

## 마우스 Macrophage의 IL-1 및 TNF- $\alpha$ 의 분비유도에 있어서 한국산 겨우살이 추출물이 미치는 영향

윤택준 · 유영춘\* · 홍은경 · 조영호 · 이석원 · I. Azuma\* · 유보림\*\* · 김종배

건국대학교 동물자원연구센터

\*北海道大學 免疫科學研究所 化學部門 · \*\*실험 중앙 연구소

### Effect of Korean Mistletoe Extracts on the Induction of IL-1 and TNF- $\alpha$ from Mouse Macrophages

Taek Joon Yoon, Yung Choon Yoo\*, Eun Kyung Hong, Young Ho Cho,  
Suk Won Lee, I. Azuma\*, Bo Im Yoo\*\* and Jong Bae Kim

Animal Resource Research Center, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea,

\*Section of Chemistry Institute of Immunological Science, Hokkaido University,

Sapporo 060, Japan and \*\*Tumor Experiment Institute, Seoul 110-012, Korea

**Abstract**—To investigate the effect of Korean mistletoe on stimulation of macrophage, the activity to induce interleukine-1(IL-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) from murine peritoneal macrophage by its extracts originated from oak was examined. From *in vitro* analysis of the cytokines using the culture supernatants of macrophages stimulated with its extracts for 1hr, it was found that Korean mistletoe induces IL-1 and TNF- $\alpha$  from murine macrophage. Furthermore, both extracts of Korean mistletoes that were extracted with distilled water and 2% acetic acid exhibited a significant activity to induce two cytokines.

In the stimulation for 30 min, Korean mistletoe at concentration of 1~100  $\mu$ g/ml showed a significant induction of IL-1 from macrophage until 24 hrs after stimulation, showing maximal activity on 5~10 hrs at 10~100  $\mu$ g/ml. On the other hand, TNF- $\alpha$  was induced on the early period, 2 hrs, after stimulation at a wide range of concentration, 1~500  $\mu$ g/ml. In addition, the fraction of Korean mistletoe from 80% saturated ammonium sulphate precipitation showed a significant activity to induce both cytokines from macrophage.

The present study demonstrates that Korean mistletoe contains immunoregulatory factors responsible for stimulating murine macrophage to secrete IL-1 and TNF- $\alpha$  which play an important role in immune responses, and suggests that the activity of Korean mistletoe to induce two cytokines is functioned by a possible independent stimulation manner.

**Keywords**—Mistletoe · *Viscum album* L. · Loranthaceae · interleukine-1 · tumor necrosis factor- $\alpha$  · immune response

암의 발생과 종양세포의 증식에 대응하는 숙주의 생체 방어기구로는, 생체의 면역작용에 의한 면역 감시(immune surveillance)기능이 중요한 역할을 담당하며, 이러한 항종양 면역작용은 T-cell과 B-cell 등의 lymphocyte, macrophage 그리고 natural killer cell 등에 의해 수행한다.<sup>1-5)</sup> 특히 macrophage는 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 lymphocyte의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비 등 비특이적 면역작용(non-specific immune response)에 관여하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 생체내의 항종양 면역작용은 일반적으로 종양세포를 배제하기에 충분한 면역능이 유도되지 않기 때문에, 숙주의 면역능을 증가시키기 위한 시도로서 biological response modifier (BRM)의 개념이 도입되어, 특히 암에 대한 면역요법에 응용되어 왔다.<sup>3-6)</sup>

겨우살이 (Mistletoe, *Viscum album* L., Loranthaceae)는 참나무, 소나무, 뱀나무 등 여러 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생 식물로서, 유럽에서는 오래전부터 암 및 고혈압 등의 질환에 대한 민간요법 약제로 사용되어져 왔다.<sup>10)</sup> 겨우살이의 면역적인 활성은 1920년대부터 연구되어, 최근 그 추출물의 면역 조절작용이 보고되고<sup>11)</sup>, 스위스에서는 항종양성 면역증강제 (immunoadjuvant)로서 인정되어, 임상에 응용되고 있다.<sup>12)</sup> 마우스를 이용한 이들의 *in vitro* 실험 결과에 의해, 겨우살이 추출물은 thymocyte의 증식을 유도하는 활성을 가지는 것이 확인되었고<sup>13,14)</sup>, 이 결과는 Rentea<sup>15)</sup> 등에 의해 지지되었다. 또한 겨우살이 추출물은 splenocyte의 증식, 식균작용(phagocytosis)의 증강<sup>8)</sup> 및 delayed-type hypersensitivity (DTH)의 상승<sup>12)</sup> 등 숙주의 생체방어 기구에 관련된 각종 기능을 강화하는 활성을 지니는 것이 판명되어, 면역 강화제로서의 작용이 주목되어져 왔다. 또한 겨우살이 추출물 중 alkaloid는 종양세포에 대한 독성을<sup>17,18)</sup> polysaccharide는 면역 증강효과를 지니는 것으로 보고되어져 있고<sup>19)</sup>, 그외에도 10여종의 염기성 단백질의 항종양 활성에 관계하는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 이상의 결과를 종합하여 볼때, 겨

