

수지상세포에 대한 *Callophyllis japonica* 추출물의 면역조절효과

제주대학교 생명자원과학대학 수의학과

김미형 · 주홍구

Immunomodulatory Effects of *Callophyllis japonica* Ethanol Extract on Dendritic Cells

Mi-Hyoung Kim and Hong-Gu Joo

Department of Veterinary Medicine, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju, Korea

ABSTRACT

Background: A red seaweed, *Callophyllis japonica* has been traditionally eaten in the oriental area. In a recent study, it has been demonstrated that the ethanol extract of *C. japonica* have antioxidant activity. However, there are few studies about the effects of *C. japonica* on the function of immune cells. We investigated the immunomodulatory effects of *C. japonica* on the function of dendritic cells, the potent antigen-presenting cells. **Methods:** Bone marrow-derived dendritic cells (DCs) were used and the viability was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay and trypan blue exclusion test. Cytokine and nitric oxide (NO) levels were determined by using ELISA and Griess reagent, respectively. The expression levels of DC surface markers were measured by flow cytometric analysis. **Results:** *C. japonica* ethanol extract did not significantly affect the DCs viability and the IL-12 production from DCs, irrespective of the presence of lipopolysaccharide (LPS). In addition, it did not significantly change the expression of DC surface markers. However, *C. japonica* ethanol extract significantly inhibited the LPS-induced NO production and also increased the proliferation of allogeneic lymphocytes activated by DCs. **Conclusion:** Our data suggests that *C. japonica* ethanol extract enhances the proliferation of allogeneic lymphocytes activated by DCs which is associated with inhibition of NO production from DCs induced by LPS. (Immune Network 2007;7(2):95-100)

Key Words: *Callophyllis japonica*, immunomodulatory effects, nitric oxide, dendritic cells

서 론

벗 붉은잎(*Callophyllis japonica*)은 예로부터 식용으로 섭취해 온 홍조류(red algae)의 일종이며 최근 연구에 의해 항산화 기능이 보고된 바 있다(1). *C. japonica* 에탄올 추출물을 전처리한 Chinese hamster lung fibroblast (V79-4) 세포는 과산화수소 처리에 의한 생존을 저하를 막을 수 있었고 관련된 항산화효소인 superoxide dis-

mutase와 catalase의 활성을 증가시켰다. 이러한 항산화 작용연구에도 불구하고 *C. japonica*의 약리작용연구는 매우 미흡한 실정이다. 특히 외부병원균의 침입에 대항하는 숙주의 면역체계 또는 그 구성세포에 대한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 면역계를 구성하는 세포 중 항원을 탐식하고 T 림프구에 항원성펩타이드를 제시할 수 있는 수지상세포(dendritic cells, DCs)를 대상으로 *C. japonica* 에탄올추출물의 약리학적 효과를 알아보았다. 수지상세포는 체내에서 유일하게 미감작 T 림프구를 자극하여 면역반응을 개시할 수 있는 특화된 항원제시세포(antigen presenting cells, APCs)이다. 말초조직에 있는 미성숙 수지상세포는 외부에서 유입된 항원을 탐식한 후 인접한 림프절로 이동하여 MHC-peptide 복합체를 이용하여 면

책임저자 : 주홍구, 제주대학교 생명자원과학대학 수의학과
☎ 7690-756, 제주시 아라1동 제주대학교 66
Tel: 064-754-3379, Fax: 064-756-3354
E-mail: Jooh@cheju.ac.kr

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2004-202-E00184).

역반응을 일으킨다. 이를 위해 세포표면에 부착분자 (adhesion molecule)와 보조자극분자(costimulatory molecule) 등 면역반응의 유도에 필요한 표지자들을 발현하고 있다(2-4).

