

장수풍뎡이(*Allomyrina dichotoma*) 렉틴의 면역기능 증강효과

전경희 · 정미연 · 최수정 · 이종욱 · 박원학 · 조세훈¹ · 이승호¹ · 정시련^{*1}

영남대학교 이과대학, ¹영남대학교 약학대학
경상북도 경산시 대동 214-1, 712-749

Immunomodulating Effect of the Lectin from *Allomyrina dichotoma*

Kyung Hee Jeune, Mi Yeun Jung, Soo Jeong Choi, Jong Wook Lee, Won Hark Park,
Se Hoon Cho¹, Seung Ho Lee¹ and See Ryun Chung^{1,*}

College of Science and ¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract – A lectin was purified from *Allomyrina dichotoma* (ADL) by physiological saline extraction, ammonium sulfate fractionation, anion exchange column chromatography on DEAE Sephadex A-50 and gel filtration column chromatography on Sephadex G-200. Several biochemical properties of ADL were characterized as follows: ADL from gel filtration column chromatography showed single band on SDS-PAGE. ADL agglutinated the erythrocytes of rabbit and human A, B, O, AB. Agglutinability was relatively stable at basic pH, and was stable at temperature below 40°C. Agglutinability was not affected by metal ions and EDTA. This lectin was proved to be a glycoprotein which contains 0.47% of sugars. The molecular weight of ADL was estimated to be 97,000 dalton by SDS-PAGE. By amino acid analysis, ADL exhibited high amounts of aspartic acid. The lectin's immunomodulating effect was measured as cytokine production. The productions of 5 cytokines (IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN γ and TNF α) from peripheral blood mononuclear cells were measured by ELISA. The lectin induced the highest secretion of IL-2 at 8 hr, TNF α at 4 hr, and IFN γ at 24hr, respectively. These results suggest that ADL can elicit the production of detectable cytokines from PBMC.

Key words – lectin, *Allomyrina dichotoma*, cytokine, immunomodulator.

최근 곤충자원의 탐색, 보전을 통한 생물자원 확보 경쟁이 날로 치열해지고 있는 가운데 이들의 가치평가 및 이용개발 연구가 매우 활발히 수행되고 있다. 이 가운데 전통적인 민간약으로 이용되어온 약용곤충의 예는 매우 다양하며, 효능 및 유효성분 분석연구가 최근 들어 각광을 받고 있다. 대표적인 예를 들면 동충하초, 반묘, 백강잠, 굼벵이, 지렁이, 거머리, 지네, 전갈, 거미 등이 인류의 질병치료에 이용되고 있다¹⁾.

렉틴은 당과 특이적으로 결합하는 단백질 또는 당 단백질로서 발견 초기에 식물의 종자를 대상으로 연

구가 행하여졌으나, 이후 식물, 동물, 미생물 등 생물계에 광범위하게 분포되어 있는 것으로 밝혀졌으며 이미 다수의 렉틴이 상품화되어 이용되고 있고^{2,3,4)}, 여러 가지 렉틴들은 생물학적, 화학적, 면역학적 성질이 매우 다양한 것으로 보고되었다⁵⁾.

렉틴이 마이토텐으로 작용할 때 분비되는 사이토카인은 혈구세포에서 분비되는 가용성단백질로서 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 합성

*교신저자 : Fax : 053-812-8891

이 끝나면 즉시 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 한 종의 사이토카인이 다른 사이토카인의 합성에 영향을 주는 인자로 작용할 수 있으며, 다른 사이토카인의 기능에도 영향을 주어 상승작용이나, 길항작용이 가능하다^{6,7)}.

본 연구에서는 옛부터 간암, 간경화, 야뇨증, 간염, 유방암, 피로회복, 중풍 등의 성인병 치료 및 예방에 탁월한 효능을 지닌다고 알려져 있어⁸⁾ 민간약으로 사용되어온 딱정벌레목에 속하는 장수풍뎅이 3령 유충(제주도산: 蟥螬, 地蠶등으로 불림)으로 부터 렉틴을 분리하여 생화학적 특성을 조사하고, 사이토카인의 생성 양상을 구명하여 장수풍뎅이 유충 렉틴의 면역기능조절 및 항암제로서의 이용가능성을 연구 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 장수풍뎅이과에 속하는 장수풍뎅이 유충을 제주도에서 구입하여 실험재료로 사용하였다 (Photo. 1).

