

참치 정소 핵산복합물질이 면역활성에 미치는 영향

서울대학교 약학대학 종합약학연구소, ¹서울시립대학교 생명과학과
²동원산업(주)식품연구소

박상은 · 김하원¹ · 이승용² · 김병각

Effects of Nucleic Acids Complex of Tuna Testis on Immunological Activities

Sang Eun Park, Ha Won Kim¹, Seung Ryong Lee² and Byong Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

²Research Center of Dong Won Industries Co. Ltd., Seoul 135-270, Korea

Tuna is one of the most abundant fish caught in Korea. The nucleic acids complex, DW-DNA, is produced in large amount from the testis. In this study, the effects of DW-DNA on humoral and cellular immune responses were examined. When administered orally in ICR mice, DW-DNA increased the number of peritoneal exudate cells twice of that of the control. The ratio of polymorphonuclear cells infiltrated into the peritoneal cavity increased from 2% to 40% by the oral administration of DW-DNA. Flow cytometry analysis showed that the cell numbers of macrophage and cytotoxic T lymphocyte of the mouse spleen increased in the S180-bearing mice group in the early stage of tumor growth. In the later stage, while the immune cells decreased in the control group, DW-DNA treated group restored the decreased immune cells to their normal level in the tumor-bearing group. In the nonspecific immune response of the mice, the acid phosphatase production and superoxide anion secretion by the activated macrophages in the DW-DNA given group increased by 1.6-fold and 1.3-fold, respectively, as compared with those of the tumor control group. These results indicate that the DW-DNA treated group restored the decreased immune response of the tumor-bearing mice to the normal level. Therefore it is concluded that DW-DNA may act as an immunomodulator.

Key Words: Nucleotides, Immune response, B lymphocyte, Acid phosphatase, Superoxide anion, Macrophage

서 론

핵산은 생물의 생식, 성장, 대사 제어에 필수 불가결한 물질이며, 단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 미네랄, 식이 섬유에 이은 제 7의 영양소로 주목 받고 있다.¹⁾ 핵산은 체내에서 *de novo* pathway와

salvage pathway의 두 경로로 합성되는데, *de novo* 합성은 주로 간에서 아미노산과 그 외 간단한 화합물로부터 합성된다. 그러나, 포유동물에 있어 간 이외에서의 *de novo* 합성능은 현저히 낮으며, 특히 인체에서 적혈구, 다형핵 백혈구, 장점막, 골수, 조혈세포, 뇌세포 등의 조직은 *de novo* 합성을

할 수 없다.^{2,3)} 간세포 이외의 조직에서, 음식물로 섭취되거나 *de novo* 합성으로 생성된 nucleotide 및 핵산염기 등을 이용하여 핵산을 합성하는 것이 salvage 합성이다. 인체가 최상의 기능을 유지하기 위해서는 외부로부터의 핵산의 섭취가 필수적이다. 또한, 조직세포에서의 핵산의 합성능은 나이가 들수록 저하되는데 이는 연령증가에 따른 간 기능의 쇠약이 *de novo* 합성의 저하를 초래한 것으로, 연령이 증가할수록 음식물로부터 핵산의 섭취를 늘려 salvage 합성능을 촉진할 필요가 있다.⁴⁾

최근, 여러 기원의 핵산이 생체 내에서 세포를 부활시키고,^{5~8)} 면역능을 증가시키며,^{9~12)} 지질대사¹³⁾와 장내 미생물¹⁴⁾을 개선하는 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 밝혀져 있다. 이 중에서 면역 반응이란, 외부로부터 침입해 오는 각종 물질이나 생물체를 자기 자신과 구별해 내어 제거하는 자기 방어 체계이다. 많은 독성 물질이나 미생물에 노출되어 있는 상황에서 스스로를 보호하는 것은 개체의 생명 유지에 있어 매우 중요한 일이다. 이러한 보호작용은 각종 면역 결핍증의 경우에, 일단 면역 체계가 파괴되면 그 면역 체계를 보완해 주지 않는 한, 어떤 방법으로도 생존할 수 없다는 사실에서 확인할 수 있다.

