

장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)와 누에(*Bombyx mori*) 렉틴의 사이토카인 생성 양상 비교

전경희* · 김세진 · 정시련¹
영남대학교 이과대학, ¹약학대학

Cytokine Expressions with Lectins from *Allomyrina dichotoma* and *Bombyx mori*

Kyung Hee Jeune*, Se Jin Kim, and See Ryun Chung¹

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

Abstract – Lectins from *Allomyrina dichotoma* (ADL) and *Bombyx mori* (BML) were partially purified 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. An assay for cytokine expression was carried out by using reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). mRNA isolated from PBMC(human peripheral blood mononuclear cells) were stimulated with ADL(O.D.=0.2) and BML(O.D.=0.1) for various times(1, 4, 8, 24, 48 and 72 h) and various cytokine mRNA assessed by RT-PCR were shown as follows: The patterns of bands for IL-1 mRNA of BML were very similar with those from ADL and these bands were decreased along the increasing reaction times after showing a strong band at 1 h. However mRNA expressions for IL-2, IL-6, IFN γ and TNF α showed different patterns between ADL and BML. With the effect of ADL, the expression of IL-2 and IL-6 mRNA were continuously detected until 72 h with the strongest band of IL-2 mRNA at 24 h. The strong bands of IFN γ mRNA were observed from 4 to 8 h but the strongest one of TNF α was just observed at 1 h. Meanwhile with BML, the bands for IL-2 and IFN γ were increased along the increasing reaction times until 72 h. The strongest bands were showed from 4 to 8 h with IL-6 and at 8 h with TNF α . To verify quantitatively ELISA was used for assay of protein secretions of the cytokine gene with IL-2 and IFN γ expressed markedly different in RT-PCR. The highest cytokine secretion for IL-2 was demonstrated at 48 h. The production of IFN γ was markedly increased at 24 h and secreted highest at 72 h. These result suggest that ADL and BML, as inducers of cytokines, can elicit detectable cytokine mRNA from PBMC within the first few hours of stimulation and maintain the production of cytokines for a few days by the methods of RT-PCR and ELISA.

Key words – lectin, *Allomyrina dichotoma*, *Bombyx mori*, cytokine, immunomodulator

렉틴은 당과 결합하는 당단백질로서, 식물에서부터 미생물, 무척추동물, 하등 척추동물과 같은 많은 유기체에서 발견되어지고, 세포간의 상호작용 및 숙주와 병원체간의 상호작용과 같은 수많은 세포작용에 관여하고 있음이 밝혀졌으며 현재 다수의 렉틴이 상품화되어 이용되고 있다.^{1,2)} 이러한 연구는 국내에서도 많이 이루어지고 있는데, 식물종자인 녹두, 강낭콩 뿐만 아니라 수종의 버섯류, 해양무척추동물, 장수풍뎅이와 같은 곤충에 이르기까지 다양하게 연구되어지고 있다.³⁻⁷⁾

렉틴은 세포막의 구조연구, 세포분열 촉진효과 등의 생물

화학적 연구와 함께 면역학적인 연구, 항암효과 등에 이용되어지고 있는데,⁸⁾ 예를 들면 표고버섯 렉틴과 별불가사리 렉틴은 암세포에 대한 응집효과 및 복수암에 대한 항암효과를 나타낸다고 밝혀졌으며,⁹⁻¹¹⁾ 이외 겨우살이 렉틴성분의 항암효과에 대해서도 *in vivo* 및 *in vitro*에서의 수많은 연구가 국내외적으로 이루어지고 있다.^{12,13)}

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 감염 반응을 중재하고, 표적 세포의 수용체와 결합함으로써 그 기능을 나타낸다. 사이토카인은 자극 받은 세포로부터 단시간에 mRNA 전사를

*교신저자(E-mail) : khjeune@yumail.ac.kr
(FAX) : 053-810-4618

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 한 종의 사이토카인이 다른 사이토카인의 합성에 영향을 주는 인자로 작용할 수 있으며, 다른 사이토카인의 기능에도 영향을 주어 상승작용, 길항작용이 가능하다.^{14,15)}

