

함초에서 분리한 다당체에 의한 큰포식세포 활성화

임진수, 이석기, 장인엽¹, 하현철¹,
임 용², 김한용³, 박경한⁴, 윤상필⁵

조선대학교 의과대학 흉부외과학교실, ¹조선대학교 의과대학 해부학교실
²조선대학교 의과대학 미생물학교실, ³서남대학교 의과대학 성형외과학교실
⁴강원대학교 의과대학 해부학교실, ⁵서남대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 함초 (*Salicornia herbacea* L.)는 국내의 해안가에서 자라는 식물로 생리활성기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만, 면역계통을 활성화 시키는 기능이 있음이 보고되었다. 이 연구에서 함초에서 분리한 다당체가 비특이적 면역반응에 관여하는 큰포식세포를 활성화 시킴을 확인하였다.

함초가 큰포식세포를 활성화시키는 기전을 밝혀내기 위하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 이용한 큰포식세포 면역형광염색을, iNOS mRNA의 변화를 보기 위한 역전사효소-중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction : RT-PCR)을 실시하였다.

함초에서 추출한 다당체 (Salicornia polysaccharide, SPS)를 생쥐 큰포식세포주인 RAW 264.7 세포에 24시간 처리한 결과, 용량의존적으로 일산화질소 생성을 증가 시켰다. iNOS에 면역형광염색을 실시한 결과, 세포질에서 소량 발현되던 iNOS 단백질이 SPS를 처리한 후에는 다량 발현됨을 알 수 있었다. 또한 RT-PCR을 실시한 결과 SPS를 처리한 RAW264.7세포에서 iNOS mRNA의 생성이 용량의존적으로 증가함을 알 수 있었다. iNOS의 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 nuclear factor- κ B/Rel (NF- κ B/Rel)의 활성을 SPS가 현저하게 증가시킴을 확인하였다.

결론적으로 함초에서 분리한 다당체의 작용은 iNOS 유전자의 발현을 통하여 일산화질소의 생성을 증가시키며, 이러한 큰포식세포의 활성화는 이 다당체를 면역증강제로 활용할 가능성을 시사해 준다.

찾아보기 낱말 : 함초, 큰포식세포, iNOS

서 론

함초는 우리 나라 서해안이나 남해안 백령도 제주도 울릉도와 같은 섬 지방의 바닷물이 닿는 해안이나 갯벌 염전 부근에 무리 지어 자라는 식물로 통통마디라고 불리며 학명은 *Salicornia herbacea* L. 라고 한다 (Kim 등 1983). 주로 해안 지방에 사는 사람들이 음식의 재료나 민간요법에 사용한 이 식물에 대한 생리활성기능에 대해서는 잘 알려져 있지

않지만, Im 등 (2003)은 함초에 면역계통을 활성화 시키는 기능이 있음을 보고하였다. 함초는 사이토카인의 생성과 일산화질소 및 세포막 단백질 등 면역기능에 중요한 역할을 하는 물질의 발현을 증가시켰다.

숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하는 큰포식세포가 활성화되면, 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제한다. 이 과정 중에 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다 (Palmer 등 1988). Lipopolysaccharide (LPS)와 interferon- γ (IFN- γ)에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도하는데, 이 효소가 L-arginine과 분자산소로

*이 논문은 2005년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

교신저자: 윤상필 (서남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: spyoon@seonam.ac.kr

부터 많은 양의 일산화질소생성을 촉진시킨다 (Hibbs 등 1987). 생쥐에 NOS 억제제를 투여했을 때 이식한 종양의 성장을 촉진시켰으며 (Yim 등 1993, Farias-Eisner 등 1994), iNOS cDNA로 형질도입 (transfection with the inducible nitric oxide synthase gene)된 멜라닌종양세포는 성장이 억제되고 전이가 잘 되지 않는 것으로 알려져 있다 (Xie 등 1995).