자기 방어 체계는 체액성 면역과 세포성 면역의 두 기전에 의한다. 체액성 면역은 혈청 내의 항체가 외부 물질과 결합해 외부 물질을 제거하는 것으로, 주로 세포밖에 있는 박테리아, 바이러스, 그리고 단백질이나 복합 탄수화물과 같은 외부 물질에 대해 효과적이다. 한편 세포성 면역은 임파계에 속하는 여러 종류의 세포가 침입해 온 세포나 조직을 직접 파괴하는 것으로, 각종 기생충, 조직, 세포내 감염, 암세포 등에 효과적이다. 이러한 이중 방어체계는 항체 생산을 담당하는 B cell과 세포성 면역을 담당하는 T cell에 의하여 주로 수행된다. 이 때 T cell의 일종인 cytotoxic T lymphocyte (CTL)는 공격 대상 세포를 직접 파괴하며, helper T cell (Th)은 B cell의 항체 생산을 유도하고 CTL의 성숙·증식을 돕는다. 이러한 T 및 B cell에 의한 면역 반응은 일단 체내에 침입한 항원에 대하여 반응하되, 같은 종류의 항원이 계속 존재하거나 반복 침입해 왔을 경우에 작용

하는 면역 체계이다. 이러한 항원 특이성 면역 반응 이외에도 체내에는 어떤 항원에 노출 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격 대상 세포를 파괴하는 자연 면역 반응이 있다.

자연 면역 반응은 바이러스에 감염된 세포나 종양 세포에 대한 방어 체계로서 매우 중요하다. 여기에 관계하는 세포는 neutrophil과 같은 polymorphonuclear leucocyte (PMN), 그리고 macrophage, natural killer cell 등이 있다. 이 세포들은 일반적으로 공격 대상 세포의 종류에 구애됨이 없이 다양한 기능을 발휘하는 것이 특징이다.

Macrophage는 외부로부터 들어오는 이물질을 직접 탐식하여 분해하고 제거하며, 항원을 적절히 변형시켜 세포 표면으로 발현하여 T cell로 하여금 그 항원을 인식하게 함으로써 면역 반응을 유도하고 항체도 만들도록 한다. 또한 조직, 간, 비장, 임파선 및 혈액 등에 널리 분포되어 있어서 혈액을 타고 들어오는 미생물 등을 파괴하는 식균작용을 수행할 뿐만 아니라 종양 세포와 접촉하게 되면 O₂, H₂O₂ 및 OH radical 등을 분비함으로써 종양 세포를 제거하기도 한다.¹⁵⁾

이에 이 연구에서는 그간 연구된 바 없는 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질이 면역에 관여하는 복강내 세포, 비장내 면역 세포, macrophage 등에 대하여 어떠한 영향을 미치는가를 실험하여 생체 반응 조절 물질로서의 가능성을 면역학적 측면에서 규명하였다.

재료 및 방법

1) 연구 재료

이 연구에 사용한 참치의 정소 추출 핵산복합물질(Dong Won DNA 또는 DW-DNA)은 동원산업(주) 연구소에서 제조한 것이다. 핵산복합물질을 분리하기 위하여 참치정소를 깨끗이 수세한 후 3배량의 10% NaCl 용액을 가하여 95°C에서 3시간 동안 교반가열하여 핵산을 추출하였다. 원심분리 후 상등액을 pH 1.5로 조정하여 산가수분해 후 중화하였다. 한외여과막을 이용하여 분자량 10,000 이상의 분획만 취하여 냉동건조로 분말상의 시료를 제조하였다.

2) 암세포 이식 및 시료 투여

마우스 sarcoma 180 cell (S180 cell)은 ICR 마우스의 복강내에서 7일 간격으로 계대배양한 것을 복수와 함께 취하여 빙냉 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 용액으로 세척한 후 약 5×10^6 cell/ml이 되도록 부유시켜 0.1 ml씩(5×10^5 cell/mouse) 건강한 정상 ICR 마우스의 서혜부에 이식하여 고휘압을 유발시켰다. 생리 식염수에 용해시킨 시료를 50 mg/kg/day씩 암세포를 이식한 다음날부터 각 실험에 적당한 기간동안 경구투여하였다.

3) 마우스의 복강내 세포에 대한 작용

Maeda등¹⁶⁾의 방법에 따라 복강내 세포 수를 측정하였다. 4~5주령의 ICR 마우스(♂, 20~25 g)를 정상 대조군과 DW-DNA를 투여한 정상 시료 투여군으로 나누었으며, 각 군마다 12마리씩 사용하였다. 시료 50 mg/kg/day을 웅성 ICR 마우스에 1회 경구 투여한 후 1, 2, 4 및 7일에 실험동물을 경추 탈구법으로 희생시키고 복강을 빙냉 PBS로 세척하여 복강내 세포(peritoneal exudate cell, PEC)를 모았다. 4,000 rpm에서 3분씩 3회 원심세척하고 얻은 세포에 PBS 용액 10 ml씩을 가하여 총 복강내 세포 수를 hemocytometer로 세었다.

상기의 복강내 세포액을 4°C, 4000 rpm에서 3분간 원심분리하여 cell pellet을 얻고 이를 0.1 ml PBS에 현탁시켜 slide glass상에 도말, 건조시켰다. 건조된 도말 표본을 absolute methanol로 고정한 후 Giemsa 염색시약(ICN biomedical Inc.)으로 2~3분간 염색하였다. 95% ethanol로 탈색하고 건조시킨 후 현미경으로 관찰하였다.¹⁷⁾ Differential white cell count를 시행하여 PMN, lymphocyte, monocyte의 3종을 100%로 하여 각 세포간의 비율을 백분율로 나타내었다.

