

## 쥐의 비장세포로부터 IL-1 $\beta$ 분비에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (비렉틴 구성물질)의 효과

전명하\* · 강태봉\*\* · 장성호\* · 최완수\* · 성낙술\*\*\* · 허 역 $\dagger$

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

### Effect of M11C (Non-lectin Components) Obtained from Korean Mistletoe on the IL-1 $\beta$ Secretion from Mouse Splenocytes

Myung Ha Jun\*, Tae Bong Kang\*\*, Sung Ho Chang\*, Wahn Soo Choi\*, Nak Sul Seong\*\*\*, and Erk Her $\dagger$

\*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 :** Korean mistletoe (*Viscum album L*) extract has been found to possess immunoregulating activity. In this study, Korean mistletoe extract, M11C (non-lectin components), was used to know whether this extract activates splenocytes to secrete interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). The splenocytes were treated with M11C, and then collected the supernatant and cell lysate that were prepared to analyze the level of IL-1 $\beta$ , using ELISA, immunoblotting, and RT-PCR. Maximum effective dose and time of M11C on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes were 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 8 hours, respectively. Treatment dose and time for the maximum expression of IL-1 $\beta$  mRNA were 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 4 hours, respectively. Saccharide degradation enzyme Viscozyme L completely blocked the effect of M11C on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes. As the result, among non-lectin components saccharide could be regarded as a main component for IL-1 $\beta$  expression from splenocytes.

**Key Words :** Korean mistletoe (*Viscum album L*), non-lectin components, M11C, splenocytes, IL-1 $\beta$  secretion, IL-1 $\beta$  mRNA expression.

## 서 언

세계각처에 널리 분포되어 있는 반 기생식물인 겨우살이에 대한 연구가 유럽에서 오래전부터 주로 당단백질인 겨우살이 렉틴에 대해서 많이 이루어졌다 (Franz *et al.*, 1981; Lyu & Park, 2006; Van Huyen *et al.*, 2006). 또한 한국에서도 1990년도 초반부터 한국산 겨우살이에 연구가 시작되면서 겨우살이 당단백질인 렉틴에 대한 연구가 많이 수행되었다 (Yoon *et al.*, 1998, 2003). 그러나 열을 가해도 활성이 사라지지 않는 겨우살이의 비단백질 성분들에 대한 연구가 아직까지 미진한 상태이다. 오래전부터 한국에서는 민간요법으로 겨우살이를 한약탕제로 이용해 온 점을 감안할 때, 겨우살이의 효능은 열에 약한 단백질이 아닌 열에 강한 단백질 이외의 물질들로부터 유래됨을 강하게 시사하고 있다. 겨우살이 비단백질 성분들 중에는 다당체, 올리고당, 아민 및 알칼로이드 성분 등이 있다 (Khwaja *et al.*, 1980; Mueller *et al.*, 1990). 당

계통인 다당체와 올리고당은 면역관련 세포들 특히 B세포, 대식세포, 단구, 혈관내피세포 및 상피세포 등을 활성화시켜 여러 가지 사이토카인 (cytokine)들을 생산 분비하게 한다. 이들 사이토카인들 중에는 interleukin (IL), interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF) 등이 있다 (Johnston, 1988; Metlay, 1989). IL은 여러 종류가 있는데 이 중 IL-1은 감염, 상처 및 항원적 자극에 의해서 면역 관련 세포들로부터 생산되는 polypeptide이다. IL-1은 림프구를 활성화하고 면역반응에 중요한 역할을 한다. (Matsushima *et al.*, 1986). IL-1은 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  두 개의 subunit로 나누어진다 (Mosley *et al.*, 1987). 초기에 IL-1은 오직 단구와 macrophage에서 분비된다고 생각하였으나, 최근에는 단구, 대식세포, B 림프구, dendritic cell, fibroblast, keratinocyte, langerhans cell, neutrophil, astrocyte, epithelial cell 및 endothelial cell 등을 포함한 많은 종류의 세포에서 생산됨이 알려졌다 (Matsushima *et al.*, 1986; Dinarello, 1989). 이에 본 연구는 한국산 겨우살이가 오래 전

$\dagger$ Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3752 (E-mail) erk.her@kku.ac.kr  
Received January 5, 2007 / Accepted January 31, 2007

부터 한방탕제로 널리 이용되고 있는 점을 감안해 열에 강한 겨우살이 구성물질들이 splenocytes를 활성화하는지 그리고 이 복합물질들 중 어떤 물질이 주 활성인자인지에 대해 규명한다. 연구결과, 한국산 겨우살이 열탕추출물인 M11C가 비장세포로부터 IL-1 $\beta$ 를 생산 분비하는 효과가 있었으며, 이러한 효과는 M11C 복합물질 중 당계통의 물질로부터 유도됨을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약, 실험동물 및 세포주

