



# Immunomodulatory activity of biosilica water on mouse dendritic cells

You-Jeong Lee<sup>1</sup>, Gyung Min Go<sup>2</sup>, Hong-Gu Joo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

<sup>2</sup>JDK BIO Co., Jeju 63243, Republic of Korea

<sup>3</sup>Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

**Abstract:** Biosilica is a material extracted from the shell (cell wall) of *Melosira nummuloides*, a type of sea diatom, and is one of the widely distributed biominerals. Recently, some studies have revealed that biosilica has a characteristic bio-modulatory activity compared to synthetic silica. However, there has been little research on the effects and action mechanisms of biosilica in immune cells. In this study, we investigated the effect of biosilica water on mouse dendritic cells (DCs), the most potent antigen-presenting cells in immunity, and whether it may alter the function of DCs. Biosilica water decreased the metabolic activity of DCs at 20% concentration (v/v) and the production of IL-1 beta in a concentration-dependent manner. And also, more cells with fragmented nuclei were observed in the DCs treated with 20% biosilica water compared to other treatment groups. The mixed leukocyte response experiment showed the biosilica water-treated DCs significantly modulated the metabolic activity and proliferation of allogeneic spleen cells compared to control DCs. This result suggests that biosilica water may modulate the antigen-presenting capability of DCs. Taken together, this study shows the immunomodulatory activity of biosilica on DCs and may affect immune responses. Further research is needed to investigate the immunological activity of biosilica water.

**Key words:** Biosilica water, dendritic cells, immunomodulatory activity, cytokines, immune response

## 서 론

바이오실리카(Biosilica)는 규조류(sea diatom)의 일종인 *Melosira nummuloides*의 껍질(세포벽)에서 추출된 물질이며, 널리 분포된 생체 광물 중 하나이다[11]. 바이오실리카는 화학적 성분이 SiO<sub>2</sub>로서 일반적으로 많이 알려진 합성 실리카 (synthetic silica)와 같이 화학 구성 성분은 동일하다. 하지만 최근 연구를 통해 바이오실리카는 합성 실리카에 비해 특징적이고 유용한 생리 활성을 갖고 있음이 밝혀졌다[14, 15].

바이오실리카는 조골세포의 성장과 파골세포의 활성 저하를 통해 골 유도 물질로 활용될 수 있다[1, 2]. 또한 바이오실리카는 지혈작용과 혈액응고에도 효과가 있다는 사실이 밝혀졌다[12, 13]. 기타 바이오실리카에 대한 항암효과, 생명공학에서의 응용이 연구되고 있지만[3, 7], 생체 및 세포에서 바이오실리카가 어떤 기능에 영향을 미치는지, 각종 세포에서의 효과, 작용기전에 대한 연구는 전반적으로 매우 미흡한 실정이다.

규소수는 바이오실리카를 정제수에 녹인 용액이다. 본 연구에서는 면역세포에 대한 규소수의 효과 및 잠재적인 기능 변화 여부를 확인하고자 하였다. 마우스 골수세포 유래의 수지상세포를 사용하였다. 수지상세포는 선천면역과 적응면역을 연결해 주

는 가고 역할을 하는 면역계의 중심세포이다[6]. 항원을 탐식하고 처리된 항원 펩타이드를 세포 표면에 있는 주조직적합성 (major histocompatibility complex, MHC) 분자의 표면에 띄워 naïve T 림프구를 활성화시킨다[6]. 본 연구에서는 수지상세포에 대한 규소수의 효과를 알아보기 위해, 규소수를 수지상세포에 처리한 후 수지상세포의 대사 활성도, 사이토카인의 생산능력, T림프구에 대한 항원 제시 능력을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물과 약물