4) 마우스의 비장내 면역세포에 대한 작용

ICR 웅성 마우스를 정상 대조군(N군), 정상 시료 투여군(NS군), S180세포(5×10^5 cell/mouse)를 서혜부에 피하이식한 암 대조군(T군) 및 암세포를 이식하고 시료를 투여한 암 시료 투여군(TS군)의 4군으로 나누었으며, 각 군마다 20마리의 마우스

를 사용하고 N군과 NS군에는 PBS를, T군 및 TS군에는 S180세포를 이식하고 24시간 후부터 시료 50 mg/kg/day를 1일 1회 10일간 연속적으로 경구 투여하였다. 암세포 이식 후 제 7, 14, 21 및 28일에 각 실험군마다 4마리씩 비장을 적출하였다. 비장세포 10 µg에 FITC-conjugated rat anti-mouse Ig 항체 10 µl와 FACS staining buffer (1% BSA, 0.1% tween 20, 0.02% NaN₃) 80 µl를 가하고 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리해 상등액을 제거한 후, cell pellet을 fixing solution (1% *p*-formaldehyde, 0.88% NaCl) 100 µl와 PBSN 600 µl에 현탁해 flow cytometer (Becton Dickinson Inc., USA)로 형광 강도를 측정하였다.

CD4⁺ T 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD4 antibody (Serotec Ltd.)로 분석하였으며, CD8⁺ T 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 antibody (Serotec Ltd.)로, macrophage의 표면항원인 Mac-1은 FITC-conjugated rat anti-mouse Mac-1 antibody (Serotec Ltd.)로, 그리고, B 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD19 antibody (Serotec Ltd.)로 분석하였다.

5) 마우스의 대식세포 활성화에 대한 작용

DW-DNA가 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 활성화된 macrophage로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다.¹⁸⁾ ICR 웅성 마우스를 정상 대조군(N군), 정상 시료 투여군(NS군), 암 대조군(T군) 및 암 시료 투여군(TS군)의 4군으로 분류하였다. 각 실험군마다 5마리의 마우스를 사용하였다. N군과 NS군에는 PBS를, T군 및 TS군에는 S180세포를 이식하고, 24시간 후부터 N 및 T군에는 생리식염수를, NS 및 TS군에는 시료 50 mg/kg/day을 매일 1회 5일간 경구투여하였다.

최종 시료 투여일로부터 5일째 되는 날 마우스를 경추 탈구법으로 희생시키고 PBS용액 5 ml를 복강 내에 투여하여 가볍게 마사지한 다음 주사기로 복강세포를 2회 반복 회수하였다. 복강 세포를 4000 rpm에서 3분간 3회 원심 세척하고 tissue culture dish에 1×10^6 cell/ml이 되도록 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양 후 plate에 부착되지 않은 세포는 PBS 용액으로 세척하여 제

거하고 부착된 macrophage만을 취하였다.

상기에서 얻은 macrophage에 0.1% Triton X-100 을 100 μ l 가한 다음 0.02 M *p*-nitrophenyl phosphate/0.1 M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 얻은 상징액에 4°C상에서 0.2 M borate buffer (pH 9.8) 1 ml씩 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Macrophage의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Acid phosphatase activity (*p*-nitrophenol μ mol/ 10⁶ macrophage/60 min)=1.15×OD 405 nm

한편, macrophage의 활성화 여부를 알아보는 또 다른 지표로서 활성화된 macrophage로부터 분비되는 superoxide anion(이후 SOA라 칭함)의 양을 측정하였다.¹⁹⁾ 즉, 상기의 방법으로 얻은 macrophage에 10 mM glucose, 80 μ M ferricytochrome C 및 0.2 mg/ml opsonized zymosan을 함유한 PBS 용액을 1.5 ml 가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 90분간 배양한 후 1,200 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상징액을 냉시험관에 옮겨 반응을 종결시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Macrophage로부터 유리된 SOA양은 다음 식에 따라 계산하였다.

SOA (nmol/10⁶ macrophage/90 min)=15.87×OD at 55 nm

6) 통계분석

모든 자료는 mean±standard error (SE)로 나타냈으며, 유의성 검사는 student's t-test로 행하였다.

