

## 한국산 겨우살이 추출물 M11C(비렉틴 구성물질)의 생쥐 비장 대식세포로부터 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 분비효과와 생쥐에 Sarcoma 180으로 유도된 육종암의 성장 억제효과

성기태<sup>1,6</sup> · 강태봉<sup>1,2</sup> · 전명하<sup>1</sup> · 장성호<sup>1</sup> · 이준호<sup>1</sup> · 김종배<sup>2</sup> · 최완수<sup>1</sup> · 유영춘<sup>3</sup>  
성낙술<sup>4</sup> · 이성태<sup>5</sup> · 성현제<sup>6</sup> · 허 익<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 의과대학 면역학교실 및 <sup>5</sup>정형외과학교실  
<sup>2</sup>한동대학교 생의학 연구소, <sup>3</sup>건양대학교 의과대학 미생물학교실  
<sup>4</sup>농촌진흥청 작물시험장 특용작물과, <sup>6</sup>세명대학교 한의과대학 한의학과

## The Effect of Korean Mistletoe Extract M11C (Non-Lectin Components) on the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Secretion from Mouse Splenic Macrophages and on the Inhibition of Sarcoma 180-Induced Tumor Growth in Mice

Ki Tai Sung<sup>1,6</sup>, Tae Bong Kang<sup>1,2</sup>, Myung Ha Jun<sup>1</sup>, Sung Ho Chang<sup>1</sup>, Jun Ho Lee<sup>1</sup>,  
Jong Bae Kim<sup>2</sup>, Wahn Soo Choi<sup>1</sup>, Yung Choon Yoo<sup>3</sup>, Nak Sul Seong<sup>4</sup>,  
Sung Tae Lee<sup>5</sup>, Hyun Jea Sung<sup>6</sup>, and Erk Her<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and <sup>5</sup>Department of Orthopaedic Surgery, <sup>2</sup>College of Medicine, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea, The Institute for Biomedical Research, Handong University, Pohang 791-708, Korea  
<sup>3</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea  
<sup>4</sup>National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea, <sup>6</sup>Department of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University, Chechun 391-711, Korea

**Abstract** – Korean mistletoe (*Viscum album*) extract has been found to possess immunostimulatory activity. In this study, Korean mistletoe extract, M11C (non-lectin components), was used to know whether this extract might activate mouse splenic macrophages to produce tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and might play a role in anticancer. To know the effect of M11C on the production of TNF- $\alpha$ , the splenic macrophages were treated by the M11C, and then collected the supernatant (M11C stimulated splenic macrophage-conditioned media; MSCM). MSCM was analyzed for the TNF- $\alpha$  secretion by means of ELISA and immunoblotting, and mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The S-180 murine sarcoma model was established to know the effect of M11C on the inhibition of tumor growth. M11C had the effect of TNF- $\alpha$  production from splenic macrophages performed by ELISA technique. This ELISA data was reconfirmed by immunoblotting assay. The effects of M11C on the expression of TNF- $\alpha$  mRNA from the macrophages was also shown. M11C also had the inhibitory effect of S-180 tumor growth. These data suggest that Korean mistletoe extract M11C may be used for an immunomodulator.

**Key words** – Korean mistletoe, non-lectin components, splenic macrophages, TNF- $\alpha$  release, TNF- $\alpha$  expression, anti-tumor growth

겨우살이는 세계 널리 분포하고 있는데, 이에 대한 연구가 오랜 세월동안 많이 수행되어 왔으며, 특히 독일산 겨우살이 렉틴에 대하여 분자생화학적 특성이 잘 규명되어 있

다.<sup>1-5)</sup> 1990년도 중반에 들어오면서 많은 연구진들에 의해 한국산 겨우살이에 대한 연구가 활성화되면서 한국산 겨우살이에 약리 효능 연구가 많이 이루어지고 있다.<sup>6-12)</sup> 한방에서는 겨우살이를 오래 전부터 고혈압을 비롯한 각종 질환에 한방 탕제로 널리 애용되어오고 있다. 그러나 열을 가하면 약리활성이 사라지는 당단백질인 겨우살이 렉틴에 대한

\*교신저자(E-mail) : erk.her@kku.ac.kr  
(FAX) : 043-851-2181

연구는 많이 수행되고 있으나,<sup>8-11)</sup> 한방탕제를 대신하는 한국산 겨우살이 성분 중 비렉틴 성분들에 대한 연구가 아주 미진한 상태에 있는데, 겨우살이 비렉틴 성분 중에는 polysaccharides, oligosaccharides, amines, alkaloids 등이 있다.<sup>3-17)</sup> 특히 면역학적 측면에서는 당 계통들의 물질들이 더 많은 흥미를 불러일으키고 있다. 이러한 당 계통들의 물질들은 spleen cell 중의 하나인 대식세포를 활성화시킨다.<sup>18-20)</sup> 대식세포는 세포 매개성 면역에 있어서 중요한 역할을 한다. 대식세포는 endotoxin, mitogen, virus 등에 의해서 활성화되며, 각종 면역활성 매개물질을 분비한다.<sup>17)</sup> 이들 물질 중에는 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 등이 있으며 대식세포가 이들을 생산 분비하여 생체방어 기능을 수행한다.<sup>21-22)</sup> TNF- $\alpha$ 는 tumor cell line을 lysis시키며 증양을 파괴시킨다.<sup>23-26)</sup> 사람과 murine의 monocyte 및 대식세포가 tumor cell line에 대한 cytotoxicity는 recombinant TNF- $\alpha$ 에 의한 tumor cell line의 cytotoxicity 효과와 관련이 있다고 보고된 바 있다.<sup>27-29)</sup> 이에 본 연구는 한국산 겨우살이가 오래 전부터 한방탕제 약제로 이용되고 있음을 감안해 비렉틴 단백질 성분인 M11C에 대한 면역효능 및 항암효과 유무를 규명하고자 함이 연구의 주목적이었다. 이러한 주목적 하에 M11C가 복강 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 와 interleukin-1 $\beta$ 의 분비와 발현에 미치는 영향에 대한 연구발표<sup>7,30)</sup>에 이어, M11C가 비장 대식세포 작용에 미치는 영향과 sarcoma-180(S-180)에 유발된 carcinoma에 미치는 영향을 연구하였다.