실험동물은 오리엔트바이오사(대한민국)에서 제공받아 본 실험실에서 유지하였으며, 8 - 12주령의 C57BL/6와 Balb/c 마우스를 실험에 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 시행하였다(승인번호 2020-0034). 본 실험에서는 JDK바이오 사(제주, 대한민국)에서 제조된 시오네트 제주 규소수®를 사용하였다. 배양된 규조류 (*Melosira nummuloides*)에서 650 - 850 °C 회화공정을 거쳐 유기물을 완전히 제거하여 얻어진 규소수 (Biosilica)를 원료로 하였으며, 주 구성 성분은 SiO<sub>2</sub> (> 95%)이며 그 밖에 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 인, 칼륨, 황, 철, 아연, 바나듐, 스트론튬, 크롬 등의 미네랄로 이루어져 있다. 정제수를 사용하여 용해한 규소수 (SiO<sub>2</sub>, pH 8-9)를 최종적으로 0.2 µm 여과필터를 사용하여 제조하였다. 규소수의 용해된 규소(Si) 함량은 141 ppm (한국세라믹기술원)으로 나타났다.

\*Received 14 September 2020, Revised 06 November 2020, Accepted 16 November 2020

† Corresponding Author. Hong-Gu Joo, Tel: +82-64-754-3379, Fax: +82-64-756-3354,

E-mail: jooh@jejunu.ac.kr

Copyright © 2020 The Korean Society of Preventive Veterinary Medicine.

The full text is freely available on the web at <http://www.jpvm.kr/>.

### 골수 유래 수지상세포의 준비와 물질 처리

골수세포는 본 실험실의 확립된 실험법에 따라 준비하였다[5]. 마우스를 이산화탄소를 이용하여 안락사 시킨 후 양쪽 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 채취하였다. ACK lysis buffer (Thermo Fisher scientific, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈 시킨 후, 세포 용액을 cell strainer (sieve size, 70  $\mu\text{m}$ )에 통과시킨 후 사용하였다. 골수세포를 10 ng/mL mouse recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor (Peprotech, USA)와 10 ng/mL의 murine interleukin (IL)-4 (Peprotech)를 포함한 배지에서 4 - 8일간 배양한 뒤 반 부유된 (semi floating) 세포를 얻어 수지상세포로 사용하였다. 수지상세포는  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 배양 plate에 넣은 뒤 물질을 처리하였다.

### 수지상세포의 대사 활성도 측정

수지상세포를 96-well culture plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 분주하여 규소수를 농도 별로 처리하여 3일간 배양하였다. 수지상세포의 대사 활성도는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)를 이용하였다[10]. 0.5 mg/mL로 처리한 후 4시간 동안 배양하고 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 처리 후 2시간 동안 배양하였다. Microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 사이토카인 생산량 측정

IL-1 beta 와 tumor necrosis factor-alpha 사이토카인의 생산량을 측정하기 위하여 수지상세포에 규소수를 농도 별로 처리하였다. 3일간 배양 후 상층액을 분리하고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Thermo Fisher Scientific)로 정량하였다. 분석은 제조사의 실험 방법에 따라 진행되었으며 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 동종이형 혼합 림프구 반응 시험 (Mixed leukocyte response, MLR)

물질 처리된 수지상세포의 항원 제시 능력을 측정하기 위해 동종이형 (allogeneic)의 비장 세포와 혼합하여 반응시키는 allogeneic mixed leukocyte response (MLR)을 실시하였다. 수지상세포는 C57BL/6 마우스에서 채취한 골수세포를 배양하여 얻었고, 비장 세포는 Balb/c 마우스에서 채취하였다[9]. 수지상세포는 물질 처리를 하여 2일간 배양하였다. Co-culture 배양 기간 동안 수지상 세포의 성숙으로 인한 오차 발생을 방지하기 위해 수지상세포를 mitomycin C 50  $\mu\text{g/mL}$ 로 30분간 처리하였다. 실험실에 확립된 실험법에 따라 비장 세포를 수확하여  $2 \times 10^6$  cells/mL의 농도로, 수지상세포는  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 각 100  $\mu\text{L}$ 씩 96-well culture plate의 well에 넣었다. 3 - 5일간 배양한 후 CCK-8 용액을 10  $\mu\text{L/well}$ 씩 처리하여 4시간 동안 배양한 후 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포사멸 및 형태 분석