세포의 배양을 위하여 배양액 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine acid, penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 각종 culture plates, flasks, 그리고 각종 tube들은 Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하였다. IL-1 $\beta$  검사를 위한 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) kit 및 immunoblotting을 위한 각종 항체는 Chemicon (Temecula, CA, USA)으로부터 구입했다. 역전사 증합 연쇄반응 (RT-PCR)을 위한 시약은 Takara (Otsu, Shiga, Japan)로부터 구입했다. Chloroform, hexane, methanol, ethanol 및 isopropanol을 비롯한 각종 유기용매들은 Merck (Berlin, Germany)으로부터 구입했다. Viscozyme L은 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입했다. 세포 자극 시약이 유기용매로 용해했을 경우 유기용매의 최종 농도는 0.1% 이하로 되게 했다. 본 실험에서 사용된 생쥐들은 대한실험동물 센터 (음성, 충북)로부터 분양받아 항온 항습실에 사육하면서 실험하였다. 항온항습실의 조건은 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 조명 150 Lux의 조건이었다. splenocytes의 추출을 위해 Balb/c 생쥐를 사용하였다.

### 2. 겨우살이로부터 M11C 추출

M11C 추출에 관한 실험은 다른 문헌을 참조하였다 (장 등, 2000; 성 등, 2003). 간단히 설명하면, 겨우살이로부터 M11C를 추출하기 위해 겨우살이를 증류수에 넣고 약한 불로 2시간 동안 끓인 후 믹서기 (솔잎 82A, 대구)로 분쇄하였다. 그리고 난 뒤 4시간 동안 교반기 (제일과학, 서울)를 사용해 저속으로 교반하였다. 그 후 30분 간 원심분리한 후, 얻은 상등액을 chloroform 및 hexane을 처리하여 탈지시킨 용액을 얻었다. 이 용액을 여과막 ( $60 \mu\text{m} \sim 0.45 \mu\text{m}$ ; Millipore, Bedford, MA 01730, USA)을 통과한 후, polymyxin-B column (Biorad, Hercules, CA, USA)을 사용해 오염된 lipopolysaccharide (LPS)를 제거한 후 PBS로 투석하였다. 투석 후 동결 건조하여 갈색분말을 얻었다 (이하 M11C 이라 칭함). M11C내의 LPS 잔유량 검사는 Limulus ES II kit(Wako, Osaka, Japan)

로 검사하였으며, 잔유량은 42 endotoxin units (EU)/ml이었다 (data not shown). 유럽국가에 있어 시약에 LPS 잔유량 허용 범위는 350 EU/ml 인데 (장 등, 2001), 본 M11C는 허용범위의 1/8 이하에 불과해 추후 실험에 아무런 문제가 없었다.

### 3. 생쥐로부터 splenocytes의 추출 및 자극

7주령의 Balb/c 생쥐를 경추탈골해서 희생시킨 후, 비장을 무균상태에서 회수하여 cold incomplete RPMI-1640 medium (100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신 추가, Gibco, USA)으로 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,  $4^\circ\text{C}$ )한 후 상등액을 버리고 세포를 얻었다. 오염된 적혈구는 hypotonic buffer로 lysis한 후 제거하였다. 그 다음 serum free RPMI-1640 medium (with penicillin-streptomycin, with L-glutamine)으로 24 well plate에 splenocytes를 plating하였다. Splenocytes에 여러 농도의 M11C를 첨가한 후,  $37^\circ\text{C}$ 에서 각각의 시간동안 자극시켜 얻은 splenocyte conditioned medium (SCM)을 실험할 때까지  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

### 4. Sandwich ELISA

IL-1 $\beta$  분석용 ELISA kit (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 검사하였는데 간단히 설명하면 다음과 같다 (장 등, 2001). IL-1 $\beta$  standard와 sample SCM을 96 well (precoated with rat anti-mouse IL-1 $\beta$ )에  $100 \mu\text{l}$  씩 넣었다. 그리고 난 후 primary antibody인 rabbit anti-mouse IL-1 $\beta$   $25 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 혼합한 뒤, 4시간 동안 항온에서 배양한 후, wash buffer로 씻어내었다. 이 후에  $100 \mu\text{l}$  second antibody인 goat anti-rabbit conjugated alkaline phosphate를 각 well에 첨가한 후 45분간 배양하였다. 배양 한 후 wash buffer로 씻어낸 후, vacuum으로 조심스럽게 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 후 colour reagent를 각 well에 넣고, 각 well 별로 차별성이 있는 주황색이 나타나면 stop solution  $50 \mu\text{l}$ 를 넣어 색깔반응을 고정시켰다. 490 nm에서 ELISA reader (Bio-Tek, Highland park, Vermont, USA)로 측정하여 IL-1 $\beta$ 의 양을 분석하였다.

