

## 유산균으로 발효된 한국산 겨우살이 추출물의 Macrophage 자극에 의한 면역학적 활성화와 종양전이 억제효과

윤택준<sup>1</sup> · 유영춘<sup>2</sup> · 강태봉<sup>1</sup> · 이관희<sup>1</sup> · 광진환<sup>1</sup> · 백영진<sup>3</sup> · 허철성<sup>3</sup> · 김종배<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>한동대학교 생의학 연구소, <sup>2</sup>건양 대학교 의과대학 미생물학 교실

<sup>3</sup>한국 야쿠르트 중앙연구소, <sup>4</sup>건국대학교 동물자원연구센터

### Fermented Extracts of Korean Mistletoe with *Lactobacillus* (FKM-110) Stimulate Macrophage and Inhibit Tumor Metastasis

Taek Joon Yoon<sup>1</sup>, Yung Choon Yoo<sup>2</sup>, Tae Bong Kang<sup>1</sup>, Kwan Hee Lee<sup>1</sup>, Jin-Hwan Kwak<sup>1</sup>, Young Jin Baek<sup>3</sup>, Chul Sung Huh<sup>3</sup> and Jong Bae Kim<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Research center, Han Dong University

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Konyang University School of Medicine

<sup>3</sup>R & D Center, Korea Yakult Co., Ltd

<sup>4</sup>Animal Resources Center, College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### Abstract

Based on the results that the extract of Korean mistletoe (KM-110) has immunological and anti-tumor activities and its main component is lectin called KML-U, this study was carried out to investigate the immunostimulatory and anti-tumor activities of FKM-110, fermented KM-110 with lactobacillus, as a basic study for the development of functional food with anti-tumor activity. The amount of lectin after fermentation determined by ELISA was varied with the fermentation time and kinds of lactobacillus. Cytotoxic effects of FKM-110 on the various tumor cells was significant and dependent on the concentration of KML-U and the kinds of lactobacillus. FKM-110 stimulated macrophage and resulted in the secretion of some cytokines such as IL-1 and IFN- $\gamma$ , but this effect was not correlated with the concentration of lectin. FKM-110 fermented with Marshall *Lactobacillus casei* showed the most potent anti-tumor activity in experimental and spontaneous metastasis models. When yoghurt produced with KM-110, Marshall *Lactobacillus casei* and skim milk was administered orally to mouse, the metastasis of tumor cells was significantly inhibited.

Key words: mistletoe extracts, fermentation, lectin, macrophage, immunostimulating, anti-metastasis

#### 서 론

겨우살이(mistletoe)는 여러 가지 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생식물로서 오래 전부터 동서양에서 여러 가지 질병에 대한 민간약제로 사용되어 왔다. 유럽에서는 민간에서 사용한 겨우살이(*Viscum album loranthacea*)를 1920년대부터 겨우살이의 잎과 줄기를 물로 추출 후 멸균 여과 하거나, 발효시키는 방법으로 주사제를 만들어 종양에 대한 치료 및 그 보조제로 임

상에서 사용하였고, 현재는 겨우살이를 이용한 기능성식품 및 보조 약제등의 개념으로 차 및 tablet의 형태로도 시판 되고 있다<sup>(1,3)</sup>.

한편, 우리나라에서도 겨우살이(*Viscum album coloratum*)는 주로 한방에서 숙주나무에 따라 상기생, 기생목, 해기생등 여러 이름으로 분류하여, 요통, 고혈압, 유산방지, 치통등에 대한 약제로 사용하여 왔다<sup>(15,16)</sup>. 이 사실에 근거하면 한국산 겨우살이의 안전성은 이미 인정된 것으로 생각되지만, 현대의 과학적인 검증이 되지 않았기에 유럽과는 달리 그 사용이 제한되어 있는 실정이다.

겨우살이의 생물학적 활성화에 대한 연구는 주로 유

Corresponding author: Kim, Jong Bae, Institute for Biomedical Research, Handong University, Namsong-Ri3, Buk-Ku, Pohang 791-940, Korea

## 재료 및 방법

럽에서 유럽지역에 서식하는 겨우살이에 대하여 수행되어 왔다<sup>(4,6)</sup>. 특히 *Lactobacillus plantarum*으로 발효시킨 겨우살이는 체액성 및 세포성 면역체계를 자극하는 면역증강 효과가 있었고<sup>(3,7,8)</sup>, 동물 및 인간에 대한 임상 실험 결과 종양세포에 대하여 직접, 간접적으로 대응하는 대식세포 및 자연살해세포(NK-cell)의 활성을 증가시킴으로서 종양세포의 성장을 억제하고, 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고 하였다<sup>(2,9,10)</sup>. 이상의 효과는 겨우살이의 면역증강 작용 외에도 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과에 의한 것으로 알려져 왔고, 이러한 작용의 활성 성분은 겨우살이 중에 존재하는 렉틴 성분들이 주로 관여하는 보고되고 있다<sup>(11-13)</sup>.

유럽산 겨우살이 렉틴은 당특이성 및 분자량에 따라 렉틴 I, II, III의 3종류로 구별하고 있다<sup>(13)</sup>. 유산균으로 겨우살이를 발효시킨 경우, 렉틴 성분의 함량은 발효를 시키지 않은 것에 비하여 약 10배정도 줄어드는 결과를 나타냈으나, 겨우살이의 면역증강 활성은 유지되는 것으로 보고되었다<sup>(14)</sup>. 현재까지 보고에서 발효에 의하여 생길 수 있는 활성성분들에 대한 자세한 언급은 없었으나, 유산균 발효에 의하여 렉틴은 A 및 B 체인으로 분리되거나 여러 peptides로 바뀌어 독성과 관련된 부위가 변형되는 것으로 알려져 있으며<sup>(7,14)</sup>, 발효 이후에도 면역증강 효과가 유지되는 것은 겨우살이 성분에 의한 효과 외에도 유산균에 의한 효과도 포함되는 것으로 생각되고 있다<sup>(3,14)</sup>.