결 과

1) 참치정소 핵산복합체(DW-DNA)의 성분조성

DW-DNA는 핵산과 단백질이 결합된 물질로써 핵산의 함량은 Diphenylamine법으로 측정된 결과 약 69.6%이었으며, 단백질의 함량은 Lowry법으로 측정된 결과 약 10.7%로 구성되어 있었으며 기타는 염류 등의 성분이었다. DW-DNA의 분자량은 Sepharose CL6B 칼럼을 이용하여 gel permeation chromatography법으로 측정하였다. 분자량 표준품으로 9.8, 73, 266, 2,000 kDa의 dextran을 사용하여

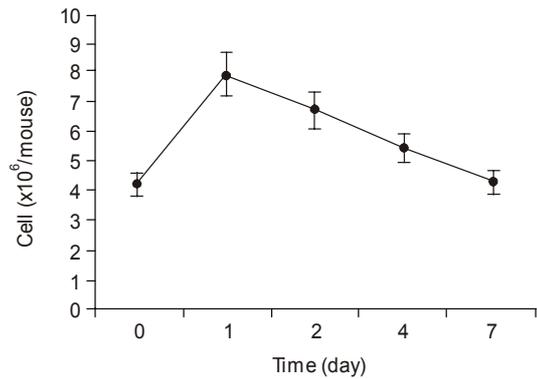


Fig. 1. Effects of DW-DNA on the peritoneal exudate cells in ICR male mice. Sample was administered once orally into the mouse at a concentration of 50 mg/kg. The total peritoneal exudated cells were counted by haemocytometer after 1, 2, 4 and 7 days.

폐놀황산법으로 표준곡선을 작성하여 분석한 결과 DW-DNA의 평균분자량은 100 kDa이었다.

2) 마우스의 복강내 세포에 대한 작용

ICR 마우스에 DW-DNA 50 mg/kg/day를 경구투여하고 복강내 세포수를 날짜별로 관찰한 결과, 투여 후 1일째 대조군의 4.2×10⁶ 세포에 비해 약 7.9×10⁶ 세포로 현저하게 증가하여 2~3일 지속되었다. 4일 이후부터는 차차 감소하여 제 7일에는 거의 대조군과 비슷한 수준이었다(Fig. 1). 복강내 세포를 Giemsa 시약으로 염색하여 Differential white cell count를 실시한 결과, Fig. 2와 같은 양상을 보였다. 시료를 투여하기 전 대조군의 복강내 세포는 90% 이상이 임파구였으나 시료투여 후 제 1일 및 2일에 증가된 복강내 세포 중 PMN의 비율이 상대적으로 증가하였다. 이후 제 7일째에는 PMN이 전체 복강세포의 0.1%로 크게 감소하였고 monocyte도 완만하게 감소하였다.

3) 마우스의 비장내 면역세포에 대한 작용

암세포 이식 후 제 7일째 마우스 비장내 면역세포의 표면항원 변화에 미치는 DW-DNA의 영향은 특히 macrophage의 경우, 표면항원인 Mac-1⁺ cell의 비율이 암세포를 이식한 T군의 28%에 비해 암세포를 이식하고 DW-DNA를 투여한 TS군이 약 50%로 그 증가 현상이 현저하였다. B

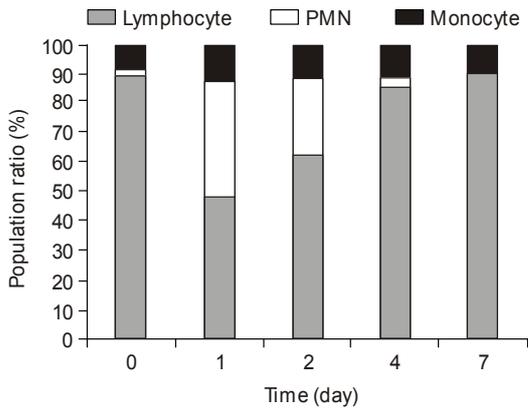


Fig. 2. Differential counts of peritoneal exudate cells in ICR male mice. Sample was administered once orally into the mouse at a concentration of 50 mg/kg. Differential leukocytes were counted by Giemsa staining of the peritoneal exudated cells after 1, 2, 4 and 7 days.

lymphocyte의 표면항원인 CD19⁺ 및 helper T cell의 표면항원인 CD4⁺ cell의 비율은 T군에 비해 증가된 양상이었으며, cytotoxic T cell의 표면항원인 CD8⁺ cell의 비율은 N군, NS군, T군 및 TS군 상호간에 변화가 없었다. 제 14일째에는 실험 초기에 비해 TS군에서 Mac-1⁺ cell의 증가폭이 둔화되어 약 30% 정도였고, CD8⁺ cell이 T군보다 약간 증가된 양상을 나타내었다. 제 21일째에도 전반적으로 TS군에서 CD4⁺, CD8⁺, Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell이 T군에 비해 증가된 양상이었다. 제 28일째, TS군에서 Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell는 그 증가폭이 상당히 둔화되었으며 CD4⁺ 및 CD8⁺ cell는 T군보다 증가하여 그 수준이 N군과 유사하였다(Fig. 3).