본 실험에서는 함초에서 추출한 다당체 (SPS)가 큰포식세포 기능에 미치는 영향을 알아보고자 한다. 면역형광염색, 역전사효소-중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction : RT-PCR) 및 겔이동성 변화분석 (electrophoretic mobility shift assay : EMSA) 등의 방법을 이용하여 SPS 처치에 의한 일산화질소의 생성, 큰포식세포의 활성화, iNOS의 유전자발현, NF- κ B/Rel에 대한 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

SPS는 다음과 같이 분리하였다 (Lee 등 2006). 함초는 충남 보령지역에서 채취하여 100 g을 95°C의 증류수로 세 차례 추출한 상층액 (500 mL)으로부터 3배의 에탄올로 다당체를 침전시켰다. 침전물을 DEAE-Sephacel 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 활성 산물인 SPS를 분리하였다. 1.56 g의 SPS가 회수되었다 (회수율 : 1.56%). 세포배양에 사용된 물질들은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

2. 세포배양

RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포들은 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum), 2 mM의 L-glutamine, 100 U/mL 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM으로 배양하였다. 세포들은 37°C에서 5% CO₂ 존재 하에 배양하였다.

3. 아질산염 (nitrite) 측정

세포들은 96-well 배양접시를 이용하여 5×10^5 cells/mL로 조절한 다음, 24시간동안 SPS로 자극시켰다. 분리된 상층액과 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)을 같은 부피로 섞고 실온에서 10분 동안 배양시켰다. 표준곡선을 만들기 위해 NaNO₂를 사용하고, 아질산염 생산은 550 nm에서 흡광도로 판독해서 측정하였다 (Green 등 1982).

4. 면역형광염색

배양된 세포를 0.01 M 인산완충액 (PBS, pH 7.4)으로 수 차례 세척 한 후, 4% paraformaldehyde로 실온에서 10분 동안 고정시키고 다시 PBS로 세척한 다음, 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS로 실온에서 20분 동안 반응시킨 후, 1% 소태아혈청단백 bovine serum albumin (BSA)이 함유된 PBS로 실온에서 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. anti-iNOS (Upstate biotechnology, USA)를 1% BSA가 함유된 PBS 용액에 1 : 200으로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. PBS로 수 차례 세척한 후, 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate IgG (Molecular Probe, OR, USA)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 대조군으로는 제1항체를 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다. 면역형광염색된 조직표본을 공초점주사현미경 (FV300, Olympus, Japan)를 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로 488 nm를 FITC용어로 사용하였다. Flow View Softwave program (Olympus, Japan)을 사용하여 최종 3차원적 영상으로 재조립하였다.

5. 역전사효소-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

RNA의 분리는 이전에 기술한 바 (Chomczynski와 Mackey 1995)와 같이 Tri시약 (Tri Reagent, Molecular Research Center, Cincinnati, OH)를 사용하였다. 프라이머 (primer) 염기 서열은 다음과 같다. iNOS: 5'-CTG CAG CAC TTG GAT CAG GAA

CCT G-3', 5'-GGG AGT AGC CTG TGT GCA CCT GGA A-3', β -actin: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. 동량의 RNA를 oligo (dT)15 프라이머를 사용해 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 cDNA와 각 프라이머를 이용하였다. 94°C에서 5분간 가열한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1.5분, 72°C에서 1분 순서로 30회 반복하고, 이후에 72°C에서 5분간 추가 단계를 거쳤다. PCR 생성물들은 3% NuSieve 3 : 1 gels (FMC Bioproducts, Rockland, ME)에서 전기영동시키고 ethidium bromide 염색시켰다. iNOS와 β -actin 프라이머는 각각 311 bp, 349 bp 크기로 증폭되었다.