렉틴(ADL)의 분리 및 정제 - 粗 렉틴(Crude 렉틴, 粗 ADL)의 분리는 Jeune 등²⁾의 방법에 따라 ammonium persulfate로 粗 렉틴을 추출한 후, DEAE Sephadex A-50 column을 통과시켜 단백질 성분은 NaCl의 농도를 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M까지 증가시켜 유출시켰고, 얻어진 각각의 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하고 렉틴 활성을 시험하였다. 렉틴 활성이 나타난 0.05 M NaCl 분획을 Sartorius ultramembrane과 Aquacid III 등을 이용하여 농축하고, 이를 Sephadex G-200 column에 통과시켜 더욱 순수하게 정제를 수행하였으며, 증류수에 투석하여 염을 제거한 후 각 분획의 렉틴 활성을 확인하여 0.1 M NaCl 분획을 ADL로 취하였다.

적혈구 응집력 시험 - 렉틴의 적혈구 응집력 시험은 U-shape microtiter plate(Falcon) 각각의 well에 생리식염수 50 μ l를 넣고, 이어서 시료를 첫번째 well에 주입한 뒤 첫번째 well에서부터 연속 2배수 희석한 후, 생리식염수로 세척하여 조제한 3% 적혈구 용액을 가하여 상온에서 1시간 정도 방치시킨 후 육안 또는 현미경으로 관찰하였다⁹⁾.

pH의 영향 - 粗 렉틴을 pH 2~11 사이의 여러 가지 완충액으로 4시간 동안 4°C에서 투석시킨 후 렉틴 활성을 조사하였다.

온도의 영향 - 粗 렉틴을 10~90°C 범위의 온도에서 30분간 가온한 후, 즉시 얼음으로 식힌 다음 렉틴 활성을 조사하였다.

금속이온의 영향 - Ba(OH)₂, CaCl₂, FeCl₂, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ 등과 착물 형성체인 EDTA를 0.05 mM~10 mM로 조제하여 각각 50 μ l씩 취하고, 연속 2배수 희석법으로 희석한 뒤, 각 well에 렉틴 용액 50 μ l를 가하였다. 그 위에 3% 적혈구 용액 50 μ l를 가하여 상온에서 30분간 방치한 뒤에 세포 응집력을 조사하였다²⁾.

아미노산 분석 - Simpson 등¹⁰⁾의 방법에 따라 粗 렉틴, DEAE Sephadex A-50의 0.05 M 분획과 Sephadex G-200의 분획(ADL) 등을 동결 건조하여 2 mg씩을 시험관에 취하고 6N-HCl 1.5 ml를 가한 후 질소 가스를 채우고 밀봉하여 115°C에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해 산물은 3N-NaOH 1 ml로 중화한 다음, 증류수로 세척하여 진공증발기로 건조시켰다. 이를 loading buffer(0.2 M sodium citrate buffer, pH 2.2) 1 ml에 녹여 millipore(0.22 μ m)로 여과시킨 후, 아미노산분석기로 아미노산 조성과 함량을 측정하였다.

단백질 함량 분석 - Lowry 등¹¹⁾의 방법에 따라 소혈청 알부민(BSA)을 표준품으로 사용하였으며, 각각의 시료는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검정곡선으로부터 단백질 함량을 분석하였다.

당 함량 분석 - 렉틴의 당 함량은 만노오스를 표준품으로 하여 phenolsulfuric acid 방법¹²⁾으로 실시하였다. 480 nm에서 흡광도를 측정하여 전항과 같은 방법으로 당 함량을 측정하였다.

SDS-PAGE - Laemmli¹³⁾방법으로 discontinuous buffer system으로 실시하였다. Stacking gel과 resolving gel을 각각 2.5%, 10%의 acrylamide로 준비하고 bis-acrylamide와 0.8:30으로 준비한 뒤, 시료는 SDS와 2-mercaptoethanol을 각각 2%, 5%를 가하여 100°C에서 5분간 처리하여 변성시켰다.