본 연구에서는 면역중심세포인 수지상세포에 *C. japonica* 에탄올추출물을 투여하거나, *C. japonica* 에탄올추출물과 lipopolysaccharide (LPS)를 차례로 투여한 후 생존율, nitric oxide (NO) 또는 면역싸이토카인의 생산에 대한 영향, 세포표면마커의 발현, allogeneic 림프구자극능에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물. C57BL/6, BALB/c 암컷 마우스를 ORIENT BIO사(Seongnam, Korea)에서 구입하여 7~12주령 시 실험에 사용하였다. C57BL/6 마우스는 수지상세포의 배양에 사용하였고, BALB/c 마우스는 allogeneic 림프구자극능 시험에 사용하였다.

세포배양배지 및 시약. 수지상세포의 배양을 위해 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 림프구의 배양에는 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지에 10 mM HEPES, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)을 더 첨가하여 사용하였다. Anti-mouse CD16/32 단클론항체, biotinylated anti-mouse I-A^b 또는 anti-mouse CD86 단클론항체, fluorescein isothiocyanate (FITC)-streptavidin은 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) solution은 세포의 증식능력 확인에 사용하였다.

***Callophyllis japonica* 에탄올추출물의 제조.** *C. japonica* 에탄올추출물은 제주대학교 수의학과 신태균 교수팀으로부터 입수하였으며 그 추출과정은 다음과 같다(1). *C. japonica*를 구입하여 증류수로 여러 번 씻은 후 에탄올을 이용하여 추출하였고, 에탄올용해성 분획은 여과한 뒤 rotary evaporator로 농축하였고 동결건조하여 갈색 분말을 얻었다. 본 실험에서 *C. japonica* 에탄올추출물은 인산완충액에 녹여 사용하였다.

수지상세포의 배양. C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 골수를 채취하여 적혈구를 용혈시킨 뒤 mouse granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF, Biosource International, Camarillo, CA, USA)가 첨가된 배지를 이용하여 배양하였다(5). 배양 2일과 4일에는 전체 배지를 교체하여 배양액 중에 떠 있는 granulocyte와 lymphocyte를 제거하였고, 배양 6~10일에는 60% 이상

의 배지를 새로 교체하였다. 배양 6~10일에 떠 있는 세포를 수지상세포로 실험에 사용하였다.

생존율측정. 수지상세포에 대한 *C. japonica* 에탄올추출물의 세포독성여부 및 생존율에 대한 영향을 확인하기 위해 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) assay를 하였다. MTT 시약을 첨가하여 24시간 동안 반응시키고, 형성된 insoluble crystal을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma)를 이용하여 24시간 동안 용해시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide (NO)와 면역싸이토카인의 정량. 수지상세포 배양액 중에 포함되어 있는 NO의 양은 modified Griess reagent (Sigma)를 이용해 측정하였으며 sodium nitrite는