### 5. Western blotting

Western blotting에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였다 (장 등, 2001; 성 등, 2003). 간단히 설명하면, SCM을 sample buffer와 섞은 후 16% separating gel로 구성된 0.1% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel내의 단백질은 nitrocellulose membrane (NC; Schleicher and Schuell, Verkaufsleiter, Germany) 위에 이동시켰다. 이동시킨

후, NC를 blocking buffer (5% nonfat dry milk in TBS-T buffer)와 배양시켜 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, rabbit anti-murine IL-1 $\beta$  polyclonal primary antibody를 첨가하였다. 그리고 난 뒤 hybridization incubator (Robbins, CA, USA; speed 10 rpm)에서 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 배양하였다. TBS-T buffer로 씻어낸 후, 2차 항체 (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated affinity purified antibody)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였고, TBS-T로 씻어내었다. 그 후 NC를 ECL (peroxidase substrate, Amersham, Cleveland, Ohio, USA)로 잘 적신 후 5분간 배양하였다. 배양한 후, 10 W safety lamp (Kodak, Rochester, NY, USA)가 설치된 암실에서 x-ray film (Agfa, Devaert, Belgium)에 감광시킨 후 x-ray film을 developing, washing, fixing 및 washing 순서과정을 거친 후 IL-1 $\beta$  band의 크기와 강도를 분석하였다.

**6. 역전사 중합연쇄 반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction)**

역전사 중합 연쇄 반응 (RT-PCR)에 관한 자세한 사항은 다른 문헌을 참조하였으며 (장 등, 2001), 역전사 kit 및 중합연쇄반응 kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 실시하였다. 간단히 설명하면, Trisol (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 2  $\mu$ g의 total RNA를 역전사 반응액 (total volume: 50  $\mu$ l; 10  $\mu$ l of 5x RAV-RTase buffer, 20  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 0.02  $\mu$ M of IL-1 $\beta$  or  $\beta$ -actin anti-sense primer, 10 units of RAV-RTase)과 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 IL-1 $\beta$ 와  $\beta$ -actin의 cDNA를 합성하였다. 합성한 각각의 cDNA를 중합연쇄 반응액 (total volume: 50  $\mu$ l; 5  $\mu$ l of 10x Taq buffer, 4  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP, 1  $\mu$ l of 10 pmoles/ $\mu$ l IL-1 $\beta$  or  $\beta$ -actin sense or anti-sense primer, 8 units of Taq)과 혼합하여 IL-1 $\beta$ 와  $\beta$ -actin의 RT-PCR 증폭산물을 얻었다. 이 증폭 산물은 1% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. 실험에 사용한 primer의 염기서열 및 증폭산물의 크기는 Table 1에 나타내었다.

**7. 당분해효소에 의한 M11C의 IL-1 $\beta$  분비 저해효과 검사**

M11C는 다당체, 올리고당, 아민, 알칼로이드 성분 등으로

구성되어 있다. M11C가 splenocyte로부터 IL-1 $\beta$  생산 분비 효과에 있어서, M11C의 구성물질인 다당체, 올리고당, 아민 및 알칼로이드 중 어떠한 물질이 주 성분인지 알기 위해 본 실험을 수행하였다. M11C의 구성물질 중 면역활성 물질로 추정되는 것이 당이기에 우선 당분해효소 Viscozyme L (100  $\mu$ g/ml)를 이용해 M11C (200  $\mu$ g/ml)를 37 $^{\circ}$ C에서 여러 시간 동안 배양했다. 배양한 후 얻은 시료를 M11C + Viscozyme L라 표기하였다. Splenocyte로부터 IL-1 $\beta$  생산 분비에 있어서 시료 M11C + Viscozyme의 효과를 검사하기 위해 medium alone과 M11C (200  $\mu$ g/ml)와 같이 splenocyte를 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 자극한 후 배양액을 수집해 immunoblotting하여 IL-1 $\beta$  생산량을 검사하였다.

**8. 통계 처리**

실험성적은 평균 또는 mean  $\pm$  SEM로 나타냈으며, 각 group 간의 통계학적 검정에는 Excel 프로그램을 이용하여 T-검정하였다. p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 있는 값으로 간주하였다.

