

별불가사리 (*Asterina pectinifera*) 렉틴의 사이토카인 생성 양상

진경희* · 최수정 · 정시련*

영남대학교 이과대학, *영남대학교 약학대학

(Received May 25, 1999)

Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on Cytokine Production

Kyung-Hee Jeune, Soo-Jeong Choi and See-Ryun Chung*

College of Science and *College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — The purpose of this study is to define whether *Asterina pectinifera* Lectin (APL) is effective on the cytokine production. Isolated mRNA from hPBMC (human peripheral blood mononuclear cells) stimulated with APL for various reaction times (1 to 96 hours) was detected by RT-PCR. The intensity of band for IL-1 and IFN γ mRNA was markedly increased at 1 hour, and IL-2 mRNA was strongly expressed at 4 hours. The mRNA band of APL-induced IL-2 and IFN γ was weaker than that of IL-1, IL-6 and TNF α . The mRNA expression of 4 cytokines (IL-1, IL-2, IFN γ and TNF α) was detected up to 48 hours, and that of IL-6 was detected until 72 hours. ELISA was used to look protein secretion of the cytokine gene with IL-1, IL-2 and TNF α expressed strongly in RT-PCR. The highest protein secretion was at 4 hours with IL-1, at 8 hours with IL-2 and at 4 hours with TNF α . These results suggest that APL can induce the production of some cytokines and the immune response from PBMC was done within the first few hours of stimulation with APL.

Keywords □ lectin, *Asterina pectinifera*, starfish, cytokine, PBMC.

천연물에서 분리, 정제되는 생리활성 물질로서 phytoagglutinin, phytohemagglutinin 등으로 불리우는 렉틴(lectins)은 항원-항체 반응과 유사한 방식으로 단당류 및 다당류와 결합하여 적혈구세포 뿐만 아니라 림프구, 박테리아, 바이러스 등 세포들을 응집시키는 것으로 처음에는 주로 식물을 대상으로 하였으나 오늘날에는 미생물, 척추동물, 무척추동물등 광범위하게 연구되고 있다.^{1,2)}

면역계를 가지지 않는 무척추동물체는 척추동물의 immunoglobulin과는 전혀 다른 형태의 인식분자인 렉틴이나 옵소닌(opsonin) 등을 가진 것으로 밝혀지고 있는바 이는 생체 내에 침입하는 이물질을 제거하는 생체 반응 기전에 관여하는 것으로 알려져 있으며 또

한 적혈구 응집력을 나타내고 항세균 작용, 옴소닌 효과 등을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.^{3,6)} 특히 렉틴은 영양물질 수송 및 저장, 해수에 용존하는 미량 원소나 효소, 당단백질의 흡착, Ca²⁺ 수송과 저장, 척추동물의 immunoglobulin과 유사한 자기방어 수단으로서의 작용을 지닌다.⁷⁾

해양 무척추동물로부터 최근에 생리활성, 약리활성, 세포독성이나 항종양활성 등의 새로운 물질이 발견되고 있다. 각종 해양생물들 중 별불가사리(*Asterina pectinifera*)를 포함한 극피동물은 세포 독성이 강하여 새로운 생물활성 물질 탐색에 유망한 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ 한편 지금까지 연구된 해양 무척추동물 렉틴에는 shellfish *Saxidomus purpuratus*,⁹⁾ acorn barnacle *Megabalanus volcano*,¹⁰⁾ starfish *Asterina pectinifera*¹¹⁾ 등에 대한 연구가 있는바 렉틴은 대부분 혈림프(hemolymph) 및 생식기관에서 발견되었다. 이 중

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2375 (팩스) 053-815-3061

에서도 별불가사리 렉틴은 사람 림프구에 대해 훌륭한 마이토젠(mitogen)으로 작용하며, HeLa cell, L929 및 L1210 등의 암세포에 대한 응집효과¹¹⁾와 복수암(ascitic tumor)에 대한 항암효과를 나타낸다.¹²⁾

렉틴이 지니는 역할 중에서도 면역학적, 생물화학적 측면에서 중요시되고 있는 특성으로는 종양 세포의 선택적 응집 능력, 사람의 혈액에 대한 특이성, 휴지기 상태의 림프구를 자극 분열시키는 마이토젠의 능력 등을 들 수 있다.²⁾