본 실험에서는 전보에서 면역증강효과를 보고한 바 있는 장수풍뎅이유충 렉틴⁷⁾과 당뇨병치료제로 알려져 많은 연구가 되고 있으며 이미 혈림프와 견사샘으로부터 렉틴성분이 확인된 누에나방유충 렉틴^{16,17)}을 이용하여 말초혈액단핵구로부터 면역반응시 중요한 역할을 하는 대표적 다기능 사이토카인인 IL-1, IL-6, TNF α , IFN γ , 그리고 IL-2¹⁸⁾의 발현을 확인하여 면역증강 효과를 비교하고자 하고 한편 ELISA 기법을 이용하여 IL-2와 IFN γ 를 대상으로 양적 확인을 통해 그 결과가 RT-PCR의 결과를 뒷받침해 준다는 것을 입증하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 장수풍뎅이과에 속하는 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충은 제주도에서 구입하여 실험재료로 사용하였고, 누에나방과에 속하는 누에나방(*Bombyx mori*) 유충은 경북 상주시에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

렉틴의 분리 및 정제 - 장수풍뎅이에서 분리한 렉틴(이하 ADL)과 누에에서 분리한 렉틴(이하 BML)은 이미 보고한 전보의 방법과 동일한 방법으로 조직을 파쇄하고 ammonium sulfate로 crude 렉틴을 추출한 후 DEAE Sephadex A-50 column을 통과시켜 가장 응집력이 강한 0.05M의 분획을 모은 시료를 다시 Sephadex G-200 column에 의해서 정제하여 0.1M의 분획을 실험에 이용하였으며, 수집한 분획은 도끼 적혈구를 사용하여 응집력이 가장 강한 것으로 취하였다.

순도확인 - 각각의 정제단계에서 수집한 각 분획에 대하여 전보의 방법⁷⁾에 따라 전기영동에 의해 순도확인을 하였다.

단백질 함량 분석 - Lowry¹⁹⁾ 등의 방법에 따라 소혈청 알부민(BSA)을 표준품으로 사용하였으며, 각각의 시료는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검정곡선으로부터 단백질 함량을 분석하였다.

PBMC의 분리 및 전처리 단계 - Jeune 등²⁰⁾의 방법에 따라 건강한 성인 2인 이상의 혈액을 heparin처리(5~10 IU/ml)하여 채혈한 후, 동량의 생리식염수로 희석하고 이를 Ficoll-paque에 2~3배의 양으로 중첩한 뒤 1,800 rpm으로 30분간 원심분리하였다.

Pasteur pipette을 사용하여 PBMC층을 조심스럽게 걷어내고 생리식염수로 3번 세척하여 10% FBS(fetal bovine

serum)가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시킨 후 세포수를 1×10^6 cells/ml로 조정하였다.

ADL의 사용 농도 결정 및 시간별 반응 - ADL의 경우 전보²¹⁾에 발표된 것을 토대로 사용농도를 정하였고 시간별 반응 또한 반응 시간을 1, 4, 8, 24, 48 및 72 시간의 6단계로 설정하고 각 시간별로 세포를 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하였다.

BML의 사용 농도 결정 및 시간별 반응 - BML을 280 nm에서 흡광도 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005 등의 7단계로 준비하여 Jeune 등¹⁸⁾의 방법에 따라 24 well plate(plat bottom)에 1×10^6 cells/ml로 분주되어 있는 PBMC를 농도별 BML로 각 1시간, 20시간동안 자극시킨 후, 세포들을 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하여 반응 적정 농도를 결정하였고, 결정된 농도(OD=0.1)로 준비한 BML을 각 well 당 100 μ l씩 넣어 반응시키고 37°C의 CO₂ incubator에서 배양하였다 반응 시간을 1, 4, 8, 24, 48 및 72 시간의 6단계로 설정하고 각 시간별로 세포를 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하였다.

mRNA 분리 - 반응시킨 PBMC를 수거하여 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 가라앉은 세포를 취하고, 0.1% DEPC가 첨가된 PBS(phosphate buffered saline)로 3번 세척한 후 TRIzol Reagent를 1 ml 넣어 실온에 5분 동안 정치시켰다. 여기에 chloroform 200 μ l를 첨가하고 7,000 rpm에서 15분간 원심분리를 한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어준 후 실온에서 10분간 정치시켰다. 다시 7,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 RNA pellet은 0.1% DEPC가 첨가된 75% EtOH로 세척하여 건조시키고 3차 증류수로 희석시켜 60°C에 10분간 배양 후 260 nm의 흡광도로 RNA를 정량하여 RT-PCR의 시료 농도(100 μ g/ml)로 조절하였다.