우살이 추출물은 생체의 면역기능을 증강하는 성분들을 함유하며<sup>12)</sup>, 이러한 면역 증강효과는 암의 예방 및 치료에 응용할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.<sup>10,20,21)</sup>

이러한 겨우살이의 생물학적인 활성에 대해서는 주로 한국산 겨우살이와 학명이 동일한 유럽산 겨우살이가 연구의 대상이 되어왔으며, 한국산 겨우살이에 대해서는 성분상 유럽산과 차이가 있다는 보고<sup>17,18)</sup> 이외에는 면역학적 측면에서의 활성에 관한 보고는 거의 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 숙주의 생체 방어기능에 미치는 한국산 겨우살이의 생물학적인 활성을 조사하기 위하여, 참나무 유래의 한국산 겨우살이의 마우스 macrophage 활성화에 미치는 효과를 *in vitro* 실험에 의해 검토하였다. Macrophage 활성화의 지표로서는 면역작용의 증강과 항종양 활성에 중요한 의미를 갖는 IL-1과 TNF- $\alpha$ 에 주목하여, macrophage의 cytokine 유도에 미치는 효과를 검토하였다.

## 실험재료 및 방법

**실험동물**—본 실험에 사용된 동물은 specific-pathogenic-free (SPF), Balb/C 및 C3H/HeJ (4~5 주령, ♂)로 Sizuoka Laboratory Animal Center (Hamamatsu, Japan)에서 구입사용 하였다.

**시약**—본 실험에 사용한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium (MEM) 배지, fetal bovine serum (FBS), Thioglycollate, lipopolysaccharide (LPS), phytohaemagglutinine (PHA) 등은 Gibco사에서, [<sup>3</sup>H]-thymidine (specific activity 23 Ci/m mol)은 Amersham사에서 구입하여 사용하였다.

**세포주 및 배양액**—본 실험에 사용된 세포주는 C3H/HeJ 유래의 fibroblast인 L929로서 일본 북해도대학 면역과학 연구소로부터 기증받은 것을 사용하였다. 세포주(L929)는 56°C에서 30 분간 불활성화 한 FBS(7.5%)와 vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 첨가된 MEM 배지에서 배양하였다. 마우스의 복강내 macrophage와 thymocyte는 FBS(7.5%), streptomycin(0.1 mg/ml), penicillin

(100 units/ml)을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였으며, 각 세포의 배양은 5% CO<sub>2</sub>, 37°C (100% humidity)의 조건하에서 실시하였다.

**겨우살이의 추출**—본 연구의 시료로서는 참나무를 숙주로 하여 성장하는 한국산 겨우살이를 사용하였다. 추출방법은 먼저 세절한 겨우살이의 잎과 줄기를 2차 증류수 또는 2% acetic acid에 첨가하여 2분간 믹서기로 분쇄한 후, 4°C에서 16시간 동안 교반하였다. 그후 원심분리(15,000 g/20min, 4°C)로 부터 얻어진 상등액을 pore size를 달리하는 membrane filter에 의해 순차적으로 여과 후(60 μm→20 μm→7.2 μm→0.45 μm→0.22 μm), 내액을 등결조건 하였다. 이 등결 건조물은 PBS로 10 mg/ml의 농도로 현탁하여 stock solution으로 한 후 실험에 사용하였다.

**Ammonium sulphate 침전**—겨우살이 추출물 20 mg을 80% 포화 ammonium sulphate 용액에 넣어 24시간 교반(4°C)한 후, 15,000 g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 10 mM PBS(pH 7.4)에 용해한 후, 동일 buffer에서 2일간 투석하였다. 15,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액 700 μl를 4°C에서 실험까지 보관하였다.

