

한국산 겨우살이 추출물 M11C (렉틴 구성물질)가 단구세포의 TNF- α 유전자 발현유도 및 분비에 미치는 효과

전명하* · 강태봉** · 장성호* · 최완수* · 성낙술*** · 허 역*[†]

*건국대학교 의과대학 면역학교실, **한동대학교 생의학 연구소, ***농촌진흥청 작물시험장 특용작물과

Effect of Korean Mistletoe Extract M11C (Non-lectin Components) on the TNF- α Expression and Secretion from Human Peripheral Blood Monocytes

Myung Ha Jun*, Tae Bong Kang**, Sung Ho Chang*, Wahn Soo Choi*, Nak Sul Seong***, and Erk Her*[†]

*Department of Immunology, College of Medicine, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

**The Institute for Biomedical Research, Handong University, Pohang 791-708, Korea.

***National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea.

ABSTRACT : It is well-known that Korean mistletoe (*Viscum album*) extract has an immune activity and anticancer effect. In this study, Korean mistletoe extract, M11C (non-lectin components), was used to examine whether this extract might activate human peripheral monocyte to produce tumor necrosis factor- α (TNF- α). To examine the effect of M11C on the production of TNF- α from monocyte, the monocyte were stimulated by the M11C, and then collected the supernatant (M11C stimulated monocyte-conditioned media; MCM). MCM was treated to the TNF- α sensitive L929 cells, and then L929 cytotoxicity was measured by means of MTT. MCM had cytotoxic effect on L929. And the cytotoxic effect of MCM on L929 was almost abolished by anti-TNF- α antibody. These data indicated that MCM contained TNF- α , suggesting the TNF- α generation from M11C-stimulated monocyte. This suggestion was confirmed from the data that TNF- α was highly detected in MCM by immunoblotting technique. M11C effect on TNF- α production from monocyte was in the dose and stimulating time dependent manners. Also the effect of M11C on the expression of TNF- α mRNA from monocyte was shown in the dose and stimulating time dependent manners. As a result, Korean mistletoe extract, M11C, could be used for an immunostimulator.

Key Words : Korean mistletoe (*Viscum album*), non-lectin components, M11C, human peripheral monocyte, L929, TNF- α generation, TNF- α mRNA expression.

서 언

세계 널리 분포되어 있는 겨우살이 (*Viscum album*)에 대한 연구가 많이 수행되어 왔으며, 특히 유럽산 겨우살이 렉틴의 약리적 효과와 분자생화학적 특성이 잘 밝혀져 있다 (Stein *et al.*, 2002; Tabiasco *et al.*, 2002; Hostanska *et al.*, 2003). 1990년도 중반부터 국내 연구진들에 의해 한국산 겨우살이에 대한 연구가 활성화되면서 겨우살이 렉틴에 대한 약리 효능 연구가 많이 이루어지고 있다 (Lyu *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001). 한방에서는 겨우살이를 오래 전부터 고혈압을 비롯한 각종 질환에 한방 당제로 널리 애용되고 있다. 그러나 열을 가하면 약리활성이 사라지는 당단백질인 겨우살이 렉틴에 대한 연구는 많이 수행되고 있으나 (Stein *et al.*, 2002;

Hostanska *et al.*, 2003), 한방당제를 대신하는 한국산 겨우살이 성분 중 비렉틴 성분들에 대한 연구가 많이 이루어지지 않고 있다 (강 등, 2000; 장 등, 2001; 이 등, 2003). 겨우살이 비렉틴 성분 중에는 다당체, 올리고당, 아민, 알칼로이드 등이 있다 (Krzaczek, 1977; Khwaja *et al.*, 1980; Mueller *et al.*, 1990; Edlund *et al.*, 2000). 특히 면역학적 측면에서는 당 계통들의 물질들이 더 많은 흥미를 불러일으키고 있다. 이러한 당 계통들의 물질들은 대식세포를 활성화 시킨다 (Jordan & Wagner, 1986). 대식세포(macrophage) 및 단구(monocyte)는 세포 매개성 면역에 있어서 중요한 역할을 한다. 대식세포 및 단구는 내독소, 유사분열물질, 바이러스 등에 의해서 활성화되며, 각종 면역 활성 매개물질들을 분비한다 (강 등, 2000). 이들 물질 중에는 중앙괴사물질인 TNF- α 등이 있으며, 대식

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3752 (E-mail) erk.her@kku.ac.kr
Received January 15, 2007 / Accepted January 31, 2007

세포는 이들을 생산 분비하여 생체방어 기능을 수행한다 (Johnston, 1988; Metlay *et al.*, 1989). 또한 TNF- α 는 종양 세포를 분해시키므로써 종양을 사멸시킨다 (Beutler & Cerami, 1987; Pennica *et al.*, 1984). 특히 생쥐 섬유아세포인 L929 세포는 TNF- α 에 아주 민감한 세포라는 잘 알려져 있다 (Mary *et al.*, 1991). 이와 같은 L929 세포의 특성을 이용해 L929 세포주를 이용해 TNF- α 분비와 관련된 생리 활성 연구가 많은 연구자들에 의해 수행되고 있다 (Mary *et al.*, 1991). 이에 본 연구는 한국산 겨우살이가 오래 전부터 한방탕제 약제로 이용되고 있음을 감안해 열탕추출물인 M11C의 면역활성 여부를 검증코자, 사람 말초혈액 단구세포에 M11C를 처리하여 TNF- α 전사 및 분비에 미치는 영향을 검사하였다.