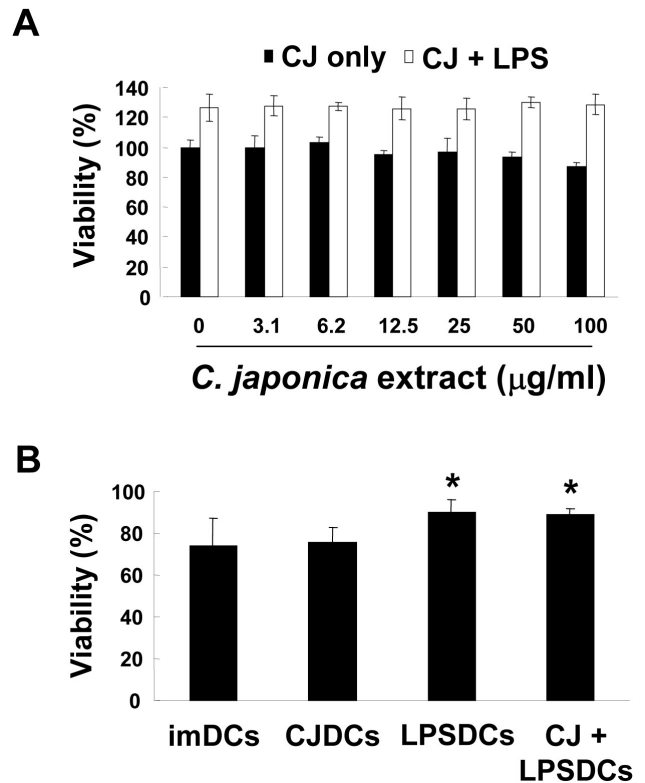


Figure 1. The viability of DCs was not significantly affected by *C. japonica* ethanol extract. DCs were seeded at a concentration of 5×10^4 cells/well in 96-well plates (A) 5×10^5 cells/well in 24-well plates (B). Cells were pretreated with *C. japonica* ethanol extract at 1 hr before LPS treatment and then treated with 0.1 µg/ml LPS for 48 h. MTT assay (A) was performed as described in Materials & Methods (M&M). Results are means±SD of three independent wells and the representative of three individual experiments. Trypan blue exclusion test (B) was performed by using a trypan blue staining solution. ImDCs, CJDCs, LPSDCs, CJ+LPS DCs were DCs treated with medium alone, 100 µg/ml *C. japonica* extract, 0.1 µg/ml LPS, 100 µg/ml *C. japonica* ethanol extract and then 0.1 µg/ml LPS.

NO 측정을 위한 표준물질로 이용되었다. TNF- α 와 IL-12의 농도는 ELISA kit (Biosource International)를 이용해 정량하였다.

세포표면마커분석을 위한 세포염색과 유세포분석. 수지상세포 표면의 Fc receptor를 차단하여 비특이반응을 줄이기 위해 anti-mouse CD16/32 단클론항체를 사용하였으며 biotinylated anti-mouse I-A^b 또는 anti-mouse CD86 단클론항체, fluorescein isothiocyanate (FITC)-streptavidin을 연속적으로 반응시켰다(6). 염색된 세포는 FACSCalibur™ flow cytometer와 CellQuest™ software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

Allogeneic 림프구자극능 시험(mixed leukocyte reaction, MLR). BALB/c 마우스의 비장유래 림프구를 채취하여 적혈구를 용혈시키고 실험에 이용하였다(7). 수지상세포 림프구는 2×10^5 cells/well, 수지상세포는 $370 \sim 1 \times 10^4$ cells/well의 농도로 96-well culture plate에 각각 100 μ l/well로 넣고 5일간 함께 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 CCK-8 solution을 10 μ l/well의 농도로 첨가하고 4시간 동안 더 배양한 후 microplate reader (Molecular devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석. 비슷한 결과를 보이는 세 개의 실험결과

중 대표적인 것을 주로 mean \pm SD의 형태로 제시하였다. Instat software (Graphpad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 1원분산분석법과 Tukey-Kramer 다중검정법을 사용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

***C. japonica* 에탄올추출물의 수지상세포의 생존율에 대한 효과.** MTT assay 결과에서 *C. japonica* 에탄올추출물은 실험에 사용한 농도에서는 수지상세포의 생존율에 유의한 영향을 미치지 않았다. 대조군인 미성숙수지상세포를 100%로 정한 뒤 비교했을 때, *C. japonica* 에탄올추출물 단독으로는 세포에 대한 독성효과가 거의 없었고 세포를 증식시키지도 않았다. *C. japonica* 에탄올추출물을 먼저 투여하고 LPS를 투여하여 함께 배양한 경우에는 *C. japonica* 에탄올추출물의 농도와는 관계없이 LPS에 의한 생존율의 변화가 관찰되었다. LPS 0.1 μ g/ml의 처리에 의해 생존율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1A). Trypan blue exclusion test를 통한 생존율 측정결과(Fig. 1B)에서도 MTT assay에서와 비슷한 결과를 보였다. 수지상세포의 NO, TNF- α , IL-12 생성에 대한 *C.*