표준 단백질 marker로는 myosin (211,000), β -galactosidase (122,000), bovine serum albumin (80,000), ovalbumin (51,000), carbonic anhydrase (35,900), soybean trypsin inhibitor (28,600), lysozyme (20,800) 등을 사용하였다.

PBMC의 분리 및 전처리 단계 - Jeune 등²⁾의 방법에 따라 건강한 성인 2인 이상의 혈액을 heparin 처리(5~10 IU/m)하여 채혈한 후 동량의 생리식염수로 희석하고 이를 Ficoll-paque에 2~3배의 양으로 중첩한 뒤 1,800 rpm으로 30분간 원심분리하였다.

Pasteur pipette을 사용하여 PBMC층을 조심스럽게 건어내고 생리식염수로 3번 세척하여 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시킨 후 세포수를 1×10^6 cells/m로 조정하였다.

ADL 사용 농도별 반응, 시간별 반응 - ADL을 생리식염수로 투석한 후 280 nm에서 흡광도가 2, 1, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005 등 8단계로 준비하였다.

24 well plate에 세포수를 1×10^6 cells/m로 조정하여 PBMC를 1 m²씩 분주하고 농도별 ADL을 각 well당 100 μ l씩 넣어 반응시키고 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다.

사용 시간별 반응을 알아보기 위해 반응 시간을 1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간의 7단계로 설정하고 각 시간별로 세포를 수거하였다.

ELISA - 흡광도가 2, 1, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005인 ADL 중 반응 적정 농도를 설정하여 PBMC를 자극시킨 후 시간별로 수거하여 1,600 rpm으로 1분간 원심분리한 후 세포배양 상층액을 취해 여과시킨 뒤 시료로 준비하였다. ELISA는 sandwich 방법¹⁴⁾으로 실시하였으며 IFN γ , IL-1 α , IL-2, IL-6 및 TNF α 의 다섯 종류 사이토카인을 대상으로 실시하였다.

각각의 사이토카인으로 표면 처리된 96 well plate에 시료를 50 μ l 분주하고 biotinylated antibody를 50 μ l 첨가해 20~25°C에서 3시간 배양시킨 후 세척 완충용액으로 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 발색하였다.

TMB 반응은 20~25°C에서 30분간 진행시킨 후 반응정지액으로 반응을 중단시켜 ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

측정된 흡광도 값은 이미 만들어진 표준 값으로 부터 농도 값(pg/ml)을 계산하였다.

결 과

DEAE Sephadex A-50 column chromatography

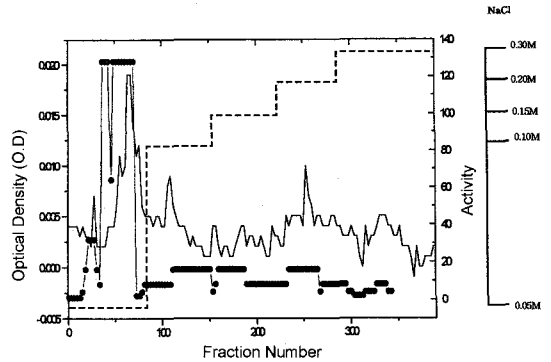


Fig. 1. Elution profile of *Allomyrina dichotoma* crude lectins on DEAE Sephadex A-50 column (3 \times 40 cm) chromatography (absorbance at 280 nm: —, lectin activity: —●—, salt gradient: ----, flow rate: 24 ml/hr).

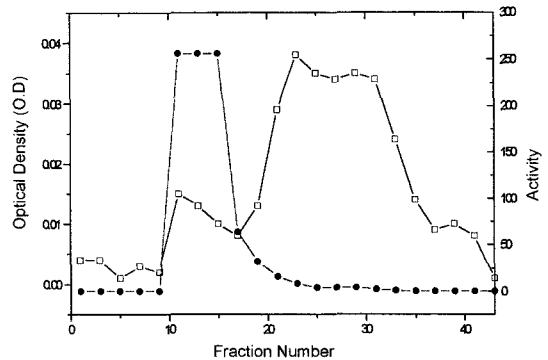


Fig. 2. Elution profile of 0.05M fraction from DEAE Sephadex A-50 column on Sephadex G-200 column (1.0 \times 19 cm) chromatography (absorbance at 280 nm: □-□, lectin activity: —●—, flowrate:12 ml/hr).