재료 및 방법

1. 시약, 실험동물 및 세포주

세포의 배양을 위하여 배양액 RPMI-1640과 fetal bovine serum (FBS), L-glutamine acid, penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA) 회사로부터 구입하였으며, 배양용 플레이트, 플라스크, 그리고 튜브는 Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA) 회사로부터 구입하였다. TNF- α 검사를 위한 항체는 Chemicon (Temecula, CA, USA) 회사로부터 구입했다. RT-PCR을 위한 시약은 Takara (Otsu, Shiga, Japan) 회사로부터 구입했다. Chloroform, hexane, methanol, ethanol, isopropanol을 비롯한 각종 유기용매들은 Merck (Berlin, Germany) 회사로부터 구입했다. 세포독성검사를 위한 Trypan Blue와 각종 시약은 Sigma 회사로부터 구입했다. 본 실험에 사용된 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA)으로부터 분양 받은 L929 (ATCC CCL 1)이었다.

2. 겨우살이로부터 M11C 추출

채취 후 곧 바로 냉동실에 보관된 겨우살이로부터 M11C 추출은 장 등 (2001)의 방법을 이용하였다. 냉동 보관된 겨우살이 500 g을 증류수에 넣고 약한 불로 6시간 동안 끓인 후, 믹서기 (솔잎 82A, 대구)로 분쇄한 후 교반기 (제일과학, 서울)를 사용해 저속으로 교반하였다. 그 후 30분 동안 원심분리 (20,000 g, Rotor A6.14, Kontron, Italy)한 후, 얻은 상등액을 chloroform 및 hexane을 처리하여 탈지시킨 용액을 얻었다. 이 용액을 여과막 (60~0.45 μ m; Millipore, Bedford, MA 01730, USA)을 통과한 후 동결건조하여 갈색분말을 얻었다 (이하 M11C 이라 칭함). M11C내의 LPS 잔유량 검사는 Limulus ES II kit (Wako, Osaka, Japan)로 검사하였으며, 잔유량은 42 endotoxin units (EU)/ml 이었다 (data not shown). 유럽국가에 있어 시약에 LPS 잔유량 허용범위는 350

EU/ml 인데 (장 등, 2001), 본 M11C는 허용범위의 1/8 이하에 불과해 추후 실험에 아무런 문제가 없었다.

3. 말초혈액으로부터 단구세포 분리 및 자극

사람의 단구세포 (monocyte)는 허와 이 (1997)의 방법을 이용하였다. 건강한 남자로부터 말초혈액을 채취한 후 헤파린 (Sigma, St Louis, MO, USA)으로 처리한 다음 Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden)에 의한 밀도구배 원심분리에 의해 중간층에 있는 모든 단핵세포 (mononuclear cell)들을 얻었다. 오염된 적혈구는 저장액 소금용액으로 분해한 후 제거하였다. 그 다음 RPMI-1640으로 24 well plate에 단핵세포들을 plating하였다. 순수한 단구세포를 모으기 위해 3시간 정도 배양한 후 단구세포가 붙었는지 확인하고, 다른 종류의 부유 세포 (주로 림프구)들을 PBS로 2-3회 세척하여 제거하였다. 세척한 후 Wright and Giemsa stain법으로 염색했을 때 단구세포의 순수도는 98% 이상이였다 (data not shown). M11C로 자극하기 전에 단구세포를 incomplete RPMI-1640 배양액으로 2회 씻어낸 후, 무혈청 RPMI-1640 배양액 (penicillin-streptomycin, L-glutamine 함유)을 1 ml씩 주입하였다. 단구세포에 여러 농도의 M11C를 첨가한 후, 37°C에서 각각의 시간동안 자극시켜 얻은 배양액(monocyte-conditioned media; MCM)을 분석하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

4. TNF- α 분비 bioassay

TNF- α 를 위한 독성검사는 TNF- α 에 민감한 세포주인 생쥐 섬유아세포 L929를 사용하였다 (Mary *et al.*, 1991). 세포는 실험 직전 Trypsin-EDTA를 처리하여 플라스크에서 분리한 후, 96 well plate에 각 well 당 4×10^4 cells/100 μ l의 세포 밀도로 plating 한 후 6시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 종료 후 각 well 속의 배양 상등액을 제거하고, 무혈청 배양액과 M11C로 자극한 배양액 MCM을 각 well에 100 μ l씩 첨가한 후 16시간 동안 5% CO₂ 37°C에서 배양하고 MTT법 (Francis & Rita, 1986)에 의해 세포독성을 검사하였다. MTT solution (1 mg/ml, Sigma, St Louis, USA)을 각 well 당 50 μ l씩 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 다시 배양했다. 그 후 배양 상등액은 모두 제거하고 침전되어 있는 불용성 formazan을 녹이기 위하여 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, USA)를 각 well당 100 μ l씩 첨가한 후 15분 동안 혼합하였다. 그리고 난 후, ELISA reader (Pharmacia, Sweden) 540 nm의 파장에서 흡광도 (O.D)를 측정하여 % cytotoxicity (O.D control - O.D test) \times 100/O.D control) 혹은 % viability (O.D test \times 100/O.D control)를 측정했다 (장 등, 2000).