## 재료 및 방법

**시약, 실험 동물 및 세포주** - 세포의 배양을 위하여 배양액 RPMI-1640과 MEM, fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 각종 culture plate들, flask들, 그리고 각종 tube들은 Falcon(Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하였다. TNF- $\alpha$  검사를 위한 ELISA kit 및 immunoblotting을 위한 각종 항체는 Chemicon (Temecula, CA, USA)으로부터 구입했다. RT-PCR을 위한 시약은 Takara(Otsu, Shiga, Japan)로부터 구입했다. Chloroform, hexane, methanol, ethanol, isopropanol을 비롯한 각종 유기용매들은 Merck(Berlin, Germany)로부터 구입했다. 본 실험에서 사용된 각종 mouse들은 대한실험동물 센터(음성, 충북)로부터 분양받아 항온 항습실에 사육하면서 실험하였다. 비장 대식세포의 추출을 위해 Balb/c mouse를 사용하였으며, 실험에 사용된 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA)로부터 분양받은 S-180(ATCC TIB 66)이었다.

**겨우살이로부터 M11C 추출** - 실험에 이용된 겨우살이로부터 M11C 추출에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였다.<sup>30)</sup> 간단히 설명하면, 겨우살이 500 g을 증류수에 넣고 약한 불로 끓인 후, 믹서기(솔잎 82A, 대구)로 분쇄하였다. 그리고 난 뒤 교반기(제일과학, 서울)를 사용해 저속으로 교반하였다. 그 후 30분간 원심분리(20,000 g, Rotor A6.14, Kontron, Italy)한 후, 얻은 상등액을 chloroform 및 hexane을 처리하여 탈지시킨 용액을 얻었다. 이 용액을 여과막(60  $\mu$ m~0.45  $\mu$ m; Millipore, Bedford, MA 01730, USA)을 통과한 후 동결건조하여 갈색분말을 얻었다(이하 M11C이라 칭함). M11C내의 LPS 잔유량 검사는 Limulus ES II kit(Wako, Osaka, Japan)로 검사하였으며, 잔유량은 42 endotoxin units(EU)/m<sup>3</sup>이었다(data not shown). 유럽국가에 있어 시약에 LPS 잔유량 허용범위는 350 EU/m<sup>3</sup>인데,<sup>20)</sup> 본 M11C는 허용범위의 1/8 이하에 불과해 추후 실험에 아무런 문제가 없었다.

**Mouse로부터 비장 대식세포의 추출 및 자극** - 7 주령의 Balb/c mouse(대한실험동물센터, 음성)를 경추탈골해서 희생시킨 후, 비장을 무균상태에서 회수하여 cold incomplete RPMI-1640 medium((100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신 추가, Gibco, USA)로 2회 씻은 후, cold incomplete RPMI-1640 medium을 첨가하여 Daunce 균질기(Wheaton, USA)로 비장을 약하게 분쇄한 후 얼음물에 10분간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 상층만 수집하여 원심분리(1000 g, 5분, 4°C)한 후 상등액을 버리고 세포를 얻었다. 오염된 적혈구는 hypotonic buffer로 lysis한 후 제거하였다. 그 다음 RPMI-1640으로 24 well plate에 splenocytes를 plating하였다. 순수한 비장 대식세포를 모으기 위해 1시간 정도 배양한 후 비장 대식세포가 붙었는지 확인하고, 다른 종류의 부유 세포들을 세척하여 제거하였다. 세척한 후 Wright and Giemsa stain법으로 염색했을 때 대식세포의 순수도는 98% 이상이었다(data not shown). M11C로 자극하기 전에 비장 대식세포 plate를 incomplete RPMI-1640 medium으로 2회 씻어낸 후, serum free RPMI-1640 medium(+penicillin-streptomycin, +L-glutamine)을 1 ml씩 주입하였다. 비장 대식세포에 M11C를 첨가한 후, 37°C에서 각각의 시간 동안 자극시켜 얻은 MSCM을 실험할 때까지 -20°C에 보관하였다.