6. 겔이동성 변화분석 (electrophoretic mobility shift assay : EMSA)

EMSA는 전에 기술했던 방법 (Jeon 등 1996)으로 수행하였다. 실험군과 대조군 264.7 세포들을 저장액 (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, pH 7.5)에 용해시켰고, 핵은 3,000 × g에서 5분 동안 원심분리하여 침전시켰다. 핵을 고장액 (30 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 450 mM KCl, 0.3 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/mL of aprotinin, and 1 μg/mL of leupeptin)을 이용하여 용해시켰다. 용해시킨 후, 14,500 × g에서 5분 동안 원심분리시키고, 상층액은 DNA결합분석 (DNA binding assay)에 사용하였다. 두 가닥의 올리고핵산 (double-stranded)의 끝은 [³²P]-ATP를 부착시켰다. 핵추출물 (5 μg)은 결합완충액 (binding-buffer : 100 mM KCl, 30 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 0.3 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/mL of aprotinin, and 1 μg/mL of leupeptin)에서 poly (dI-dC) 및 [³²P]-labeled DNA 프라이머와 함께 10분 동안 반응시켰다. DNA 결합활성도 (DNA binding activity)는 0.5X TBE 완충액내에서 4% polyacrylamide gel을 이용하여 free probe로부터 분리시켰다. 전기영동을 시행하고 겔을 말린 후 자기방사법 (autoradiography)으로 확인하였다.

Table1. Activation of NO production by SPS in RAW 264. 7 cells

Treatment	Nitrite (nmole/10 ⁶ cells)
Vehicle (saline)	3.1 ± 1.3
SPS (10 μg/mL)	15.5 ± 3.6
SPS (50 μg/mL)	32.2 ± 6.8
SPS (100 μg/mL)	67.9 ± 3.7
SPS (200 μg/mL)	68.2 ± 4.5
LPS (1 μg/mL)	72.1 ± 3.1

RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of SPS and LPS for 24 hr. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite production. Each value shows the mean ± S.D. of triplicate determinations.

7. 통계처리

각각의 실험군은 평균 ± SD로 통계처리하였다. 의미있는 차이가 존재했을 때, 처치군은 Dunnett's two-tailed *t* test를 사용해 대조군 (Vehicle control)과 비교하였다 (Dunnett 1955).

결 과

1. SPS가 큰포식세포의 일산화질소 생성에 미치는 영향

종양세포와 병원체에 대한 숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하는 일산화질소의 생성에 대한 SPS의 영향을 조사하기 위해 본 실험에서는 Griess 시약이 함유된 배양액에서 일산화질소의 안정화된 최종 산물인 아질산염의 축적된 양을 측정하였다. SPS에 의해 유발된 아질산염의 생성은 쥐의 큰포식 세포주인 RAW 264.7 세포에서 용량의존적으로 증가하였다 (Table 1). SPS를 100 μg/mL과 200 μg/mL 처리한 군에서는 양성대조군인 LPS (1 μg/mL) 처리군과 거의 유사하게 아질산염을 생성하였다.

2. SPS에 의한 iNOS 단백질의 생성증가

SPS에 의한 큰포식세포활성화 기전을 알아보기 위해, iNOS유전자의 발현 산물인 iNOS 단백질의 생성에 대한 영향을 실험하였다. SPS를 큰포식세포주

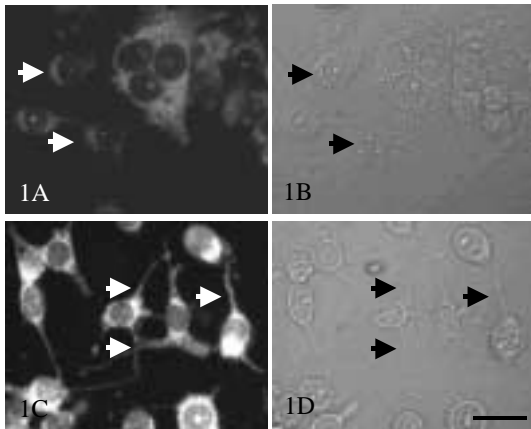


Fig. 1. Immunohistochemical staining of iNOS in RAW 264.7 cells. Cells (5×10^5 cells/mL) were incubated with Salicornia polysaccharide (SPS) for 24 hr on cover slide in 12 well plates. Immunohistochemical staining of iNOS showed expression of iNOS gene. Immunoreactivity of iNOS was localized along the margin (arrows) of the cytoplasm of in control (Fig. 1A-B). After incubation with the polysaccharide, expression of iNOS (arrows) was strongly expressed in the cytoplasmic processes of activated RAW 264.7 cells (Fig. 1C-D). Scale bar, 20 μ m.