물질 처리된 수지상세포의 세포사멸을 확인하기 위해 Hoechst 33342 용액으로 염색하였다. 수지상세포를 6-well culture plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 분주한 후 물질 처리 후 2일간 배양하였다. Hoechst 33342 염색 용액을 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 10분간 처리하였으며, 형광현미경(ZOE™ Fluorescent Cell Imager; BIO-RAD, USA)으로 응축된 핵을 확인했다[8]. 또한 동일한 세포의 모양을 확인하였고, 디지털카메라가 장착된 도립현미경(IX70; Olympus, Japan)을 이용하여 특이한 세포 형태 유무를 관찰하였다.

### 통계분석

Figure 1 - 3의 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며 one way ANOVA 분석 후 Tukey-Kramer multiple comparison test로 유의성을 확인하였다. 0.05 미만의 *p* value를 갖는 경우 유의한 것으로 판단하였다. \*, \*\*, \*\*\*은 대조군과 비교하여 *p* < 0.05, 0.01, 0.001임을 나타낸다.

## 결 과

### 규소수가 수지상세포의 대사 활성도에 미치는 영향

규소수가 수지상세포의 대사 활성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, MTT assay를 실시하였다. 수지상세포에 규소수를 0 - 20% 농도 (volume/volume)까지 4배 계단 희석하여 3일간 처리하였다. 0 - 5%의 농도에서는 수지상세포의 대사 활성도에 유의하게 영향을 주지 않았다. 하지만 20% 농도에서는 대조군에 비해 대사 활성도가 유의하게 감소하였다 (Fig. 1).

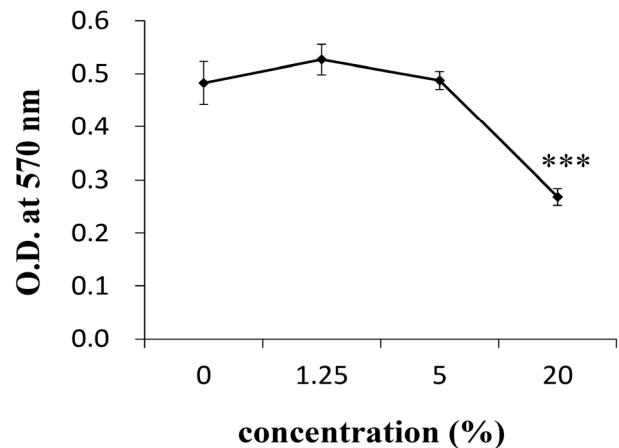


Fig. 1. Effect of Biosilica water on the metabolic activity of DCs. DCs were cultured in 96-well culture plate at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL with 0 to 20% (v/v) Biosilica water for 3 days. MTT solution was used for measuring the cellular metabolic activity. The optical density (O.D.) was measured at 570 nm by using a microplate reader. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*\*\* represents *p* < 0.001 compared to the control.