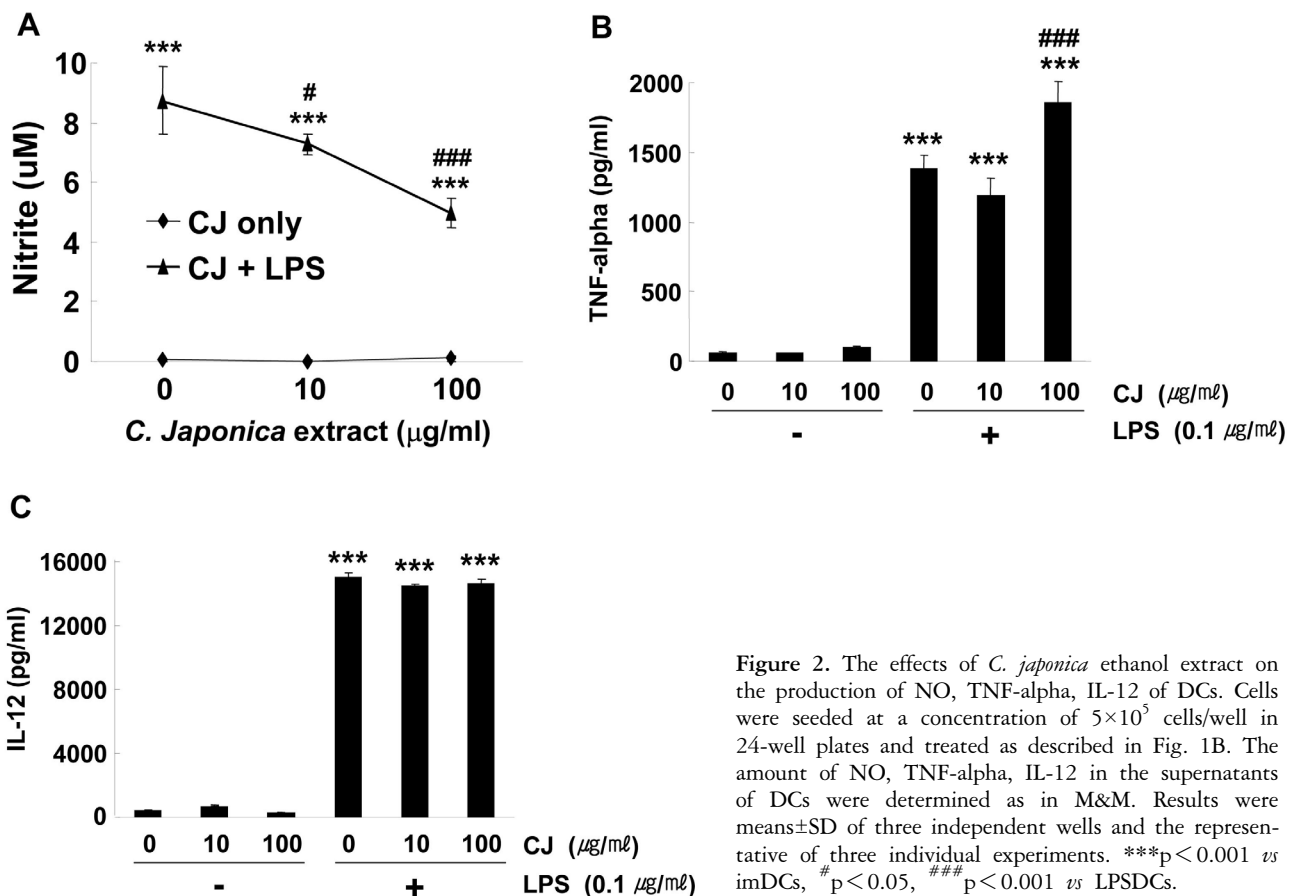


Figure 2. The effects of *C. japonica* ethanol extract on the production of NO, TNF- α , IL-12 of DCs. Cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/well in 24-well plates and treated as described in Fig. 1B. The amount of NO, TNF- α , IL-12 in the supernatants of DCs were determined as in M&M. Results were means \pm SD of three independent wells and the representative of three individual experiments. *** $p < 0.001$ vs imDCs, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs LPSDCs.