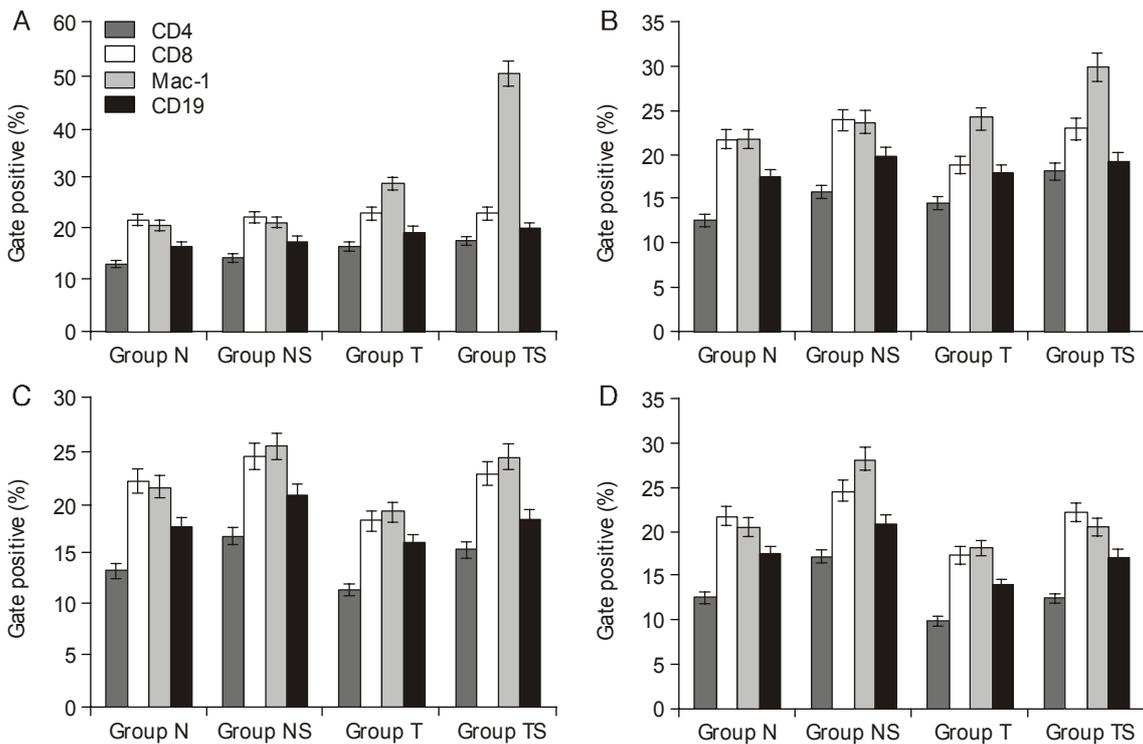


Fig. 3. Effects of DW-DNA on the surface antigens of immune cells in the spleen of ICR mice on (A) day-7, (B) day-14, (C) day-21 and (D) day-28 after tumor inoculation. Sarcoma 180 (5×10^5 cell/mouse) was inoculated in the mouse of T and TS groups on day 0. After 24 hrs, sample was administered orally into the mice of NS and TS groups at the concentration of 50 mg/kg/day for 10 consecutive days. Spleen cells were obtained on the 7th of the tumor injection and analyzed with flow cytometer after staining with anti-CD4-FITC (CD4⁺ T cell), anti-CD8-FITC (CD8⁺ T cell), anti-Mac-1-FITC (macrophage) and anti-CD19-FITC (B cell).

Table 1. Effects of DW-DNA on the release of acid phosphatase in normal and tumor bearing ICR mice peritoneal macrophages

Mice	Group	Stimulation	Acid phosphatase ¹⁾ (μ mol)	Stimulation index ²⁾
Normal	N	Saline	0.83 \pm 0.07 ³⁾	1.00
	NS	DW-DNA ⁴⁾	1.12 \pm 0.0	11.35*
Tumor-bearing	T	Saline	0.72 \pm 0.06	1.00
	TS	DW-DNA ⁴⁾	1.18 \pm 0.02	1.64*

¹⁾p-nitrophenol μ mol/10⁶ macrophage/60 min=1.15 \times O.D. at 405 nm

²⁾Stimulation index=(Enzyme activity of treated group)/(Enzyme activity of control group)

³⁾Mean \pm SE ⁴⁾DW-DNA was administered orally 50 mg/kg/day for 5 days, *p<0.05

Table 2. Effects of DW-DNA on the release of superoxide anion (SOA) in normal and tumor bearing ICR mice peritoneal macrophage