에 의한 정제 - 粗 렉틴을 음이온 교환수지인 DEAE Sephadex A-50 column으로 정제하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 25 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 NaCl의 농도를 단계적으로 증가시켰을 때 0.05 M 분획에서 가장 강한 렉틴 활성을 나타내 0.05 M 분획물을 대상으로 더욱 분리 정제하였다.

Sephadex G-200 column chromatography에 의한 정제 - DEAE Sephadex A-50 column의 0.05 M 분획을 Sephadex G-200 column으로 정제하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 0.1 M NaCl을 포함한 25 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 유출시켜 그 첫번째 분획이 가장 강한 활성을 나타내었으므로 이 분획을 ADL로 명명하였다.

적혈구 응집력 시험 - 장수풍뎡이 렉틴(ADL)에 대하여 사람 및 토끼 적혈구로 렉틴 활성도를 조사한

Table I. Specificity of ADL on agglutination of erythrocytes of human and rabbit

Species	Cell agglutinating activity (HU)
Human A Type	64
B	64
O	64
AB	2,048
Rabbit	128

Table II. Effect of pH on hemagglutinating activity of crude lectin from *Allomyrina dichotoma*

Buffer	pH	Hemagglutinating activity (HU)
25mM KCl-HCl Buffer	2.18	16
25mM Glycine-HCl Buffer	3.18	16
25mM Citrate Buffer	4.16	16
25mM Citrate Buffer	5.35	32
25mM Phosphate Buffer	6.54	32
25mM Tris-HCl Buffer	7.40	16
25mM Tris-HCl Buffer	8.71	16
25mM Carbonate Buffer	9.62	16
25mM Carbonate Buffer	10.08	16

결과 모든 적혈구에서 응집능력이 있었으나 그 중 사람 적혈구 AB형에서 가장 높은 활성을 나타내었다 (Table I).

pH의 영향 - pH 변화에 따른 장수풍뎡이 粗 렉틴의 적혈구 응집력 변화는 Table II와 같았다. 강산(pH 2~4), 중성 및 약 염기(pH 7~9), 강염기(pH 10)에서 모두 렉틴 활성이 안정하였다.

온도의 영향 - 장수풍뎡이 粗 렉틴의 온도에 따른

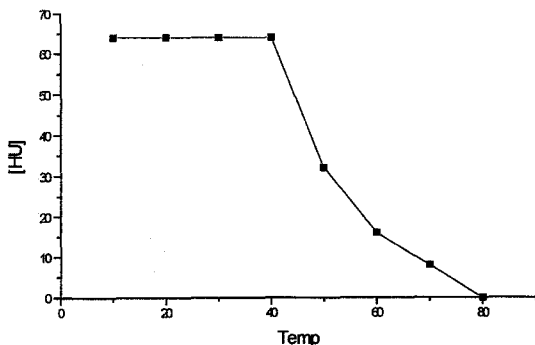


Fig. 3. Effect of temperature on hemagglutinating activity of crude lectin from *Allomyrina dichotoma*.

Table III. Amino acid composition of *Allomyrina dichotoma* Lectin

Amino acid	Crude Lectin		ADL	
	Amount	%	Amount	%
Asp	7.04	10.08	7.34	12.18
Thr	3.66	5.24	3.09	5.13
Ser	3.49	5	4.7	7.8
Glu	5.44	7.78	2.8	4.65
Pro	2.68	3.84	1.84	3.05
Gly	4.29	6.15	4.1	6.80
Ala	3.57	5.12	2.40	3.97
Cys	ND	ND	ND	ND
Val	4.48	6.42	3.71	6.16
Met	0.75	1.08	1.40	2.32
Iso	3.57	5.12	2.60	4.31
Leu	4.88	7	3.3	5.47
Tyr	3.51	5.03	2.3	3.82
Phe	3.65	5.23	3.77	6.26
His	1.86	2.67	1.36	2.26
Lys	5.51	7.88	4.55	7.55
Amm	7.51	10.76	9.11	15.12
Arg	3.91	5.61	1.90	3.15
Total amino acid	69.8	100	60.27	100