**Sandwich ELISA** - TNF- $\alpha$  분석용 ELISA kit(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 검사하였는데 간단히 설명하면 다음과 같다. TNF- $\alpha$  standard와 MSCM을 96 well (precoated with rat anti-mouse TNF- $\alpha$ )에 100  $\mu$ l씩 넣었다. 그리고 난 후, primary antibody인 rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ 를 첨가하여 혼합한 뒤, 항온에서 배양한 후 buffer로 씻어내었다. 이 후에 second antibody인 goat anti-rabbit conju-

**Table I.** Primers used in RT-PCR

Target mRNA	Primer sequences	Product size (bp)
TNF- $\alpha$	sense: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	286
	anti-sense: 5'-CATTCGAGGCTCCAGTGAATTCCAG-3'	
$\beta$ -actin	sense: 5'-GGAGAAGATCTGGCACACACC-3'	840
	anti-sense: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'	

gated alkaline phosphate를 well에 첨가한 후 배양하였다. 배양 후 wash buffer로 씻어낸 후, 조심스럽게 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 후 color reagent를 각 well에 넣고, 각 well 별로 차별성이 있는 주황색이 나타나면 stop solution를 넣어 색깔반응을 고정시키고, 490 nm에서 ELISA reader (Bio-Tek, Highland park, Vermont, USA)로 측정하여 TNF- $\alpha$ 의 양을 분석하였다.<sup>17)</sup>

**Western blotting** – MSCM을 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 nitrocellulose membrane(NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. NC는 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)에 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, TBS-T buffer를 siliconized bottle에 넣고 여기에 rabbit anti-murine TNF- $\alpha$  polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 NC를 siliconized bottle에 넣고 hybridization incubator(Robbins; CA, USA; speed 10 rpm)에서 incubation하였다. 그 후, TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 hybridization incubator에서 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 ECL(peroxidase substrate, Amersham, USA)을 NC에 잘 섞은 후 배양하였다. 그 후, 암실(10W safety lamp; Kodak; USA)에서 NC가 들어있는 cassette에 X-ray film을 넣고 감광시킨 후 X-ray film을 developing, washing, fixing, washing 순서과정을 거친 후 TNF- $\alpha$  band의 크기와 강도를 분석하였다.<sup>30)</sup>

**역전사 중합연쇄 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction)** – 비장 대식세포로부터 역전사 중합 연쇄 반응(RT-PCR)은 역전사 kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan) 및 중합연쇄반응 kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다.<sup>17)</sup> 간단히 설명하면, TRISOL(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 total RNA의 추출하였다. Total RNA를 역전사 반응액과 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액과 혼합하여 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -actin의 RT-PCR 증폭산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1%

agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열 및 증폭산물의 크기는 Table I에 나타내었다.<sup>31)</sup>

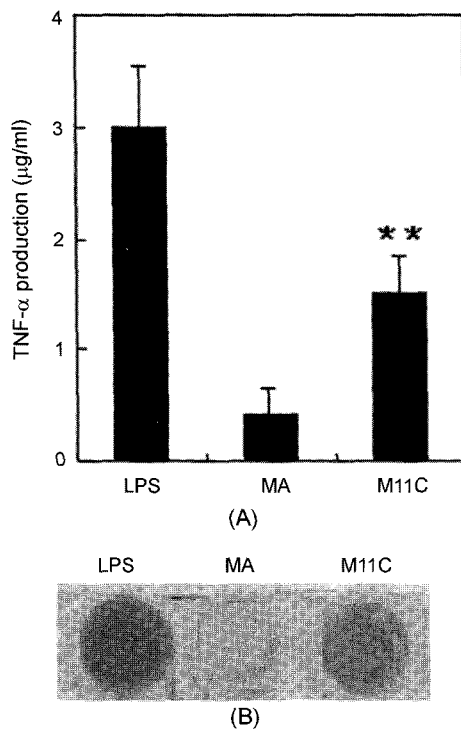
**육종암의 크기 변화 관찰과 종양부위의 조직 검사** – M11C를 육종암 유발 30일 전부터 2일에 한번씩 1 ml(5  $\mu$ g/ml in saline)을 육종암 유발 후 30일까지 복강 주사한 mice group과 M11C 대신 복강에 saline을 투여한 mice group에 있어서 종양성장에 따른 각종 변화를 정상 mice group과 비교 검사하였다. 본 실험에 사용되어진 mice는 6 주령 Balb/C (대한 실험동물센터, 음성) 수컷들이었다. 육종암을 유발하기 위해 Balb/C mouse 유래의 육종암 세포주인 S-180을 복강 내 주사하여 복수형 암을 유발시켜 생체내 계대배양하여 nonimmunogenic한 상태를 만들어 복수형암( $3 \times 10^8$ /ml) 100  $\mu$ l를 mouse의 후족 서해부 상부 및 등에 피하 주사하였다. 2일에 한번씩 종양의 직경크기((장경+단경)/2)변화와 M11C를 투여한 후 7~30일에 종양사진 촬영, 종양부위의 조직검사를 하였다. 종양의 크기는 calibrator(Mitotoyo, Japan)로 측정하였다. 그리고 조직검사는 M11C 투여 25일 후에 mouse를 희생시켜 암조직 부위를 적출하여 slide에 smear한 후 헤마톡실린에 오진 염색법을 이용하여 종양의 진행정도를 관찰하였다.

**성숙 mouse의 성장발육에 미치는 영향검사** – M11C의 안전성 검사의 일환으로 성숙 mouse의 성장발육에 미치는 영향을 조사하였다. 간단히 기술하면 M11C를 300  $\mu$ g/ml 농도가 되도록 0.01 M PBS에 녹여 생후 7 주령 수컷 mouse의 복강 내 주사하였으며, 반면에 대조군은 0.01 M PBS를 복강 내에 주사하였다. 한 그룹당 mouse 5마리로 하였으며, 3번의 독립된 실험을 실시하였다.

**통계 처리** – 실험성적은 평균 또는 mean $\pm$ SD로 나타냈으며, 각 group 간의 통계학적 검정에는 PC-SAS 혹은 Excel 프로그램을 이용하여 T-검정하였다. *p* 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 있는 값으로 간주하였다.