**In vitro에서의 macrophage 자극**—Balb/C 마우스에 1% thioglycollate를 1 ml씩 복강주사하고, 72시간 후에 마우스의 복강내로부터 macrophage를 회수하였다. Macrophage를 24 well plate에 1×10<sup>6</sup>ml/well의 세포 밀도로 plating한 후 2시간 배양하였다. Culture medium으로 회석한 겨우살이를 1~500 μg/ml 농도로 각 well에 1ml씩 첨가하여 30분, 1시간 또는 24시간 동안 macrophage를 자극하였다. 이때 양성 대조군으로 10 μg/ml의 LPS를, 음성 대조군으로 배양액을 첨가하였다. 그후 각 well을 3회 세척하고 fresh medium을 1ml/well씩 첨가하여 일정시간 배양하였다. 배양종료 후, 원심분리에 의해 배양 상등액을 회수하여 IL-1 및 TNF-α assay에 사용하였다. 한편 각 배양시간별로 각 well의 macrophage를 회수하여 trypan blue dye exclusion 법에 의해 시료에 의한 macrophage에 대한 직접적인 독성을 조사하였다.

**IL-1 assay**—Macrophage의 배양 상등액 중의

IL-1 assay는 Mizel<sup>22)</sup> 등의 방법에 의해 실시하였다. 약술하면, 4~6주령의 C3H/HeJ 마우스로부터 회수한 흉선세포(thymocyte)를 96 well plate에 1.5×10<sup>6</sup>/100 μl/well씩 plating하고, 각 well에 macrophage 배양 상등액과 PHA 용액(최종용도 0.25%)을 50 μl씩 첨가한 뒤 72시간 배양하였다. 배양종료 5시간 전에 0.5 μCi의 [<sup>3</sup>H]-thymidine([<sup>3</sup>H]-TdR)을 50 μl/well에 첨가한 후, 배양세포를 Filter mate 196(Packard Instrument, Meriden, CT)에 의해 glass filter에 흡착시킨 뒤 Matrix 96™ Direct Beta Counter(Packard)로부터 각 well의 방사선 활성을 측정하였다.

**TNF-α assay**—TNF-α assay는 Fish와 Gifford<sup>23)</sup> 등의 방법에 준하여, TNF-α에 감수성을 나타내는 L929 세포를 이용한 bioassay에 의해 실시하였다. L929 세포를 96 well에 1×10<sup>4</sup>/100 μl/well의 세포 밀도로 plating한 후 배양 상등액을 각 well당 50 μl씩 첨가하였다. 이 plate에 actinomycin D를 최종농도 0.1 μg/ml이 되도록 첨가하고, 50 μl/well씩 첨가한 뒤 72시간 배양하였다. 배양종료 5시간 전에 0.5 μCi의 [<sup>3</sup>H]-TdR(50 μl/well)을 첨가한 뒤, 각 well의 방사선 활성을 측정하였다. 배양 상등액중 TNF-α 활성은 L929 세포의 증식 저해율로서 나타내었으며, 계산식은 다음과 같다.

% 증식 저해율=(1-시료첨가군의 [<sup>3</sup>H]-TdR 양/대조군의 [<sup>3</sup>H]-TdR 활성)×100

## 결 과

**한국산 겨우살이 추출물에 의한 macrophage의 활성화**—한국산 겨우살이의 macrophage 활성화에 미치는 효과를 조사하기 위하여, 증류수 또는 acetic acid로 추출한 두 시료(M 110 또는 M 120)를 이용하여, macrophage로부터의 IL-1 및 TNF-α의 분비 유도능을 조사했다. 10 또는 100 μg/ml 농도의 M110 또는 M120으로 60분간 macrophage를 자극하고, fresh medium에서 macrophage를 24시간 배양한 후, macrophage의 배양 상등액을 취하여, bioassay에 의해 IL-1과 TNF-α의 활성을 측정된 결과, M110과 M120은 공히 macrophage로부터 IL-1과 TNF-α의 분

비를 유도하는 작용을 지니는 것으로 나타났다. 또한 두 겨우살이 추출물에 의한 이들 cytokine 유도능은 10 µg/ml의 농도에서도 유효하며, 특히 100 µg/ml의 농도에서는 양성 대조군(LPS, 10 µg/ml) 이상의 IL-1 유도활성을 나타내는 것으로 관찰되었다. Fig. 1의 결과에서 보듯이, 한국산 겨우살이는 macrophage를 활성화하여 IL-1 및 TNF-α의 분비를 유도하였고, 이러한 macro-

phage의 활성화는 60분 이내의 자극에 의해 유발되는 것으로 판단되었다. 이 결과를 중심으로, 이하의 실험에서는 M110을 이용하여 한국산 겨우살이의 macrophage 활성화에 미치는 효과를, IL-1 및 TNF-α 두 cytokine 분비유도의 관점에서 구체적으로 검토하였다.