한편 국내에서도 최근에 와서 겨우살이 추출물 및 그 활성성분에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다<sup>(15-21)</sup>. 이미 본 연구실에서는 한국산 겨우살이 추출물의 항종양 효과를 종양세포 비특이적 및 특이적인 관점에서 조사하였으며<sup>(15,20-22)</sup>, 그 활성 성분 중 하나는 한국산 특이적인 렉틴 성분이 관여됨을 보고 하였다<sup>(18)</sup>. 한국산 겨우살이 렉틴과 유럽산 렉틴의 차이점은 생화학적 측면에서 당특이성, 분자량, 렉틴의 N-말단을 구성하는 아미노산 배열 및 등전점이 서로 다르고, 활성면에서도 한국산 렉틴이 유럽산에 비하여 종양 세포에 대한 높은 *in vitro* 세포 특성 활성을 나타내었다.

본 연구는 이러한 연구결과<sup>(15,18-22)</sup>를 바탕으로 산업체에서 사용하는 여러 가지 유산균으로 발효시킨 한국산 겨우살이 추출물 분획이 항암활성을 가지는 기능성 재료로서의 응용가능성을 검토하기 위하여, *in vitro*에서의 종양세포에 대한 세포독성 효과, macrophage로부터 cytokine의 유도능 및 경구투여등에 의한 *in vivo* 항종양 효과를 조사하였다.

### 겨우살이 추출 및 발효

본 실험에 사용한 겨우살이는 강원도 지방에서 참나무를 숙주로 하여 자라는 겨우살이로서 1월에 채취하였다. 실험에 사용된 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 가지의 끝에서 부터 두마디까지의 잎, 줄기 그리고 열매를 겨우살이로부터 절단하여 증류수로 충분히 세척 한후, 건조 시킨 다음 진공 포장하여 추출시까지 -80°C에서 보관하였다. 동결된 겨우살이 잎과 줄기를 세절하여 이온교환수지를 통과한 증류수를 첨가하고, 믹서기로 2분간 분쇄하여 4°C에서 16시간 교반하였다. 그 후, 원심분리(10,000 rpm, 30 min, 4°C)하여 얻은 상등액을 pore size가 다른 membrane filter에 의해 순차적으로 여과한 후(7.2, 0.45, 0.22 μm), 내액을 동결 건조시켜 갈색의 분말(KM-110)을 얻었다. 유산균에 의한 KM-110의 발효는 한국 야쿠르트 유업(주)의 중앙연구소로부터 분양 받은 여러 가지 유산균주를 이용하여 상법으로 실시하였다<sup>(19)</sup>. 약술하면, Chr. Hansen's VEGE-START 10, Marshall *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus-KR2*, *Lactobacillus-KR1*를 1%가 되도록 20 mg/mL의 KM-110에 접종하고 30°C에서 1일, 2일 그리고 3일간 배양 후 동결건조(FKM-110)하였다. 이 동결 건조물은 PBS로서 10 mg/mL의 농도로 조정하여 stock solution으로 만든 후, -20°C에 저장하면서 실험에 사용하였다.

### 실험동물

본 실험에 사용된 동물인 Balb/c 및 C57BL/6 (female, 6주령) 마우스는 Shizuoka Laboratory Animal Center (Hamamatsu, Japan)에서 구입하였으며, specific-pathogen-free (SPF)의 조건에서 사육하였다. 사료는 마우스용 실험동물 고형사료(Nihon Nosan Kogyo, Co. Ltd., Yokohama, Japan)을 구입하였고, 음수는 상수도물을 여과시키고 autoclave로 멸균(121°C, 20분)하여 자유 급식 시켰다.

### 시약 및 세포배양

본 실험에 사용된 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium (EMEM), fetal bovine serum (FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco사에서, [<sup>3</sup>H]-thymidine ([<sup>3</sup>H]-TdR, specific activity 23 μCi/mmol)는 Amersham사에서 구입하였다.

### 공시 종양세포

실험에 사용된 고전이성 종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 B16-BL6 melanoma는 북해도 대학 면역과학연구소에서 기증 받아 사용하였고, 각 세포주의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를 이용하였다. 그리고 마우스 복강으로부터 수집된 macrophages의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지로 배양하였다. 각 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C (100% humidity)의 조건하에서 실시하였다.

### In vitro 항암성 조사

FKM-110의 종양세포에 대한 세포독성 효과를 조사하기 위하여 colon26-M3.1 lung carcinoma 세포주를 1×10<sup>6</sup>/100 mL의 밀도로 조정하여 각 well에 100 µL씩 취하였다. 그 후, 각 well에 KM-110 및 FKM-110의 최고 농도 500 µg/mL부터 희석하여 각 well에 100 µL를 첨가한 후, 37°C (5% CO<sub>2</sub>)에서 3일간 배양하였다. 배양종료 6시간 전에 0.5 µCi/50 µL의 [<sup>3</sup>H]-TdR을 넣고 배양한 후, 생존한 세포가 흡수한 [<sup>3</sup>H]-TdR (Filtermate 196; Packard Instrument Company, Meriden, CT)의 양을 Matrix 96 direct betacounter (Packard Instrument Company)로 측정하였다.

### Macrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

Balb/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI 1640 배지 10 mL을 주입하고 복벽을 가볍게 두드려 복강내 세포를 잘 섞이게 한 후 복강내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수확한 PEC을 24 well culture plate에 1.5×10<sup>6</sup>/well의 농도로 조정하여 plating 하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후, 적정농도로 조정된 KM-110 및 FKM-110을 첨가하여 24시간 동안 macrophage를 자극하였다. Macrophage 배양 상등액에 유도 분비된 IL-1 및 IFN-γ 등의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit (Endogen)을 구입하여 조사하였다.