RT-PCR - 100 μ g/ml로 조정된 mRNA 1.5 μ l를 취하여 혼합된 mixture 22.5 μ l(Nuclease-Free Water 15 μ l, AMV/Tfl 5 \times Reaction buffer 5 μ l, dNTP mix 0.5 μ l, 25 mM MgSO₄ 1 μ l, AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ l, Tfl DNA polymerase 0.5 μ l)에 넣고 primer는 50 pM의 upstream, downstream을 각각 0.5 μ l씩 준비하여 넣었다.

먼저 48°C에서 45분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고 94°C에서 2분 동안 반응시켜 역전사효소를 불활성화시킨 후, 94°C에서 30초 동안 불활성화 단계, 55°C에서 1분 동안 증합효소 연쇄 결합반응 단계, 68°C에서 2분간 핵산 증합 단계를 거치는 반응을 30회 실시하고, 68°C에서 7분간 전체의 핵산 증합 반응을 종결시켰다. RT-PCR대상 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ , TNF α 등이고 house keeping gene으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였다. 각 사이토카인과 GAPDH의 primer는 Bank for Cytokine Research (BCR)과 bioneer에서 합성

한 것으로 그 sequence는 다음과 같다.

- GAPDH (250 bp)
(5')5'-GTC ATG AGC CCT TCC ACG ATG C-3'
(3')5'-GAA TCT ACT GGC GTC TTC ACC-3'
- (h)IL-1 α (420 bp)
(5')5'-ACT ACT GGG TGT GCT TGG CAG G-3'
(3')5'-AGG TCT GTG GCT TCT TGT TTC AA-3'
- (h)IL-2 (395 bp)
(5')5'-GCA CCT ACT TCA AGT TCG ACA AAG-3'
(3')5'-AGT TAG TGT TGA GAT GAT GCT-3'
- (h)IL-6 (648 bp)
(5')5'-GCT ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3'
(3')5'-CCC ATG CTA CAT TTG CCG AA-3'
- (h)IFN γ (438 bp)
(5')5'-TGT TAC TGC CAG GAC CCA T-3'
(3')5'-CCA TTA CTG GGA TGC TCT TCG AC-3'
- (h)TNF α (706 bp)
(5')5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC C-3'
(3')5'-CTC CTC ACA GGG CAA TGA TCC-3'

전기영동 - 1.5% agarose gel을 제조하여 100 volt에서 30분간 전기영동을 실시하여 관찰하였다. 완충용액은 0.5 x TBE 용액(tris-borate buffer)을 사용하였고 marker로는 123 bp DNA ladder를 사용하였으며 전기영동이 끝난 후 발색시약인 EtBr(ethidium bromide, 1 μ l/ml)로 10분간 염색하여 UV-Illuminator를 이용하여 이미지 분석을 하였다.

ELISA - 사용적정농도(OD=0.1)로 결정된 BML로 PBMC를 자극시킨 후 시간별로 수거하여 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 세포배양 상층액을 취해 여과시킨 뒤 시료로 준비하였다. ELISA는 sandwich 방법²²⁾으로 실시하였으며 IL-2와 IFN γ 두 종류의 사이토카인을 대상으로 실시하였다.

각각의 사이토카인이 표면 처리된 96 well plate 에 시료를 50 μ l 분주하고 biotinylated antibody를 50 μ l 첨가해 공기를 차단하여 20~25°C에서 30분간 배양시키고, 세척한 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 표준 값에 준하여 농도 값(pg/ml)을 계산하였다.

결과 및 고찰

렉틴의 분리 및 정제 - ADL 정제는 이미 보고⁷⁾된 것과

같이 마지막 정제 단계인 Sephadex G-200의 0.1M 분획에서 가장 순수하고 강한 응집력이 확인되어 시료로 사용되었고, BML도 동일한 정제 방법을 따른 결과 band의 수가 정제단계에 따라 점점 줄어들었으며 마지막 단계의 Sephadex G-200방법으로 column을 통과한 0.1M 분획은 가장 순수하며 또한 강한 응집력을 가진 것으로 확인되어 시료로 사용하였다.

단백질함량 - 누에 유충 100 g을 파쇄하여 염석을 거친 crude 렉틴은 99.01 mg의 단백질이 함유되어 있었고, DEAE Sephadex A-50 column을 통과한 0.05M 분획에서는 3 mg의 단백질, Sephadex G-200의 0.1M 분획에서는 0.84 mg의 단백질이 함유되어 있었다. 이는 전보에 보고된 ADL의 단백질 함량과 비교하였을때, crude 렉틴과 부분 정제된 DEAE Sephadex A-50분획에서는 누에가 보다 낮은 단백질을 함유하고 있었으나 최종 정제된 BML에서는 ADL보다 약 4.7 배 가량 더 많은 순수 단백질이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

농도에 따른 사이토카인 유전자 발현 양상 - ADL은 이전 보고²⁰⁾에서 결정된 최적농도인 흡광도 0.2를 그대로 사용하였다.