5. Anti-TNF- α antibody에 의한 세포독성 중화작용 분석

10 μ g/ml 농도의 anti-TNF- α antibody를 medium alone 후

은 M11C로 자극한 단구세포의 배양액 MCM에 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 배양했다. 배양한 후, 각각의 100 ml 를 L929 (10⁵ cells/well)가 있는 각 well에 주입했다. 그리고 37°C에서 12시간 동안 배양 한 뒤 MTT 방법 (Francosis & Rita, 1986)에 의하여 L929들의 사멸 정도를 검사했다.

6. Western blotting

배양액 MCM을 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis)에서 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, 여기에 rabbit anti-murine TNF- α polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 NC를 항온에서 3시간 가볍게 흔들면서 배양하였다. 그 후, TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 항온에서 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 ECL (peroxidase substrate, Amersham, USA)을 NC에 잘 섞은 후 배양하였다. 그 후, 암실 (10 W 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- α band의 크기와 강도를 분석하였다 (장 등, 2001).

7. 역전사 중합연쇄 반응

단구세포로부터 역전사 중합 연쇄 반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)은 역전사 kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan) 및 중합연쇄반응 kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다 (장 등, 2001). TRISOL (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 total RNA의 추출하였다. Total RNA를 역전사 반응액과 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 TNF- α 와 β -actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액과 혼합하여 TNF- α 와 β -actin의 RT-PCR 증폭 산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1% agarose gel 전기영동에서 분석하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열 및 증폭산물의 크기는 Table 1에

나타내었다 (장 등, 2000).

8. 통계 처리

실험성적은 평균 또는 mean \pm S.E.M으로 나타냈으며, 각 group간의 통계학적 검정에는 PC-SAS 혹은 Excel 프로그램을 이용하여 T-검정하였다. p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 있는 값으로 간주하였다.

결 과

1. M11C로 자극한 배양액 MCM의 L929 독성효과는 M11C 농도 의존성

L929세포는 TNF- α 에 민감한 세포로 잘 알려져 있다 (Mary *et al.*, 1991). 본 실험은 이러한 사실을 이용해 M11C로 단구를 자극했을 때 단구로부터 TNF- α 가 분비하는 지 알아보기 위해, M11C로 자극 처리한 단구의 배양액을 L929세포와 같이 8시간 동안 배양하면서 L929 독성정도를 검사하였다. 실험결과 여러 농도 (0-2000 μ g/ml)의 M11C로 처리한 단구 배양액들을 L929세포와 배양했을 때, M11C 농도 (0-2000 μ g/ml)에 따라 얻은 MCM이 M11C 농도증가에 따라 L929 세포의 사멸이 점점 증가하다가 M11C 200 μ g/ml로 자극해서 얻은 MCM이 최대의 L929 사멸효과를 보였다 (Fig. 1). 그리고 M11C 2000 μ g/ml로 자극으로 얻은 MCM으로 L929를 처리했을 때 L929 사멸 plateau 현상을 보였다 (Fig. 1). 즉, M11C 농도가 증가함에 따라 TNF- α 가 증가하다가 M11C 200 μ g/ml 농도에서 최대량의 TNF- α 가 분비함을 시사했다. 이러한 L929 독성결과가 MCM이 아니라 M11C의 직접적인 세포독성효과 때문인 지 알아보기 위해, M11C 2000 μ g/ml으로 이 L929세포를 24시간 배양하면서 L929사멸 여부를 검사하였는데, M11C에 의한 L929 세포독성을 전혀 관찰할 수 없었다 (data not shown).

2. M11C로 자극한 배양액 MCM의 L929 독성효과는 M11C 자극시간 의존성

농도 의존도 실험에서 얻은 최적효과 농도인 200 μ g/ml M11C로 0.5-24시간으로 단구를 자극을 했어 얻은 여러 시간 대의 배양액으로 L929를 처리했다. 이 때 얻은 결과는 처리 1시간 MCM에서 L929 독성효과를 보이다가 12시간 동안 단

Table 1. Primers used in RT-PCR.