## 결 과

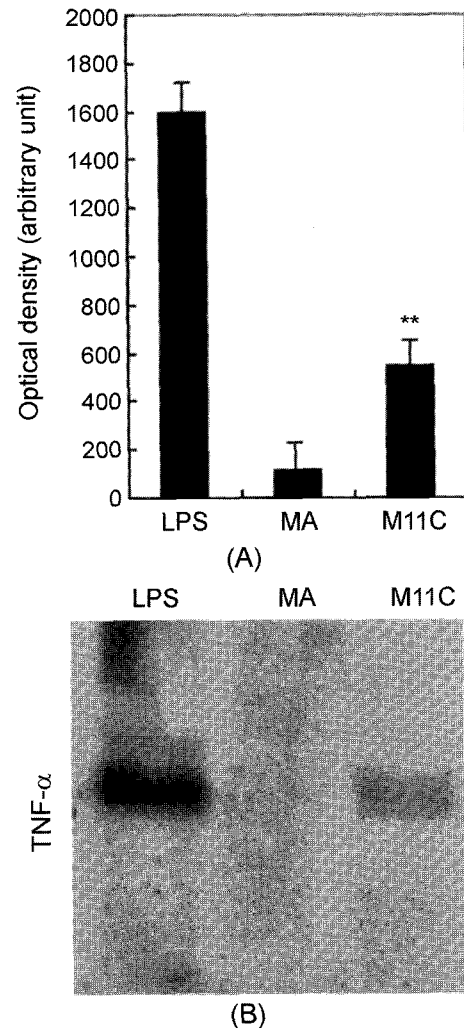
**M11C의 비장 대식세포로부터 TNF- $\alpha$ 의 분비유도 효과** – ELISA 예비실험 결과에서 최대 효과적인 농도가 M11C 20  $\mu$ g/ml이었고, 최대 효과적인 자극시간이 8시간이었다(data not shown). M11C로 비장 대식세포를 자극했을 때 양성 대



**Fig. 1.** ELISA for the measurement of TNF- $\alpha$  in conditioned media obtained from LPS, medium alone (MA), or Korean mistletoe extract (M11C) stimulated splenic macrophages. (A) The upper panel represents the densitometric analysis of the ELISA photograph, and each bar represents mean $\pm$ SD of three replicates within one of three independent experiments (\*\* $p$ <0.01, MA vs M11C). (B) The lower panel represents the photograph of ELISA, and this result is one of three independent experiments. LPS was used for positive control.

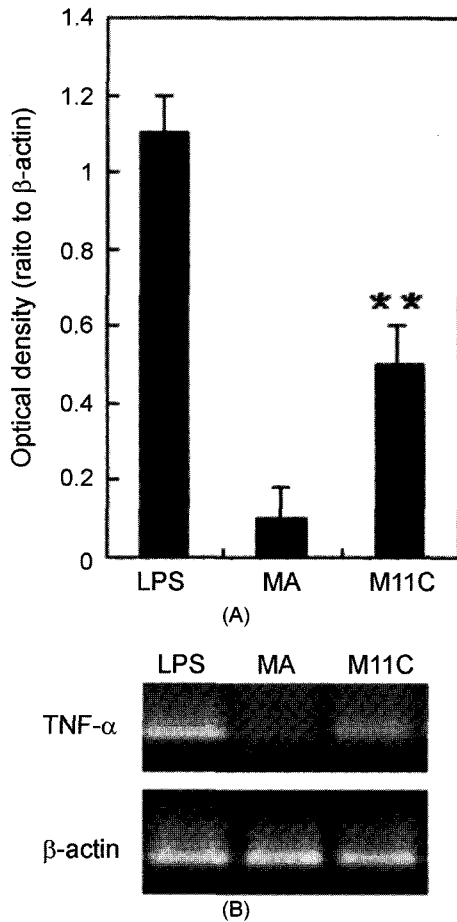
조군으로 사용한 LPS(1  $\mu$ g/ml) 보다는 TNF- $\alpha$ 를 적게 분비 했지만, medium alone group 보다는 유의하게 큰 차이로 TNF- $\alpha$ 가 더 많이 분비됨을 보여 주었다( $p$ <0.01; Fig. 1A, 1B). 이러한 실험 결과를 다시 한번 더 검증하기 위한 immunoblotting 실험결과에서도 M11C로 대식세포를 자극했을 때 TNF- $\alpha$ 가 medium alone group 보다 더 많이 분비된다는 사실을 입증해 주었다( $p$ <0.01, Fig. 2A, 2B).

**M11C의 대식세포로부터 TNF- $\alpha$  전사유도 효과** - M11C가 비장 대식세포를 자극해서 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 한다는 것을 앞의 여러 실험결과(Figs. 2~3)에서 밝혔다. 이러한 TNF- $\alpha$  분비가 유전자 발현과 어떠한 상관관계를 가지고 있는지 알기 위해 실험을 수행한 결과 TNF- $\alpha$  유전자발현 변화양상은 TNF- $\alpha$  분비와 비슷한 양상을 보여 주었다. 즉, M11C로 비장 대식세포를 자극했을 때 양성 대조군으로 사용한 LPS (1  $\mu$ g/ml) 보다는 TNF- $\alpha$  mRNA를 적게 발현했지만, medium alone group 보다는 유의하게 큰 차이로 TNF- $\alpha$  mRNA가 더 많이 발현됨을 보여 주었다( $p$ <0.01; Fig. 3A, 3B).