BML에 의한 사이토카인의 발현은 각 농도에 따라 다양한 band의 양상을 나타냈다. 1시간 후 PBMC와의 결과는, IL-1의 경우 band의 굵기가 농도에 비례했고, IL-2는 유전자 발현이 흡광도 0.1 이하에서 소멸하였으며, IL-6는 흡광도 0.0005에서 소멸하였다. IFN γ 와 TNF α 는 7단계의 모든 농도에서 고른 band의 양상이 나타났고, 특히 TNF α 는 다

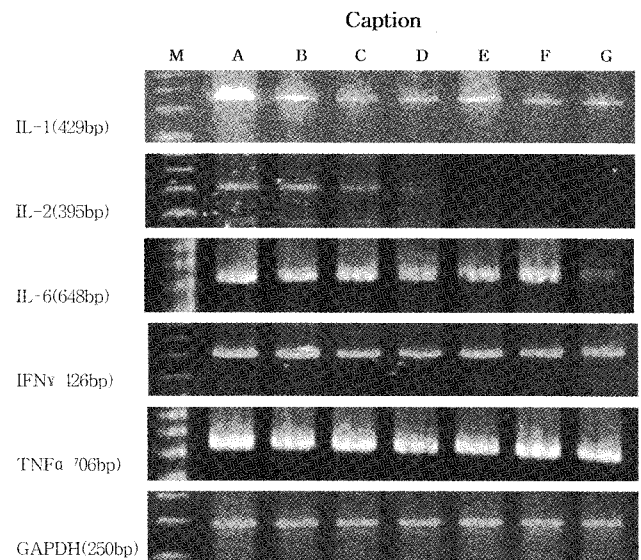


Fig. 1. Dose dependent effects of BML on mRNA expression for various cytokines in PBMC cultured for 1 h. M: 123 bp DNA ladder, A: O.D.=2, B: O.D.=1, C: O.D.=0.5, D: O.D.=0.1, E: O.D.=0.05, F: O.D.=0.005, G: O.D.=0.0005

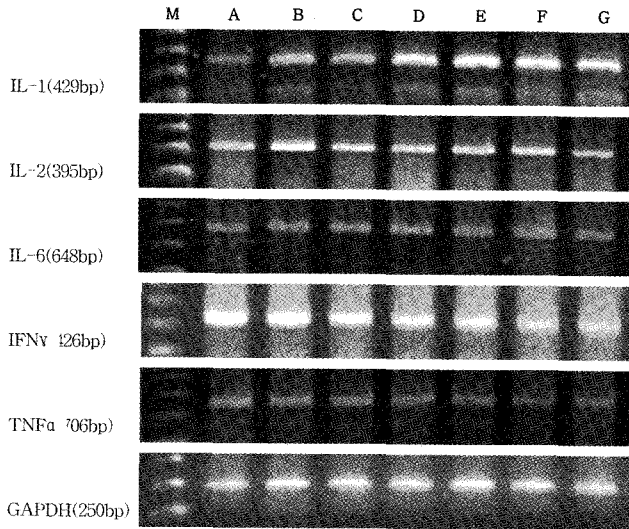


Fig. 2. Dose dependent effects of BML on mRNA expression for various cytokines in PBMC cultured for 20 h. M: 123 bp DNA ladder, A: O.D.=2, B: O.D.=1, C: O.D.=0.5, D: O.D.=0.1, E: O.D.=0.05, F: O.D.=0.005, G: O.D.=0.0005

른 사이토카인에 비해서 매우 강한 유전자 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 20시간 반응 뒤의 관찰에서, IL-1은 1시간 반응시와는 다르게 흡광도 0.05에서 가장 강한 유전자 발현이 나타났으며, IL-2는 흡광도 1에서, IL-6는 0.005, IFN γ 와 TNF α 는 흡광도 2에서 가장 강한 유전자 발현을 나타낼 수 있었다. 그 중에서도 IFN γ 는 다른 사이토카인에 비해 굵은 band를 나타냈다(Fig. 2). 이 실험결과에 따라 BML에 대한 모든 사이토카인 발현의 유도체로서 가장 적절한 농도를 흡광도 0.1로 결정하였다.