### In vivo 종양전이 모델

시료의 항종양 효과는 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 B16-BL6 melanoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다. 각 세포주의 종양전이를 위한 실험동물로 각각 Balb/c, C57BL/6 마우스를 사용하였으며, in vitro에서 배양된 종양세포주의 접종(inoculation)은

정맥주사(intravenously; i.v.)하였다<sup>(20)</sup>. 시험물질에 의한 종양의 전이억제 효과의 조사는 group당 5마리의 마우스에 여러 농도의 KM-110 또는 FKM-110을 종양접종 -2일 부터 5일 사이에 정맥 및 경구(orally; p.o.) 투여 하였다. 전이된 종양의 판정은 종양접종 14일 후에 마우스를 희생시켜 종양의 표적기관인 폐를 적출 후 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정 후, 종양의 군집수를 셈하였고, 시료에 의한 항종양전이 효과는 종양만 접종한 시료 무처리의 대조군과 비교함으로써 조사하였다. B16-BL6 melanoma에 의한 종양의 자연전이 모델은 배양된 종양세포를 발바닥에 피하주사(subcutaneously; s.c.)하고 21일 후에 종양의 원발소를 수술적으로 제거하였다. 종양 원발소 제거 14일 후 실험동물 전이모델과 같은 방법으로 폐에 전이된 종양의 수를 조사하였다<sup>(22)</sup>.

### ELISA

표준곡선작성을 위해 사용된 KML-U는 KML-U에 특이성을 갖는 단일 크론 항체를 이용한 immunoaffinity column을 이용하여<sup>(18,24)</sup> KML-110으로부터 분리된 것이었다. 각 시료 중에 함유된 KML-U의 정량은 본 연구실에서 개발된 ELISA법으로 조사하였다<sup>(24)</sup>.

### 통계처리

그룹들간의 통계적 유의성은 Student's two-tail *t* test 로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

유산균에 의하여 발효된 겨우살이(KM-110)의 in vitro 항암성 조사

여러 가지의 유산균주로 발효된 FKM-110 중에서 발효에 의하여 암세포에 대한 세포독성 효과가 감소된 경우는 발효균주 *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus-KR2*, *Lactobacillus-KR1*의 경우이었고, *Lactobacillus plantarum*의 경우는 발효 72시간에 약간 감소된 결과를 나타내었다. 그러나 그 외의 경우에 있어서는 발효에 의한 세포독성의 감소현상이 나타나지 않았기에 발효에 의한 KM-110의 종양세포에 대한 세포독성은 유산균 발효균주 특이성이 있는 것으로 사료되었다(Fig. 1). 세포독성 결과만으로는 KM-110의 세포독성 감소효과의 원인을 정확하게 설명할 수는 없지만, 최소한 KM-110의 세포독성 활성물질을 이들 발효균주가 배지로 이용하였거나, 세포독성을 가지는 물질에 어떠한 변화를 주는 것으로 생각되었다. 이전의 보고

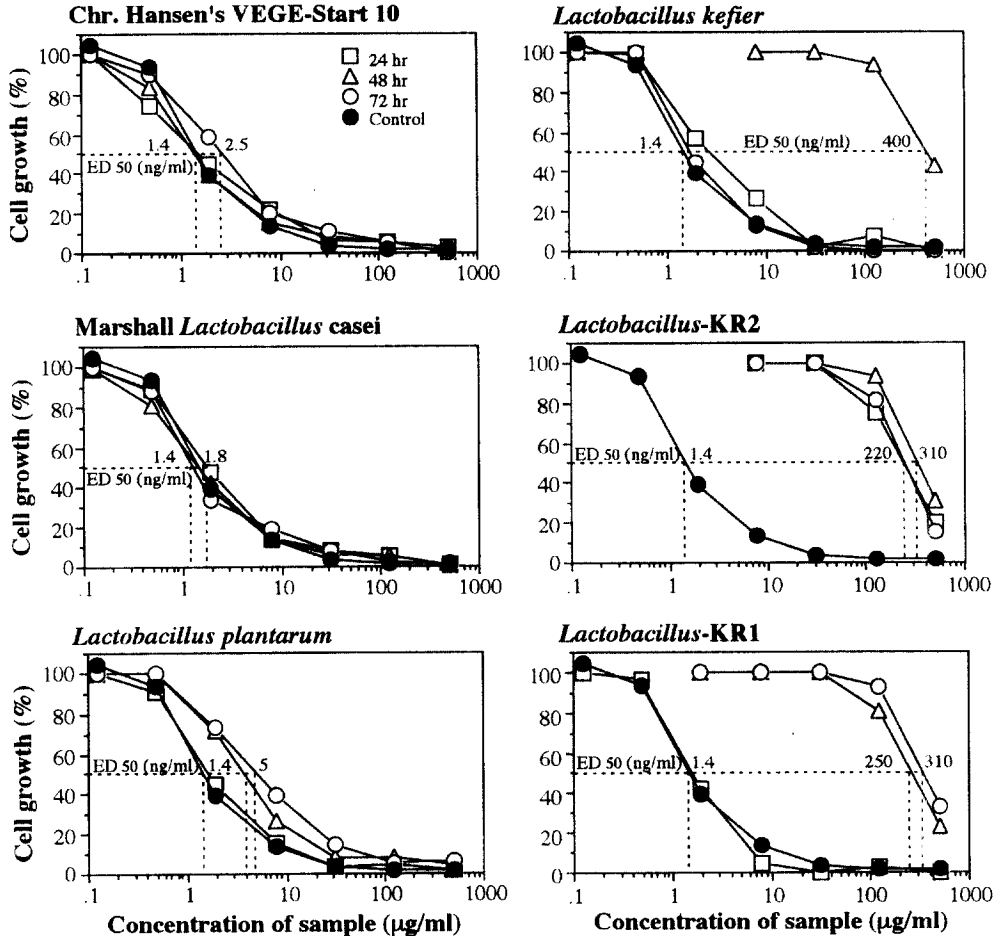


Fig. 1. Effect of various lactobacillus used for the fermentation of KM-110 on the cytotoxicity of FKM-110 to colon 26-M3.1 cells.