Mice	Group	Stimulation	SOA released ¹⁾ (O ²⁻ nmol)	Stimulation index ²⁾
Normal	N	Saline	12.75 \pm 0.46 ³⁾	1.00
	NS	DW-DNA ⁴⁾	16.14 \pm 0.53	1.27*
Tumor-bearing	T	Saline	14.50 \pm 0.48	1.00
	TS	DW-DNA ⁴⁾	18.63 \pm 0.73	1.28*

¹⁾SOA released (O²⁻ nmol/10⁶ macrophage/90 min)=15.87 \times O.D. at 550 nm

²⁾Stimulation index=(SOA amount of treated group)/(SOA amount of control group)

³⁾Mean \pm SE ⁴⁾DW-DNA was administered orally 50 mg/kg/day for 5 days, *p<0.05

4) 마우스의 대식세포 활성화에 대한 작용

활성화된 macrophage로부터 분비되는 물질로서 acid phosphatase 및 superoxide anion 양을 측정하여 macrophage의 활성화에 대한 DW-DNA의 영향을 실험한 결과, N군에 비하여 NS군의 경우 acid phosphatase 분비는 1.35배, superoxide anion 분비는 1.27배 증가하였으며 TS군의 경우 T군에 비해 1.64배의 acid phosphatase 및 1.28배의 superoxide anion 증가가 확인되었다(Table 1, 2).

고 찰

핵산복합물질이 생체 면역 기능을 증강시키거나 억제된 면역 기능을 정상으로 회복시켜 줌으로써 효과를 발휘한다는 것이 그간의 연구 결과에 의해 밝혀지고 있다. Kulkarni 등^{9,10)}은 섭취한

핵산이 T_h를 활성화시켜 IL-2의 생산을 증대시킴으로써 면역능을 증가시킨다고 하였으며, Pizzini 등¹¹⁾ 및 Buren 등¹²⁾은 단백질 영양부족의 경우에 섭취한 Nucleotide가 면역반응 체계의 유지와 회복에 영향을 나타내는 것을 알아내었다. 이에 우리 나라의 풍부한 어족 자원인 참치, 그 중에서도 양질의 핵산이 풍부하게 포함되어 있는 정소에서 추출한 핵산복합물질이 경구투여시 세포성 및 체액성 면역에 어떤 영향을 미치는가에 대하여 실험하였다.

ICR 마우스에 DW-DNA를 경구투여하고 복강내 세포수를 날짜별로 관찰한 결과, 투여 후 1일째 대조군의 4.2 \times 10⁶ 세포에 비해 약 7.9 \times 10⁶ 세포로 현저하게 증가하여 2~3일 지속되었다. 4일 이후부터는 차차 감소하여 제 7일에는 거의 대조군과 비슷한 수준이었다. 이러한 현상은 담자균류의 항암성 다당체와 유사한 경향을 나타내었

다.^{20~22)}

복강내 세포를 Giemsa 시약으로 염색하여 differential white cell count를 실시한 결과, 시료를 투여하기 전 대조군의 복강내 세포는 대부분이 lymphocyte였으나 시료투여 후 제 1일 및 2일에는 복강내 세포 중 PMN 및 monocyte의 비율이 상대적으로 증가하였다. 이렇게 증가된 PMN은 macrophage와 더불어 숙주 방어의 초기 단계에 비특이적 면역 반응에 큰 도움을 줄 것으로 사료된다. 제 4일째에는 PMN의 경우 거의 관찰되지 않을 정도로 비율이 감소하였고, monocyte도 완만하게 감소하였다.

면역세포들이 활성화되면 여러 가지 세포 분비물의 증가 및 다른 세포에 자극을 줄 수 있는 물질을 분비하거나, 기능 항진 및 세포 표면 항원이 특징적으로 변한다. 암의 진전에 따른 마우스의 비장내 면역세포에 대한 DW-DNA의 영향을 알아보기 위한 방법으로 세포 표면 항원의 증가 여부 및 정도를 이들 항원에 대한 단일 클론 항체를 사용하여 측정하였다.

암세포를 이식하고 DW-DNA를 경구로 투여한 지 제 7일째 마우스 비장내 면역세포의 표면항원 변화는 특히 Mac-1⁺ cell에서 크게 나타났다. Mac-1⁺ cell이 암 대조군에서 28% 증가한 반면, 암세포를 이식하고 DW-DNA를 투여한 암 시료 투여군에서는 약 50%나 증가하였다. CD19⁺ 및 CD4⁺ cell의 비율도 암 시료 투여군에서 암 대조군에 비해 더 증가하였으며, CTL의 표면항원인 CD8⁺ cell의 비율은 정상 대조군, 정상 시료 투여군, 암 대조군 및 암 시료 투여군 상호간에 변화가 없었다. 제 14일째에는 실험 초기에 비해 암 시료 투여군에서 Mac-1⁺ cell의 증가폭이 약 30%로 둔화되었고, CD8⁺ cell이 암 대조군보다 약간 증가하였다. 제 21일째에도 전반적으로 암 시료 투여군에서 CD4⁺, CD8⁺, Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell이 암 대조군에 비해 증가하였다. 제 28일째, 암 시료 투여군에서 Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell는 그 증가폭이 상당히 둔화되었으며 CD4⁺ 및 CD8⁺ cell는 암 대조군보다 증가하여 그 수준이 정상 대조군과 유사하였다.