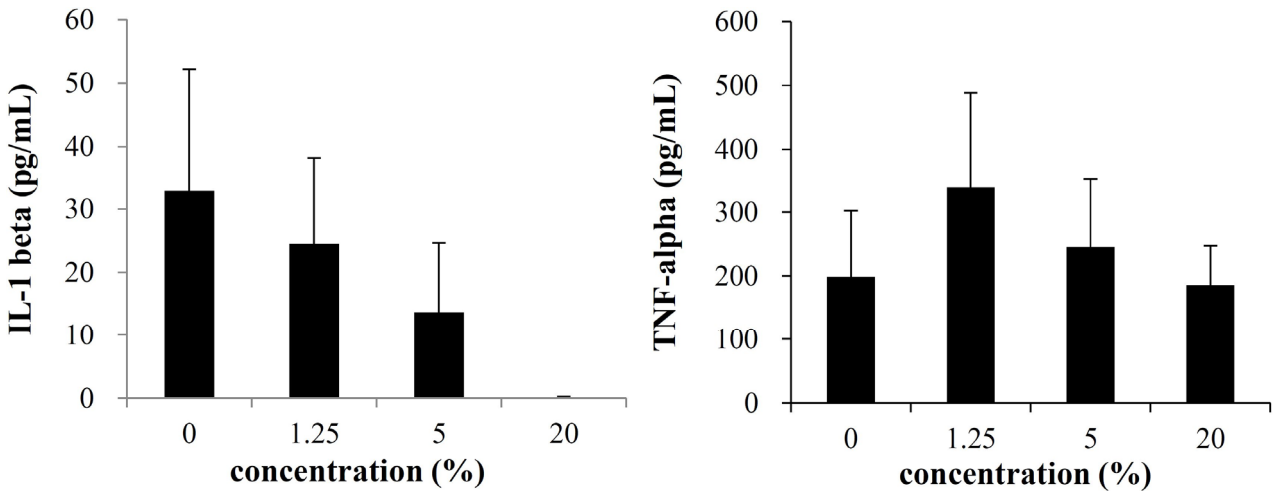


Fig. 2. Effect of Biosilica water on the production of immune-related cytokines. DCs were cultured in 96-well culture plate at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL with 0 to 20% Biosilica water for 3 days. The supernatants of DCs were used for ELISA. The optical density was measured at 450 nm by using a microplate reader.

**규소수 처리에 의한 수지상세포 사이토카인 생산량 변화**  
 규소수를 처리한 수지상세포로부터 생산되는 IL-1 beta와 TNF-alpha의 양을 ELISA를 통하여 정량하였다. IL-1 beta 생산량은 대조군과 비교하여 점차적으로 감소하였으나 유의하지 않았다 (Fig. 2). TNF-alpha 생산량은 대조군과 비교하여 전체 농도에서 증가하였으나, 가장 높은 농도인 20%에서는 대조군과 유사하였다. 특히 1.25%의 농도에서 생산량이 가장 증가하였다 (Fig. 2). ELISA 결과, 염증성 사이토카인 IL-1 beta와 TNF-alpha의 생산량 변화는 유사하지 않았다.

**규소수가 수지상세포의 항원 제시 능력에 미치는 영향**  
 규소수가 수지상세포의 항원 제시 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동종이형 혼합 림프구 반응 시험 (MLR)을 실시하였다. 수지상세포는 규소수를 농도 별로 처리하여 2일간 배양하였고, Balb/c 마우스로부터 수확한 동종이형(allogeneic) 비장세포와 1:20의 비율로 혼합하여 반응시켰다. MLR 결과, 1.25%와 5% 농도에서는 대조군과 비교하여 유의하게 약간 증가하였다 (Fig. 3). 20% 농도에서는 대조군 보다 약간 감소하였다. 규소수를 수지상세포에 처리하였을 때, 동종이형 비장 세포의 대사 활성이 상대적으로 낮은 규소수 농도에서는 증가, 높은 농도에서는 감소시키는 것으로 추정된다. 이 결과는 특정 농도 구간에서 규소수가 수지상세포의 항원 제시 능력을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

**규소수 처리에 의한 수지상세포의 세포사 관찰**  
 규소수가 수지상세포의 세포사 (cell death)에 미치는 영향을 확인하기 위해 Hoechst 33342 염색을 이용하였다. 규소수가 처리된 수지상세포에 Hoechst 33342 용액을 10분간 처리한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 다른 군에 비해 20%