Target mRNA	Primer sequences	Product size (bp)
TNF- α	sense : 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3' anti-sense : 5'-CATTCGAGGCTCCAGTGAATCCAG-3'	286
β -actin	sense : 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3' anti-sense : 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'	840

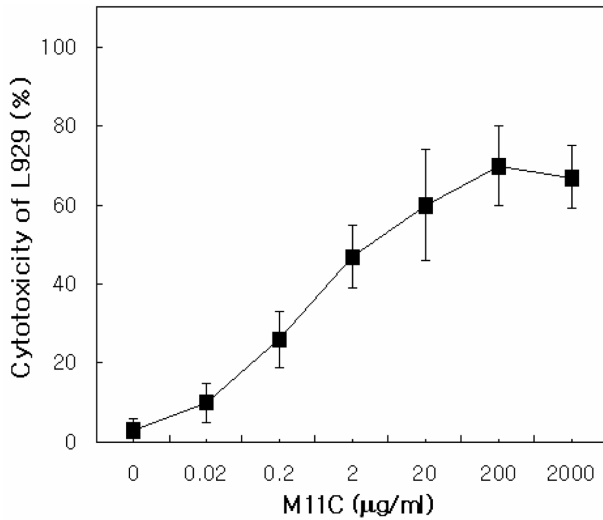


Fig. 1. Dose dependent effect of M11C on indirect cytotoxicity of L929 cells. L929 cells were incubated with the conditioned medium obtained from human peripheral monocyte which is stimulated with indicated doses of M11C for 12 hours. The cytotoxicity on L929 cells after culture with conditioned medium is expressed as means \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

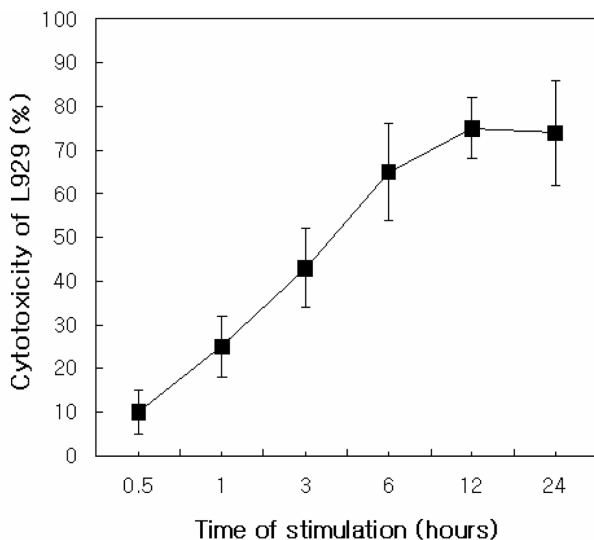


Fig. 2. Time dependant effect of M11C on indirect cytotoxicity of L929 cells. L929 cells were incubated with the conditioned medium obtained from human peripheral monocyte which is stimulated with indicated time of M11C at 200 μ g/ml. The cytotoxicity on L929 cells after culture with conditioned medium is expressed as means \pm S.E.M of five independent experiments performed in triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

구를 처리한 배양액 MCM이 최고 L929 독성효과를 보였다. 그리고 24시간 이후 배양시간부터는 plateau 경향을 보였다

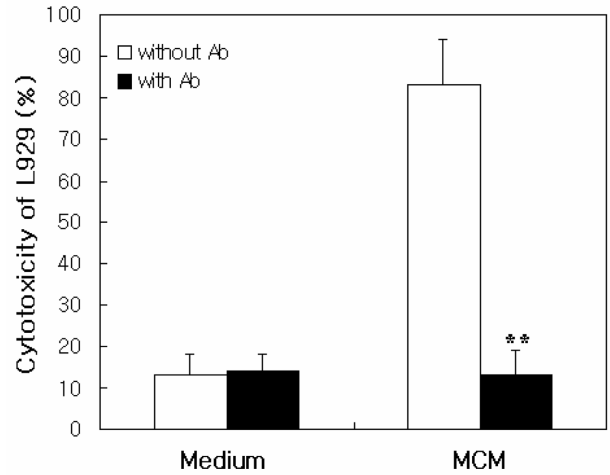


Fig. 3. Neutralization by monoclonal TNF- α antibody (Ab) of the L929 cell cytotoxicity obtained from the actions of medium alone (medium) and 200 μ g/ml of M11C stimulated monocyte-conditioned media (MCM). The cytotoxicity on L929 cells is expressed as means \pm S.E.M. All other details are described in "Materials and Methods". ** p < 0.01, (without Ab vs with Ab in MCM).

(Fig. 2). 이는 M11C가 단구를 자극할 때 시간에 따라 TNF- α 를 생산 분비하게 함을 말해주고 있다.

3. M11C로 자극한 배양액 MCM에 의한 L929의 독성효과 억제에 있어 anti-TNF- α antibody의 효과

상기 실험결과 (Fig. 1, 2)를 분석해 볼 때, MCM 내에 TNF- α 가 존재할 가능성을 강하게 시사했었다. 이를 재확인하기 위하여 TNF- α antibody (10 μ g/ml)를 L929에 대해 최대의 독성효과가 있는 MCM (M11C 200 μ g/ml로 12시간 동안 단구를 자극해서 얻은 배양액)에 투여하여 2시간 동안 반응시킨 후, 이 MCM을 L929 세포에 처리하여 L929 세포 사멸을 검사했었다. 그 결과 MCM에 의한 L929 세포에 대한 독성효과가 TNF- α antibody에 의해 완전히 억제됨을 보였다 (Fig. 3). 이는 MCM에 TNF- α 가 존재하고 있으며, 또한 L929가 TNF- α 에 의해 사멸됨을 보여 주었다.