***japonica* 에탄올추출물의 효과.** 수지상세포는 LPS에 의해 NO 생성이 유도되었지만 *C. japonica* 에탄올추출물에 의해서는 유도되지 않았다. 흥미롭게도 수지상세포에 *C. japonica* 에탄올추출물을 전처리하고 LPS를 처리했을 때, LPS에 의한 수지상세포의 NO 생성을 유의하게 억제하는 사실을 확인하였다(Fig. 2A). *C. japonica* 에탄올추출물을 수지상세포에 처리한 결과 TNF-alpha, IL-12의 생산을 유의하게 증진시키지 않았다. LPS는 수지상세포의 성숙을 유도하여 TNF-alpha와 IL-12의 생산을 증가시키는 주요인자로 알려져 있다(8). 본 연구에서도 LPS가 처리된 수지상세포가 두 사이토카인의 생성을 증진시키

는 사실을 확인하였다. LPS 처리에 의한 수지상세포의 TNF-alpha, IL-12의 생산증가는 *C. japonica* 에탄올추출물 처리에 의해 억제하지 않았다(Fig. 2B, C). 오히려 *C. japonica* 에탄올추출물 100 µg/ml과 LPS를 연속적으로 처리했을 때 TNF-alpha 생성은 LPS 단독 처리에 비해 유의하게 증가하였다.

***C. japonica* 에탄올추출물 처리에 의한 수지상세포의 성숙마커 발현변화.** 대표적인 수지상세포 성숙유도인자인 LPS에 의해 수지상세포의 성숙마커 발현이 전반적으로 증가된 반면 *C. japonica* 에탄올추출물 자체는 수지상세포의 성숙마커 발현에 유의한 변화를 일으키지 않았다