Amount: nmol

Aspartic acid = Asp + Asn, Glutamic acid = Glu + Gln

*ND : Not detected

적혈구 응집력의 변화는 Fig. 3과 같았다. 40°C까지는 안정하였으며 50°C에서 활성이 감소하기 시작하여 80°C에서 렉틴 활성이 완전히 소실되었다.

금속 이온의 영향 - Ba(OH)₂, CaCl₂, FeCl₂, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ 등과 EDTA를 0.05 mM 농도에서부터 10 mM 까지의 범위에서 시험한 결과, 장수풍뎡이 렉틴 (ALD)의 활성에 금속 이온은 아무런 영향을 주지 않았다.

아미노산 분석 - ADL에 대한 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table III과 같았다. 粗 렉틴에서 ADL로 정제가 될수록 aspartic acid, serine, methionine과 phenylalanine 등의 함량은 증가하였으며, alanine, arginine, glutamic acid, leucine, tyrosine등의 함량은 현저히 감소하였고, cysteine의 존재가 확인되지 않았다. 또한 산성 아미노산인 aspartic acid가 가장 높은 함량을 나타내었다.

단백질 함량 분석 - 장수풍뎡이 유충 86.88g을 extraction한 粗 렉틴은 735.077 mg이 함유되어 있었

Table IV. Purification of the lectin from *Allomyrina dichotoma*

Purification step	Total Protein (mg)	Total Activity (units×10 ⁻³)	Specific Activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Extraction	2,864.8	1,847.3	645	1	100
Salt fractionation	735.077	666	906.02	1.4	36
0.05M fraction of DEAE Sephadex A-50	9	154	17,111	27	8.5
Sephadex G-200(ADL)	0.18	49.9	277,222	429	2.7

*The procedure started with 86.88 g of alive *Allomyrina dichotoma*

으며, DEAE Sephadex A-50의 0.05 M 분획에서는 9 mg의 렉틴이 분리되었고, 최종 정제된 ADL의 단백질 함량은 0.18 mg이었다(Table IV).

당 함량 분석 - 당 함량을 측정한 결과 정제된 ADL은 0.47%의 당을 함유한 당단백질로 밝혀졌다.

SDS-PAGE - 장수풍뎅이 렉틴의 정제 단계에 따른 각 분획을 SDS-PAGE한 결과 Photo 2와 같았다. 粗 렉틴은 다수의 band를 나타냈지만 정제됨에 따라서 band 수가 줄어들었고 최종 정제된 ADL에선 single band가 나타나 가시적으로 순도를 확인할 수 있었고 분자량은 97,000 dalton으로 측정되었다.

ADL 사용 농도별 반응 - 시료의 사용적정 농도를 결정하기 위해 ADL을 생리식염수로 투석한 후 280 nm에서 흡광도가 2, 1, 0.3, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005로 세분하여 PBMC를 자극한 후 이를 1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간대별로 반응한 결과 흡광도 2와 1에서는 PBMC가 ADL의 독성에 의해 모두 파괴됨이 관찰되어 사이토카인의 생성양상을 볼 수 없었으며 나머지 다섯 단계의 흡광도 중에서 IL-1 α 와 IL-2는 흡광도 0.005에서 사이토카인을 생성할 수 있는 최저 농도로 결정되었고, IFN γ 와 TNF α 는 흡광도 0.3에서 사이토카인을 생성할 수 있는 최저 농도로 결정되었다.

ADL의 반응시간에 따른 사이토카인 생성양상 - ADL을 다양한 시간대의 조건에서 PBMC와 반응시키면서 IL-1 α , IL-2, IL-6, TNF α 와 IFN γ 의 사이토카인 생성양상을 ELISA 방법으로 확인하였으며 그 결과를 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 시간에 따라 측정하였다(Table V).