에서 *Lactobacillus*에 의한 발효 결과 종양 세포에 대한 세포독성 효과는 실험자에 의하여 상당한 차이를 보여 주었으며, 그 차이는 사용한 발효균주간의 차이에 의한 것으로 보여지는 바<sup>(14,19)</sup>, 겨우살이의 세포독성 효과와 선택되는 발효균주간에는 발효균주가 겨우살이의 세포독성 관련물질의 구조변화나, 분해에 의한 불활성화등 어떠한 관련성이 있을 것으로 사료되었다<sup>(3,7,14)</sup>. 현재 유럽에서 시판되고 있는 유산균 발효 겨우살이 주사제인 Iscador는 주로 *Lactobacillus plantarum*으로 발효시키는 것으로 알려져 있는데, 특히 Molt 4 (human leukemia) 및 HTC (rat hepatoma tissue culture) 세포주에 대한 세포독성 효과가 감소 되었으며 그 원인을 조사한 결과 렉틴성분의 함량이 발효되지 않은 겨우살이 추출물에 비하여 약 10배 정도 감소된 것으로 보고된 바 있다<sup>(14)</sup>. 본 실험에서 동일한 발효균주로

72시간 발효시킨 경우 colon26-M3.1세포주에 대한 세포독성 효과가 KM-110에 비하여 3배이상 감소된 결과를 보여 동일한 경향을 나타내었다. 이전의 결과에서 한국산 겨우살이 추출물 혹은 발효 분획은 면역담당세포(thymocytes, lymphocytes) 또는 비 종양성 세포주(non-tumorigenic normal 3T3 cell)에 대해서 독성을 나타내지 않는 농도에서는 림프구자극 활성 또는 세포의 증식활성이 있는 것으로 보고하였다<sup>(16,19)</sup>. 특히 KM-110 혹은 렉틴이 투여된 마우스의 비장 및 흉선 세포는 *in vitro* mitogen에 대한 높은 반응성을 보임으로서, 외부로부터 항원에 노출될 경우 효과적인 면역반응을 위한 작동세포의 활성화가 유도된다고 하였다<sup>(24)</sup>. 따라서 발효와 세포독성간의 관계는 *in vitro*에서의 1차적인 세포독성보다는 *in vivo*에서의 2차적인 면역계에 미치는 활성화에 주목해야 할 것으로 사료된다<sup>(14,16,24)</sup>.

겨우살이가 첨가된 유산균 발효유의 KML-U의 함량 측정

유산균으로 발효된 겨우살이 추출물 중 렉틴 함량의 측정을 기 보고된 방법<sup>(24)</sup>으로 수행하였다. 분석결과 10 mg의 KM-110에는 510 ng의 KML-U가 존재하는 것으로 나타났고 발효 후의 분획물인 FKM-110의 렉틴 함량도 같은 요령으로 측정하여 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

이상의 결과에 나타나 있듯이 Chr. Hansen's VEGE-Star. 10, Marshall *Lactobacillus casei*와 같은 발효균주는 KML-U의 함량에 어떠한 변화를 야기하지 않았으며, *Lactobacillus-plantarum* 및 *Lactobacillus-KR2*의 경우는 발효 24시간부터 KML-U의 함량이 약 50% 혹은 그 이하로 감소되었고, *Lactobacillus-KR1*의 경우는

발효 48시간 이후부터 급격한 KML-U의 함량감소를 나타내어 발효 72시간 후 KML-U의 함량은 발효전과 비교하여 14배이상 적게 함유된 결과를 나타내었다. *Lactobacillus kefir*에 의한 발효결과는 특이한 형태를 보여주었는데 발효개시 24시간까지는 유의한 렉틴의 감소현상이 나타나지 않았다. 그러나 발효가 진행되면서 48시간의 발효 결과 5배 이상 감소하였고, 그 후 72시간의 발효결과 다시 증가된 현상이 나타났다. 이 현상은 박과 김<sup>(17)</sup>이 보고한 결과와 유사한 결과로서 그 기전에 대하여는 설명하기 힘들었다.

이 결과에서, KM-110 및 FKM-110의 세포독성 효과는 대부분 KML-U의 함량과 비례하는 경향을 나타내었기에 KM-110 및 FKM-110에서 주된 세포독성 효과를 나타내는 물질은 렉틴 성분으로 사료되었다<sup>(18)</sup>.

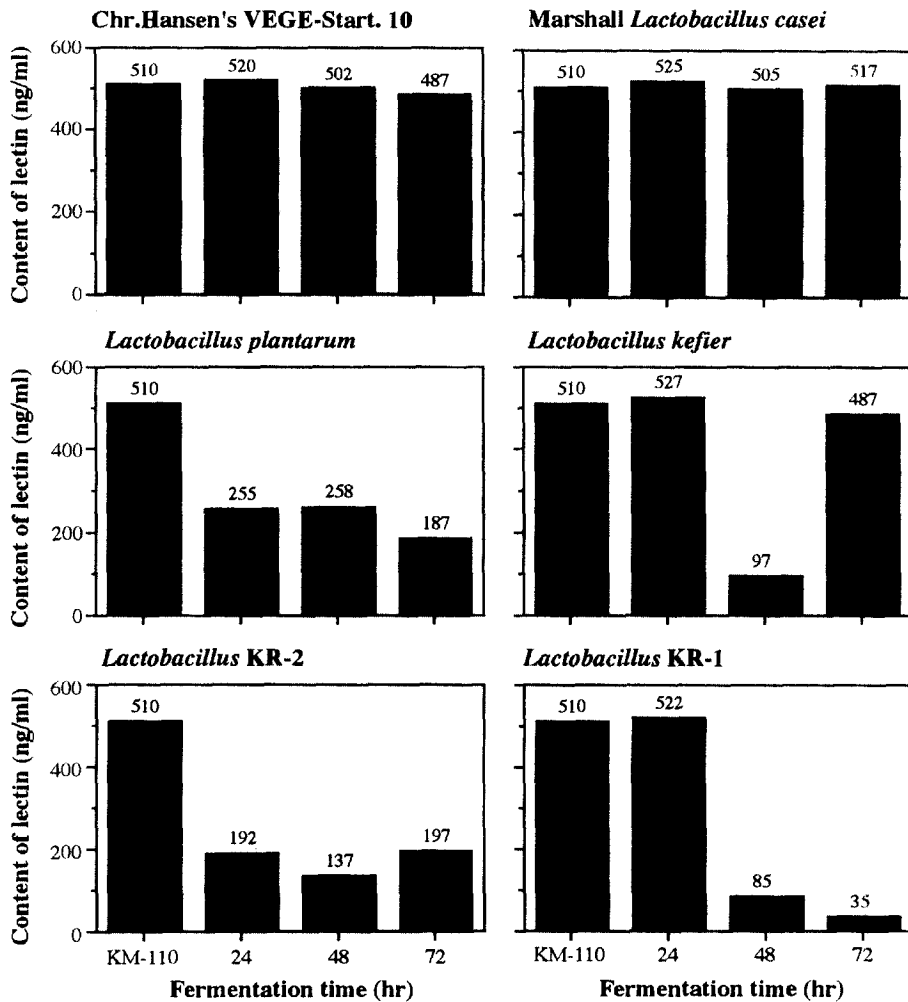


Fig. 2. Concentration in of lectin, KML-U in FKM-110 determined by sandwich ELISA.