결국 PBMC로부터 사이토카인 발현을 유도할 수 있는 적정농도는 ADL과 BML의 경우 매우 유사하다는 것을 확인하였다. 한편 다른 렉틴의 사이토카인 발현유도 적정농도와 비교한 결과 적정농도가 흡광도 3인 LEL(*Lentimus edodes* Lectin)²³과 흡광도 4인 MBL(*Mung Bean, Phaseolus radiatus* Lectin)²⁴에 비해 낮은 농도에서 사이토카인 유전자를 유도할 수 있으며 항암효과가 있음이 밝혀진 바 있는 APL (*Asterina Pectinifera* Lectin)¹⁸과 유사한 농도에서 사이토카인 유전자를 유도하는 것으로 보아 ADL과 BML은 훌륭한 생리활성 물질임이 시사되었다.

반응시간에 따른 사이토카인 유전자 발현 양상 - 흡광도 0.2로 조절된 ADL과 0.1로 조절된 BML을 PBMC에 각각 1시간에서 72시간까지 자극시킨 결과, IL-1의 경우 ADL에 대해서는 반응 8시간까지는 강한 반응을 나타내다가 24시간 이후 감소하였고, BML에 대해서는 24시간 이후 감소하였으나 72시간까지 유지되었다. IL-2, IL-6, IFN γ 와 TNF α 에 대해서는 두 렉틴이 차이를 보였다. 먼저 ADL의 자극에서 IL-2와 IL-6는 72시간까지 고른 band의 양상을 나타

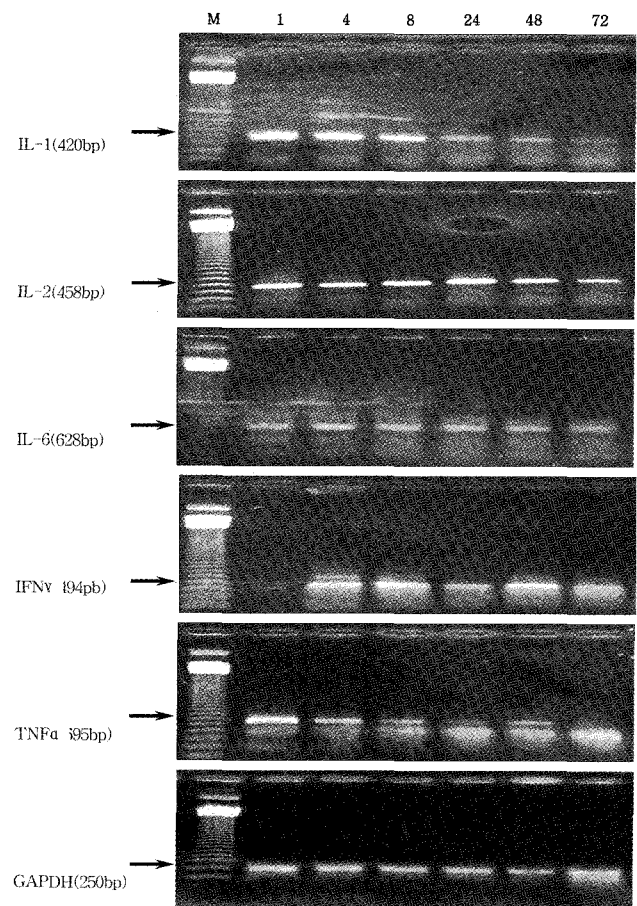


Fig. 3. PCR-assisted amplification of IL-1(420 bp), IL-2(458 bp), IL-6(628 bp), IFN γ (494 bp), TNF α (695 bp) and GAPDH (250 bp) in PBMC according to the increased reaction times with ADL. M: 123 bp DNA ladder(123~4182 bp).²¹⁾

냈고, 그 중에서 IL-2는 반응 24시간에서 가장 강한 유전자 발현을 나타냈다. IFN γ 는 반응 4시간에서 8시간까지 가장 강한 발현을 나타내었고, TNF α 는 반응 초기인 1시간에서 강한 발현을 나타내었으며, 점차 감소하여 48시간까지 유전자 발현을 나타냈다(Fig. 3).