**결 과**

**1. Splenocyte로부터 IL-1 $\beta$  분비유도에 있어서 M11C의 농도 의존성 효과**

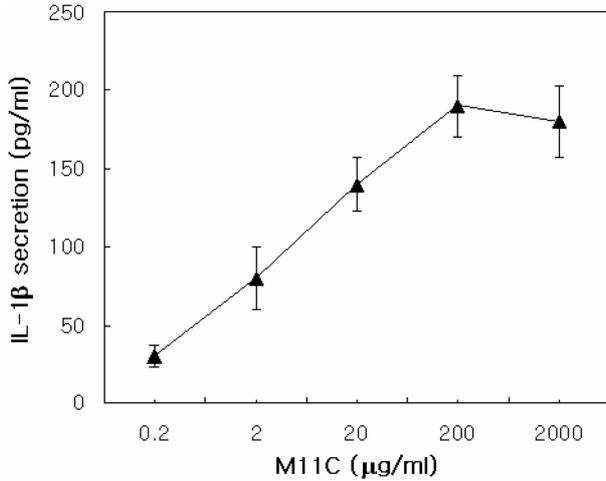
M11C로 splenocyte를 자극했을 때 M11C의 어느 농도가 최적의 효과인지 알기 위한 ELISA기법 검사결과는 splenocyte로부터 IL-1 $\beta$  분비효과가 농도 의존성이라는 것을 보여주었다 (Fig. 1). 0.2  $\mu$ g/ml 농도에서는 medium alone 처리군과 같은 IL-1 $\beta$  분비효과를 보였다. 농도가 증가함에 따라 IL-1 $\beta$  분비량이 증가하여 M11C의 농도 200  $\mu$ g/ml에서 190  $\pm$  20 pg/ml의 IL-1 $\beta$  분비량 최고정점을 보였으며, 2000  $\mu$ g/ml에서는 180  $\pm$  24 pg/ml로 plateau 현상을 보였다 (Fig. 1). 또한 ELISA기법으로 얻은 결과를 immunoblotting기법으로 재검정한 결과, 두 기법으로 얻은 결과들이 거의 일치하는 경향을 보여주었다 (Fig. 1, 2a 및 2b).

**2. Splenocytes로부터 IL-1 $\beta$  분비유도에 있어서 M11C의 자극시간 의존성 효과**

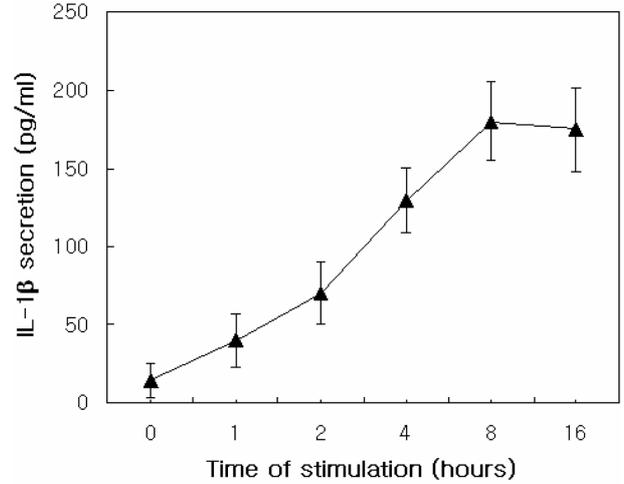
M11C로 splenocyte를 자극했을 때, 최적농도인 M11C (200

**Table 1.** Primers used in RT-PCR.

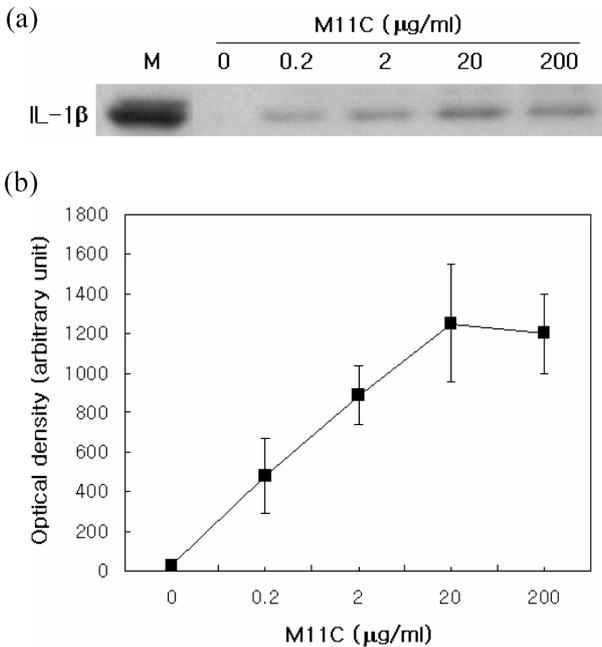
Target mRNA	Primer sequences	Product size (bp)
IL-1 $\beta$	sense : 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAAC-3' anti-sense : 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3'	563
$\beta$ -actin	sense:5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3' anti-sense:5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'	840



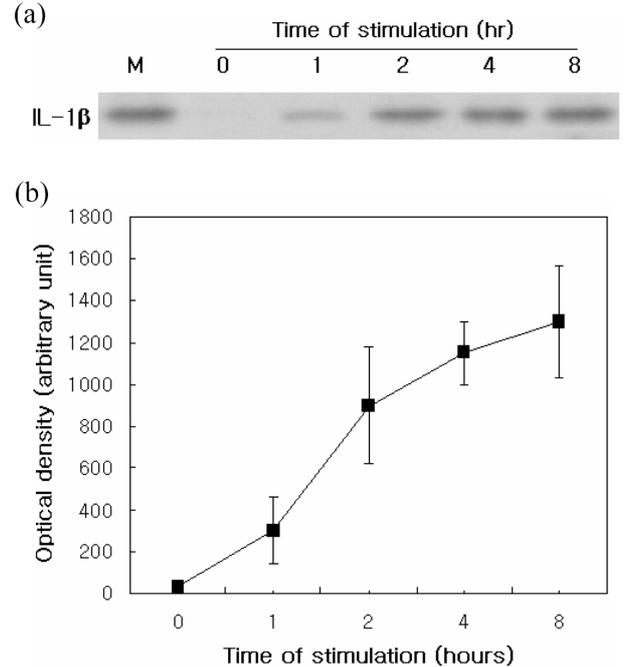
**Fig. 1.** The dose dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with the indicated concentrations of M11C for 8 hr. IL-1 $\beta$  secretion was detected by ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".