4. TNF- α 의 분비유도에 있어서 M11C의 농도 의존성 효과

TNF- α -sensitive L929를 이용한 실험 결과 (Fig. 1-3)에서 M11C가 단구를 자극해서 TNF- α 를 분비함을 확인하였다. 이를 다른 실험 기법인 immunoblotting을 이용해 MCM에 TNF- α 존재를 재확인하기로 하였다. 이를 위해 여러 농도 (0-200 μ g/ml)로 12시간 동안 단구를 자극해서 얻은 MCM를 재확인 했다. 그 결과, TNF- α 생산 분비를 위한 단구자극 최대 효과적인 M11C 농도가 200 μ g/ml이었으며 농도에 따라 증가함을 보여주었다 (Fig. 4a, 4b). 이러한 결과는 TNF- α -sensitive L929를 이용한 실험 결과와 일치했었다 (Fig. 1).

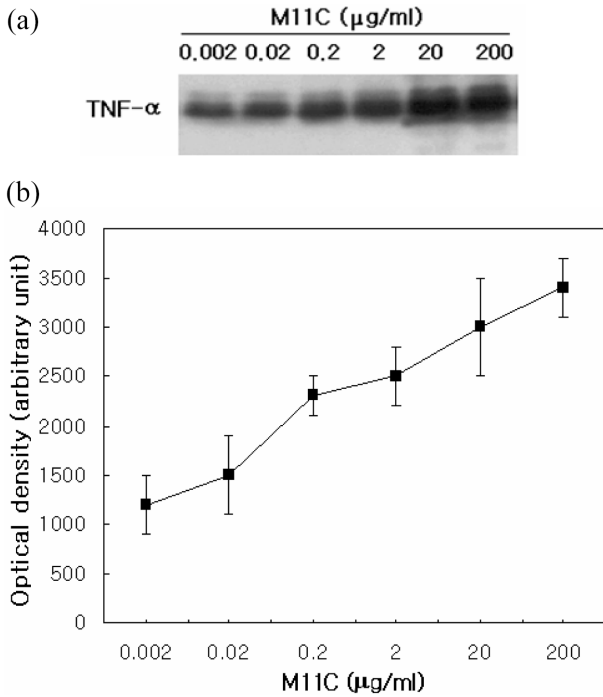


Fig. 4. The dose dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on TNF- α secretion from monocyte. The cells (1×10^6 cells/well) were treated with the indicated concentrations of M11C for 12 hours. a) TNF- α secretion was analyzed by immunoblotting. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean \pm S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

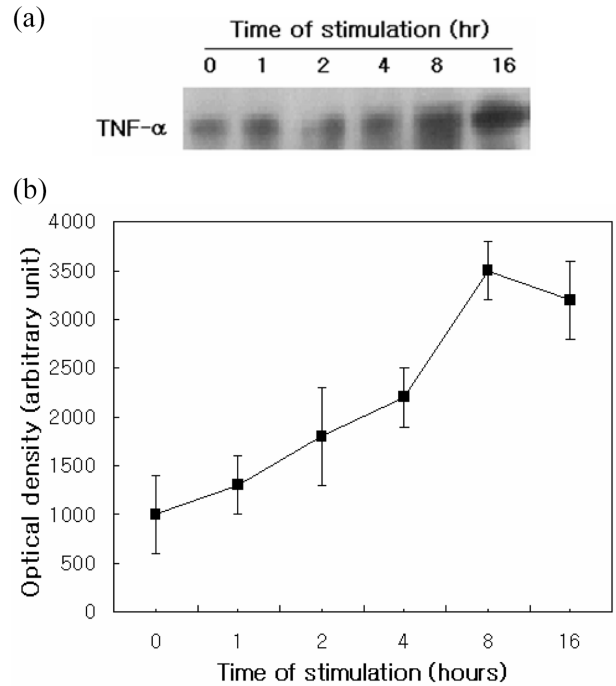


Fig. 5. The time dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on TNF- α secretion from monocyte. The cells (1×10^6 cells/well) were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ M11C for 0-16 hours. a) TNF- α was analyzed by immunoblotting. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean \pm S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

5. TNF- α 의 분비유도에 있어서 M11C의 자극시간 의존성 효과

단구를 M11C 최고농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 자극했을 때, M11C에 의한 자극시간의 효과를 알기 위한 실험에서 자극 1시간부터 증가하기 시작해서 8시간 동안 자극에서 최대의 TNF- α 가 분비됨을 보여주었다 (Fig. 5a, 5b). 그리고 난 뒤 자극 16시간에서는 plateau에 이르렀다 (Fig. 5a, 5b). 이러한 결과들은 TNF- α -sensitive L929를 이용한 자극 의존성 효과실험 결과와 일치했었다 (Fig. 2).