IL-1은 흡광도 0.005에서 반응초기인 1시간대부터

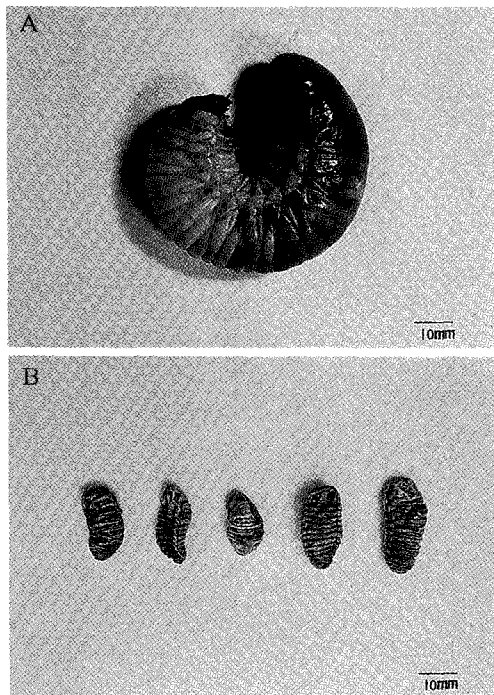


Photo 1. A: Alive material of *Allomyrina dichotoma*. B: Dried material of *Allomyrina dichotoma*.

Table V. Cytokine productions from PBMC stimulated with ADL were analyzed by ELISA

Reaction time (hours)	Amounts (pg/ml) of cytokine			
	IL-1 α	IL-2	TNF α	IFN
1	12.02	132.43	21.88	25.82
4	35.81	135.83	69.02	27.04
8	97.27	158.48	64.71	31.84
24	115.35	135.21	27.73	32.81
48	223.87	118.85	22.65	27.73
72	399.02	89.13	22.64	27.54
96	494.31	90.78	14.16	27.73

*ADL concentration was determined by optical density. OD of IL-1 α and IL-2 are 0.005; OD of TNF α and IFN γ are 0.3

생성능을 보였으며 이후 계속 96시간대까지 그 생성능이 증가하고 지속됨을 보였다.

IL-2는 흡광도 0.005에서 반응 1시간 뒤부터 강하게 생성되면서 8시간대에 가장 강한 사이토카인 생성능을 보였으며 그 후 서서히 감소되어 72시간 이후부터는 감소하였다.

IL-6는 ADL의 흡광도 0.0005 이하에서도 그 생성능이 1시간대부터 발현된 후 ELISA reader의 측정 한계치 이상에서 96시간대까지 계속 나타났다. TNF α 는 ADL의 흡광도 0.3에서 가장 최적의 생성능이 나타났으며 반응 4시간대에 가장 강한 생성능을 보였고, 그 생성능이 72시간까지 지속되었다.

IFN γ 는 ADL의 흡광도 0.3에서 24시간대에 가장 강한 사이토카인 생성능을 보였으며, 그 생성능은 48시간부터 감소하였다.

고 찰

민간에서 간질환의 치료에 효능이 있다고 알려져 약용으로 사용되고 있는 장수풍뎡이 유충을 제주도에서 구입하여 렉틴을 분리 정제하고 면역학적 측면에서 효능이 있는지 알아보고자 장수풍뎡이 유충 렉틴의 생화학적 특성 및 사이토카인의 생성효과를 실험하여 면역기능 증강효과를 입증하고자 하였다.

본 연구에서 사용된 장수풍뎡이 렉틴(이하 ADL, Sephadex G-200 column의 첫 번째 분획)은 0.47%의 당을 함유하고 있는 당단백질로서 galactose에 특이성이 있고 사람 적혈구 AB형에 가장 높은 응집력을 나타내는 렉틴 성분임이 최초로 밝혀졌으며, 본 실험에서 정제단계를 거치면서 429배 정제되었고 그 결과 순수한 렉틴 성분은 2.7% 회수되었다. 또한 SDS-PAGE에 의해 순도확인 및 분자량을 측정해본 결과 정제가 진행됨에 따라 ADL이 single band로 나타나 단일물질로 정제되었음을 확인하였으며, 분자량은 약 97,000으로 측정되었다.