인 RAW 264.7 세포에 24시간 동안 처리한 후 현미경하에서 관찰한 결과 자극을 받은 실험군에서 큰 포식세포의 크기가 현저히 증가하였다. 또한 iNOS의 항체를 이용한 면역형광염색 소견을 보면, SPS를 처리한 실험 군에서 iNOS의 발현이 세포질에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 자극되지 않은 RAW 264.7 세포에서의 iNOS의 발현은 대부분 세포질에서 미약하게 나타난 반면, SPS를 24시간 처리한 후 면역형광염색을 실시한 결과 iNOS의 발현이 증가하여 세포질에서의 농도가 매우 높아져 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과는 SPS에 의한 일산화질소의 생성증가는 iNOS 단백질의 생성증가에 기인한 것임을 시사한다.

3. SPS에 의한 iNOS mRNA의 생성증가

SPS에 의한 iNOS 증가가 iNOS 유전자의 발현에 의한 결과인지 알아보기 위해, iNOS mRNA의 생성에 대한 영향을 실험하였다. RAW 264.7 세포에 SPS

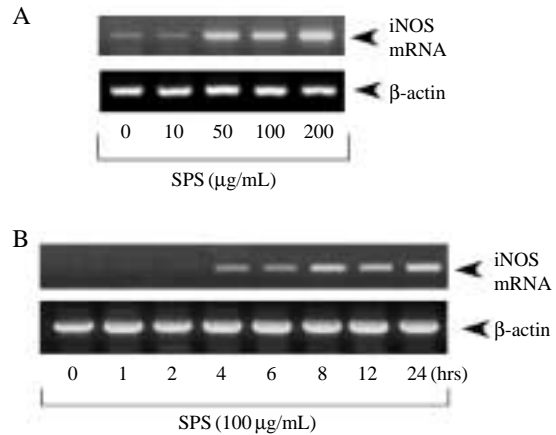


Fig. 2. Activation of iNOS gene expression by SPS in RAW 264.7 cells. Cells (5×10^5 cells/mL) were incubated with SPS (10, 50, 100 or 200 μ g/mL) for 8 hr (A) or incubated with 100 μ g/mL SPS for the indicated times (B). Total RNA was then isolated and analyzed for the magnitude of mRNA expression of iNOS using RT-PCR.

를 24시간 동안 처리한 후 전체 RNA를 추출하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS mRNA 생성 정도를 측정하였다. RAW 264.7 세포에 SPS를 처리하면 iNOS mRNA의 양이 용량의존적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2A). RAW 264.7 세포에 SPS (100 μ g/mL)를 처리한 후 시간대별로 iNOS mRNA의 발현 정도를 측정한 결과, iNOS mRNA의 양이 약 4시간 이후부터 유의하게 증가되어 24시간까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 2B). 이러한 결과들로 미루어 볼 때 SPS에 의한 일산화질소 생성증가는 iNOS 유전자 발현에 기인한 것임을 알 수 있었다.

4. SPS에 의한 NF- κ B/Rel의 활성화

SPS가 nuclear factor- κ B/Rel (NF- κ B/Rel)이 DNA에 결합을 유도시키는지 아닌지를 알아보기 위해 EMSA를 이용하여 NF- κ B/Rel의 DNA결합 활성도를 분석하였다. RAW 264.7 세포에 SPS를 처리하면, NF- κ B/Rel의 DNA결합은 용량의존적으로 크게 증가되었다(Fig. 3A). 단백질-DNA 결합의 특이성은 단백질결합에 경쟁적으로 작용하는 32 P-비표지 두가닥 (32 P-unlabeled double-stranded) B 혹은 Oct oligonu-