6. TNF- α mRNA 전사유도에 있어 M11C의 농도 의존성 효과

M11C가 단구세포를 자극해서 TNF- α 를 분비하게 한다는 것을 앞의 여러 실험 결과 (Fig. 1-5)에서 밝혔다. 이러한 TNF- α 분비가 TNF- α mRNA 유전자 발현과 어떠한 상관관계를 가지고 있는지 알기 위해 실험을 수행하였다. 실험한 결과 M11C로 단구세포를 자극했을 때 M11C 20 $\mu\text{g/ml}$ 가 최대의 TNF- α mRNA 발현을 보이다가 M11C 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 plateau 경향을 보였다 (Fig. 6a, 6b). 이는 최대 TNF- α mRNA 유전자발현을 위한 M11C의 농도가 TNF- α 최대 분비

를 위한 농도보다 훨씬 적은 농도였다 (Fig. 4).

7. TNF- α mRNA 전사유도에 있어 M11C의 자극시간 의존성 효과

TNF- α mRNA 전사를 위한 최적 자극시간을 알기 위한 실험결과에 있어서, M11C 최적 농도인 20 $\mu\text{g/ml}$ 으로 단구를 자극했을 때, 1시간 동안의 자극에서 전사의 효과를 확실하게 보이다가 4시간에서 최대의 TNF- α mRNA 전사 유도효과를 보였다 (Fig. 7a, 7b). 그리고 난 뒤 8시간부터는 점차 감소하는 것을 보여 주었다. M11C의 TNF- α mRNA 전사유도 최적효과 시간이 TNF- α 단백질생산 분비 최적효과 시간보다 4시간 앞서 있다는 것을 보여주었다 (Fig. 5, 7).

고 찰

유럽산 겨우살이나 한국산 겨우살이에 대한 연구에 있어서, 당단백질인 렉틴에 대한 연구가 많이 보고되었다 (Lyu *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2002; Tabiasco *et al.*, 2002; Hostanska *et al.*, 2003). 이에 본 연구는 겨우살이가 일부 한약탕제에 사용되고 있다는 점을 감안하여, 한국산

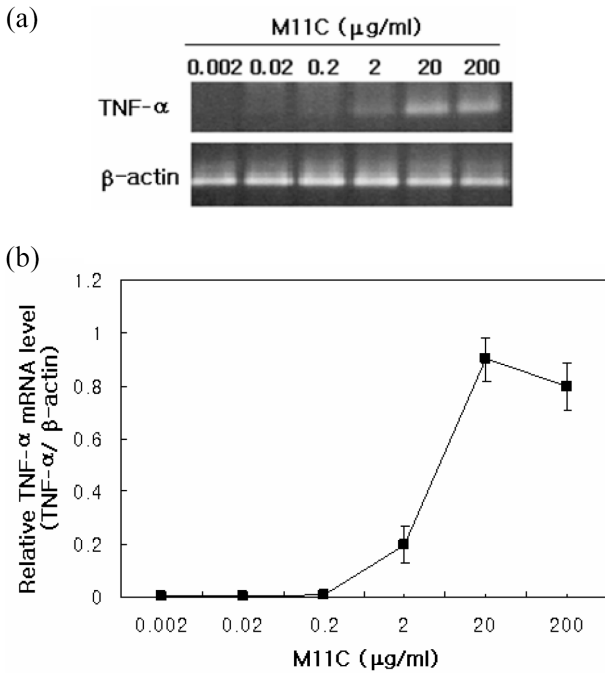


Fig. 6. The dose dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on TNF- α mRNA expression from monocyte. The cells (1×10^6 cells/well) were treated with the indicated concentrations of M11C for 4 hours. a) RT-PCR profile of monocyte TNF- α and β -actin mRNA expression. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean \pm S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

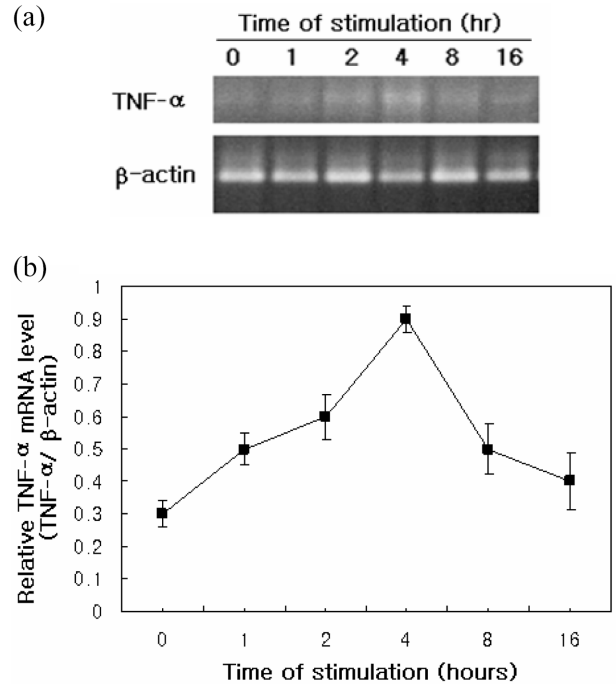


Fig. 7. The time dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on TNF- α mRNA expression from monocyte. The cells (1×10^6 cells/well) were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ M11C for 0-16 hours. a) RT-PCR profile of monocyte TNF- α and β -actin mRNA expression. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean \pm S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".