렉틴이 마이토젠으로 작용할 때 분비되는 사이토카인은 혈구세포에서 분비되는 가용성 단백질로서 외부 항원, 세포 손상 등에 의해서도 분비가 된다. 이는 자연 면역과 특이 면역의 활성화 단계에서 생성되며 면역 감염 반응을 증대하고, 표적 세포의 수용체와 결합함으로써 그 기능을 나타낸다. 사이토카인은 자극 받은 세포로부터 단시간에 mRNA 전사를 거쳐 합성이 끝나면 금방 분비되고, 사이토카인에 대한 세포성 반응은 수 시간에 걸쳐 일어나며 새로운 mRNA와 단백질 합성을 필요로 한다는 특성을 지닌다. 이와 더불어 많은 표적세포에 있어 사이토카인이 세포분열의 조절자로 작용한다는 사실과^{13,14)} 한 종의 사이토카인이 다른 사이토카인의 합성에 영향을 주는 인자로 작용할 수 있으며, 다른 사이토카인의 기능에도 영향을 주어 상승작용, 길항작용이 가능하다는 점이 주목할만하다.

본 연구에서는 이미 우리가 별불가사리로부터 분리 정제하여 그 특성과 수종의 암세포성장저해효과¹¹⁾ 및 복수암에 대한 항암효과¹²⁾를 밝혀 발표한바 있는 렉틴 APL을 이용하여 사람의 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 RT-PCR로 확인하고자 하였다. 이후 사이토카인 생성 유무를 ELISA로 측정한 뒤 유전자 발현과 생성간의 상관 관계를 조사하였으며, 이 결과를 토대로 별불가사리 렉틴의 면역조정제로서의 가능성을 더욱 밝히고자 하였다.

실험방법

렉틴 APL의 분리정제 - 별불가사리 렉틴 APL은 이미 보고한 전보의 방법으로 정제하여 실험에 이용하였다.^{11,12)}

PBMC의 분리 및 전처리 - 건강한 성인 2인 이상의 혈액을 heparin 처리(5~10 IU/ml)하여 채혈한 후

동량의 생리 식염수로 희석하고 이를 Ficoll-paque (Pharmacia Biotech, Sweden)에 2~3배의 양으로 중첩한 뒤 1,800 rpm으로 30분간 원심분리하였다. PBMC층을 조심스럽게 걷어내고 생리 식염수로 3번 세척하여 10% fetal bovine serum(FBS) (Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지 (Gibco, USA)에 부유시킨 후 1×10^6 cells/ml로 조정하였다.

APL 사용 농도 결정 - APL을 280 nm에서 흡광도(OD)가 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01인 6단계로 준비하였다. 24 well plate(flat bottom) (Costar, USA)에 1×10^6 cells/ml로 분주되어 있는 PBMC를 농도별 APL로 각 1시간과 20시간동안 자극시킨 후 세포들을 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하고 반응 적정 농도를 결정하였다.

APL 시간별 반응 - 24 well plate(flat bottom)에 1 ml의 PBMC를 분주하고 OD를 0.1로 준비한 APL을 각 well당 100 μ l씩 넣어 반응시키고 37°C의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 시간별 반응을 알아보기 위해 반응 시간을 1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간의 7 단계로 설정하고 각 시간별로 세포를 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하였다.

mRNA 분리 - 반응시킨 PBMC를 수거하여 16,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 세포를 취하고, 0.1% DEPC(Sigma, USA)가 첨가된 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척한 후 Ultraspec-II(Biotex, USA)를 1,000 μ l 넣어 골고루 현탁시켰다. 여기에 100 μ l의 chloroform을 첨가하고 15분간 얼음에 정치한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어준 후 -20°C에서 45분간 정치시켰다. 다시 원심분리한 후 RNA pellet는 75% ethanol로 세척하고 건조시킨 후 0.1% DEPC가 첨가된 증류수로 희석하여 260 nm와 280 nm의 흡광도로 RNA 순도를 검정하고 260 nm의 흡광도로 RNA를 정량하여 RT-PCR의 시료 농도(100 μ l/ml)로 조절하였다.¹⁵⁾

RT-PCR - 100 μ l/ml로 조정된 시료 mRNA층 3 μ l를 취하여 혼합된 mixture 17 μ l [MgCl₂ 4 μ l, 10 \times PCR bufferII 2 μ l, dNTP 8 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(M-MLVRT : RAV-2) 1 μ l, oligo[dT]16 1 μ l]에 넣었다. 여기에 수분 증발을 막기 위해 mineral oil을 50 μ l 넣고 42°C에서 15분 동안 반응시켜 상보 DNA를 합성하고 99°C에서 5분간,

5°C에서 5분간 반응시켜 역전사 효소를 불활성화 시키고 cDNA를 합성하였다.