**Fig. 2.** Immunoblot analysis of conditioned media obtained from LPS, medium alone (MA), or Korean mistletoe extract (M11C) stimulated splenic macrophages using polyclonal antibody of rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$ . LPS was used for positive control. (A) The upper panel represents the densitometric analysis of the immunoblot photograph, and each bar represents mean $\pm$ SD of four replicates within one of two independent experiments (\*\* $p$ <0.01, MA vs M11C). (B) The lower panel represents the photograph of immunoblot, and this result is one of two independent experiments.

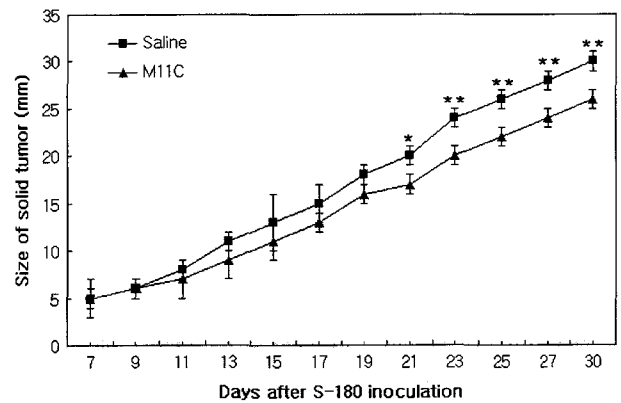
**Sarcoma-180으로 유도된 육종암의 성장지연에 미치는 영향** - Saline을 투여한 group에 있어서 S-180에 의한 육종암을 유발시킨 후 사흘째부터 암괴의 형성을 관찰할 수 있었으며(data not shown), 7일 후에는 종양 직경이 약 5 cm 정도였다(Fig. 4). 투여 12~17일째까지는 대조군 saline 투여군과 비교군 M11C 투여군에 있어 종양의 크기에 있어 유의한 차이가 없었다(Fig. 4). 21일째부터는 종양의 크기에 있어 M11C 투여군이 saline 투여군보다 종양 크기가 유의한 차이로 더 작음을 보여 주었다( $p$ <0.05 혹은  $p$ <0.01). 즉



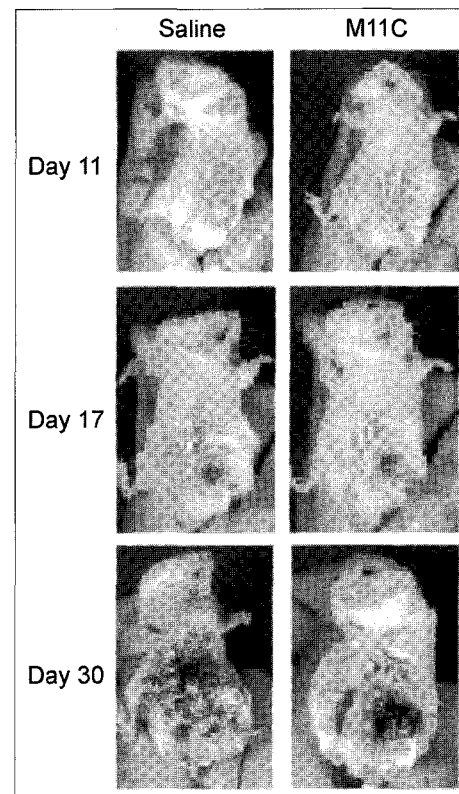
**Fig. 3.** The effect of Korean mistletoe extract (M11C) on the expression of TNF- $\alpha$  mRNA from splenic macrophages. Expression of mRNA was detected by RT-PCR. Equivalent quantities of mRNA were used since similar amounts of  $\beta$ -actin were expressed in each specimen. LPS and medium alone were used for positive and negative control, respectively. (A) The upper panel represents the densitometric analysis of the gel photograph and each bar represents mean $\pm$ SD of four replicates within one of three independent experiments (\*\* $p$ <0.01, MA vs M11C). (B) The lower panel represents gel photograph of PCR-amplified cDNA from TNF- $\alpha$  and DNA competitor  $\beta$ -actin, and this result is one of three independent experiments.

M11C가 종양성장을 저해함을 암시했다. 30일째 이르러 saline 투여군에 있어서는 몸 전체에 암괴가 퍼져 죽기 시작하였다. 반면에 M11C를 투여한 group에서는 하루 늦게 암괴가 나타났으며, 또한 10일 정도 더 수명연장을 시켰다(그룹별 평균수명일; saline 투여그룹 vs M11C 투여그룹 =31 $\pm$ 7 vs 41 $\pm$ 5).

**종양부위의 조직세포의 괴사 억제에 미치는 영향** - M11C 투여 25일 후 종양부위에 대한 조직검사 비교에 있어 정상 쥐 그룹, saline 투여 그룹, M11C 투여 그룹의 표본을 사

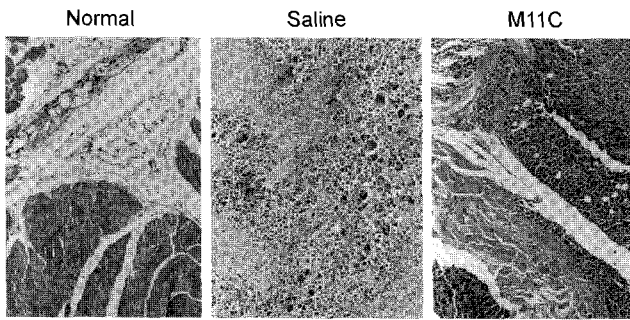


**Fig. 4.** The inhibitory effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on tumor growth. Each bar represents mean $\pm$ SD of six replicates within one of two independent experiments (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, saline vs M11C). Saline was used for control.