BML에 의한 자극의 경우, IL-2와 IFN γ 의 mRNA 발현은 시간이 지남에 따라 계속 증가하여 IL-2는 72시간에서 가장 강한 유전자 발현을 나타내었고, IFN γ 는 48시간에서 72시간까지 가장 강한 발현을 나타냈다. IL-6는 72시간까지 계속 강한 발현을 나타냈고 그 중에서도 4시간과 8시간에서 가장 강하였다. TNF α 에서는 발현 초기인 1시간에서부터 강한 발현이 나타나 반응 8시간에서 가장 강하였고 이후에는 감소함을 관찰하였다(Fig. 4).

ADL의 자극에서 대체적으로 반응 24시간 이내에 강한 사이토카인 발현이 유도되는 것을 확인하였고, 반면 BML의 경우 IL-2와 IFN γ 는 반응시간이 증가함에 따라 발현이 점점 강해지는 것을 확인하였다. 이것은 ADL과 BML이 염증

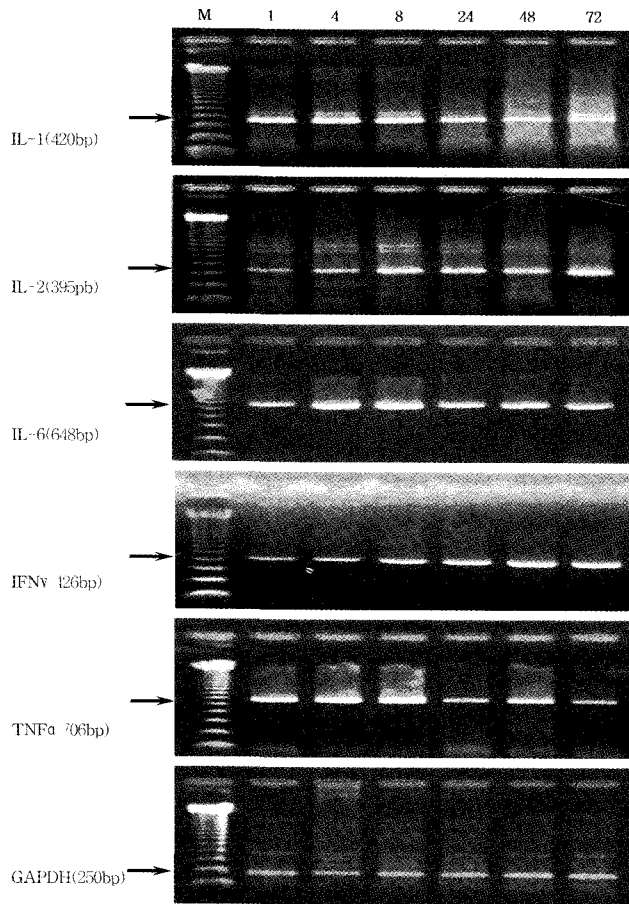


Fig. 4. PCR-assisted amplification of IL-1(420 bp), IL-2(458 bp), IL-6(628 bp), IFN γ (494 pb), TNF α (695 bp) and GAPDH (250 bp) in PBMC according to the increased reaction times with BML. M: 123 bp DNA ladder(123~4182 bp).

성 반응을 유도하는 사이토카인에서는 단시간 반응을 유도 하지만, 적응면역에 관여하는 사이토카인에 관해서는 BML 이 장시간에 보다 강한 유전자 발현을 유도할 수 있는 것으로 해석되었다. 본 실험결과에서 두 렉틴에 의한 TNF α 유전자 발현은 단시간 반응 사이토카인이라는 다른 보고²⁵⁾와 일치하였다.

반응시간에 따른 사이토카인 생성 - BML을 다양한 시간대의 조건에서 PBMC와 반응시켜 ELISA를 이용한 IL-2와 IFN γ 의 사이토카인 생성량을 측정하였다.

BML의 경우 IL-2는 점차적으로 증가해서 반응 48시간대에서 가장 강한 사이토카인 생성능을 나타내고 이후 서서히 감소하였고, IFN γ 는 반응 초기인 1시간에서 8시간까지는 매우 약한 생성능을 나타내다가 반응 24시간에서 급격히 증가해서 반응 48시간에서부터는 10배 이상의 사이토카인 생성능을 나타냈고 72시간에서 가장 강한 생성능을 보였다(Table I).