PCR대상 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ , TNF α 로, house keeping gene으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였다. 이들의 primer는 20 μ M의 upstream, downstream을 각각 1 μ 씩 준비하여 MgCl $_2$ 4 μ l, 10 \times PCR bufferII 8 μ l, 증류수 65.5 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l가 혼합된 PCR master mixture에 넣었다. 합성된 cDNA에 해당 사이토카인 primer의 PCR master mixture를 80 μ 씩 넣고 thermal cycler(Perkin Elmer, USA)로 증합효소 연쇄 반응을 실시했다. 94°C에서 1분 동안 불활성화 단계, 60°C에서 1분 동안 결합 반응 단계, 72°C에서 1.5분 동안 핵산 증합 단계를 거치는 반응을 35회 실시하고 72°C에서 10분간 전체 핵산 증합 반응을 종결시켰다. GAPDH와 각 사이토카인의 primer는 연세대학교 의과대학 생화학교실 및 한국 생공에서 합성한 것으로 그 sequence는 다음과 같았다.

GAPDH (250 bp)

(5')5'-GTCAT GAGCC CTTCC ACGAT GC-3'

(3')5'-GAATC TACTG GCGTC TTCAC C-3'

IL-1 (420 bp)

(5')5'-GTCTC TGAAT CAGAA ATCCT TCTAT C-3'

(3')5'-CATGT CAAAT TTCAC TGCTT CATCC-3'

IL-2 (458 bp)

(5')5'-ATGTA CAGGA TGCAA CTCCT GTCTT-3'

(3')5'-GTTAG TGTTG AGATG ATGCT TTGAC-3'

IL-6 (628 bp)

(5')5'-ATGAA CTCCT TCTCC ACAAG CGC-3'

(3')5'-GAAGA GCCCT CAGGC TGGAC TG-3'

IFN γ (494 bp)

(5')5'-ATGAA ATATA CAAGT TATAT CTTGG CTTT-3'

(3')5'-GATGC TCTTC GACCT CGAAA CAGCA T-3'

TNF α (695 bp)

(5')5'-ATGAG CACTG AAAGC ATGAT CCGG-3'

(3')5'-GCAAT GATCC CAAAG TAGAC CTGCC C-3'

전기영동 - 발색 시약으로 EtBr(ethidium bromide)을 첨가(1 μ l/ml)하여 1.5% agarose gel을 제조하였고 완충용액은 0.5 \times TBE용액을 사용하였다.

ELISA - 흡광도가 0.1인 APL로 PBMC를 자극시

킨 후 7단계의 시간별로 수거하여 1,600 rpm으로 1분간 원심분리한 후 세포 배양 상층액을 취해 여과시키고 시료로 준비하였다. ELISA는 sandwich 방법¹⁶⁾으로 IL-1, IL-2 및 TNF α 의 세 종류 사이토카인만 실시하였다.

각 각의 사이토카인이 표면처리된 96 well plate에 시료를 50 μ l 분주하고 biotinylated antibody를 50 μ l 첨가해 공기를 차단하여 20~25°C에서 3시간 배양시킨 후 세척 완충 용액으로 3회 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP(horseradish peroxidase) conjugate를 100 μ l 첨가해 20~25°C에서 30분간 배양시키고 세척 후 TMB(tetramethyl benzidine) substrate 100 μ l로 발색되게 하였다. TMB 반응은 20~25°C에서 30분간 진행시키고 stop solution으로 반응을 중단시켜 450 nm에서 ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 이미 만들어진 standard값에 준하여 concentration 값(pg/ml)을 계산하였고 세 종류의 사이토카인에서 각각 4번의 실험으로 평균치를 산출하였다.