ADL에 대한 급속이온 효과를 측정해 본 결과 급속이온은 장수풍뎡이 렉틴의 활성에 아무런 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있었으며, 장시간 동안 ADL을 실온에 방치함으로써 활성이 낮아질 때 pH 5~6 사이의 완충액으로 투석하여 어느 정도 기능을 회복할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다. 온도 변화에서는 40°C까지는 활성이 있었으나 50°C 이상에서는 활성이 점점 감소되어 80°C에서 활성이 완전

히 소실됨이 관찰되어 비교적 온도에 안정한 렉틴으로 판명되었다.

아미노산 분석에서 ADL은 전체적으로 중성 아미노산이 대부분이었으나 산성 아미노산의 함량이 염기성 아미노산 함량보다 많은 것으로 시사되었다.

ADL로 PBMC를 자극한 후 시간별 반응에서 IL-1 α 는 반응초기인 1시간대부터 강한 생성능을 보였으며 이후 반응시간 96시간대까지 그 생성능이 급격히 증가하고 지속됨을 보였다. IL-2는 반응 8시간대에 가장 강한 사이토카인 생성능을 보이고 그 후 서서히 감소되어 72시간이후부터는 급격히 감소되었다.

반응시간에 따른 사이토카인 생성 양상에 관한 보고는 TNF α 의 경우, *Candida albicans*에 대한 PBMC나 말초 혈액 림프구의 TNF α 유도능에 관한 Kim 등¹⁵⁾의 보고와 표고버섯 렉틴에 대한 Lee 등¹⁶⁾에 의해 TNF α 가 초기 반응시간에만 발현이 관찰되고, 그 이후에는 활성능이 떨어져 다른 사이토카인에 비해서 단 시간에 반응하는 사이토카인임이 확인된 바 있었다. 본 실험에서의 ADL 자극에 의한 TNF α 의 발현 양상도 Kim 등과 Lee등의 실험 결과와 일치함을 관찰하였다.

IL-1, TNF α 그리고 IL-6는 서로 상호 작용하며, 발열이나 허약 등의 전신성 증상에 있어서 유사한 작용을 함과 동시에 IL-1이나 TNF α 는 세포성 면역시 IL-6를 유도한다고 알려져 있고 IL-1이 가장 강하게 작용한다고 보고된 바 있는데¹⁷⁾, 본 실험에서도 IL-1과 IL-6가 지속적으로 강하게 유도됨을 보였고, 특히 IL-6는 0.5 μ g/ml의 농도이하에서도 사이토카인 생성능이 아주 강하게 유도됨을 보아 IL-1과 IL-6의 연관성을 시사하는 것으로 사료되었다.

IL-2가 IFN γ 의 분비를 유도한다는 이론¹⁸⁾에서 볼 때 IL-2와 IFN γ 모두 반응시간 48시간까지 사이토카인 생성능이 유지되고, IL-2가 초기에 강하게 발현된 뒤 IFN γ 가 발현되는 것으로 보아 상호연관성을 입증하는 것으로 시사되었다.

이상의 결과에서 장수풍뎡이 렉틴(ADL)은 확실한 마이트젠으로서의 역할을 수행하여 PBMC로부터 각종 사이토카인을 생성하는 유도제로 작용할 수 있음이 확인되었으며 생성된 사이토카인은 본래의 PBMC로부터 미리 만들어진 것이 분비되는 것이 아니라 ADL로 자극될 때 새로이 생성된 것임을 알 수 있었다.

또한 살아있는 장수풍뎡이 유충과 말린 장수풍뎡이

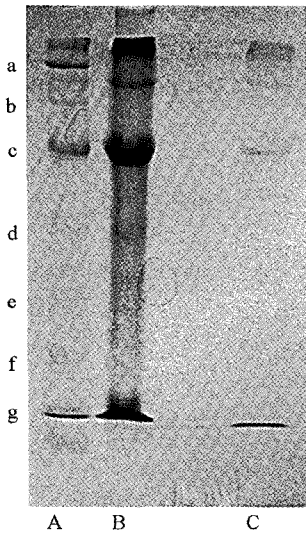


Photo 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of ADL.