이미 보고된 ADL의 사이토카인 생성(Table II)⁷⁾과 비교

Table I. Cytokine productions from PBMC stimulated with BML were analyzed by ELISA

| Reaction time (h) | Amount(pg/ml) of cytokine | |
|-------------------|---------------------------|--------------|
| | IL-2 | IFN γ |
| 1 | 24.46 | 24.29 |
| 4 | 29.37 | 20.24 |
| 8 | 34.61 | 26.62 |
| 24 | 42.18 | 106.45 |
| 48 | 66.26 | 1475.71 |
| 72 | 55.39 | 1634.71 |

Table II. Cytokine productions from PBMC stimulated with ADL were analyzed by ELISA⁷⁾

| Reaction time (h) | Amount(pg/ml) of cytokine | |
|-------------------|---------------------------|--------------|
| | IL-2 | IFN γ |
| 1 | 132.43 | 25.82 |
| 4 | 135.83 | 27.04 |
| 8 | 158.48 | 31.84 |
| 24 | 135.21 | 32.81 |
| 48 | 118.85 | 27.73 |
| 72 | 89.13 | 27.54 |

하였을 때, IL-2의 경우 양적으로는 BML이 ADL보다 좀 적었으나 72시간까지 계속됨을 보여 ADL보다 더욱 지속적이었고, IFN γ 의 경우는 BML이 양적으로 ADL보다 생성량이 많았고, 시간적으로도 48시간 이후 72시간에서 엄청난 양이 생성되는 것으로 나타나서 ADL보다 매우 우수한 사이토카인 생성능이 있음이 밝혀졌다.

이상의 결과에서 ADL과 BML 모두 사이토카인의 발현 및 생성 유도물질로서 수행한다는 것을 확인하였고, IL-2와 IFN γ 의 생성능 비교에서 ADL은 시간이 경과함에 따라 생성량이 감소하였으나 BML은 시간이 경과함에 따라 생성량이 증가하여 72시간 이후까지 생성되었고, IFN γ 의 경우 72시간 이후에 폭발적인 IFN γ 의 분비가 확인됨으로써, 장수풍뎅이 유충보다 누에 유충에서 정제한 렉틴인 BML이 더욱 강력한 면역증강 효과가 있는 것으로 시사되었다.

결론

장수풍뎅이유충(*Allomyrina dichotoma*)과 누에나방유충(*Bombyx mori*)에서 추출한 렉틴을 말초혈액 단핵구(PBMC)에 농도별, 시간별로 자극하여 IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ 및 TNF α 등 다섯 종류의 사이토카인 유도능을 역전사 효소 중합반응(RT-PCR)으로 측정하였다. ADL은 흡광도 0.2, BML은 0.1에서 적정농도로 결정하여 1, 4, 8, 24, 48 및 72 시간동안 반응시킨 뒤 관찰된 사이토카인의 발현 양상은 ADL의 경우 IL-1은 1시간에서 8시간까지, IL-2와 IL-6는 72시

간까지 지속적인 발현을 나타냈고 IL-2는 24시간에서 가장 강한 발현을 나타냈다. IFN γ 는 4시간에서 8시간까지, TNF α 는 반응 1시간에서 강한 발현을 나타냈다. 반면 BML의 경우에는 IL-1은 1시간에서 8시간까지, IL-2는 72시간에서, IL-6는 4시간에서 8시간까지, IFN γ 는 48시간에서 72시간까지, 그리고 TNF α 는 반응 1시간에서 8시간까지 강한 발현을 나타냈다. 이 실험에서 ADL과 BML의 IL-2와 IFN γ 의 유전자 발현양상이 현저한 차이가 있음이 확인되었는데 ADL은 시간이 경과할수록 band가 약해지는 반면 BML은 시간이 경과할수록 band가 강해짐을 나타내었다. 이 결과를 양적으로 뒷받침하기 위해 ELISA를 통해 BML에 의한 사이토카인 생성량을 정량하여 ADL의 사이토카인 생성량과 비교한 결과, IL-2의 경우 ADL에서는 24시간까지 다소 강한 생성량을 나타내는 반면 BML은 서서히 증가해 48시간에 서부터 다소 강한 생성량을 나타내었고, IFN γ 의 경우 ADL의 자극에서는 서서히 생성량이 증가하다가 24시간을 정점으로 다시 감소하는 경향을 나타낸 반면 BML의 자극에서는 반응 24시간부터 현저하게 증가하여 72시간에 최고의 생성량이 관찰되었다. 이 결과는 유전자 발현 양상과 거의 일치하였고 이는 ADL과 BML이 사이토카인 발현 및 생성을 유도할 수 있음을 확인시켜주었다. 또한 누에 유충에서 정제한 BML이 장수풍뎅이 유충에서 정제한 ADL보다 많은 양의 IFN γ 를 생성함이 밝혀짐으로서 우수한 면역증강제로서의 가능성을 시사하였다.