실험결과

APL의 농도에 따른 사이토카인 유전자 발현 양상 -

대상 사이토카인은 최저 농도인 흡광도 0.01에 이르기까지 각 농도에서 모두 band를 나타냈고 특정 농도에 있어 그 양상은 다소 차이가 있었다. 즉, APL과 PBMC와의 반응 1시간 후 사이토카인 유전자 발현을 관찰한 결과 IL-1은 흡광도 0.03에서 발현이 현저히 감소했고 IL-2는 전체적으로 다소 약한 band로 나타났다. IL-6의 band는 그 강도가 농도에 비례하였으며, IFN γ 의 경우 전반적으로 고른 band 양상을 나타냈으나 농도가 낮아질수록 band는 가늘어짐을 관찰할 수 있었다. 그리고 TNF α 의 경우 흡광도 0.3과 0.1의 농도에서 강한 유전자 발현을 나타냈다. 이들을 종합해 본 결과 흡광도 0.1의 농도에서 실험한 사이토카인의 유전자 발현 양상이 가장 적정 수준으로 나타났다(Fig. 1).

APL과 PBMC의 반응 20시간 후의 농도별 사이토카인 유전자 발현 양상 역시 대상 사이토카인은 최저 농도인 흡광도 0.01까지의 모든 농도에서 유전자가 발현되었다. IL-1의 경우 흡광도 0.1 이하에서 강한 band를 얻었고 IL-2는 농도별로 다소 고른 band 양상을 보였으나 농도 의존적이었다. IL-6는 다른 사이토

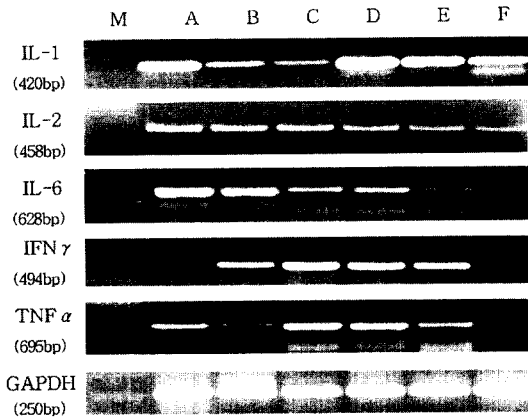


Fig. 1 - Dose dependent effect of APL on mRNA expression for various cytokines in PBMC cultured for 1 hour. M; 123 bp DNA ladder, A; OD 3.0, B; OD 1.0, C; OD 0.3, D; OD 0.1, E; OD 0.03, F; OD 0.01.

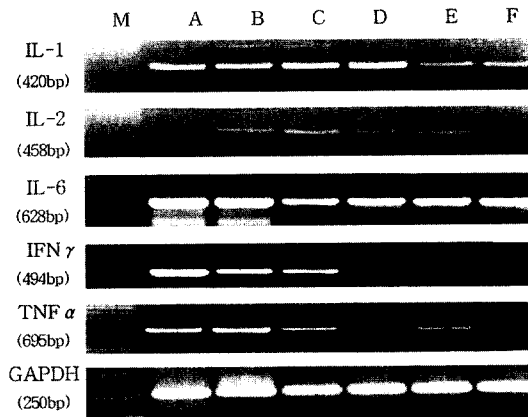


Fig. 2 - Dose dependent effect of APL on mRNA expression for various cytokines in PBMC cultured for 20 hours. M; 123 bp DNA ladder, A; OD 3.0, B; OD 1.0, C; OD 0.3, D; OD 0.1, E; OD 0.03, F; OD 0.01.

카인에 비해 짧은 band를 나타냈고 IFN γ 와 TNF α 는 흡광도 0.1 이하에서 유전자 발현이 현저히 감소됨을 관찰하였다(Fig. 2). 이와 같이 반응 1시간과 20시간에서 농도 0.1의 APL이 사이토카인 유전자 발현에 고농양상을 나타냈으므로, 이후 실시할 실험에서는 적정농도를 흡광도 0.1로 하였다.

반응시간에 따른 APL의 사이토카인 유전자 발현 양상 - 흡광도 0.1로 조제한 APL을 PBMC와 1시간에서 96시간동안 반응시킨 결과 IL-6를 제외한 나머지 사이토카인은 모두 반응 24시간 내지 48시간까지 유전자 발현이 진행되었고 IL-6는 다소 오래 지속되