겨우살이로부터 열에 약한 단백질 성분이 아닌 강한 열에 의해서도 약리효능을 지니는 물질들을 분리하여 면역학적 효능을 밝히고자 하였다. 이 목적을 위한 연구 접근 중 하나가 겨우살이 열탕추출물인 M11C가 단구세포로부터 TNF- α 분비효과를 가지고 있는지를 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 (장 등, 2001). 그래서 M11C를 겨우살이 비렉틴 구성물질로 칭하기로 하였다 (강 등, 2000; 장 등, 2001). 본 실험에 사용된 비렉틴 (non-lectin) 성분인 M11C가 쥐의 복강 대식세포를 활성화해 TNF- α 와 IL-1 β 를 분비한다는 것을 우리 실험실 연구원들이 발표하였다 (강 등, 2000; 장 등, 2001). 또한 단구가 활성화할 때 TNF- α 를 비롯한 IL-1 β , IL-6, IL-12 등 여러 cytokine들이 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다 (Johnston, 1988; Dinarello, 1989; Metlay *et al.*, 1989). 본 연구에서는 M11C로 사람 말초혈액에서 분리한 단구세포를 자극했을 때 TNF- α 가 생산 분비되는지를 검사하기 위해 TNF- α sensitive L929 세포 독성검사, TNF- α neutralization, immunoblotting, RT-PCR 기법들을 이용하였다.

TNF- α sensitive L929 세포의 독성검사에서 단구를 자극한 M11C 농도가 증가함에 따라 얻은 배양액 MCM이 L929 세포의 독성을 점점 증가시켰으며 (Fig. 1), 또한 M11C로 단구 자극시간 증가에 따라 얻은 MCM이 L929 세포의 독성을 점점 증가시켰다 (Fig. 2). L929 세포 독성이 TNF- α 의존성이라는 것을 고려할 때 (Mary *et al.*, 1991), 이러한 결과는 M11C가 단구를 자극해 TNF- α 를 분비하게 한다고 다분히 추측할 수 있었다. 이러한 추측이 사실이라면 anti-TNF- α 항체가 M11C로 단구를 자극해 얻은 MCM의 L929 세포독성 효과를 완전히 억제해야 한다고 가정했다. 이 가정을 확인하기 위해 TNF- α neutralization 실험을 하였다. 실험 결과, 가정처럼 anti-TNF- α 항체가 MCM의 L929 세포독성 효과를 완전히 억제했다 (Fig. 3). 이는 M11C로 단구를 자극해 얻은 MCM에 TNF- α 가 존재함을 말해 주고 있다. MCM에 TNF- α 가 존재하는 것이 사실인지 재확인하기 위해 immunoblotting 기법을 이용해 MCM에 존재하는 TNF- α 를 분석하였다. 분석 결과 MCM에 존재하는 TNF- α 의 양은 단구를 자극한 M11C의 농도와 자극시간에 의존적이었다 (Fig. 4a, 4b, 5a, 5b). 이러한 M11C의 효과가 TNF- α mRNA 발현에는 어떠한 작용을 하는지를 알기 위해 RT-PCR 기법을 이용해 M11C의 여

리 농도와 자극시간에 따라 단구를 자극한 후, TNF- α mRNA 발현을 검사하였다. 검사결과, M11C의 여러 농도가 증가함에 따라 단구로부터 TNF- α mRNA 발현이 증가하다가 자극시간 4시간에서 최고의 TNF- α mRNA 발현을 보여 주었다 (Fig. 6a, 6b, 7a, 7b). 이는 TNF- α mRNA 전사가 TNF- α 단백질 생산보다 4시간 정도 빨리 정점에 도달했다가 서서히 감소함을 보여 주었다. 이는 단구세포가 M11C의 자극을 받아 TNF- α 를 분비하기까지 전사에 관련된 신호전달 시간이 필요함을 말해 주고 있다. 결론적으로 본 연구는 겨우살이를 열탕 추출해서 얻은 M11C가 사람의 말초혈액 단구로부터 TNF- α 를 전사, 생산 분비하는 효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 이는 겨우살이가 면역 활성효능을 얻기 위한 한약탕제로 이용할 수 있음을 시사하는 실험결과였다.