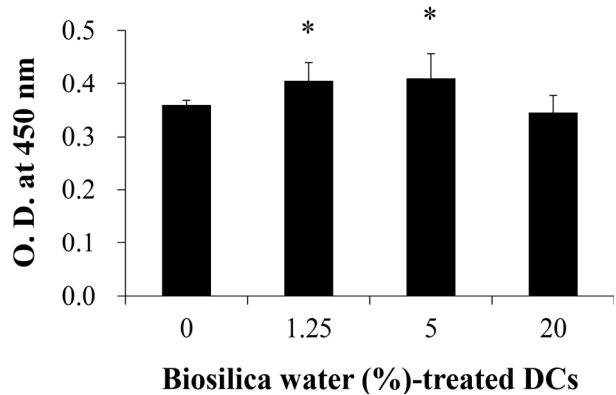


Fig. 3. Effect of Biosilica water on the antigen-presenting capability of DCs. DCs were cultured in 6-well culture plate at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL with 0 to 20 % Biosilica water for 2 days. The treated DCs were treated with 50  $\mu$ g/mL mitomycin C for 30 min before the co-culture step. Allogeneic spleen cells were harvested from Balb/c mice. DCs and allogeneic spleen cells were co-cultured in 96-well culture plate at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL and  $2 \times 10^6$  cells/mL respectively. After 5 days, CCK-8 assay was performed. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control, respectively.

농도로 처리된 수지상세포에서 분절된 핵이 더 많이 관찰되었다. 이는 다른 처리 군에 비해 20% 처리 군에서 수지상세포의 세포사가 증가한 것으로 판단된다 (Fig. 4).

**규소수 처리에 의한 수지상세포의 형태학적 변화**  
 규소수를 3일간 처리한 후 형광현미경에서 관찰한 결과, 대부분의 규소수 처리 군에서 mesenchymal stem cell과 유사한 얇고 길게 뻗은 특징적인 세포의 모양이 관찰되었으며, 규소수 5%

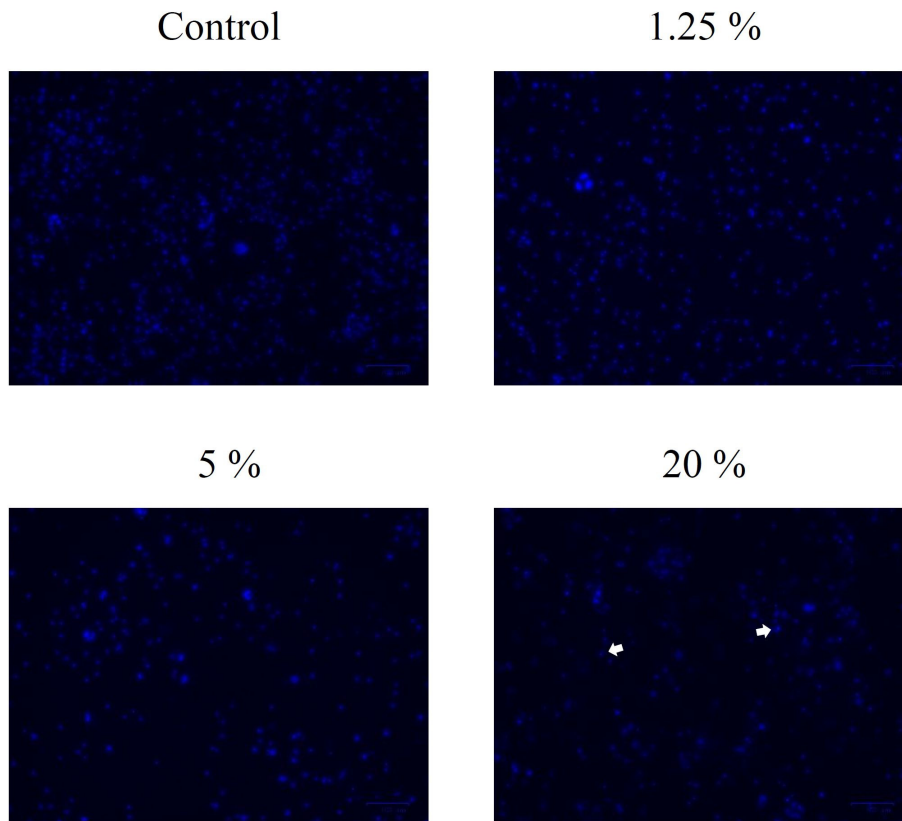


Fig. 4. Effect of Biosilica water on the cell death of DCs. The cells were cultured in 6-well culture plate at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL with 0 to 20 % Biosilica water for 3 days. The treated DCs were incubated with 2.5  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 staining solution for 10 min. A fluorescence microscopy was used for the analysis of dead cells.