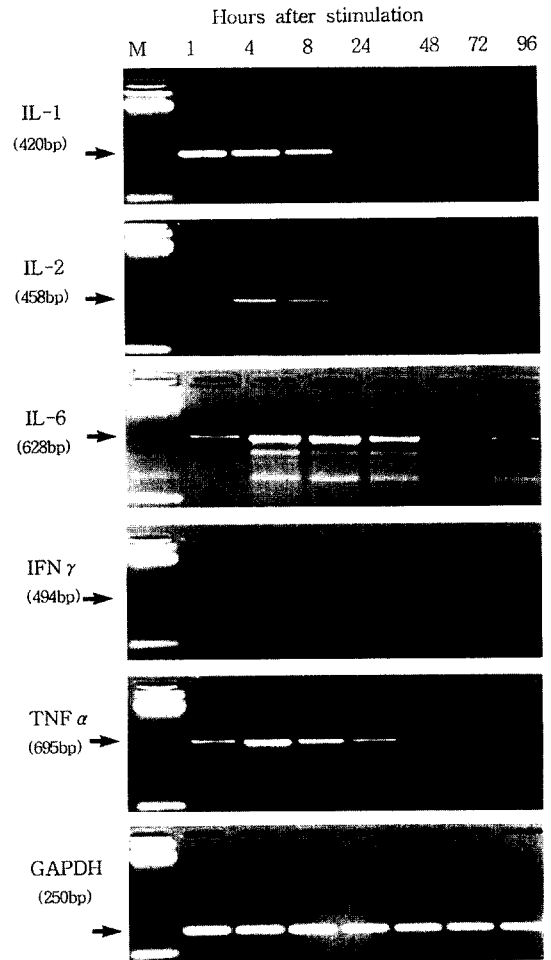


Fig. 3 - PCR-assisted amplification of IL-1 (420 bp), IL-2 (458 bp), IL-6 (628 bp), IFN γ (494 bp), TNF α (695 bp) and GAPDH (250 bp) in PBMC according to the increased reaction times with APL. M; 123 bp DNA ladder (123~4182 bp).

어 72시간까지 발현되었다(Fig. 3). IL-1은 반응 초기인 1시간대에 강한 유전자 발현을 나타냈고 8시간 후에는 현저히 감소되어 48시간까지 지속되었다. IL-2는 반응 8시간까지 강한 발현을 나타내었으며 IL-1과 같이 24시간 이후 현저히 감소하여 48시간까지 지속되었다. IL-6는 반응 초기에는 약한 발현이었으나 8시간대에 가장 강했으며 다시 점차 약해져서 48시간 이후 현저히 감소하였다. IFN γ 의 경우 전체 대상 사이토카인 중 가장 약하게 나타나 반응 초기인 1시간대에 발현이 나타났으나 시간이 지남에 따라 아주 약하게 48시간까지 유지되었다. TNF α 의 mRNA 발현

Table I – Secretion of IL-1, IL-2 and TNF α by PBMC stimulated with APL. Cytokine release by PBMC was analyzed by ELISA

Reaction time (hours)	Amount (pg/ml) of cytokine secreted		
	IL-1	IL-2	TNF α
control	67 \pm 4	68 \pm 7	22 \pm 3
1	105 \pm 13	130 \pm 22	72 \pm 6
4	234 \pm 33	139 \pm 25	562 \pm 23
8	138 \pm 25	176 \pm 20	543 \pm 22
24	133 \pm 16	168 \pm 18	330 \pm 7
48	131 \pm 8	163 \pm 10	137 \pm 5
72	98 \pm 16	156 \pm 8	69 \pm 6
96	73 \pm 3	150 \pm 7	34 \pm 3

Values are means \pm standard error of the means for 4 experiments and are expressed as picograms per milliliter.

은 반응 4시간대에서 최고의 양상을 보였으며 48시간까지 지속되었다. 이처럼 전체적으로 APL의 사이토카인 유전자 발현은 PBMC와의 반응 초기에 강하게 나타났다. 또한 인터루킨 그룹 중 IL-2의 유전자 발현은 다소 약했으며 IL-1과 IL-6는 그 발현이 강하게 나타났다.