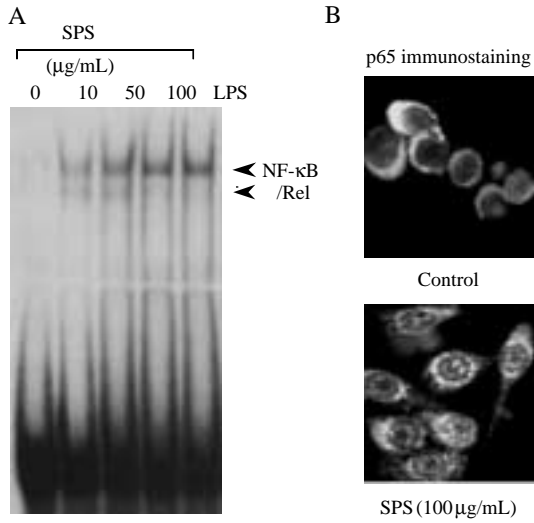


Fig. 3. Activation of NF- κ B/Rel by SPS in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were treated with SPS (10, 50, 100 or 200 μ g/mL) for 2 hr. Nuclear extracts (5 μ g/mL) were isolated and incubated with 32 P-labeled B. (B). Cells (5×10^5 cells/mL) were incubated with SPS for 2 hr on cover slide in 6 well plates. Immunohistochemical staining of p65 showed nuclear translocation of NF- κ B/Rel family of transcription factors. Immunoreactivity of p65 was localized along the margin of the cytoplasm of in control. After incubation with SPS, nuclear translocation of p65 was revealed in activated RAW 264.7 cells.

cleotide의 과량 투여에 의해 확인하였다(자료미제공). NF- κ B/Rel의 구성단백질인 p65에 대한 항체를 이용한 면역형광염색 소견을 보면, 자극을 받은 실험군에서 p65의 발현이 핵에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 자극되지 않은 RAW 264.7 세포에서의 p65의 발현은 대부분 세포질과 핵에서 별 차이를 보이지 않게 나타난 반면, SPS를 4시간 처리한 후 면역형광염색을 해보면 p65가 핵으로 이동하여 대조군의 발현양상과는 달리 핵에서 발현이 증가함을 알 수 있었다.

고 찰

이 연구에서 SPS의 치료로 생쥐의 큰포식세포 RAW 264.7 세포군에서, iNOS 유전자 발현을 통해

일산화질소 생성을 유도 한다는 것을 밝혀내었다. 또한 면역형광염색결과 iNOS 단백질이 세포질에서 증가함을 확인하여 SPS가 큰포식세포를 활성화시키는 것을 증명하였다. 큰포식세포는 숙주방어기전에서 중요한 역할을 한다. 활성화 된 큰포식세포들은 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제하는데 이 과정에서 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다(Palmer 등 1988). LPS와 IFN- γ 에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 iNOS를 발현시키는데, 이 효소는 L-arginine과 분자산소로부터 많은 양의 NO생성을 촉진시킨다(Hibbs 등 1987). 기니픽 L10 간종양세포나 생쥐 L1210 림프종양세포에 있어서, LPS/IFN- γ 를 통해 활성화된 생쥐 일차배양 큰포식세포의 세포용해작용은 NO 생산의 억제물질인 N^G-methyl-L-arginine(NMA)에 의해 차단되고, NO기체나 산산화된 NO₂⁻는 유사하게 작용하며, iNOS 유전자결함(iNOS^{-/-})을 보이는 생쥐의 큰포식세포에서는 세포용해작용이 나타나지 않는다(Hibbs 등 1987, Stuehr와 Nathan 1989, MacMicking 등 1995). 생쥐에 NOS억제제를 투여했을 때 이식한 종양의 성장을 촉진시켰으며(Yim 등 1993, Farias-Eisner 등 1994), iNOS cDNA에 transfection된 멜라닌 종양세포는 성장이 억제되고, 전이가 잘 되지 않는 것으로 알려지고 있다(Xie 등 1995).