Splenomegaly 현상이 T군 및 TS군에서 확인되었는데 비장의 중량 증가는 암세포 주입과 관련

된 것으로 판단되었다. 암 대조군에서의 암이식 초기에 Mac-1⁺ cell의 증가 현상은 암 대조군에서 대식세포의 기능 중 engulfment activity가 암이식 초기 단계에는 저하되지 않는 것에 의한 것으로 사료되었으며, 반면 digestive 및 특히 chemotactic activity는 현저히 저하되어 활성화된 macrophage가 암세포의 조직내로 infiltration되지 못하므로 결국 *in vivo*에서 암 대조군에서 암의 퇴행은 일어나지 않는 것으로 판단되었다.²³⁾

담암동물에 있어서 B cell의 작용은 손상을 입지 않으나 T cell의 작용은 선택적인 피해를 받는다는 것이 보고되었는데,²⁴⁾ T cell 중 CD8⁺ cell의 비율이 암이식 초기 단계에서는 각 실험군 상호간에 큰 변화가 없었지만 암이 진행될수록 CD4⁺ 및 CD8⁺의 비율이 정상 대조군에 비하여 암 대조군에서 감소된 반면, 암 시료 투여군은 감소된 T cell 수준을 정상 대조군에 가깝게 회복시켰다.

본 실험으로 암이식 초기단계에 암 시료 투여군에서 DW-DNA에 의한 macrophage의 활성화가 일어나며, 암이 진행될수록 활성화된 macrophage에 의해 T cell이 활성화된다는 사실을 확인하였다. 즉 T cell의 작용이 DW-DNA의 면역 기능 개선 작용을 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다. 활성화된 macrophage로부터 분비되는 물질인 acid phosphatase 및 superoxide anion 양을 측정하여 macrophage의 활성화에 대한 DW-DNA의 영향을 실험해 보았다. 그 결과, 정상 대조군에 비하여 정상 시료 투여군의 경우 acid phosphatase 분비는 1.35배, superoxide anion 분비는 1.27배 증가하였으며, 암 시료 투여군의 경우 암 대조군에 비해 1.64배의 acid phosphatase 및 1.28배의 superoxide anion 증가를 확인하였다. 상기와 같은 모든 작용은 DW-DNA에 함유된 핵산 성분에 기인하는 것으로 사료된다. 왜냐하면 DW-DNA의 70%는 핵산성분이며, 단백질은 추출과정에서 95°C로 가열하였으므로 파괴되었을 것이기 때문이다. 참치 정소의 핵산복합체에 함유된 단백질은 대부분이 protamine이며, 그 작용은 항균작용을 가지고 있음이 알려져 있을 뿐이다.

상기의 실험 결과로부터 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질인 DW-DNA는 암으로 인하여 저하된 숙주의 면역 기능을 정상으로 회복시키거나

증강시켜 생체 반응 조절 물질로서의 작용을 나타내는 것으로 사료된다. 궁극적으로 면역 요법제로서의 적용 가능성을 위하여서는 보다 활성이 강한 물질의 순수한 분리와 구조 규명이 수행되어야 한다고 본다.

결 론

우리 나라의 다핵 어종의 하나인 참치의 정소에서 추출한 핵산복합물질(DW-DNA)이 면역체계에 미치는 효과, 즉 DW-DNA가 세포성 및 체액성 면역에 미치는 영향을 연구하였다. ICR mouse에 DW-DNA를 경구로 투여했을 때, 시료 투여군의 경우 대조군에 비해 복강내 세포 수가 약 2배로 증가하였다. 또한 PMN이 전체의 2%에서 40%로 증가하였다. *In vivo*에서 마우스 비장내 면역세포에 대한 DW-DNA의 영향을 비교해 본 결과, 암 이식 초기에는 macrophage와 cytotoxic T cell의 비율이 암 대조군과 암 시료 투여군에서 증가하였다. 그러나 암이 진전될수록 이들 면역 세포들이 암 대조군에서 감소된 반면에, 암 시료 투여군에서는 정상군의 수준으로 회복되었다. 정상 시료 투여군에서도 정상 대조군에 비해 각 면역세포가 증가되었다. Macrophage의 acid phosphatase 활성이 정상 시료 투여군과 암 시료 투여군의 경우 정상 대조군과 암 대조군에 비해 각각 1.35배, 1.64배 증가하였으며, superoxide anion의 분비도 정상 시료 투여군과 암 시료 투여군의 경우 정상 대조군과 암 대조군에 비해 각각 1.27배, 1.28배 증가하였다. 이러한 실험 결과는 참치 정소 추출 핵산 복합물질인 DW-DNA의 면역 활성 조절 물질로서의 가능성을 보여 준다.