이 결과를 종합하여 고찰하면, 일부의 유산균은 KM-110 중의 락틴 물질을 분해하고, 특히 항원결정기와 관련된 부위의 구조적 변화를 야기하여 항체와의 반응성을 감소 또는 상실시키는 활성을 가지는 것으로 사료되었다<sup>(6,7,14)</sup>. 그러나 일부의 유산균은 발효 후에도 락틴의 함량에는 어떠한 변화를 나타내지 못하여 비록 이들이 락틴 물질을 배지로 이용한다 하더라도 락틴의 항원 결정기 혹은 독성을 나타내게 하는 활성부 위에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다. 이러한 유산균주에 따른 세포독성 효과의 차이 또는 락틴 성분 변화 등의 기전에 관한 이해는 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

FKM-110의 cytokine 유도능

KM-110의 macrophage 자극활성에 의한 cytokines의 유도능 및 세포독성 효과는 이미 확인되었다<sup>(15,22)</sup>. 본 연구에서는 KM-110을 유산균으로 발효시킨 FKM-110의 macrophage 자극효과를 cytokine 유도능으로 발효되지 않은 KM-110과 비교하였으며, 조사된 cytokines는 IL-1과 IFN- $\gamma$ 이었다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 Marshall *Lactobacillus casei*로 발효된 FKM-110은 KM-110에 비하여 우수한 IL-1의 유도분비 활성을 나타냈으며 *Lactobacillus kefir*의 경우는 발효

24-48시간까지는 유효한 IL-1의 유도능이 없었고 72시간의 발효에서 KM-110의 경우에 비하여 우수한 IL-1의 유도능을 나타내어 이 경우에는 IL-1의 유도와 KML-U의 함량과 비례하는 결과를 나타내었다. 그리고 *Lactobacillus*-KR1 및 *Lactobacillus*-KR2로 발효된 FKM-110의 경우는 KM-110과 유사한 IL-1의 유도능을 나타내었다. 한편, 각 시료에 의한 IFN- $\gamma$  유도분비 양식은 IL-1의 유도활성과는 다른 양상을 나타냈다. 즉, 발효시간, 세포독성 효과 및 KML-U의 함량과 비례관계가 없는 분비유도활성을 나타내었다(Table 1). 유산균주 및 배양시간에 따라 복잡한 양상의 cytokine유도 활성이 나타난 것은 KM-110이 단일성분이 아니라 여러 물질로 구성되는 복합 물질이기 때문에 나타나는 현상으로 생각되었다. 다만 IL-1의 유도양식과 IFN- $\gamma$  유도양식에 차이가 있다는 것은 흥미로운 사실로서, 발효에 의하여 KM-110의 활성물질이 구조적으로 변화될 가능성이 있음을 시사하는 결과로 생각되었다. 즉, IL-1의 유도에 있어서 발효 후의 경우, KM-110에 비하여 우수한 유도양식을 나타낸 것은 발효균주로부터의 endotoxin 혹은 발효대사산물에 의한 상승효과에 기인되는 결과임을 배제할 수는 없었으나<sup>(6,7)</sup>, IL-1의 분비를 유도하는 물질은 KML-U가 주요 성분인 것으로 사료되었다. 반면, KM-110 혹은

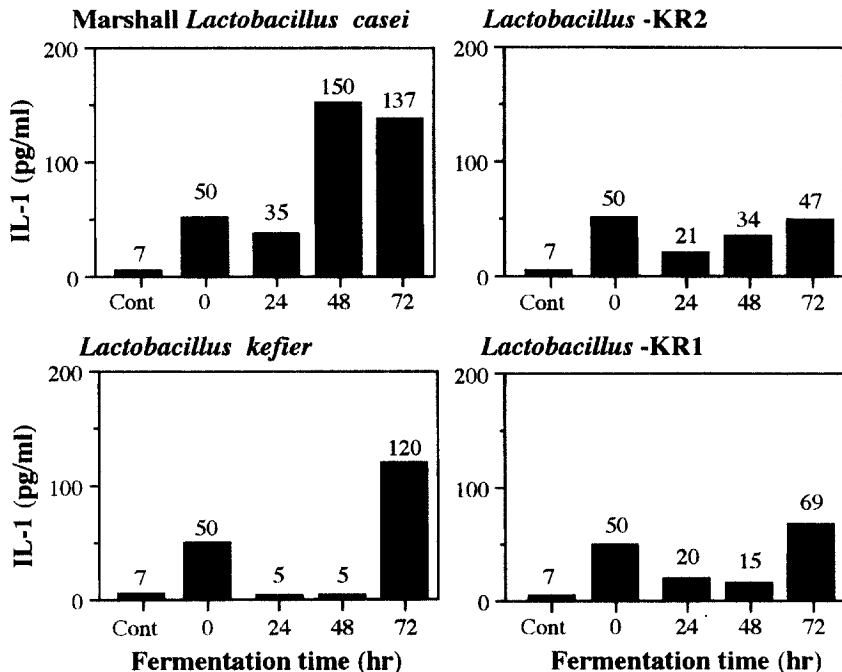


Fig. 3. Effect of KM-110 and FKM-110 on the induction of IL-1 from peritoneal macrophage stimulated with KM-110 and FKM-110.