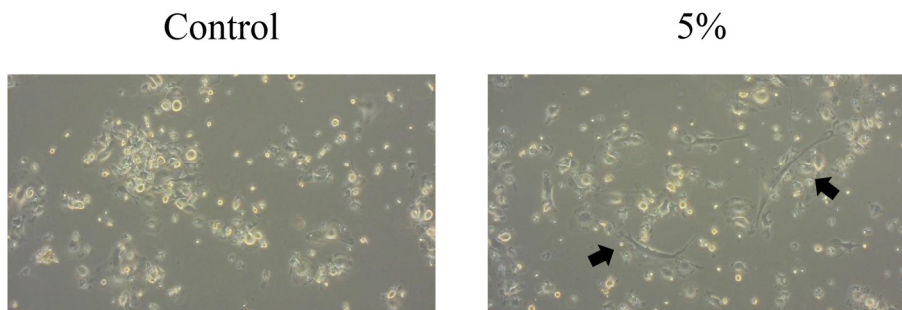


Fig. 5. Morphological changes of Biosilica water-treated DCs. The cells were cultured in 6-well culture plate at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL with 0 to 20 % Biosilica water for 3 days. Arrows indicate the morphologically changed cells.

처리 군에서 가장 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 5).

### 고 찰

바이오실리카는 화학 구성 성분이 동일한 합성실리카에 비해 특징적인 생리 활성을 갖고 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서는 바이오실리카를 주요성분으로 하는 규소수의 면역세포에 대한 효과 및 기능 변화를 알아보는 실험을 진행하였다. 마우스의 수지

상세포에 규소수를 처리한 결과, 20%의 농도에서 대사 활성이 유의하게 감소한 반면 1.25%와 5%의 상대적으로 낮은 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 세포의 대사 활성도가 크게 변하지 않았다. 또한 Hoechst 33342 staining 결과 대조군에 비해 20%의 농도에서 세포사멸이 더 증가함을 확인하였다. 이들 결과를 통해 규소수 20%의 농도는 수지상세포에 독성이 있는 것으로 판단된다.

IL-1 beta와 TNF-alpha는 대표적인 염증성 사이토카인으로 서 유사한 전사 인자에 의해 생산이 조절되지만, TNF-alpha의 전사가 IL-1 beta에 선행되고, pathogen-associated molecular pattern에 대한 민감도도 다르다[4]. ELISA 분석 결과, IL-1 beta와 TNF-alpha 생산 방식은 서로 차이를 보였다 (Fig. 2). TNF-alpha의 생산은 대조군에 비해 크게 변화하지 않은 반면, IL-1 beta는 농도가 증가함에 따라 감소하였고, 특히 20 %의 농도에서는 변화가 두드러졌다. IL-1 beta의 경우 규소수 5%에서도 생산량이 감소하였지만 수지상세포의 대사 활성 저하는 20%에서 나타났다. 이는 규소수에 의한 IL-1 beta의 생산량 저하가 대사활성 저하에 선행하는 것으로 판단된다. 하지만 통계적인 유의성이 확보되지 않아 규소수의 농도, 수지상세포의 수 등의 조건을 조절하여 더욱 자세한 연구가 필요하다.

MLR 결과, 규소수로 처리된 수지상세포와 혼합 반응시킨 비장 세포의 대사 활성도가 상대적으로 낮은 규소수 농도에서는 증가하였고, 높은 규소수 농도에서는 감소하였다 (Fig. 3). 이 결과는 수지상세포의 항원제시능이 규소수의 농도에 따라 조절될 수 있음을 의미한다. 이것은 수지상세포가 적응면역과 밀접한 관련이 있음을 감안하면, 규소수가 수지상세포를 통해 면역반응을 조절할 수 있는 것으로 보인다.