Lane A: Molecular weights of standard were given as follows: 1, myosin (211,000); 2, β -galactosidase (122,000); 3, bovine serum albumin (80,000); 4, ovalbumin (51,000); 5, carbonic anhydrase (35,900); 6, soybean trypsin inhibitor (28,600); 7, lysozyme (20,800). Lane B: crude Lectin, OD=58.

Lane C: ADL after Sephadex G-200: OD=2.

유충을 통해 실험해본 결과 건조시킨 장수풍뎅이 유충의 분리된 렉틴성분은 적혈구를 용혈시키는 반면, 살아있는 장수풍뎅이 유충으로부터 분리된 렉틴은 혈구응집능력으로 확인한 결과 응집능력이 아주 높았다. 이는 건조과정에서 방부제의 사용가능성이 의심되는 현상이며 그 결과 말린 장수풍뎅이 유충을 약제로 사용하는 것에 대한 재고가 있어야 할 것으로 사료된다(Photo 1).

민간에서 사용되는 장수풍뎅이 유충이 약으로 이용되는 것은 ADL의 강력한 사이토카인 생성능을 보아 근거가 있는 것으로 보이고 또한 항암효과를 기대할 수도 있지만 확실한 임상학적 응용을 위해서는 추후 *in vivo* 실험을 통하여 항암효과 등에 관한 실험이 계속 되어야 할 것으로 사료되며, 따라서 본 연구팀은 현재 암세포를 이용한 항암효과에 관한 실험을 진행중이며 이에 관한 결과를 발표할 예정이다.

감사의 말씀

이 연구는 2000년도 영남대학교 학술연구조성비의

지원과 BK21 핵심분야 연구사업 수행 경비의 일부 지원으로 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 박호용 (1994) 곤충유래 항생물질 탐색 및 개발. 생명공학동향 2(2): 85-93.
2. Jeune, K.H., Choi, S.J. and Chung, S.R. (1999) Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on Cytokine Production. *Yakhak Hoeji* 43: 474-480.
3. Chung, S. R., Lee, Y. C. and Jeune, K. H. (1995) Immunomodulating lectins from marine natural products. *Proceedings of International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Commemorating the 80th Anniversary of Modern Pharmaceutical Education in Korea*, 403-412.
4. Liener, I. E. (1976) Phytohemagglutinins (phytolectins). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 291-319.
5. Lis, H. and Sharon, N. (1986) Biological properties of lectins, in *The Lectins*, Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J.(eds.), 266. Academic Press, New York.
6. Balkwill, F. R. and Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunol. Today* 10: 299.
7. Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Cytokines; coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783.
8. 상해과학기술 (1998) 중약대사전, 8: 4931-4933. 정답사, 서울.
9. Chung, S. R., Jeune, K. H. and Kim, K. A. (1980) Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products, *Arch. Pharm. Res.* 3: 31-36.
10. Simpson, R. J. Neuberger, M. R. and Lieu, T. Y (1976) Complete amino acid analysis of protein's from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.* 251: 1936-1940.
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
12. Dubois, M., Gilles, K. M., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
13. Laemmli, G. U. K. and King, J. (1970) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62: 465-477.
14. Kemeny, D. M. and Challacombe, S. J. (1988) ELISA and other solid phase immunoassays. *John Wiley & Sons, Ltd.* 197-216.
15. Kim, H. S., Sung, Y. O., Lee, Y. S. and Kim, S. K. (1995) *Candida albicans*-induced TNF α production

- from human peripheral blood lymphocytes. *Korean J. Microbiol.* **30**: 1-12.
16. Lee I. K., Kim H. S., Jeune K. H., Kim S. K., and Chung S. R. (1995) Effects of *Lentinus Edodes* lectin on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Kor. Soc. Microbiology* **30**: 473-481.
17. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C. and Dinarella, C. A. (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin 6, IL-1 and tumor necrosis factor in human blood mononuclear cells. *Blood* **75**: 40-47.
18. Robb, R. J. (1984) Interleukin 2; The molecule and its function. *Immunol. Today* **5**: 203-209.

(2001년 2월 6일 접수)