사 사

이 논문은 2002학년도 영남대학교 연구년제 수행에 의한 연구결과이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Elgavish, S. and Shaanan, B. (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principle. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 462-467.
2. Chung, S. R. and Jeune, K. H. (1986) Lectins. *Review of Biochem. Biochem. Soc. Kor.* **1**: 371-382.
3. Chung, S. R., Hong, S. S. and Jeune, K. H. (1983) Isolation and purification of lectin from *Phaseolus radiatus*. *Yakhak Hoeji.* **27**: 221-227.
4. Chung, S. R., Suh, Y. A., So, and M. S. Jeune, K. H. (1984) Purification and immunochemical studies on L-PHA lectin. *Yakhak Hoeji.* **28**: 139-147.
5. Jeune-Chung, K. H., Kim, M. K. and Chung, S. R. (1987) Studies on lectins from mushrooms(II); Screening of bio-active substance, lectins, from Korean wild mushrooms. *Yakhak Hoeji.* **31**: 213-218.
6. Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune-Chung, K. H., (1987) Studies on Lectins from Narine Shells(V); Isolation and purification of lectin from *Tapees philippinarum*. *Yakhak Hoeji.* **31**: 213-218.
7. Jeune, K. H., Jung, M. Y., Choi, S. J., Lee, J. W., Park, W. H., Cho, S. H., Lee, S. H. and Chung, S. R. (2001) Immunomodulating effect of the lectin from *Allomyrina dichotoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 31-38.
8. Lis, H. and Sharon, N. (1986) Biological properties of lectins. In Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. (eds.), *The Lectins*, 266. Academic Press, New York.
9. Moon, I. J., Chug, S. R. and Jeune, K. H. (1995) Mitotic stimulation and cancer cell agglutination of the lectin from *Lentimus edodes*. *Yakhak Hoeji.* **39**: 260-267.
10. Jeune, K. H., Park, C. S., Park, W. H., Choi, S. J., So, M. S. and Chung, S. R. (1997) Characteristics and cancerostatic activity of the strafish lectin. *Yakhak Hoeji.* **41**: 421-432.
11. Shon, Y. H., Jeune, K. H., Choi, S. J. and Chung, S. R. (1998) Antitumor effect of *Asterina pectiifera* lectin on ascitic tumor. *Yakhak Hoeji.* **42**: 388-394.
12. Hwang, S. Y., Yang, E. Y., Yeo, J. H., Jin, J. Y., Kim, H. S., Park, W. B. and Suh, J. J. (2003) Anti-tumor effect of Korean mistletoe extract intensigied with mistletoe lectin against melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 218-222.
13. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P. and Anton, P. (1996) Mistletoe lectins I, II, and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer letters.* **109**: 33-38.
14. Balkwill, F. R. and Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunol. Today.* **10**: 299.
15. Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyataka, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Cytokines; Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* **59**: 783.
16. Suzuki, T. and Natori, S. (1983) Identification of a protein having hemagglutinating activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem.* **93**: 583-590.
17. Kazuhito, A., Mie, S., Sho, S. and Tochio, M. (1991) Occurrence of lectin in the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.* **33**: 421-427.
18. Tomsom, A. (1991) The cytokine handbook. *Academic Press, Sandiego*
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
20. Jeune, K. H., Choi, S. J. and Chung, S. R. (1999) Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on cytokine production. *Yakhak Hoeji.* **43**: 474-480.
21. Han, J. H. (2004) Effects of ADL on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *M.A. Thesis. Yeungnam Univ.* 1-33.
22. Kemeny, D. M. and Challacombe, S. J. (1988) ELISA and other solid phase immunoassays. 197-216. *John Wiley &*

Sons Ltd.

23. Lee, I. K., Kim, H. S., Jeune, K. H. (1995) Effects of *Lentinus edodes* lectin on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Korean Soc. Microbiol.* **30**: 473-481.
24. Jeune, K. H., An, M. G., Jung, S. M., Choi, K. M., Lee, S. H., Chung, S. R. (1999) Effect of mung bean lectin(MBL) on

cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 355-362.

25. 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. *Korea J. Microbiol* **30**: 1-12.

(2005년 4월 13일 접수)