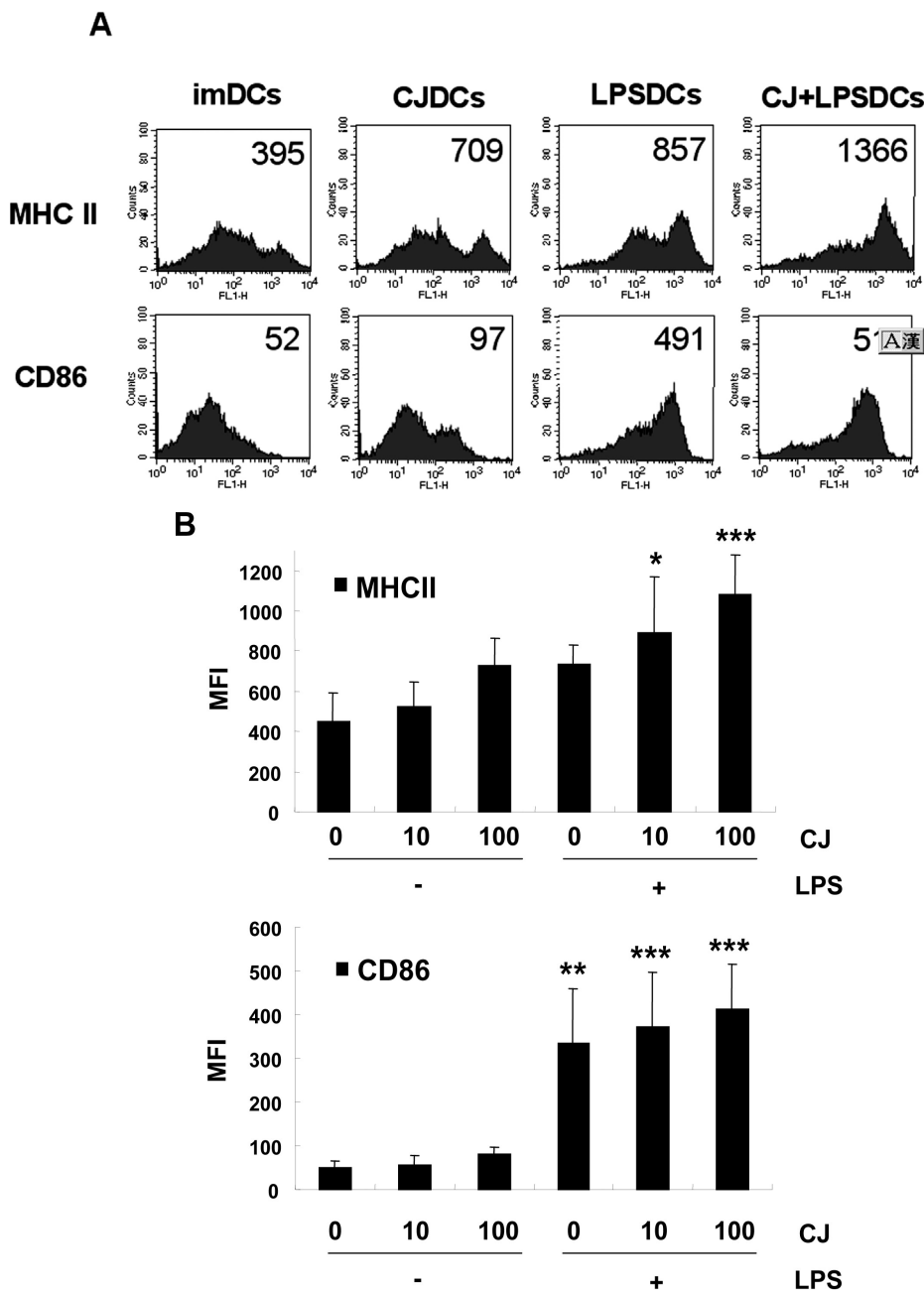


Figure 3. The effects of *C. japonica* ethanol extract on the expression of surface DC markers. DCs were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/well in 24-well plates and treated as described in Fig. 1B. The cells were stained and analyzed as described in M&M. The number in histogram indicates the mean fluorescein intensity (MFI). The representative data of three individual experiments were shown (A). Results were mean \pm SD of three individual experiments (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs imDCs.

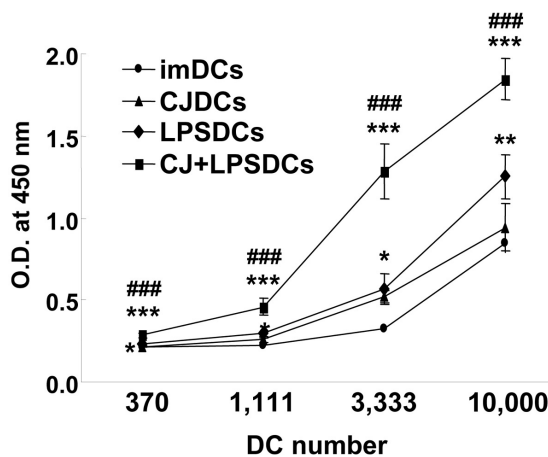


Figure 4. The effect of *C. japonica* ethanol extract on the proliferation of allogeneic lymphocytes activated by DCs. DCs were seeded at a concentration of 1×10^6 cells/well in 6-well plates and treated as described in Fig. 1B. The treated DCs were cocultured with allogeneic lymphocytes and analyzed as described in M&M. Results are means \pm S.D. of four independent wells and the representative of three individual experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ vs imDCs, ### $p < 0.001$ vs LPSDCs.

(Fig. 3). MHC II 분자와 CD86의 발현은 *C. japonica* 에탄올추출물 100 μ g/ml의 경우 미성숙수지상세포보다 약간 증가하였지만 유의하지 않았다. 또한 수지상세포 표면의 두 성숙마커의 발현에서 각 농도의 *C. japonica* 에탄올추출물은 LPS와 유의한 상승작용을 일으키지 않았다. ***C. japonica* 에탄올추출물 처리에 의한 수지상세포의 allogeneic 림프구증식능 변화.** *C. japonica* 에탄올추출물을 처리한 수지상세포는 미성숙 수지상세포보다 allogeneic 림프구의 증식을 촉진하였다. LPS를 처리한 수지상세포는 allogeneic 림프구의 증식을 더욱 증가시켰고, *C. japonica* 에탄올추출물을 전처리하고 LPS를 처리한 수지상세포는 allogeneic 림프구의 증식을 가장 크게 나타냈다(Fig. 4).