한국산 겨우살이에 의한 IL-1 유도양식—Fig. 1에 나타난 바와같이 M110의 60분간의 자극에 의해 macrophage로부터 IL-1이 유도되는 것이 확인되었으므로, 다음으로 M110에 의한 macrophage 자극시간을 30분으로 단축하여, M110의 각 농도에 따른 IL-1 분비유도 경향을 경시적(經時的)으로 검토하였다. Fig. 2에 나타난 바와같이, 10~100 µg/ml 농도의 M110으로 30분간 macrophage를 자극한 결과, 공히 자극 후 10시간 후에는 거의 동등한 수준의 IL-1 활성을 나타내었으며, 정점에 달하였다. 하지만 자극 후의 초기 단계(5시간 후)에서는 50 µg/ml의 농도가 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, 500 µg/ml 농도의 M110의 자극에 있어서는 자극 후 24시간 후까지는 유의한 IL-1 활성이 관찰되지 않았으나, 1 µg/ml의 농도에서는 자극 후 24시간 후에는

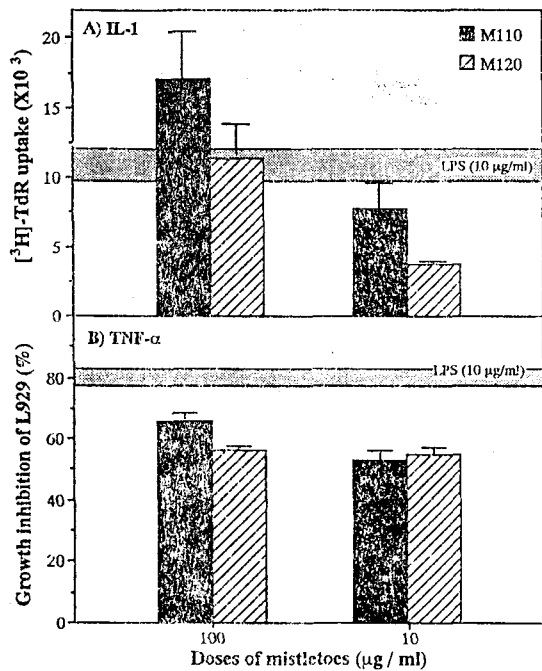


Fig. 1. Activity of Korean mistletoes to induce IL-1 and TNF-α from murine peritoneal macrophages *in vitro*

Peritoneal exudative cells ( $1 \times 10^6$ /well) collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice treated with 1% thioglycollate were plated into 24-well plates and incubated for 2 hrs. The plates were washed 3 times with culture medium to remove non-adherent cells. Adherent cells, mainly macrophages, were stimulated with two doses of M110 or M120 for 60min. After 3 times wash, fresh culture medium was added into the plates and the cells were incubated for 24 hrs. The activity of IL-1 and TNF-α in the supernatant of each well was measured by a bioassay described in Materials and Methods. The wells stimulated with culture medium did not exhibit a significant activity of both cytokines.

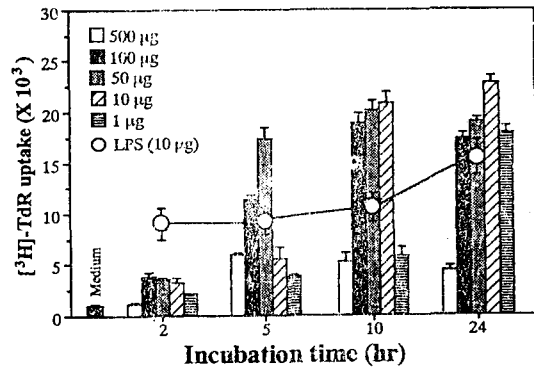


Fig. 2. Time course of the induction of IL-1 from murine peritoneal macrophages by M110 *in vitro*

Peritoneal macrophages in 24-well plates were stimulated with various doses of M110 for 30 min. After 3 times wash, fresh culture medium was added into the plates and the cells were incubated for the indicated times. After incubation, the activity of IL-1 in the supernatant of each well was measured by a bioassay described in Materials and Methods.