적 요

한국산 겨우살이 (*Viscum album*)는 면역 활성효과와 항암효과가 있다는 것으로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 한국산 겨우살이 추출물 M11C (비렉틴 구성물질)가 사람의 말초혈액 단구를 활성화시켜 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)를 생산 분비하게 하는지를 규명하기 위해 실험에 이용되었다. 단구로부터 TNF- α 의 생산에 있어 M11C의 효과를 알기 위해 단구를 여러 농도 (0-2000 $\mu\text{g/ml}$)의 M11C로 0.5-24시간 동안 자극한 후 배양액 MCM을 수거했다. 수거한 배양액 MCM을 TNF- α 에 민감한 L929 세포에 첨가한 후 L929 세포의 독성 정도를 MTT 기법으로 검사하였는데, 배양액 MCM이 L929 독성효과를 가졌으며, 이 MCM의 L929 세포 독성효과는 TNF- α 항체에 의해 거의 완전하게 억제되었다. 이러한 결과는 배양액 MCM에 TNF- α 가 존재함을 지적했으며, 또한 M11C가 단구를 자극해 TNF- α 를 생산하리라고 암시했다. 이러한 암시를 확인하기 위해 immunoblotting 기법을 사용해 배양액 MCM에 존재하는 TNF- α 를 검사를 수행했다. 검사결과 배양액 MCM에 많은 양의 TNF- α 가 검출되었다. 이러한 TNF- α 검출량은 단구를 자극한 M11C의 농도와 자극시간에 비례해서 증가했다. 즉, 단구로부터 TNF- α 의 생산 분비량은 M11C의 농도와 자극시간에 의존적이었다. 이러한 M11C의 농도와 자극시간의 의존적 효과는 단구로부터 TNF- α mRNA 발현에도 같은 경향을 보였다. 결론적으로 한국산 겨우살이로부터 열탕 추출한 M11C가 면역활성제로 작용할 수 있음을 시사함과 동시에 한방탕제로 사용되는 한국산 겨우살이가 면역학적 효능을 가지고 있음을 말해주고 있다.

사 사

이 논문은 산업자원부 지정 지역협력연구센터인 건국대학교

바이오 식·의약 연구센터의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

LITERATURE CITED

- Beutler B, Cerami A** (1987) Cachectin : more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316:379-194.
- Dinarello CA** (1989) Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44:153-205.
- Edlund U, Hensel A, Frose D, Pfuller U, Scheffler A** (2000) Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Arzneimittelforschung.* 50(7):645-665.
- Francosis D, Rita L** (1986) Ripid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89:271-277.
- Hostanska K, Vuong V, Rocha S, Soengas MS, Glanzmann C, Saller R, Bodis S, Pruschy M** (2003) Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer.* 2;88(11):1785-1792.
- Jordan E, Wagner H** (1986) Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology.* 43 Suppl 1:8-15.
- Johnston RB** (1988) Current concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318:747-752.
- Khawaja TA, Varven JC, Pentecost S, Pande H** (1980) Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album*, coloratum. *Experientia.* 36(5):599-600.
- Krzaczek T** (1977) Pharmacobotanical research of the sub-species *Viscum album* L. IV. acids and amines. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med].* 32:281-291.
- Lyu SY, Park WB, Choi KH, Kim WH** (2001) Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. coloratum agglutinin in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65(3):534-541.
- Mary JB, Michael JW, Thomas WM, Michael PM** (1991) Detection of tumor necrosis factor a from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J Immunol Methods.* 140:15-22.
- Metlay JP, Pure E, Steinman RM** (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.
- Mueller EA, Anderer FA** (1990) A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer Immunol Immunother.* 32(4):221-227.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV** (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 312:724-728.
- Stein GM, Bussing A, Schietzel M** (2002) Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 in vitro. *Anticancer Res.* 22(1A):267-274.
- Tabiasco J, Pont F, Fournie JJ, Vercellone A** (2002) Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity.

한국산 겨우살이 추출물 M11C(렉틴 구성물질)가 단구세포의 TNF- α 유전자 발현유도 및 분비에 미치는 효과

- Eur J Biochem. 269(10):2591-2600.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Her E, Kim SH, Kim K, Azuma I, Kim JB** (2001) Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album colaratum*). Int Immunopharmacol. 1(5):881-9.
- 강태봉, 채동주, 장성호, 문세환, 김종배, 허억 (2000) Macrophages로부터 TNF- α 분비 및 전사에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (Non-Lectin Components)의 효과. 대한면역학회지, 22(4):207-215.
- 이소진, 이미경, 최근표, 유창연, 노성규, 김종대, 이현용, 이진하 (2003) 한국산 겨우살이 분획물의 면역세포의 생육증진 및 세포독성. 한국약용작물학회, 11(1):62-70.
- 이소진, 이미경, 최근표, 김나영, 노성규, 허문영, 김종대, 이현용, 이진하 (2003) 한국산 겨우살이의 산화적 DNA 손상 억제작용. 한국약용작물학회지, 11(2):89-96.
- 장성호, 전명하, 강태봉, 문세환, 이준호, 성낙술, 이성태, 김종배, 허억 (2001) Macrophages로부터 IL-1 β 분비 및 전사에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (non-lectin components)의 효과. Immune Network, 1(2):170-178.
- 허억, 이성태 (1997) T 림프구에서 분비된 미지의 호중구 수명연장물질의 분자 화학적 규명. 대한면역학회지, 19(3):363-373.