천연 식물로부터 나온 다당체는 면역계통에 많은 영향을 줄 수 있으며, 면역조절물질로 사용하여 다양하게 임상에 적용이 가능하다(Tzianabos, 2000). 예를 들면, 식물, 곰팡이 및 세균의 세포벽으로부터 분리한 β -glucan은 항종양활성과 더불어 병원균의 감염 억제 효과를 나타내는 것으로 보고 되었다(Kataoka 등 2002, Brown 등 2003). 또한, 식물로부터 분리한 다당체가 *in vitro*나 *in vivo*에서 면역증강활성을 나타낸다는 보고들이 있었다(Liu 등 1998, Sonoda 등 1998). 복령에서 추출한 다당체는 큰포식세포활성화를 통하여 항종양활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kaminaga 등 1996, Ukiya 등 2002). 복령 및 그 추출물에 대한 항종양 활성기전이 비록 잘 밝혀지지는 않았지만, 면역계 활성을 통해 숙주의 방어 기전을 한층 더 강하게 해줄 것으로 추측

되고 있다. 복령균핵에서 정제된 다당체인 PCSC22는 B림프구의 항체생산을 자극하고, 큰포식세포계통인 RAW 264.7 세포들로부터 일산화질소의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Rhee 등 1999, Lee와 Jeon 2003).

NF- κ B/Rel은, iNOS를 포함한 많은 유전자의 조절단백질 중 하나로, 면역반응과 염증반응에 관여한다 (Xie 등 1994). NF- κ B/Rel은 자극 받지 않은 세포의 세포질에 억제자인 I κ B와 결합한 상태로 존재한다. 어떤 외부자극에 의해 큰포식세포가 활성화되면 I κ B의 인산화가 초래되어 NF- κ B/Rel로부터 떨어져 나오게 된다. 유리된 NF- κ B/Rel은 핵으로 이동해서 κ B와 결합하게 되면, 다양한 유전자의 발현을 자극하게 된다. 본 실험에서는 면역형광염색결과 NF- κ B/Rel 구성 단백질이 핵 내로 이동하는 것을 확인하여 함추추출다당체인 SPS가 NF- κ B/Rel을 활성화 시킴을 증명하였다. 본 연구에서 iNOS유전자발현에 있어서 NF- κ B/Rel이 SPS에 의해 조절된다는 것을 보여주었다.

SPS의 막수용체는 아직 알려지지 않았지만, 몇몇 막단백질들이 큰포식세포의 수용기로 작용하는 것으로 추정된다. 예를 들면, CD14, CR3, Toll-like receptors (TLRs) 등이다. CD14는 단핵구, 호중구, 큰포식세포에서 잘 발현되는 55-kDa의 GPI-부착 당단백 (glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein)로 LPS수용기라고 알려져 있으며, LPS와 강하게 결합한다 (Goyert 등 1988). 보체수용체 CR3 (Mac-1, CD11b/CD18, and $\alpha_M\beta_2$ -integrin라고도 함)는 β -glucans에 대한 백혈구막수용기로 알려져 있는데 (Thornton 등 1996), 호중구, 단핵구, 큰포식세포, 자연살해세포 (natural killer cell)의 표면에서도 발현되고, 수많은 세포-세포사이 및 세포-기질 사이의 작용에 연관되어있는 것으로 알려져 있다 (Hynes 1992). TLRs는 포유류 막투과성단백질군을 구성하고, 신생면역인식에서 중요한 역할을 한다 (Kopp와 Medzhitov 1999).

결론적으로 본 실험은 SPS가 큰포식세포를 자극하여 iNOS유전자발현유도를 통하여 일산화질소를 생성하게 한다는 것을 보여주었다. SPS의 큰포식세포 활성화 작용은 이 SPS를 면역증강제로 활용할

가능성을 시사해 준다.