**Fig. 3.** The time dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with 200  $\mu\text{g/ml}$  M11C for 16 hr. IL-1 $\beta$  secretion was detected by ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M for two independent experiments with triplicates. All other details are described in "Materials and Methods".



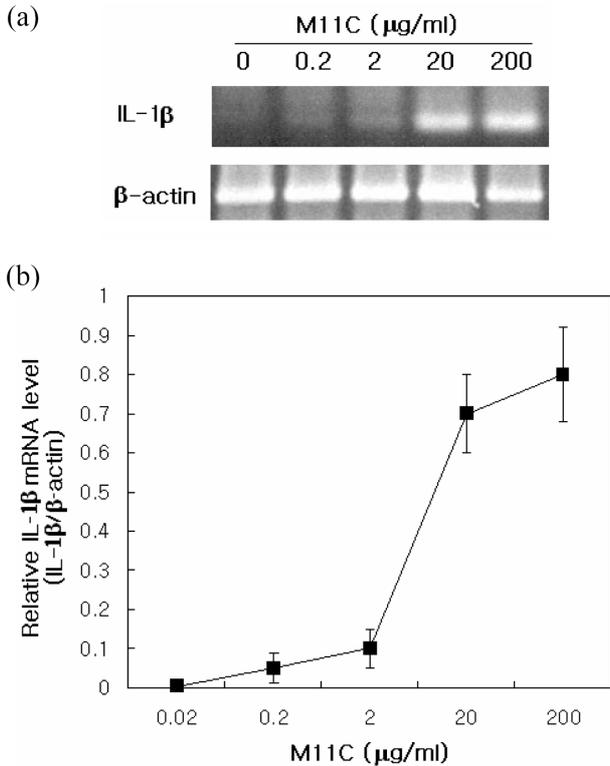
**Fig. 2.** The dose dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with the indicated concentrations of M11C for 8 hr. a) IL-1 $\beta$  secretion was analyzed by immunoblotting. **M** expresses the marker of IL-1 $\beta$ . 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. 4.** The time dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1 $\beta$  secretion from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with 200  $\mu\text{g/ml}$  M11C for 8 hr. a) IL-1 $\beta$  secretion was analyzed by immunoblotting. **M** expresses the marker of IL-1 $\beta$ . 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".

$\mu\text{g/ml}$ )에 의한 자극시간의 효과를 알기 위한 실험에서, ELISA 기법으로 얻은 결과는 1시간 자극에서 미미한 분비를 보이다

가 자극 8시간에서 최고 분비량  $180 \pm 25 \text{ pg/ml}$ 을 보였으며, 16 시간에서는  $175 \pm 27 \text{ pg/ml}$ 로 거의 정점에 도달했었다 (Fig. 3).

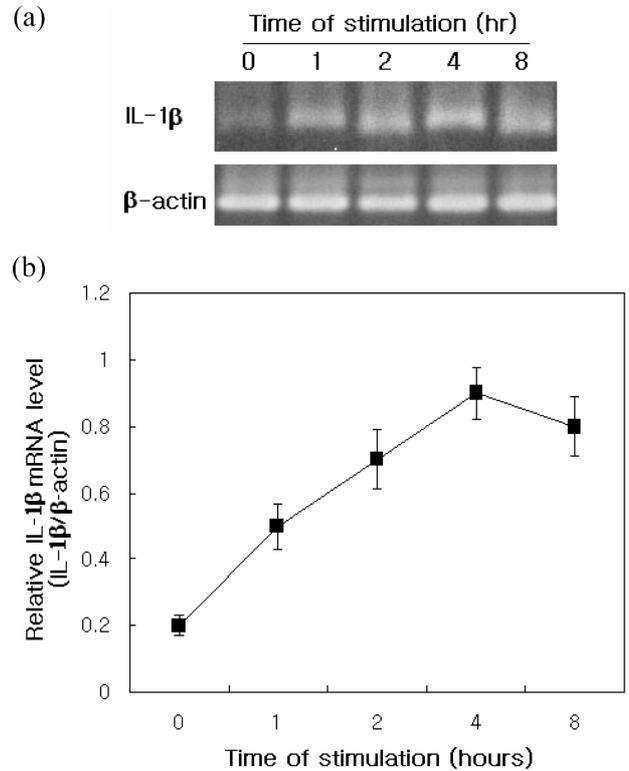


**Fig. 5.** The dose dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1β mRNA expression from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with the indicated concentrations of M11C for 4 hr. a) RT-PCR profile of splenocyte IL-1β and β-actin mRNA expression. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M for three independent experiments with triplicates. All other details are described in “Materials and Methods”.