APL의 반응시간에 따른 사이토카인 생성 양상 – APL로 자극시키지 않은 PBMC를 control로 하고 PBMC를 APL로 자극한 후 1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간 반응시킨 뒤 ELISA를 이용하여 IL-1, IL-2 및 TNF α 의 활성능(생성능)을 측정하여 Table I의 결과를 얻었다. 실험결과에서 보듯이 IL-1의 경우 사이토카인의 생성은 반응 4시간대에 가장 높은 농도로 나타났으나 8시간 이후부터는 계속 감소하였고 48시간 이후의 활성능은 현저히 감소함을 관찰하였다. 이것은 RT-PCR 결과에서 확인된 반응 1시간대의 강한 유전자 발현이 이후 4시간대의 강한 사이토카인의 생성을 뒷받침하는 것으로 ELISA에 의해 입증된 것이다. IL-2는 반응 1시간부터 활성능이 서서히 증가하는 양상으로 진행되어 8시간대 활성능이 가장 높게 관찰되었으며 반응 24시간 이후부터는 다시 서서히 감소하면서 96시간까지 지속되었다. IL-2 또한 RT-PCR 결과로 확인한 반응 4시간대의 강한 유전자 발현이 이후의 생성능과 유관함을 입증하였다. TNF- α 는 반응 4시간대에 폭발적으로 활성능이 높아져서 8시간까지 매우 강하게 유지되다가 24시간대에서 조금 낮아졌고 48시간대부터는 감소하기 시작하였다. 이는 RT-PCR에 의한 mRNA의 발현이 반응 4시간대에 최고의 양상을 보이고 48시간까지 지속된 점과 생성능과의 시간대가 일치하는 것이었다.

고 찰

본 연구진이 이미 보고한 APL에 관한 여러 가지 결과^{11,12)}에 의하면 이 렉틴은 사람의 A, B, O, AB형과 생쥐 및 토끼의 적혈구를 강하게 응집시키고 흰쥐에 대해서는 적혈구 응집 현상을 나타내지 않으며, 세포 독성이 있고 HeLa cell, L929, L1210 등의 암세포를 응집시켜 암세포의 증식 저지 효과가 있음이 밝혀졌다.¹¹⁾ 또한 APL을 사용하여 생쥐, 흰쥐와 사람의 림프구에 대해 자극 분열 효과를 측정한 결과, 생쥐 림프구(최고활성 0.3 μ g/ml)와 사람 림프구(최고활성 1.2 μ g/ml) 모두에 대해 활성도를 나타내었고 그 중 사람 림프구에 대한 자극 분열 세포수가 훨씬 높게 나타났다. 이 결과를 이미 마이토젠으로 잘 알려진 Con A와 비교해 보면 Con A는 최고활성 1.2 μ g/ml로서 사람 림프구에 대해 비슷한 세포 분열 효과가 있었다. 또한 백합조개 렉틴이 1.95 μ g/ml에서 최고 활성도,¹⁷⁾ 눈알고등 렉틴은 15.63~31.25 μ g/ml에서,¹⁸⁾ 표고버섯 렉틴은 1.2 μ g/ml에서¹⁹⁾ 최고 활성도를 나타내는 것과 비교하여 볼 때 높은 세포분열 효과를 지니고 있음이 확인되어 우량한 마이토젠으로 입증되었다. 또한 Ehrlich ascites tumor cell을 마우스 복강내에 이식한 후 APL 투여로 복수암세포의 성장이 억제되고 수명 연장효과가 확인됨으로서 항암효과가 있음을 밝힌 바 있다.¹²⁾

본 실험에서는 APL을 대상으로 사이토카인 유전자 발현 양상을 밝혔다. 농도별 사이토카인 유전자 발현을 반응 1시간과 20시간으로 나누어 실험한 결과 대체적으로 농도 의존적임을 나타냈고 모든 사이토카인의 적정 농도를 찾아본 결과 1ml의 PBMC를 260 nm에서 흡광도 0.1인 시료 100 μ l로 자극하였을 때 최적의 유전자 발현을 기대할 수 있었다. 이는 적정 농도가 50~100 μ g/ml인 LCL(*Lens culinaris* Lectin)²⁰⁾이나 적정농도가 흡광도 3인 LEL(*Lentinus edodes* Lectin)²¹⁾인 경우와 비교해 볼 때, 낮은 농도에서도 충분히 사이토카인 유전자를 발현시키는 사실을 확인한 결과였다.