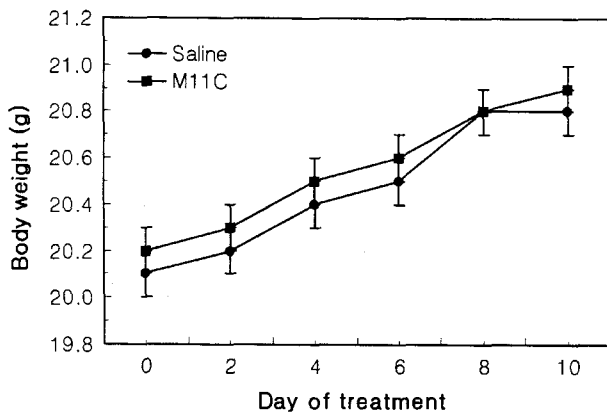


**Fig. 5.** The photograph of S-180 inoculated muscle sarcoma cancer at 30 days after treatment of saline and Korean mistletoe crude extract (M11C) to mouse. Saline and M11C represent treatment of saline and M11C to mouse, respectively.

용하였다. Saline 투여 그룹의 종양조직은 거의 괴사된 상태인데 반해 M11C 투여 그룹은 saline 투여 그룹에 비해 많은 부분이 정상을 유지하는 상태였으며 괴사를 억제시켰다 (Fig. 5). 이러한 조직검사 결과가 종양 진행속도를 대변하는 종양 크기 변화의 결과와 많은 상관관계를 가졌다(Figs.



**Fig. 6.** An inhibitory effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on tumor progression 25 days after treatment of the S-180 cancer cell to mouse. Tissues were from normal mouse (Normal), saline-treated mouse (Saline), and M11C-treated mouse (M11C).



**Fig. 7.** The effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on the body weight of mature mouse. Three experiments were carried out with five replicates.

4-5). 이러한 조직괴사 억제효과(tissue necrosis inhibition)는 암세포에 대한 한국산 겨우살이 비렉틴 물질인 M11C의 종양 억제효과 현상 중 하나라고 생각한다.

**성숙 mouse의 체중에 미치는 영향** - M11C가 성숙한 mouse 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알기 위해 성숙한 mouse의 체중증감조사를 실시하였다. M11C 투여군이 PBS 투여군보다 유의한 차이로 증가되지 않았으나 체중이 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7). 신체발육에 유해한 독성 영향을 미치지 않고 조금이나마 체중 증가 영향을 미치는 경향이 있는 것으로 유추되었다.

### 고 찰

유럽산 겨우살이나 한국산 겨우살이에 대한 연구에 있어서, 당단백질인 렉틴에 대한 연구가 많이 보고되었다.<sup>1-12)</sup> 이에 본 연구는 겨우살이가 일부 한약탕제에 사용되고 있다는 점을 감안하여, 한국산 겨우살이로부터 열에 약한 단백

질 성분이 아닌 열에 의해서도 약리효능을 지니는 물질들을 분리하여 면역학적 효능을 밝히고자 하였다. 이 목적을 위한 연구 접근 중 하나가 비장 대식세포로부터 TNF- $\alpha$  분비효과를 알기 위한 것이었다. 한국산 겨우살이 렉틴인 KML이 적혈구 응집반응을 보이는데 반해 한국산 겨우살이를 열탕 추출 후 일부 용출된 지용성 물질을 제거한 추출물인 M11C는 겨우살이 렉틴이 가지는 적혈구 응집작용을 가지지 않았다.<sup>17)</sup> 그래서 M11C를 겨우살이 비렉틴 물질로 칭하기로 하였다.<sup>17,30)</sup> 본 실험에 사용된 비렉틴(non-lectin) 성분인 M11C가 복강 대식세포를 활성화해 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 분비한다는 것을 발표하였다.<sup>17,30)</sup> 대식세포가 활성화할 때 TNF- $\alpha$ 를 비롯한 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12가 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다.<sup>32,33)</sup> 본 연구에서는 M11C로 비장 대식세포를 자극했을 때 TNF- $\alpha$ 가 생산 분비된다는 것을 검사하기 위해 ELISA, immunoblotting, RT-PCR 기법들을 이용하였다. ELISA 실험기법에서 M11C 20  $\mu$ g/ml로 6시간 동안 비장 대식세포를 자극한 그룹이 자극하지 않았던 그룹보다 TNF- $\alpha$ 가 유의한 차이로 많이 분비되었음을 보여주었다(Fig. 1). 이러한 TNF- $\alpha$  분비에 대한 ELISA 실험결과를 다시 한번 더 확실하게 하기 위해 immunoblotting 실험기법을 이용하였다. 이 실험결과, ELISA 기법에서 얻은 결과처럼 M11C가 비장 대식세포를 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 가 분비됨을 확증해 주었다(Fig. 2). 겨우살이 렉틴이 면역세포로부터 각종 cytokine을 생산 분비하게 하는 기전은 면역세포표면의 당과 결합으로 인한 작용이라 제안하고 있다.<sup>34)</sup> 그러나 렉틴이외의 겨우살이 물질들에 대한 작용기전은 잘 밝혀지지 않았다. 비장 대식세포가 M11C의 자극을 받아 TNF- $\alpha$ 를 분비하기까지 signal transduction에 의해 세포내 여러 작용기전들에 의해 여러 전사조절 물질들을 활성화시킬 것이라 유추되었다. TNF- $\alpha$  mRNA의 전사는 TNF- $\alpha$  단백질 분비보다 2시간 정도 빨리 전사의 peak를 보인다는 보고가 있다.<sup>17)</sup> M11C 자극에 의해 TNF- $\alpha$  단백질분비와 같이 양성 대조군으로 사용된 LPS 보다는 M11C가 TNF- $\alpha$  mRNA를 더 적게 발현시켰지만 비교구인 medium alone 그룹보다는 유의한 차이로 더 많이 발현시켰다(Fig. 3). 이러한 TNF- $\alpha$  전사와 분비기전의 양상은 어떠한 signal transduction 인자가 관련되어 있는지에 대해서는 추후 심도 있는 다른 연구 과제들을 요구하고 있다. TNF- $\alpha$ 는 대식세포가 분비하는 주요한 cytokine이며, anticancer 작용을 가지고 있다.<sup>23-26)</sup> 본 실험에서 M11C가 S-180으로 유도된 육종의 증식을 저해했으며 또한 조직괴사 억제효과를 보였다(Figs. 4-6). 이 결과는 M11C가 암 예방 효과와 암의 진행속도를 느리게 하는 효과가 있다고 예측할 수 있게 했다. 이러한 M11C의 항종양 효과는 직접적인 효과가 아니라(data not shown),