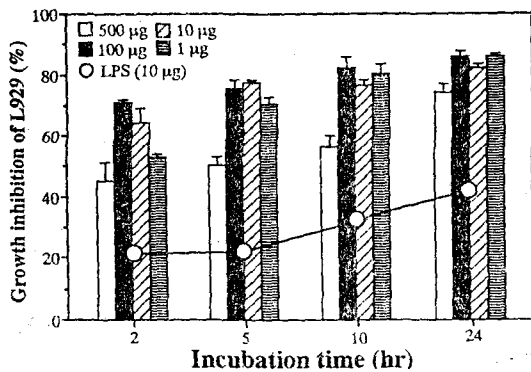


Fig. 3. Time course of the induction of TNF- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages by M110 *in vitro*

Peritoneal macrophages in 24-well plates were stimulated with various doses of M110 for 30min. After 3 times wash, fresh culture medium was added into the plates and the cells were incubated for the indicated times. After incubation, the activity of TNF- $\alpha$  in the supernatant of each well was measured by a bioassay described in Materials and Methods. The wells stimulated with culture medium did not exhibit a significant activity of TNF- $\alpha$ .

높은 IL-1 활성이 인정되었다. 따라서, M110에 의한 IL-1 분비 유도활성은 10~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 가장 유효하며, 1  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 그 활성이 유지되는 것으로 판단되었다.

한국산 겨우살이에 의한 TNF- $\alpha$  유도양식— Fig. 2와 동일한 방법에 의하여, M110의 TNF- $\alpha$  분비 유도경향을 조사한 결과, 1~100  $\mu\text{g/ml}$  농도에 M110은 자극 후 단시간 내(2시간 후)에 TNF- $\alpha$ 를 높은 수준으로 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한, IL-1의 유도에 있어서는 유효성이 적었던 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에 있어서도 자극 후 초기단계 부터 TNF- $\alpha$  활성이 관찰되어 24시간 후에는 다른 농도의 M110과 거의 동일한 활성을 나타내었다.

Fig. 2와 Fig. 3에서 보듯이, M110은 적어도 30분간의 자극에 의해 macrophage로부터 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유도하며, 또한 M110농도에 따른 두 cytokine의 발현(expression)양식의 차이에서 M110에 대한 macrophage의 감수성(susceptibility)과 두 cytokine의 분비 유도능 간

에는 어떠한 상관관계가 있는 것으로 판단되었다.

M110의 분획물에 의한 IL-1 및 TNF- $\alpha$  유도양식—유럽산 겨우살이에 관한 이전의 보고에서, lectin 또는 저분자 peptide 성분이 cytokine 유도에 관련하는 것이 알려져 있고<sup>24,25</sup>, 또한 70% 포화 ammonium sulphate 용액에서 침전하는 분획물이 이 성분들을 포함하는 것으로 보고되고 있다.<sup>26</sup>

IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비유도에 관여하는 한국산 겨우살이 활성성분을 검토하기 위하여, ammonium sulphate 침전에 의해 분획한 성분으로 cytokine 분비 유도능을 조사하였다. 그 결과 한국산 겨우살이는 40% 포화 용액에서 소량의 성분이 침전하고, 60% 및 80% 포화 용액에서는 lectin 및 polypeptide로 보여지는 거의 대부분의 성분이 침전되었다. 80% 포화 용액에서 침전된 분획을 bicinehoninic acid(BCA)법<sup>30</sup>에 의해 단백질 양을 측정된 결과, 그 분획물 중 단백질 양은 0.25 mg/ml이었다. 이 80% 포화 ammonium sulphate에 의한 분획물을 10배 희석법에 의해

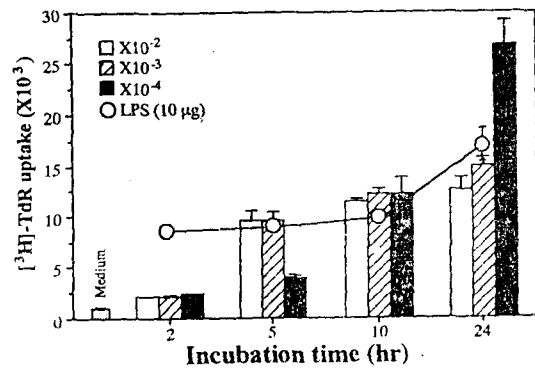


Fig. 4. Time course of the induction of IL-1 from murine peritoneal macrophages *in vitro* by the precipitant of M110 obtained by precipitation with ammonium sulphate

Peritoneal macrophages in 24-well plates were stimulated with various dilutions of the precipitant of M110 for 30 min. After 3 times wash, fresh culture medium was added into the plates and the cells were incubated for the indicated times. After incubation, the activity of IL-1 in the supernatant of each well was measured by a bioassay described in Materials and Methods.