고 찰

C. japonica 에탄올추출물은 단독으로 처리 시 수지상세포의 면역기능 수행에 필요한 두 가지 주요 싸이토카인, TNF- α 와 IL-12의 생산, 세포표면마커의 발현 그리고 allogeneic 림프구증식능에 유의한 변화를 일으키지 않았다. *C. japonica* 에탄올추출물을 전처리한 후 LPS를 수지상세포에 처리한 경우 TNF- α 생산과 allogeneic 림프구증식능을 유의하게 증진시키는 사실을 확인하였다. 이는 *C. japonica* 에탄올추출물이 자체적으로 수지상세포의 성숙을 유도하는 효과는 미약한 반면 LPS와 함께 투여한 경우 상승효과를 유발하는 것으로 보인다.

본 연구에서 *C. japonica* 에탄올추출물을 수지상세포에 전처리한 후 LPS를 처리하면 NO의 생산을 유의하게

감소시킬 수 있는 사실을 확인하였다. 동일한 수지상세포의 상층액에서 두 가지 싸이토카인과 NO를 정량한 결과 TNF- α 의 생산량은 오히려 증가한 사실을 감안하면 NO의 생산량 감소는 *C. japonica* 에탄올추출물의 수지상세포에 대한 특이적 면역조절기능의 일종으로 판단된다. NO는 대식세포에서 세포내 병원성 미생물을 사멸시키는 역할을 하는 반면 수지상세포에서 과다 발생 시 면역반응을 감소시킨다(9,10). 내인성 NO생산의 증가와 s-nitroso-N-acetyl-penicillamine과 같은 NO 공여물질의 처리는 수지상세포의 세포사멸을 유도하였다(10). 이는 IFN- γ 또는 LPS 처리에 의해 수지상세포에서 생산된 NO가 일정부분 수지상세포의 세포사멸을 유도하여 allogeneic 림프구와 함께 배양 시 항원제시세포로서의 제 기능을 수행하지 못할 수 있음을 의미한다. 따라서 *C. japonica* 에탄올추출물에 의한 LPS로 유도된 NO생산 저하효과는 allogeneic 림프구증식능의 증가를 설명할 수 있는 기전이 될 수 있을 것으로 보인다. Allogeneic 림프구증식능의 증가를 설명할 수 있는 또 다른 기전으로는 수지상세포의 면역기능을 향상시킬 수 있는 TNF- α 의 생산 증가를 들 수 있다.

C. japonica 에탄올추출물을 수지상세포에 처리한 결과 생존율에는 영향을 거의 미치지 않으면서도 면역기능을 유의하게 증진시키는 사실을 확인하였다. 특히 패혈증의 원인물질 중 하나인 LPS 처리 시 발생하는 NO의 과다생산을 효과적으로 억제하는 사실을 알았다. 따라서 본 연구를 통해 *C. japonica* 에탄올추출물의 새로운 약리학적 효능을 발견하였으며 NO의 과다생산이 문제가 되는 질환에 대해 치료효과를 기대할 수 있는 후보물질이 될 수 있을 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Kang KA, Bu HD, Park DS, Go GM, Jee Y, Shin T, Hyun JW: Antioxidant activity of Ethanol extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother Res* 19;506-510, 2005
- Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N: Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 25;87-98, 2005
- Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392;245-252, 1998
- Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 68;160-166, 2001
- Joo HG: Altered maturation of dendritic cells by taxol, an anticancer drug. *J Vet Sci* 4;229-234, 2003
- Kim HJ, Kim MH, Byon YY, Park JW, Jee Y, Joo HG: Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells. *J Vet Sci* 8;39-44, 2007
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, Bernstorff W, Eberlein TJ: Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 69;555-564, 2001
- Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T, Falo LD, Thomson AW: Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to diffe-

- rentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 98;1512-1523, 2001
9. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Sequin MC, Klotz FW, Slayter M, Nelson BJ, Nacy CA: Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett* 43;87-94, 1994
 10. Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkin SC, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW: Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 157; 3577-3586, 1996
-