**Table 1. Induction of IFN- $\gamma$  from macrophages by the stimulation with FKM-10**

Bacterium	Fermentation time; IFN- $\gamma$ (pg/mL)				
	Medium	KM-110	24 hr	48 hr	72 hr
Marshall <i>Lactobacillus casei</i>	3	510	44	45	51
<i>Lactobacillus jefier</i>	3	510	45	700	66
<i>Lactobacillus</i> -KR2	3	510	56	47	49
<i>Lactobacillus</i> -KR1	3	510	51	380	237

FKM-110에서 IFN- $\gamma$ 의 유도양식이 KML-U의 함량과 전혀 비례하지 않는 결과를 보임으로서 KML-U는 IFN- $\gamma$  inducer로의 활성은 가지지 않는 것으로 보였다. 따라서 앞으로 KM-110에서 macropage로부터 IL-1을 유도하는 물질을 렉틴 성분으로 이해할 때, 렉틴 성분의 발효에 의한 함량변화 및 발효에 의해 생성된 렉틴의 단편(fragment)에 의한 활성 분석 및 활성부위의 결정과 같은 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 사료되며, 동시에 IFN- $\gamma$ 의 유도분비와 관련이 있을 것으로 생각되는 렉틴 외의 성분에도 대해서도 심도있게 연구조사 되어야 할 것으로 생각되며 현재 연구 중에 있다.

#### 실험동물 전이모델에서의 항암효과 조사

발효된 겨우살이의 *in vivo* 항암효과의 조사는 colon26-M3.1 lung carcinoma 세포주를 이용한 실험동물 모델에서의 종양전이억제 효과와 B16-BL6 melanoma 세포주를 이용한 종양의 자연전이 모델을 이용하여 종양의 증식 및 전이에 미치는 효과를 조사하였다. 발효된 겨우살이의 선택은 *in vitro*에서의 세포독성 효과 및 cytokine의 유도능을 토대로하여 종양세포에 대한 세포독성 효과가 유지된 발효균주 Marshall *Lactobacillus casei*와 독성이 감소된 *Lactobacillus*-KR1 발효균주에 의하여 발효된 FKM-110을 이용하여 *in vivo* 항암효과를 조사하였다. *In vivo* 항암효과의 측정은 발효균주 Marshall *Lactobacillus casei* 및 *Lactobacillus*-KR1에 의하여 발효된 시료를 종양접종 2일전에 1회 혈관주사 후, 종양의 전이에 미치는 영향을 조사하였다. Table 2에 나타난 결과에서 보듯이 KM-110의 경우 78.2%의 종양전이 억제 효과를 나타냈고, Marshall *Lactobacillus casei*에 의하여 24, 48 및 72시간 발효된 분획(각각 M.L.casei-24, 48, 및 72)의 투여는 약 91~87%로서 KM-110보다 우수한 항종양 전이효과를 보였다. 그러나 *Lactobacillus*-KR1에 의하여 24, 48 및 72시간 발효된 분획(각각 L.-KR1-24, 48, 및 72)의 경우는 발효 초기인 24시간의 발효에서만 KM-110과 비슷한 81% 정도의 종양전이 억제효과를 보였을 뿐 그 이상시간 발효된 분획은 대조군에 비하여 약간의 종

**Table 2. Prophylactic effect of i.v. administration of KM-110 and FKM-110 on lung metastasis produced by colon 26-M3. in experimental metastasis model**

Samples	Dose of sample ( $\mu$ g/head)	No. of lung tumor
		Mean $\pm$ SD (Inhibition %)
Untreated (PBS)		55 $\pm$ 17
KM-110	100	12 $\pm$ 5 (78.2)*
M.L.casei-24	100	5 $\pm$ 3 (90.0)*
M.L.casei-48	100	6 $\pm$ 4 (89.1)*
M.L.casei-72	100	7 $\pm$ 3 (87.3)*
L.-KR1-24	100	10 $\pm$ 4 (81.0)*
L.-KR1-48	100	47 $\pm$ 17 (14.5)
L.-KR1-72	100	46 $\pm$ 6 (14.5)

\*p<0.001, compared with the control group (by Student's two-tailed *t* test).

양전이 억제효과를 나타내었으나 통계적인 유의성이 없어, 이들 분획에 의한 항종양 전이효과는 인정되지 않았다. 이러한 *in vivo* 항종양 활성은 FKM-110 각각에 존재하는 KML-U의 함량에 의존하는 것으로 나타나 KM-110 혹은 FKM-110에서의 항종양 활성을 나타내는 주된 물질은 렉틴 성분 중의 하나인 KML-U인 것으로 사료되었다.<sup>(18,20,24)</sup>

#### 종양의 자연전이모델에서의 항암효과 조사

B16-BL6 melanoma 세포주에 의한 종양의 증식 및 전이에 미치는 KM-110 및 Marshall *Lactobacillus casei* (M.L.casei)과 *Lactobacillus*-KR1 (L.-KR1) 발효균주로 24시간 동안 발효된 FKM-110의 효과를 조사하였다. 종양의 증식은 종양을 이식시킨 부위(종양의 원발소)의 크기 및 부피를 측정하였으며, 이식 21일 후 종양의 원발소를 제거하고 원발소로부터 종양의 목표 기관인 폐(lung)로 전이한 종양의 colony수를 측정함으로써 조사하였다. 시료의 투여는 종양의 이식 5, 8, 11, 14, 17, 22, 25, 28, 31일 후에 총 9회 정맥투여 하였다. Table 3의 결과에 나타난 바와 같이 종양 원발소의 성장은 KM-110 및 M.L.casei 혹은 L.-KR1에 의한 발효 분획등 모든 경우에서 대조군에 비하여 통계적으로

**Table 3. Therapeutic effect of multiple administration of FKM-110 on lung metastasis produced by B16-BL6 melanoma cells in spontaneous model**

Treatment (µg/head)	Size of primary tumor (mm) (mean ± SD)	Volumn of primary tumor (mm <sup>3</sup> ) (mean ± SD)	No. of lung tumor
			Mean ± SD (Inhibition %)
Control	11.8 ± 0.9	980.4 ± 253.2	72 ± 38
KM-110 (100)	8.9 ± 1.0	427.9 ± 150.5***	34 ± 18* (52.8)
M.L. casei (100)	8.1 ± 0.6	268.8 ± 127.6***	23 ± 6** (68.1)
L.-KR1 (100)	8.6 ± 0.9	348.9 ± 160.0***	64 ± 49