APL로 PBMC를 자극한 후 시간별 반응에서 IL-1은 반응 1시간대에 유전자 발현이 가장 높으면서 이후 48시간까지 지속되었고, IL-2가 반응 1시간대에 극히 약한 유전자 발현을 나타내었고 4시간대에 발현이 가장 왕성하였으며 이어서 48시간까지 유지되는 것

로 보아 IL-1의 분비가 IL-2 발현을 유도한다는 이론이²²⁾ 본 실험의 결과와 어느 정도 일치하였다. IL-6는 반응 4시간대의 강한 발현이 72시간까지 지속이 되었고, 4시간 이후에 더 강한 IL-6 유전자 생성은 없는 것으로 나타났는데, 이는 Horii²³⁾ 등이 발표한 보고와는 일치하지 않는 것이었다. Horii 등은 IL-6의 분비가 첫 4시간대에는 단핵구와 대식세포에 기인하며, 후반 48시간에서는 다시 마이토젠 자극에 의한 T와 B 세포에 의한 생성이 야기된다 하였다. IL-1, TNF α 그리고 IL-6는 서로 상호 작용하며, 발열이나 허약 등의 전신성 증상에 있어 유사한 작용을 함과 동시에 IL-1이나 TNF α 는 세포성 면역시에 IL-6를 유도한다고 알려져 있고 유도에는 IL-1이 가장 강하게 작용한다고 하였다.²⁴⁾ 본 실험결과 IL-1이 다른 사이토카인에 비해 유전자 발현이 강하게 나타났으며 이는 IL-6를 유도함을 입증하는 것이었다. 그 외 IL-2나 IFN γ 는 반응 48시간까지 유전자 발현이 지속되었으나 발현 정도가 아주 미약하였고 IL-2가 IFN γ 의 분비를 유도한다는 이론²⁵⁾으로 볼 때 2종류 사이토카인은 관계가 있는 것으로 사료되었다. 그리고 이들의 약한 band는 IL-1, IL-6, TNF α 가 단핵세포, 대식세포 등 다양한 종류의 세포에서 조절 및 분비되는데 반해, IL-2와 IFN γ 는 그 생산원이 T 세포나 Natural Killer(NK) 세포로 한정되어 있기 때문인 것 같다.

단핵구와 활성화된 T 세포가 모두 분비하는 IL-1은 다른 4종의 사이토카인보다는 그 양이 많이 분비되는 것으로 알려진 바 본 실험에서도 RT-PCR 결과 다른 사이토카인보다 유전자 발현이 많은 것으로 확인되었다.

생성된 사이토카인의 분비를 ELISA로 측정된 결과 IL-1의 4시간대에서 생성된 최고치는 전사된 mRNA가 단백질 합성을 시작하고 분비하기까지의 과정이 1시간과 4시간 사이에 많은 양의 IL-1 분비가 증가됨을 의미하고 이는 1시간대에 IL-1 유전자가 가장 많이 발현되었음을 입증하는 결과였다. 그리고 유전자 발현이 되지 않았던 72시간과 96시간대에서 측정된 미량의 IL-1 양은 초기의 많은 분비가 cell culture supernatant에 다소 잔존함을 나타내는 것으로 추정되었다. IL-1과 IL-2의 사이토카인 분비량 비교시 IL-1의 분비량이 IL-2 분비량보다 많은 것은 RT-PCR결과 IL-1의 band가 IL-2의 band보다 굵었던 것을 반영하며, 이는 IL-1이 APL의 자극 전에 단핵식세포 등에 의해서도 분비되지만 IL-2는 활성화된 T 세포(주로 CD⁴⁺)에 의

해서만 분비된다는 점을 고려하여 이해해야 할 것이다. TNF α 는 RT-PCR결과 4시간대에서 가장 유전자 발현이 강했으며 ELISA결과 그 분비능은 4시간대에서 가장 높았다. 그러나 4시간과 8시간대에서 분비량은 큰 차이가 없었으며 96시간까지 서서히 분비량이 감소됨을 확인하였다.

실험 대상이었던 5종류의 사이토카인은 RT-PCR로 확인한 결과 대부분 반응 초기에 유전자가 강하게 발현되어 단시간에 생성이 끝나는 공통된 특징이 있었으며 이 중 3종류의 사이토카인을 선정하여 실질적인 생성 및 분비를 ELISA로 확인한 결과 APL은 PBMC로부터 사이토카인을 생성, 유지시킬 수 있는 유도체로서의 역할을 수행한다는 것을 확인할 수 있었다.