참 고 문 헌

- Brown GD, Gordon S : Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19: 311-315, 2003.
- Chomczynski P, Mackey K : Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem* 225: 163-164, 1995.
- Dunnett M : A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Statistics Assoc* 50: 1096-1121, 1955.
- Fariasi-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, Chaudhuri G : Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9407-9411, 1994.
- Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM : The CD14 monocyte differentiation antigen mSPS to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239: 497-500, 1988.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982.
- Hibbs JB Jr., Taintor RR, Vavrin Z : Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476, 1987.
- Hynes RO : Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.
- Im SA, Kim GW, Lee CK : Immunomodulatory activity of *Salicornia herbacea* L. components. *Nat Prod Sci* 9: 273-277, 2003.
- Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, Kaminski NE : Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor- κ B/Rel activation. *Mol Pharmacol* 50: 334-341, 1996.
- Kaminaga T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M : Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 53: 382-385, 1996.

- Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K : Activation of macrophages by linear (1-3)-b-D-glucans. *J Biol Chem* 277: 36825-36831, 2002.
- Kim CS, Song TG : Ecological studies on the halophyte communities at Western and Southern coasts in Korea. *Kor J Ecol* 6: 167-176, 1983.
- Kopp EB, Medzhitov R : The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18, 1999.
- Lee KY, Lee MH, Chang IY, Yoon SP, Lim DY, Jeon YJ : Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*. *J Ethnopharmacol* 103: 372-378.
- Lee KY, Jeon YJ : Polysaccharide isolated from *Poria cocos sclerotium* induces NF- κ B/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 3: 1353-1362, 2003.
- Liu M, Li J, King F, Lin J, Gao Y : Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelis of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 40: 187-198, 1998.
- MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N et al. : Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81: 641-650, 1995.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.
- Rhee SD, Cho SM, Park JS, Han SB, Jeon YJ, Kim HM, Kim GP : Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos sclerotium*. *Kor J Mycol* 27: 293-298, 1999.
- Sonoda Y, Kasahara T, Mukaida N, Shimizu N, Umoda M, Takeda T : Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacology* 38: 287-294, 1998.
- Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555, 1989.
- Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD : Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 156: 1235-1246, 1996.
- Tzianabos AO : Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13: 523-533, 2000.
- Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Hirano M, Oshikubo M, Nobukuni Y, Kimura Y, Tai T, Kondo S, Nishino H : Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos*. *J Nat Prod* 65: 462-465, 2002.
- Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ : Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 181: 1333-1343, 1995.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C : Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.
- Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB Jr., Samlowski WE : Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res* 53: 5507-5511, 1993.

Abstract

**Activation of Macrophage by Polysaccharide Isolated from
Salicornia herbacea L.**

Jin-Soo Im, Seog-Ki Lee, In-Youb Chang¹, Hyun-Chul Ha¹,
Yong Lim², Han-Yong Kim³, Kyeung-Han Park⁴, Sang-Pil Yoon⁵

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chosun University

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University*

²*Department of Microbiology, College of Medicine, Chosun University*

³*Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Seonam University*

⁴*Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University*

⁵*Department of Anatomy, College of Medicine, Seonam University*

Salicornia herbacea L. is one of the halophytes that can grow in salt marshes, or salt fields along the seashores in Korea. The objective of this study is to investigate the mechanism by which *Salicornia* Polysaccharide, (SPS) activates macrophages.

To analyze macrophage activation and iNOS gene expression, we performed nitrite generation assay, immunohistochemistry, and reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

A polysaccharide isolated from the *Salicornia herbacea* L. significantly induces nitric oxide (NO). Immunohistochemical staining of inducible NO synthase (iNOS) showed that the increase of NO was due to the induction of iNOS production. RT-PCR analysis showed that SPS produced significant induction of iNOS gene expression. Immunohistochemical staining of p65 showed that SPS produced strong induction of NF-κB/Rel nuclear translocation. Electrophoretic mobility shift assay further confirmed the activation of NF-κB/Rel by SPS.

In conclusion, we demonstrate that SPS stimulates the macrophages to express iNOS gene via the activation of NF-κB/Rel.

Key words : *Salicornia herbacea* L., Macrophages, iNOS