간접적인 효과였다. 이러한 M11C의 간접효과 중에는 비장 대식세포로부터 TNF- $\alpha$  분비도 한 부분을 차지하고 있음을 시사하고 있다. 결론적으로, 한국산 겨우살이 열탕 추출물인 비렉틴(non-lectin) 구성성분인 M11C가 비장 대식세포를 활성화하며 항암효과가 있음을 강하게 제시하였다. 본 실험결과에 의한 이러한 제안은 겨우살이 추출물이 항암효과가 있다는 보고에 의해 입증되고 있다.<sup>35-37)</sup> 그리고 약물이 체중증가에 미치는 영향은 안전성검사에 좋은 잣대로 이용되고 있다.<sup>38,39)</sup> 겨우살이 추출물인 M11C가 10일 이상 투여해도 체중감소와 같은 부작용이 나타나지 않은 것으로 보아(Fig. 7) 앞으로 더 많은 독성 검사를 해야겠지만 일단 성장에는 독성이 없는 것으로 보인다. 본 연구는 겨우살이가 면역활성효능을 얻기 위한 한약탕제로 별 부작용 없이 사용할 수 있음을 시사하는 실험결과였다. 그러나 추후 더욱 더 많은 연구를 수행해서 M11C 구성물질 중 어떠한 단일 물질이 면역활성화에 주로 기여하는 지를 알아내야 하는 과제를 남겨 놓고 있다.

## 결 론

한국산 겨우살이를 열탕 추출 후 지용성 물질을 제거한 추출물인 M11C (20  $\mu\text{g}/\text{m}$ )로 비장 대식세포를 자극했을 때 TNF- $\alpha$ 가 생산 분비되었고( $p < 0.01$ ), 비교구인 medium alone 그룹보다는 TNF- $\alpha$  mRNA를 유의한 차이로 더 많이 발현시켰다( $p < 0.01$ ). 항암효과 실험에서 M11C가 S-180으로 유도된 육종의 증식을 저해했으며( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), 또한 조직괴사 억제효과를 보였다. M11C의 성장발육에 미치는 영향 검사에서, 10일 이상 투여해도 체중감소와 같은 부작용이 나타나지 않았다. 본 실험결과들은 겨우살이가 면역활성효능을 얻기 위한 한약탕제로 별 부작용 없이 사용할 수 있음을 시사하였다.

## 사 사

이 논문은 과학기술부 지정 지역협력 연구센터인 건국대학교 바이오 식·의약 연구센터의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

## 인용문헌

1. Tabiasco, J., Pont, F., Fournie, J. J., and Vercellone, A. (2002) Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* May; **269**(10): 2591-600.
2. Stein, G. M., Bussing, A., and Schietzel, M. (2002) Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 *in vitro*. *Anticancer Res.* Jan-Feb; **22**(1A): 267-74.
3. Klein, R., Classen, K., Berg, P. A., Ludtke, R., Werner, M., and Huber, R. (2002) *In vivo*-induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. *Eur. J. Med. Res.* Apr 30; **7**(4): 155-63.
4. Kuehn, J. J. and Kovacs, E. (2002) Lectin compared to mistletoe use: experimental therapy form with preclinically verified risk potential. *Dtsch Med Wochenschr.* Dec 6; **127**(49): 2637.
5. Hostanska, K., Vuong, V., Rocha, S., Soengas, M. S., Glanzmann, C., Saller, R., Bodis, S., and Pruschy, M. (2003) Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br. J. Cancer.* 2; **88**(11): 1785-92.
6. Pae, H. O., Oh, G. S., Seo, W. G., Shin, M. K., Hong, S. G., Lee, H. S., and Chung, H. T. (2001) Mistletoe lectin synergizes with paclitaxel in human SK-hep1 hepatocarcinoma cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **23**(4): 531-40.
7. Park, C. H., Lee, D. W., Kang, T. B., Lee, K. H., Yoon, T. J., Kim, J. B., Do, M. S., and Song, S. K. (2001) cDNA cloning and sequence analysis of the lectin genes of the Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Mol. Cells.* 31; **12**(2): 215-20.
8. Pae, H. O., Oh, G. S., Kim, N. Y., Shin, M. K., Lee, H. S., Yun, Y. G., Oh, H., Kim, Y. M., and Chung, H. T. (2001) Roles of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in apoptosis of human monoblastic leukemia U937 cells by lectin-II isolated from Korean mistletoe. *In Vitro Mol Toxicol.* **14**(2): 99-106.
9. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Her, E., Kim, S. H., Kim, K., Azuma, I., and Kim, J. B. (2001) Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Int. Immunopharmacol.* **1**(5): 881-9.
10. Kim, M. S., So, H. S., Lee, K. M., Park, J. S., Lee, J. H., Moon, S. K., Ryu, D. G., Chung, S. Y., Jung, B. H., Kim, Y. K., Moon, G., and Park, R. (2000) Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album var. coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen. Pharmacol.* **34**(5): 349-55.
11. Lyu, S. Y., Park, W. B., Choi, K. H., and Kim, W. H. (2001) Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album var. coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **65**(3): 534-41.
12. Lyu, S. Y., Park, S. M., Choung, B. Y., and Park, W. B. (2000) Comparative study of Korean (*Viscum album var.*