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.01, compared with the control group (by Student's two-tailed t test)

유의한 억제효과를 나타내었다. 특히 종양의 부피를 측정된 결과 대조군에 비하여 KM-110은 56%, M.L. casei은 72%, L.-KR1은 64% 이상의 종양증식 억제효과를 나타내었다. 그러나 최종적으로 목표기관인 폐에 전이된 종양의 colony 수를 조사한 결과 L.-KR1의 경우는 종양의 자연전이 모델에서의 종양전이 억제효과는 인정되지 않았으며, KM-110 및 M.L.casei에 의한 발효 분획등 두 시료만이 종양의 전이를 유의하게 억제하였고, 그 억제 효과는 M.L. casei에 의한 발효 분획(약 68%)의 경우가 KM-110 (약 58%)에 비하여 우수한 결과를 나타냈고, 종양의 예방뿐 아니라 치료적인 효과도 있는 것으로 사료되었으며<sup>(22)</sup>, 두 물질의 항암 활성은 Table 2의 결과와 일치하는 경향을 나타냈다.

유산균으로 발효시킨 겨우살이 첨가 유제품의 실험동물 전이모델에서의 항종양 효과

발효된 겨우살이를 기능성 식품으로 개발할 경우, 발효 유제품인 야쿠르트류가 가장 적합한 대상이 될 것으로 생각되기에 FKM-110의 경구투여에 의한 종양전이억제효과를 조사하였다. Table 4의 결과에 나타낸 바와 같이 Marshall *Lactobacillus casei*에 의하여 24시간 및 72시간 발효된 분획(각각 M.L.casei-24 및 M.L. casei-72)의 경구투여는 colon26-M3.1 lung carcinoma 세포주에 의한 종양의 전이를 각각 60% 및 55% 정도 억제하여 대조군인 KM-110의 45%의 전이 억제효과보다 우수한 성적을 나타냈다. 이는 Table 2 및 3의 결과와 유사한 경향으로서 KM-110에 비하여 항암활성이 우수한 것으로 보였다. 또한, 경구투여에 의한 숙주의 방어능 증진 그리고 이에 의한 종양의 예방효과가 인정되는 바 유산균으로 발효된 겨우살이를 이용한 기능성식품으로 개발할 수 있는 가능성이 충분히 있을 것으로 사료되어, 탈지유를 Marshall *Lactobacillus casei*균주로 발효시킨 야쿠르트(Skim casei)를 대조군으로 탈지유에 KM-110을 혼합 후 Marshall *Lactobacillus casei* 발효균주로 발효시킨 분획(Skim casei+KM-110)

**Table 4. Prophylactic effect of oral administration of KM-110 and its fermented preparations on lung metastasis produced by colon 26-M3.1 in experimental model**

Sample	KM-110 (mg/head)	No. of lung tumor
		Mean ± SD (Inhibition %)
Untreated (PBS)		60 ± 6
KM-110	1	33 ± 6 (45.0)*
M. L. casei-24	1	24 ± 5 (60.0)*
M. L. casei-72	1	27 ± 15 (55.0)*
Skim-casei		54 ± 8
Skim-casei+KM-110	1	19 ± 8 (68.3)*

\*p<0.01, compared with the control group (by Student's two-tailed t test)

의 경구투여에 의한 종양전이 억제효과를 조사 하였다. 탈지유를 Marshall *Lactobacillus casei*로 발효시킨 대조군에서는 종양의 군집수가 45-59개를 나타냄으로서 종양대조군(종양의 군집수;54-69)과 비교하여 10% 정도의 전이된 종양의 수가 축소된 결과를 보였으나 통계적 유의성이 없었고, Skim casei+KM-110 경우에는 68.3%의 종양전이 억제효과가 인정되었다. 이 결과는 동량의 KM-110 단독투여에 의한 45%의 항종양 전이효과에 비하여 우수한 활성이 인정됨으로서 유산균 발효에 의한 KM-110을 이용한 기능성식품으로의 개발 가능성을 강하게 시사하였다.

Marshall *Lactobacillus casei* 균주에 의하여 발효된 FKM-110의 경우는 *in vitro*에서 종양세포에 대한 직접적인 세포독성 효과는 KM-110과 유사한 활성을 나타내었었고, KML-U의 함량도 유사한 결과를 보였으나, *in vivo*에서 KM-110에 비하여 우수한 항종양 효과를 나타낸 것은 유산균 발효에 의하여 유도된 KM-110의 발효산물 및 발효균자체가 macrophage의 활성화 등과 같은 면역자극활성을 상승시키는 효과에 의한 결과로 생각된다<sup>(3,7,14)</sup>. 따라서 본 연구의 결과는 KM-110의 *in vivo* 독성 실험이 선행된다면 유산균으로 발효시킨 분획의 항종양 활성을 가지는 기능성 식품으로서의 응용 가능성을 제시할 수 있는 근거가 될 수



있다고 생각한다. 앞으로 유산균 발효에 의한 KM-110의 항종양 활성 및 면역자극 상승효과에 대한 구체적인 기전을 규명하기 위하여 KM-110의 발효전후 활성물질의 탐색 및 활성물질의 구조적변화에 관하여 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 경구 투여시 어떻게 항암활성 및 면역기능을 증진시킬 수 있는가에 대한 기전도 연구되어야 할 과제라 생각된다.