감사의 글

본 연구는 한국해양수산개발원 및 (주)동원산업의 연구비로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1) Carver JD. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. *J Nutr* 1994; 124(1

Suppl): 144S-148S.
 2) Adjei AA, Yamamoto S, Kulkarni A. Nucleic acids and/or their components: a possible role in immune function. *J Nutr Sci Vitaminol* 1995; 41: 1-16.
 3) Kulkarni AD, Fanslow WC, Rudolph FB, Van Buren CT. Immunohemopoietic effects of dietary nucleotide restriction in mice. *Transplantation* 1992; 53: 467-472.
 4) Van Buren CT, Kulkarni AD, Rudolph FB. The role of nucleotides in adult nutrition. *J Nutr* 1994; 124(1 Suppl): 160S-164S.
 5) Klubes P, Leyland-Jones B. Enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil by uridine rescue. *Pharmacol Ther* 1989; 41: 289-302.
 6) Klubes P, Cerna I, Meldon MA. Uridine rescue from the lethal toxicity of 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982; 8: 17-21.
 7) Uauy R, Quan R, Gil A. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J Nutr* 1994; 124: 1436S-1441S.
 8) Leleiko NS, Walsh M, Abraham S. Gene expression in the intestine: the effect of dietary nucleotides. *Adv Pediatr* 1995; 42: 145-169.
 9) Kulkarni A, Fanslow W, Rudolph F. Effect of dietary nucleotides on response to bacterial infections. *J Parenter Enteral Nutr* 1986; 10: 169-171.
 10) Kulkarni A, Rudolph F, Buren V. The role of dietary sources of nucleotides in immune function. *J Nutr* 1994; 124: 1442S-1446S.
 11) Pizzini R, Kumar S, Kulkarni A, Rudolph F, Buren V. Dietary nucleotides reverse malnutrition and starvation-induced immunosuppression. *Arch Surg* 1990; 125: 86-89.
 12) Buren V, Kulkarni A, Rudolph F. The role of nucleotides in adult nutrition. *J Nutr* 1994; 124: 160S-164S.
 13) Sato N, Murakami Y, Nakano T, Sugawara M, Kawakami H, Idota T, Nakajima I. Effects of dietary nucleotides on lipid metabolism and learning ability of rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59: 1267-1271.
 14) Uauy R. Non-immune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr* 1994; 124: 157S-159S.
 15) van der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K, Roos D, van den Berg TK, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* 1998; 92: 67-75.
 16) Maeda YY, Chihara G. Periodical consideration on the establishment of antitumor action in host and activation of peritoneal exudate cells by lentinan. *Gann* 1973; 64: 351-357.
 17) McDonald GA. *Atlas of Haematology*. 5th ed. London, Churchill Livingstone, 1988.
 18) Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M,

- Yadomae T. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 1989; 37: 410-413.
- 19) Ito M, Suzuki H, Nakano N, Yamashita N, Sugiyama E, Maruyama M, Hoshino K, Yano S. Superoxide anion and hydrogen peroxide release by macrophages from mice treated with *Nocardia rubra* cell-wall skeleton: inhibition of macrophage cytotoxicity by a protease inhibitor but not by superoxide dismutase and catalase. *Gann* 1983; 74: 128-136.
- 20) Lee CO, Choi EC, Kim BK. Immunological studies on antitumor component of *Lyophyllum decastes* (I). *Yakhak Hoeji* 1987; 31: 70-81.
- 21) Lee CO, Choi EC, Kim BK. Immunological studies on antitumor component of *Lyophyllum decastes* (II). *J Korean Cancer Assoc* 1987; 19: 57-62.
- 22) Kim BK, Sung U, Choi EC. Studies on antitumor constituents of *Stropharia rugosoannulata*. *J Korean Cancer Assoc* 1989; 21: 249-261.
- 23) Kurashige S, Mitsuhashi S. Macrophage activities in sarcoma 180-bearing mice and EL4-bearing mice. *Gann* 1982; 73: 85-90.
- 24) Huber B, Devinsky O, Gershon RK, Cantor H. Cell-mediated immunity: delayed-type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T-cell subclasses. *J Exp Med* 1976; 143: 1534-1539.
-