문 헌

- 1) Sharon N. and Lis H. : A century of lectin research (1888-1988). *Trend in Biochem. Sci.* **12** (1987).
- 2) Liener I. E., Sharon N. and Goldstein I. J. : Biological properties of Lectins. in *The Lectin*. Academic Press, New York, p. 266 (1986).
- 3) Renwrandt L. : Lectins in molluscs and arthropods; their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond* **56** (1986).
- 4) Rögener W. and Uhlenbruck G. : Invertebrate lectins; The biological role of a biological rule. *Dev. Comp. Immunol.* **5** (1984).
- 5) Lackie A. M. : Invertebrate immunity. *Parasitology* **80** (1980).
- 6) Parish C. R. : Simple model for self-nonself discrimination in invertebrates. *Nature* **267**, 711 (1977).
- 7) Chung, S. R., Kim, J. H., Suh, Y. A. and Jeune-Chung, K. H. : Studies on lectins from marine shells (III), screening of lectin-like agglutinins from marine shells. *Arch. Pharm. Res.* **9**, 201 (1986).
- 8) Son, B. W., Cho, Y. J. and Yi, D. R. : Screening on cytotoxicity of marine organisms using brine shrimp bioassay. *Yakhak Hoeji* **37**, 527 (1993).
- 9) Tatsumi M., Arai Y. and Itoh T. : Purification and characterization of a lectin from the shellfish, *Saxidomus purpuratus*. *J. Biochem.* **91**, 1139 (1982).
- 10) Kamiya H., Muramot K. and Goto R. : Isolation and characterization of agglutinins from the hemolymph of an arcorn banacle *Megabalanus volcano*. *Dev.*

- Comp. Immunol.* **11**, 297 (1987).
- 11) Jeune, K. H., Park C. S., Park, W. H., Choi, S. J., So, M. S. and Chung, S. R. : Characteristics and Cancerostatic Activity of the Starfish Lectins. *Yakhak hoeji*, **41**, 421-432 (1997).
 - 12) Shon, Y. H., Jeune, K. H., Choi, S. J. and Chung, S. R. : Antitumor Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on Ascitic Tumor Cells. *Yakhak hoeji*, **42**(4), 388-394 (1998).
 - 13) Balkwill F. R. and F. Burke : The cytokine network. *Immunol. Today* **10**, 299 (1989).
 - 14) Arai K., Lee F., Miyajima A., Miyatake S., Arai N. and Yokota T. : Cytokines; coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 783 (1990).
 - 15) Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. : Molecular Cloning; A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1-3 (1989).
 - 16) D. M., Kemeny and S. J., Challacombe : ELISA and other solid phase immunoassays. *John Wiley & Sons Ltd.*, 197-216 (1988).
 - 17) Kim, J. H., Chung, S. R. and Jeune, K. H. : Lectins from marine shell (IX); Purification and carbohydrates specificities of a lectin, MLA-1, from the hemolymph of *Meretrix lusoia*. *Korea Biochem. J.* **23**, 328 (1990).
 - 18) So, M. S., Jeune, K. H. and Chung, S. R. : Lymphocytes mitogenic and immunochemical properties of the lectins from marine animal *Lunella coronatacoreensis*. *Yakhak Hoeji* **37**, 254 (1993).
 - 19) Moon, I. J., Chung, S. R. and Jeune, K. H. : Mitotic stimulation and cancer cell agglutination of the lectins from *Lentinus edodes*. *Yakhak Hoeji* **39**, 260 (1995).
 - 20) Ronnblom L., Funa K., Ersson B. and Alm G. V. : Lectins as inducers of interferon γ production in human lymphocytes; Lentil lectin is highly efficient. *Scand. J. Immunol.* **16**, 327 (1982).
 - 21) Lee, I. K., Kim, H. S., Jeune, K. H., Kim, S. K. and Chung, S. R. : Effects of *Lentinus edodes* Lectin on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Korean Soc. Microbiol.* **30**, 473 (1995).
 - 22) Dinarello C. A. : Biology of interleukin-1. *FASEB J.* **2**, 108 (1988).
 - 23) Horii Y., Muraguchi A., Suematsu S., Matsuda T., Yoshizaki K., Hirano T. and Kishimoto T. : Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells; Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunology* **141**, 1529 (1988).
 - 24) Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S. C. and Dinarella C. A. : Correlations and interactions in the production of IL-6, IL-1 and TNF in human blood mononuclear cells. *Blood* **75**, 40 (1990).
 - 25) Douglas A. W., Stanton G. J. and Howard M. J. : Interleukin-2 enhances natural killer cell activity through induction of IFN γ . *Infect. Immun.* **41**, 92 (1983).