- coloratum) and European mistletoes (*Viscum album*). *Arch. Pharm. Res.* **23**(6): 592-8.
13. Edlund, U., Hensel, A., Frose, D., Pfuller, U., and Scheffler, A. (2000) Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Arzneimittelforschung* Jul; **50**(7): 645-651.
  14. Mueller, E. A. and Anderer, F. A. (1990) A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer. Immunol. Immunother.* **32**(4): 221-227.
  15. Krzaczek, T. (1977) Pharmacobotanical research of the subspecies *Viscum album* L. IV. acids and amines. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]*. **32**: 281-291.
  16. Khwaja, T. A., Varven, J. C., Pentecost, S., and Pande, H. (1980) Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album*, *Coloratum*. *Experientia*. **15**; **36**(5): 599-600.
  17. Kang, T. B., Chae, D. J., Chang, S. H., Mun, S. H., Kim, J. B., and Her, E. (2000) The effect of Korean mistletoe extract M11C (Non-lectin components) on TNF- $\alpha$  release and expression from macrophages. *Korean J. Immunol.* **22**(4): 207-215.
  18. Stein, G. M. and Berg, P. A. (1997) Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: *in vitro* studies. *Anticancer Drugs*. **8** Suppl **1**: S39-42.
  19. Jordan, E. and Wagner, H. (1986) Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology*. **43** Suppl **1**: 8-15.
  20. Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Fahlbusch, B., and Suss, J. (1985) The *in vitro* activity of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells. *Immunobiology* **169**(5): 461-71.
  21. Johnston, R. B. (1988) Current concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* **318**: 747-752.
  22. Metlay, J. P., Pure, E., and Steinman, R. M. (1989) Control of the immune response at the level of antigen presenting cells: A comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv. Immunol.* **47**: 45-116.
  23. Rietschel, E. T. and Wagner, H. (1996) Pathology of septic shock. Springer-Verlag, pp.146-147.
  24. Beutler, B. and Cerami, A. (1987) Cachectin : more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* **316**: 379.
  25. Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., and Goeddel, D. V. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**: 724.
  26. Le, J. and Vilcek, J. (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest* **56**: 234-248.
  27. Mary, J. B., Michael, J. W., Thomas, W. M., and Michael, P. M. (1991) Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J. Immunol. Methods* **140**: 15-22.
  28. Feinman, R., Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., and Vilcek, J. (1987) Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol.* **138**: 635.
  29. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J., and Schreiber, H. (1986) Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 5233.
  30. Chang, S. H., Jun, M. H., Kang, T. B., Mun, S. H., Lee, J. H., Seong, N. S., Lee, S. T., Kim, J. B., and Her, E. (2001) The effect of Korean mistletoe extract M11C (non-lectin components) on IL-1 $\beta$  release and expression from macrophages. *Immune Network* **1**(2).
  31. Farrar, J. D. and Street, N. E. (1995) A synthetic standard DNA construct for use in quantification of murine cytokine mRNA molecules. *Mol. Immunol. Sep*; **32**(13): 991-1000.
  32. Dinarello, C. A. (1989) Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* **44**: 153-205.
  33. Gery, I., Gershon, R. K., and Waksman, B. H. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J. Exp. Med.* Jul **1**; **136**(1): 128-142.
  34. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P., and Anton, R. (1996) Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* Dec **3**; **109**(1-2): 33-38.
  35. Burger, A. M., Mengs, U., Schuler, J. B., and Fiebig, H. H. (2001) Antiproliferative activity of an aqueous mistletoe extract in human tumor cell lines and xenografts *in vitro*. *Arzneimittelforschung* **51**(9): 748-57.
  36. Boneberg, E. M. and Hartung, T. (2001) Mistletoe lectin-1 increases tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated whole blood via inhibition of interleukin-10 production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**(3): 996-1000.
  37. Zarkovic, N., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, M., and Mang, S. (2001) An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract isorel. *Cancer Biother Radiopharm.* Feb; **16**(1): 55-62.
  38. Gaal, D. and Hudecz, F. (1998) Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin by conjugation to an immunopotential amphoteric branched polypeptide. *Eur. J. Cancer.* **34**(1): 155-61.
  39. Pal, S., Mukherjea, K., Bhattacharya, R., and Maity, P. (1997) Pt-ATP as an antineoplastic agent in an experimental mice model system. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* **16**(3): 255-60.

(2003년 6월 13일 접수)