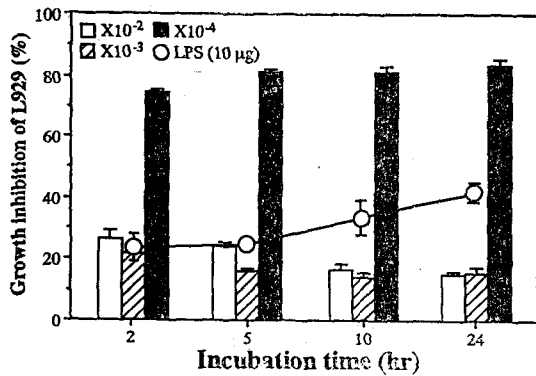


Fig. 5. Time course of the induction of TNF- $\alpha$  from murine peritoneal macrophages *in vitro* by the precipitant of M110 obtained by precipitation with ammonium sulphate

Peritoneal macrophages in 24-well plates were stimulated with various dilutions of the precipitant of M110 for 30 min. After 3 times wash, fresh culture medium was added into the plates and the cells were incubated for the indicated times. After incubation, the activity of TNF- $\alpha$  in the supernatant of each well was measured by a bioassay described in Materials and Methods. The wells stimulated with culture medium did not exhibit a significant activity of TNF- $\alpha$ .

회석한 뒤, Fig. 2 또는 Fig. 3과 동일한 방법으로 macrophage로부터 IL-1 및 TNF- $\alpha$  분비 유도능을 조사하였다. 그 결과, ammonium sulphate 침전법에 의한 M110의 분획물도 30분간의 자극에 의해 macrophage로부터 IL-1(Fig. 4) 및 TNF- $\alpha$ (Fig. 5)의 분비를 유도하는 것이 확인되었다.

### 고 찰

겨우살이의 생물학적 활성에 대한 연구는, 지금까지 유럽산 겨우살이가 주된 연구대상이 되어왔고, 많은 연구결과에서 면역증강 및 항종양 효과가 인정되어 유럽에서는 이들 추출물을 소재로 한 의약품(Helixor, Iscador 등)이 시판되고 있다. 유럽산 겨우살이에 대한 종래의 연구결과에 의하면 겨우살이는 종양 세포에 직접적인 독성을 나타내는 물질<sup>17,20)</sup>과 cytokine 분비를 유도하는 물질<sup>24,27-29)</sup>이 공존하고 있으며, 이러한 복

합적인 작용에 의해 높은 항종양 및 면역증강 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 한편, 한국산 겨우살이에 있어서는 유럽산 겨우살이와 성분상의 차이를 인정하는 약간의 보고 이외에는<sup>17,18)</sup> 생물학적 활성에 관한 정보는 거의 알려져 있지 않다. 이러한 이유에서, 본 연구는 한국산 겨우살이의 생물학적 활성에 관한 연구의 일환으로서 macrophage의 cytokine(IL-1, TNF- $\alpha$ ) 분비 유도능에 초점을 맞추어 면역학적인 활성을 검토하였다.