규소수를 수지상세포에 처리했을 때 특이한 세포 형태의 변화를 관찰했다. 규소수 5%에서 가장 특징적이었으며, 세포 형태는 mesenchymal stem cell과 유사하였다 (Fig. 5). 형태 변화가 수지상세포의 기능에 어떤 영향을 미치는지, 규소수에 의한 작용 기전을 조사할 필요가 있다.

본 연구결과를 종합하면, 규소수는 특정 농도 이상에서 수지상세포의 세포 대사 활성을 저하시킬 수 있는 반면, 적절한 농도 범위에서는 항원제시능을 약하게 증가시킬 수 있음을 보여주었다. 또한 수지상세포의 사이토카인 생산을 조절할 수 있고 세포 형태의 변화를 유도하는 사실을 확인했다. 더욱 심도 있는 연구를 통해 다양한 조건에서 규소수를 처리하고 수지상세포의 기능에 어떤 변화가 있는지, 자세한 작용기전에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2020년도 정부(산업통상자원부)의 재원으로 한국산업기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (N0002327, 2020년 산학융합지구 조성사업).

## REFERENCES

1. Cicco SR, Vona D, De Giglio E, Cometa S, Mattioli-Belmonte M, Palumbo F, Ragni R, Farinola GM. Chemically Modified Diatoms Biosilica for Bone Cell Growth with Combined Drug-Delivery and Antioxidant Properties. *Chempluschem*. 2015, 80: 1104-1112.
2. Cicco SR, Vona D, Leone G, De Giglio E, Bonifacio MA, Cometa S, Fiore S, Palumbo F, Ragni R, Farinola GM. In vivo functionalization of diatom biosilica with sodium alendronate as osteoactive material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019, 104: 109897.
3. Delasoie J, Zobi F. Natural Diatom Biosilica as Microshuttles in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2019, 11:537.
4. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000, 118: 503-508.
5. Han Y, Joo HG. Determination of the toxicity of enrofloxacin on mouse bone marrow cells. *J Prev Vet Med*. 2019, 43: 141-145.
6. Hivroz C, Chemin K, Tourret M, Bohineust A. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol*. 2012, 32: 139-155.
7. Hussein HA, Abdullah MA. Anticancer Compounds Derived from Marine Diatoms. *Mar Drugs*. 2020, 18:356.
8. Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol*. 2014, 68: 234-238.
9. Jang YR, Yoon HR, Kim MH, Joo HG. Anti-inflammatory activity of doxorubicin on lipopolysaccharide-induced hyperactivation of spleen cells. *J Prev Vet Med* 2018, 42: 61-65.
10. Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci*. 2015, 16: 145-150.
11. Kröger N, Poulsen N. Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu Rev Genet*. 2008, 42: 83-107.
12. Lee J, Lee HA, Shin M, Juang LJ, Kastrup CJ, Go GM, Lee HS. Diatom Frustule Silica Exhibits Superhydrophilicity and Superhemophilicity. *ACS Nano*. 2020, 14: 4755-4766.
13. Li J, Han J, Sun Q, Wang Y, Mu Y, Zhang K, Dou X, Kong M, Chen X, Feng C. Biosynthetic calcium-doped biosilica with multiple hemostatic properties for hemorrhage control. *J Mater Chem B*. 2018, 6: 7834-7841.
14. Maher S, Kumeria T, Aw MS, Losic D. Diatom Silica for Biomedical Applications: Recent Progress and Advances. *Adv Healthc Mater*. 2018, 7: e1800552.
15. Wang Y, Cai J, Jiang Y, Jiang X, Zhang D. Preparation of biosilica structures from frustules of diatoms and their applications: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013, 97: 453-460.