ELISA 기법으로 얻은 결과들을 다시 한번 더 검증하기 위해 immunoblotting 실험 기법을 이용하여 수행하였다. 본 immunoblotting 실험결과에서 M11C의 최적 자극시간이 8시간임을 보여 주었으며, 본 기법으로 얻은 결과들이 ELISA로부터 얻은 결과와 같은 경향을 보여주었다 (Fig. 3, 4a 및 4b).

### 3. Splenocytes로부터 IL-1β mRNA의 전사유도에 있어서 M11C의 농도 의존성 효과

RT-PCR 기법에서, IL-1β mRNA 전사를 위한 M11C의 최저 및 최대 효과 농도를 알 수 있었다. M11C의 0.2 μg/ml 와 2 μg/ml 농도에서는 IL-1β mRNA 전사유도를 미미하게 보여주다가, 20 μg/ml 농도에서는 거의 최고의 유도효과를 그리고 200 μg/ml 농도에서는 최고의 유도효과를 보였다 (Fig. 5a와 5b). IL-1β mRNA 전사유도에 있어서, 20 μg/ml 농도의 효과와 200 μg/ml 농도의 효과는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. M11C의 IL-1β mRNA 전사유도를 위한 최대 효과 농도는 IL-1β 단백질 분비결과와 같았다 (Fig. 1, 2 및 5).



**Fig. 6.** The time dependent effect of Korean mistletoe crude extract (M11C) on IL-1β mRNA expression from splenocytes. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with 200 μg/ml M11C for 8 hr. a) RT-PCR profile of splenocyte IL-1β and β-actin mRNA expression. b) Densitometric analysis. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M for three experiments with triplicate. All other details are as described under “Materials and Methods”.

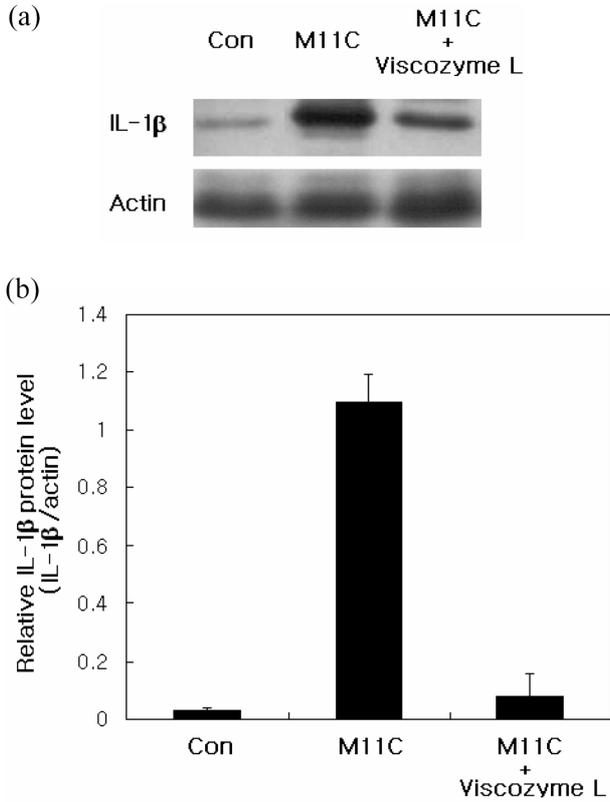
### 4. Splenocytes로부터 IL-1β mRNA의 전사유도에 있어서 M11C의 자극시간 의존성 효과

IL-1β mRNA 전사를 위한 최적 자극시간을 조사하였다. M11C 최적 농도인 200 μg/ml로 splenocyte를 자극했을 때, 1 시간 동안의 자극에서 전사의 효과를 확실하게 보이다가 4시간에서 최대의 전사유도효과를 보였다 (Fig. 6). 8시간 동안의 자극에서는 거의 plateau 현상을 보였다. M11C의 IL-1β mRNA 전사유도 최적효과 시간이 IL-1β 단백질생산 분비 최적효과 시간보다 4시간 앞서 있다는 것을 보여주었다 (Fig. 3, 4 및 6).

### 5. 당분해효소인 Viscozyme L로 처리된 M11C에 의한 splenocytes로부터 IL-1β 단백질생산 분비 저해효과

Splenocyte로부터 IL-1β 생산 분비에 있어 M11C의 구성물질들 중 어떠한 물질이 영향을 미치는지 알기 위해 M11C를 당분해효소인 Viscozyme L로 하루 동안 처리한 후 splenocytes를 자극하는 실험을 하였다. Viscozyme L로 처리하는 시

쥐의 비장세포로부터 IL-1 $\beta$  분비에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (비렉틴 구성물질)의 효과



**Fig. 7.** The inhibitory effect of saccharide degradation enzyme Viscozyme L on IL-1 $\beta$  secretion from M11C-stimulated splenocytes. Conditioned-media were obtained from media alone (**Con**), M11C (200  $\mu$ g/ml), or M11C (200  $\mu$ g/ml) plus Viscozyme L (100  $\mu$ g/ml)-stimulated splenocytes. a) The three conditioned media were analyzed for IL-1 $\beta$  measurement 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".