증류수 또는 acetic acid에 의해 추출한 한국산 겨우살이 추출물을 자극원(stimulant)으로 하여 마우스의 macrophage를 1시간 자극한 결과, 두 추출물은 공히 macrophage로부터 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유도하였다. 이 결과는, 한국산 겨우살이도 macrophage를 활성화하는 작용을 지니며, 또한 이 활성에 관여하는 성분은 산성 조건 하에서도 안정된 물질임을 시사하고 있다. 겨우살이에 의한 IL-1 유도능에 있어서는 이 전 Hajto<sup>29)</sup> 등에 의해 lectin이 활성 성분임을 시사하는 보고가 제시되어 있고, 본 연구에서도 80% 포화 ammonium sulphate에서 침전하는 분획물이 IL-1을 유도하는 작용을 지니는 것으로 확인되어, 유럽산과 한국산 겨우살이의 유사성을 제시하고 있다. 그리고 Fig. 2에서 보듯이, 한국산 겨우살이의 증류수 추출물(M110)은 500  $\mu$ g/ml 농도에서는 유의한 IL-1 유도가 관찰되지 않았고, 1~100  $\mu$ g/ml 농도에서는 양성 대조군 이상의 활성이 인정되어 crude한 겨우살이 추출물에는 macrophage 활성화를 증가시키는 물질과 억제시키는 물질이 공존하고 있을 가능성이 있는 것으로 사료되었다. 그리고 1~500  $\mu$ g/ml 농도의 겨우살이 추출물로 macrophage를 30분 자극시킨 후, 각 배양시간별로 trypan blue dye exclusion 법에 의해 macrophage 생존율을 조사한 결과, 이 영역의 농도에 있어서는 자극후 24시간 배양 후에도 macrophage는 90% 이상의 생존율을 나타내었다. 이 결과로부터 한국산 겨우살이는 500  $\mu$ g/ml의 고농도에 있어도 macrophage에 대해 직접적인 독성(direct cytotoxicity)을 나타내지 않는다는 것과, 또한 이 농도에서 cytokine이 유도되지 않는 이유로서는 적어도 macrophage

에 대한 세포상해에 기인됨을 배제할 수 있는 것으로 판단되었다.

한국산 겨우살이에 의한 TNF- $\alpha$  유도능에 있어서는, IL-1의 유도양식과는 달리 자극후 극히 단시간(2시간)에 높은 수준의 TNF- $\alpha$ 의 발현이 관찰되었고, ammonium sulphate 분획물에 있어서도 그 활성의 유의성이 인정되었다. 그러나 ammonium sulphate 분획물에 의한 TNF- $\alpha$  유도능에 있어서, 낮은 농도( $\times 10^{-4}$ )의 분획물이 높은 농도( $\times 10^{-2}$  또는  $\times 10^{-3}$ )의 분획물보다 높은 수준의 활성을 나타내었으며, 이는 ammonium sulphate 분획물에 의한 IL-1의 경우와 유사한 현상이 관찰되었다. 그 이유는 ammonium sulphate 분획물이 높은 농도에서는 이들 cytokine 유도를 억제하는 성질이 있는 것으로 사료되었다.

이상의 결과에서 한국산 겨우살이는 macrophage를 자극하여 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비를 유도하는 작용을 지니는 것이 판명되었으며, TNF- $\alpha$ 의 발현시간이 IL-1의 발현시간보다 빠른 것으로 보아, TNF- $\alpha$ 의 유도는 IL-1에 의한 macrophage의 2차 자극에 의한 것이 아니고, macrophage에 대한 직접적인 작용에 의해 TNF- $\alpha$ 를 유도하는 것으로 사료되었다.

본 연구에서 밝혀진 한국산 겨우살이의 면역학적인 활성을 바탕으로, 현재의 면역증강활성에 관련된 성분들의 화학적 및 구조적 특징에 관한 연구를 진행 중이며, 나아가 한국산 겨우살이의 생물학적 활성을 규명하고, BRM 또는 항종양 물질로서의 응용 가능성에 대해서도 검토할 예정이다.

## 결 론

본 연구에서는 한국산 겨우살이의 마우스 macrophage 활성화에 미치는 효과를 검토하기 위하여, 참나무 유래의 겨우살이 추출물에 의한 macrophage로부터의 IL-1 및 TNF- $\alpha$  유도능을 *in vitro* assay에 의해 검토하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 증류수 또는 acetic acid에 의해 추출한 한국산 겨우살이로 마우스 복강 macrophage를 1시간 자극한 결과, 두 추출물은 공히 macrophage로부터

IL-1 및 TNF- $\alpha$ 를 높은 수준으로 유도하였다.

2. Macrophage의 자극시간을 30분으로 단축한 후, 이들 두 cytokine의 분비 유도능을 경시적(經時的)으로 측정된 결과, IL-1의 분비는 1~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유효한 것으로 나타났으며, 특히 10~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 자극 후 5~10시간 이내의 최대 활성에 달하였다. 그리고 TNF- $\alpha$ 의 유도는 1~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유효성이 인정되었고, 특히 자극 2시간 후부터 높은 활성을 유지하였다.