## 요 약

한국산 겨우살이 추출물(KM-110)이 면역학적 활성 및 항암효과를 갖고 있으며 그 주성분은 렉틴이라는 사실은 이미 밝혀져 있다. 이에 기초하여 본 연구는 KM-110을 이용하여 항암효과를 가지는 기능성식품의 개발을 위한 기초연구로서 KM-110을 유산균으로 발효시킨 물질(FKM-110)의 항암 및 면역자극효과를 조사하였다. FKM-110의 렉틴함량은 발효시킨 유산균주 및 발효시간에 따라 다양한 변화를 나타냈고, 종양 세포에 대한 세포독성 효과의 측정 결과, 그 활성은 FKM-110에 존재하는 렉틴 성분인 KML-U의 함량과 비례하였다. FKM-110의 면역 자극 효과를 macrophage로부터 IL-1 및 IFN- $\gamma$ 와 같은 cytokine의 유도분비능으로 조사한 결과, IL-1의 유도 분비능은 렉틴함량에 비례하였으나, IFN- $\gamma$ 의 경우는 렉틴함량과 무관한 결과를 나타내어 KM-110 혹은 FKM-110에서 IFN- $\gamma$ 의 유도물질은 렉틴성분이 아님을 강하게 시사하였다. 여러 가지 유산균으로 발효된 분획의 미정맥투여에 의한 in vivo 항종양 활성을 마우스를 이용한 종양전이 모델에서 조사한 결과 Marshall Lactobacillus casei로 발효된 FKM-110이 가장 우수한 항종양 활성을 나타냈다. 이 결과를 근거로 기능성 식품으로 응용가능성을 조사하고자 Skim milk에 KM-110을 혼합후 Marshall Lactobacillus casei로 발효시킨 요쿠르트를 경구투여한 결과 대조군에 비하여 약 68%의 항종양 활성을 보여 KM-110 단독의 경구투여에 의한 항종양 활성(45%)보다 우수한 성적을 나타냈고, 그 이유는 발효 유산균 혹은 그 대사산물에 기인되는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 98년도 건국대학교 동물자원 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금 및 98년도 보건과학기술 연구개발사업의 지원에 의한 것입니다.

## 문 헌

1. Bussing, A.: Mistletoe: a stroy with an open end. *Anti-Cancer Drug*, **8** (suppl 1), s1-s2 (1997)
2. Rentea, R., Lyon, E. and Hunter, R.: Biologic properties of Iscador: A *Viscum album* preparation: I. Hyperplasia of thr thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. *Lab. Invest.* **44**, 43-48 (1981)
3. Bloksma, N., Dijk, H.V., Korst, P. and Willers, J.M.: Cellular and humoral adjuvant activity of mistletoe extract. *Immunobiology*, **156**, 309-319 (1979)
4. Kuttan, G., Vasudevan, D.M. and Kuttan, R.: Isolation and identification of a tumor reducing component from mistletoe extract (Iscador). *Cancer Lett.*, **41**, 307-314 (1988)
5. Gabius, S., Joshi, S.S., Kayser, K. and Gabius, H.-J.: The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier. (review) *Int. J. Oncology*, **1**, 705-708 (1988)
6. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H.J.: Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclearcells exposed to  $\beta$ -galactoside lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.*, **50**, 3322-3326 (1990)
7. Bloksma, N., Schmiermann, P., de Reuver, M., Dijk, H. V. and Willers, J.M.: Stimulation of humoral and cellular immunity by *Viscum* preparations. *J. Med. Plant Res.*, **46**, 2-8 (1982)
8. Fischer, S., Scheffler, A. and Kabelitz, D.: Stimulation of the specific immune system by mistletoe extracts. *Anti-Cancer Drugs*, **8** (Suppl. 1), s33-s37 (1997)
9. Holtskog, R., Sand, K., and Olsnes, S.: Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. *Oncology* **45**, 172-179 (1988)
10. Hajto, T.: Immunomodulatory effects of Iscador: a *Viscum album* preparation. *Oncology*, **43** (suppl. 1), 51-65 (1986)
11. Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H.-J.: Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defence system *in vitro*, in rabbits and patients. *Cancer Res.*, **49**, 4803-4808 (1989)
12. Doser, C., Doser, M., Hulsen, H. and Mechelke, F.: Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneim.-Forsch. /Drug Res.*, **39**, 647-651 (1989)
13. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M.-L., Poindron, P. and Anton, R.: Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.*, **109**, 33-38 (1996)
14. Gilles, R.G., Jung, M.L., Dominique, D.S. and Beck, J.P.: Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology*, **43** (suppl. 1), 35-41 (1986)
15. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Hong, E.K., Cho, Y.H., LeSe, S. W., Azuma, I., Yoo, B.L. and Kim, J.B.: Effect of Korean mistletoe extracts on the induction of IL-1 and TNF- $\alpha$  from mouse macrophage (in Korean). *Korean J.*

- Pharmacog.*, **25**, 132-139 (1994)
16. Park, W-B and Kim, H-S.: Isolation and characterization of lectin from *Viscum coloratum* (in Korean). *Yakhak Hoej*, **38**, 418-424 (1994)
  17. Park, W-B and Kim, H-S.: Changes of lectin from *Viscum coloratum* by fermentation with *Lactobacillus plantarum* (Isolation and Purification) (in Korean). *Yakhak Hoej*, **38**, 687-695 (1994)
  18. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Shimazaki, K.I., Song, S.K., Lee, K.H., Kim, S.H., Park, C.H., Azuma, I. and Kim, J.B.: Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* (1999, in printing)
  19. Park, J-H., Hyun, C.K., Shin, H-K. and Yeo, I-H.: Effect of heat treatment, sugar addition and fermentation on cytotoxicity of Korean mistletoe (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 362-368 (1997)
  20. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Baek, Y.J., Huh, C. S., Song, S.K., Lee, K.H., Azuma, I. and Kim, J.B.: Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int. J. Immunopharmac.*, **20**, 163-172 (1998)
  21. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Do, M-S., Suh, B.S., Azuma, I. and Kim, J.B.: Immunological activities of Korean mistletoe extract (*Viscum album coloratum*: KM-110) (in Korean). *Korean J. Immunol.* **19**, 571-581 (1997)
  22. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Choi, O.B., Do, M-S., Kang, T. B., Lee, S.W., Azuma, I., and Kim, J.B.: Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of *haematogenous and non-haematogenous* tumor cells in mice. *Cancer Lett.*, **97**, 83-91 (1995)
  23. Jaggy, C. Musielski, H., Urech, K. and Schaller, G.: Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* **45**, 905-909 (1995)
  24. Yoon T.J.: Studies on the biological activities of lectin purified from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extracts and its characterization. Ph.D thesis, college of animal husbandry, Kon-Kuk University, Seoul, Korea. (1998)

---

(1998년 12월 23일 접수)