간이 24시간일 때 M11C에 대한 Viscozyme L의 억제효과가 제일 높았다 (data not shown). 이러한 Viscozyme L의 저해 효과는 M11C의 효과를 medium alone의 효과처럼 splenocytes로부터 IL-1 $\beta$  단백질생산 분비를 완전히 억제시켰다 (Fig. 7a와 7b).

## 고 찰

겨우살이 (Mistletoe, *Viscum album* L)는 참나무, 사과나무 및 뽕나무 등 여러 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생 식물로서, 오래전부터 유럽과 한국에서 민간요법의 치료제로 이용되어 왔다 (Kuttan & Kuttan, 1990). 유럽이나 한국에서 겨우살이에 대한 연구는 주로 겨우살이 구성물질 중의 하나인 당단백질 렉틴에 대해 많이 연구가 이루어졌다 (Yoon, 2003; Lyu & Park, 2006; Van Huyen *et al.*, 2006). 그러나 겨우

살이 렉틴 이외의 물질들에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있는 상황이다 (성 등, 2003; 이 등, 2003). 본 연구는 한국산 겨우살이가 일부 한약탕제에 사용되고 있다는 점을 감안하여, 한국산 겨우살이로부터 열에 약한 단백질 성분이 아닌 열에 의해서도 약리활성을 지니는 단백질 이외의 추출물이 어떤 면역학적 효능을 가지는 지 밝히고자 한 것이었다. 이 목적을 위한 연구 접근 중 하나가 M11C의 splenocyte로부터 IL-1 $\beta$  분비효과를 알기 위한 것이었다. 한국산 겨우살이를 열탕 추출 후 일부 용출된 지용성 물질을 제거한 추출물인 M11C는 겨우살이 렉틴이 가지는 적혈구 응집작용을 가지지 않았으며, 렉틴 기능이 없는 물질들 (non-lectin components)로 구성되어 있다고 알려져 있다 (장 등, 2001). 이러한 연구 결과는 한방탕제에서 사용되는 겨우살이의 약리활성 효능을 이해하는데 많은 도움을 주었다. 또한 M11C는 대식세포를 활성화해 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등과 같은 사이토카인을 분비한다는 것이 발표되어져 있다 (강 등, 2000; 장 등, 2001). Splenocyte는 면역기관 중 주요한 기관 중의 하나인 비장에 존재하는 세포이며, 이 세포가 활성화해 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-12가 분비된다는 것이 잘 알려져 있는 사실이다 (Labeur *et al.*, 1995). 따라서 M11C의 면역활성 효능을 알기 위한 연구 접근 방법들 중 하나가 M11C가 생쥐 splenocyte로부터 IL-1 $\beta$ 의 생산능력을 가지고 있는 지를 알아보는 것이었다. M11C로 splenocyte를 자극했을 때, IL-1 $\beta$ 의 생산과 전사에 있어서 M11C의 농도와 시간적 의존성 효과를 보였다 (Fig. 1-6). Splenocyte를 자극했을 때 IL-1 $\beta$ 가 생산 분비되는 최대 효과의 농도와 자극시간은 각각 200  $\mu$ g/ml와 8시간이었다 (Fig. 1-4). 이러한 IL-1 $\beta$  분비에 대한 ELISA 실험결과를 다시 한번 더 확증하기 위해 immunoblotting 실험기법을 이용한 검사에서도 ELISA에서 얻은 결과와 거의 같은 경향을 보였다. 이러한 결과들은 M11C가 splenocyte를 활성화시켜 IL-1 $\beta$ 가 생산 분비됨을 확증해 주었다. 유럽산 겨우살이 렉틴 ML은 사람 단구로부터 IL-1 $\beta$ 를 대조군보다 2~3배 더 분비하게 했다 (Ribereau-Gayon *et al.*, 1996). Splenocytes가 M11C의 자극을 받아 IL-1 $\beta$ 를 분비하기까지 세포내 여러 작용기전들에 의해 여러 전사조절 물질들을 활성화시킬 것이라 유추되었다. 따라서 본 실험에서도 IL-1 $\beta$  유전자의 전사와 해독의 관계를 알기 위해 RT-PCR기법을 이용하였다. 실험결과, IL-1 $\beta$  mRNA의 전사는 IL-1 $\beta$  단백질분비 결과처럼 M11C의 농도와 배양 시간에 의존했다 (Fig. 5-6). 최대의 IL-1 $\beta$  전사를 위한 M11C 농도는 최대의 IL-1 $\beta$  해독을 위한 농도와 같았다. 그러나 IL-1 $\beta$  전사의 최고점이 IL-1 $\beta$  단백질 생산 분비의 최고점에 도달하는 시간보다 4시간 정도 빠르다는 것을 보여 주었다 (Fig. 3, 4, 6). 이러한 IL-1 $\beta$  전사와 생산 분비기전을 연결해주는 신호전달에 관련된 인자들에 대해서는 추후 심도 있는 연구가 필요한 것으로 사료된다. 이러한 연구에 앞서 먼저 밝