3. 80% 포화 ammonium sulphate 용액에 의해 분획한 침전물을 이용하여 이들 두 cytokine의 분비 유도능을 검토한 결과, crude 추출물과 유사한 양식으로 두 cytokine을 유도하는 것이 확인되었다.

이상의 결과로부터 한국산 겨우살이는 macrophage를 활성화하여 IL-1 및 TNF- $\alpha$ 를 유도하는 성분을 포함하고 있으며, 이 활성 성분은 산에 대해 안정하며, 80% 포화 ammonium sulphate에 의한 침전물 중에도 포함되어있는 것으로 사료되었다. 또한 TNF- $\alpha$ 가 IL-1보다 빠른 시간에 발현되는 것으로 보아 한국산 겨우살이에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비유도는 IL-1의 2차적인 자극에 의한 것이 아니고, 각각 독립적인 pathway에 의한 것으로 사료되었다.

(1994년 3월 15일 접수: 4월 1일 수리)

## 참 고 문 헌

- Hanna, N.: *Metastasis Rev.* 33, 91 (1982).
- Fidler, I.J.: *Cancer Res.* 45, 1 (1982).
- Pilarski, L.M.: *J. Exp. Med.* 145, 4714 (1982).
- Pfizenmaier, K., Deizelt, R., Rollinghoff, M. et al.: *Eur. J. Immunol.* 10, 577 (1980).
- Fujiwara, H., Levy, R.B. and Shearer, G.M.: *J. Immunol.* 127, 940 (1980).
- Hellstrom, K.E. and Hellstrom, I.: *J. Faseb.* 3, 1715 (1989).
- Morton, D.L., Dave, S.B., Gupta, R.G. et al.: *Elsevier, Sci. Publ., Amsterdam* p.665 (1989).
- Oldham, P.K.: *J. Biol. Response Mod.* 1, 181 (1982).
- Old, R.K.: *Cancer Treat. Repts.* 68, 221 (1984).

10. Kuttan, G., Vasudevan, D.M. and Kuttan, R.: *J. Ethnopharmacology* 29, 35 (1990).
11. Hajto, T.: *Oncology* 43: suppl. 1, 51 (1986).
12. Bolksma, N., Dijk, H.V., Korst, P. and Willers, J.M.: *Immunobiol.* 156, 309 (1979).
13. Nienhaus, J., Stoll, M. and Vester, F.: *Experientia* 26, 523 (1970).
14. Nienhaus, J. and Leroi, R.: *Elemente Naturwissenschaft* 13, 45 (1970).
15. Rentea, R., Lyon, E. and Junter, R.: *Lab. Invest.* 44, 43 (1981).
16. Zschiesche, W.: *Monatsber. der Deutschen akad. d. Wiss.* 8, 750 (1966).
17. Khwaja, T., Varven, J.C., Pertecost, S. and Pande, H.: *Experientia* 36, 599 (1980).
18. Khwaja, T., Dias, C.B. and Pertecost, S.: *Oncology* 43: suppl. 1, 42 (1986).
19. Wagner, H. and Jordan, E.: *Phytochemistry* 27, 2511 (1988).
20. Evans, M.R. and Pree, A.W.: *Bristol Medico-chirurgical Journal* 88, 17 (1973).
21. Kuttan, G. and Kuttan, R.: *Immunol. Invest.* 21, 285 (1992).
22. Mized, S.B., Oppenheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: *J. Immunol.* 120, 1497 (1978).
23. Fish, H. and Gifford, G.E.: *J. Immunol. Methods* 57, 311 (1983).
24. Männel, K.N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A. and Franz, H.: *Immuol. Immunother.* 33, 177 (1991).
25. Hamprecht, K., Handgretinger, R., Voetsch, W. and Anderer, F.A.: *Int. J. Immunopharmac.* 9, 199 (1987).
26. Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A.: *J. Biol. Chem.* 257, 13263 (1982).
27. Kuttan, G., Vasudevan, D.M. and Kuttan, R.: *Cancer Lett.* 41, 307 (1988).
28. Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H.S.: *Cancer Res.* 49, 4803 (1989).
29. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H.J.: *Cancer Res.* 50, 3322 (1990).
30. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T. Mallia, A.K., Gather, F.H., Provenzano, M.D. Fujimato., Goeke, N.M., Oslon, B.J. and Klenk D.C.: *Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).