조군보다 약 2~5배의 nitric oxide 생성을 촉진하였다. 대식세포의 활성화 정도는 GAN의 구조와 분자량 그리고 화학적 조성에 따라 NO생성에 차이를 보였다. 서당을 탄소원으로 배양된 균사체로부터 추출된 알칼리 가용성이며 수용성인 G-SUC로 활성화된 Raw 264.7세포는 22 μ M의 NO생성을 유도하였다. G-SUC(WS)는 87%의 탄수화물과 3.4%의 단백질로 된 평균분자량 30 kD의 다당류이다. 탄수화물의 구성당은 48%의 포도당과 22%의 mannose등으로 구성된 glucomannan성 GAN이다. 세포분획성 GAN가운데 세포벽으로부터 추출된 알칼리 가용성(CW-AS-WS)인 β -glucan성 다당류가 가장 많은 NO생성을 촉진시켜 영지의 대식세포 활성 다당류로 가장 잠재력이 있는 다당류인 것으로 나타났다. NO생성에 GAN과 대식세포 활성물질(LPS 및 IFN- γ)의 혼합 효과는 독자적인 자극보다는 혼합하여 자극했을 때 NO의 생성이 증폭되었다. GAN으로 활성화된 대식세포의 유사분열은 대조군에 비해 현저히 억제되었으며, 활성화된 대식세포의 배양액은 *in vitro*에서 L1210 암세포주에 세포독성을 나타내었다. 이와 같은 결과로 보아 영지의 β -glucan성 다당류(GAN)는 β -anomeric glucan receptor를 갖고 있는 대식세포를 자극하여 NO를 생성하며, 이때 NO생성의 촉진하는 다당류의 조건은 어느정도의 수용성을 갖고 있는 소량의 단백질이 포함된 고분자성 β -glucan다당류이다.

감사의 글

본 연구는 1997년 "김천대학 자체 학술연구비"의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Adams, D. O. and Marino, P. A. 1981. Evidence for a multistep mechanism of cytolysis by G-activated macrophages: the interrelationship between the capacity for cytolysis, target binding, and secretion of cytolytic factor. *J. Immunol.* **126**: 981-987.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 3666-3670.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, T., Sasaki, T. and Fukuoda, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Nature.* **222**: 687-688.
- Chan, J., King, Y., Magliozzo, R. S. and Bloom, B. R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**: 1111-1122.
- Chun, Q. C., Assreuy, J., Xu, D., Charles, I., Liew, F. Y. and Moncada, S. 1993. Repeated induction of nitric oxide synthetase and leishmanicidal activity in murine macrophage. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1385-1388.
- Cui, S., Jonathan, S., Reichner, Romeo, B., Mateo and Jorge E. Albina. 1994. Activated murine macrophage induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or independent mechanism. *Cancer Res.* **54**: 2462-2467.
- Darroch C. J., Christmas, S. E. and Barnes R. M. R. 1994. *In vitro* human lymphocyte proliferative responses to a glycoprotein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunology.* **81**: 247-252.
- De Vries, O. M. H. and Wessels, J. G. H. 1973. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* **76**: 319-330.
- Ding, A. J., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. 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.
- Franz, G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Medica.* **55**: 493-497.

- Goldman, R. 1988. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophage. *Exp. Cell Res.* **174**: 481-490.
- Halliwell, B. and Cuttidge, J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical J.* **219**: 1-14.
- Han, M. D., Lee, J. W., Jeong, H., Chung, S. K., Lee, S. Y. and Yoon K. H. 1995a. The effects of carbon sources on antitumor and anticomplementary activities of Ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. *Korean J. Mycol.* **23**: 209-225.
- Han, M. D., Jeong, H., Lee, J. W., Back, S. J., Kim, S. U. and Yoon K. H. 1995b. The composition and bioactivities of Ganoderan by mycelial fractionation of *Ganoderma lucidum* IY009. *Korean J. Mycol.* **23**: 285-297.
- Hibbs, J. B., Lambert, L. H. and Remington, J. S. 1972. *In vitro* nonimmunological destruction of cells with abnormal growth characteristics by adjuvant activated macrophages. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.) **139**: 1049-1052.
- Hibbs, J. B., Vavrin, Z. Jr. and Tainer, R. R. 1987. L-Arginine is required for expression of the activated effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**: 550-565.
- Higuchi, M., Higagashi, N., Taki, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages; Tumor necrosis factor and L-Arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**: 1425-1431.
- Ichinose, Y., Bakouche, O., Tsao, J. Y. and Fildler, I. J. 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.
- Johnson, W. J., Somers, S. D. and Adams, D. O. 1983. Activation of macrophages for tumor cytotoxicity. *Contemp. Top. Immunobiol.* **14**: 127-146.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. 1969. Host mediated antitumor action of *Schizophyllum commune*. *Gann.* **60**: 137-144.
- Lei, M. G. and Morrison, D. C. 1988. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations. *J. Immunol.* **141**: 996-1005.
- Loewenstein, J., Rottem, S. and Gallily, R. 1983. Induction of macrophage-mediated cytotoxicity of neoplastic cells by mycoplasmas. *Cell. Immunol.* **77**: 290-297.
- Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthetase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 12231-12234.
- Meltzer, M. S. 1981. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: characterization of priming and trigger signal during lymphokine activation. *J. Immunol.* **127**: 179-183.
- Moncada and Higgs, A. 1993. The arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* **329**: 2002-2012.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Pissens, W. F., Churchill, W. H. and David, J. R. 1975. Macrophages activated *in vitro* with lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells. *J. Immunol.* **114**: 293-299.
- Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. 1985. In Immunology, 11.7-11.12, Gower Medical Publishing, Cleveland, U.S.A.
- Ross, G. D., Cain, J. A., Myones, B. L., Newman, S. L. and Lachmann, P. J. 1987. Specific of membrane complement receptor type three (CR₃) for β -glucan. *Complement* **4**: 61-74.
- Schultz, R. M., Chirigos, M. A. and Heine, U. I. 1978. Functional and morphological characteristics of interferon-treated macrophage. *Cell. Immunol.* **35**: 84-91.
- Shin, H. W., Kim, H. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1985. Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma lucidum* in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **16**: 181-190.
- Somers, S. D., Mastin, J. P. and Adams, D. O. 1983. The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided into two, qualitatively distinct types. *J. Immunol.* **131**: 2086-2093.
- Suttles, J., Giri, J. G. and Mizel, S. B. 1990. IL-1 secretion by macrophages. Enhancement of IL-1 secretion and processing by calcium ionophores. *J. Immunol.* **144**: 175-182.
- Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**: 557-558.