히고자 했던 것은 다당체, 올리고당, 아민, 알칼로이드 등 여러 물질들로 구성된 M11C에서 이들 중 어떠한 물질이 IL-1 $\beta$  생산 분비에 있어서 주된 역할을 하는 지를 밝히고자 하는 것이었다. 이를 위해 먼저 당분해 효소가 M11C의 IL-1 $\beta$  생산 분비효과를 저해하는 지를 확인하여 보았다. 그 결과 당분해 효소인 Viscozyme L이 M11C의 IL-1 $\beta$  생산 분비효과를 완전히 저해한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 7). 이는 M11C의 구성물질 중 다당체 혹은 올리고당들이 IL-1 $\beta$  생산 분비를 유도하는 주된 물질임을 말해주고 있다. 결론적으로, 한국산 겨우살이 열당 추출물인 M11C에 포함된 여러 구성물질들 중 당계통의 물질이 splenocytes를 활성화해 IL-1 $\beta$ 를 전사 생산 분비하게 한다는 것을 보여 주었으며, 이는 겨우살이 당계통의 물질이 면역조절제로 기여할 수 있음을 제시하였다.

## 적 요

한국산 겨우살이 (*Viscum album L*)는 면역조절작용이 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서 한국산 겨우살이 열당추출물 M11C (non-lectin components)가 비장세포를 활성화시켜 IL-1 $\beta$ 를 생산 분비하게 하는지를 조사하였다. 비장세포를 M11C로 자극한 후, 배양액을 수집 혹은 세포 용해물을 수거해 IL-1 $\beta$  분비와 전사량을 ELISA, immunoblotting, RT-PCR로 검사하였다. 비장세포로부터 IL-1 $\beta$  분비와 전사 효과에 있어서 M11C는 농도 의존성과 자극시간 의존성을 보였다. 비장세포로부터 최대의 IL-1 $\beta$  분비를 위한 M11C의 최대의 농도와 자극시간은 각각 200  $\mu\text{g/ml}$ 와 8시간 이었다. 그리고 최대 IL-1 $\beta$  mRNA 전사를 위한 M11C의 최대의 농도와 자극시간은 각각 200  $\mu\text{g/ml}$ 와 4시간 이었다. 최대의 전사시간은 최대의 분비시간보다 4시간 빨리 도달된 것으로 나타났다. 이러한 최대의 IL-1 $\beta$  분비효과가 당분해효소인 Viscozyme L에 의해 완전히 저해되었다. 이는 M11C (non-lectin components)의 구성물질들 중 다당체 혹은 올리고당들이 IL-1 $\beta$  생산 분비를 유도하는 주된 물질임을 말해주고 있다.

## 사 사

이 논문은 산업자원부 지정 지역협력연구센터인 건국대학교 바이오 식·의약 연구센터의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

## LITERATURE CITED

Dinarelo CA (1989) Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44:153-205.  
 Franz H, Ziska P, Kindt A (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). *Biochem. J.* 195:481-484.

Johnston RB (1988) Current concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318:747-752.  
 Khwaja TA, Varven JC, Pentecost S, Pande H (1980) Isolation of biologically active alkaloids from Korean mistletoe *Viscum album, coloratum*. *Experientia.* 36(5):599-600.  
 Kuttan, D.M, Kuttan, R (1990) Effect of a preparation from *Viscum Album* on tumor development I vitro and in mice. *J. Ethnopharmacology.* 29:35-42.  
 Lyu SY, Park WB (2006) Mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) modulates proliferation and cytokine expressions in murine splenocytes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39(6):662-670.  
 Labeur MS, Arzt E, Wieggers GJ, Holsboer F, Reul JM (1995) Long term intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone administration induces distinct changes in rat splenocyte activation and cytokine expression. *Endocrinology,* 136(5):2678-2688.  
 Matsushima K, Akahoshi T, Yamada M, Furutani Y, Oppenheim JJ (1986) Properties of a specific interleukin 1 (IL-1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1-alpha and IL 1-beta. *J Immunol.* 136(12):4496-502.  
 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.  
 Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J. Biol. Chem.* 262(7):2941-2944.  
 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.  
 Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R (1996) Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 109(1-2):33-38.  
 Van Huyen JP, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV (2006) Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett.* 243(1):32-37.  
 Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Shimazaki K, Song SK, Lee KH, Kim SH, Park CH, Azuma I, Kim JB (1999) Lectins isolated from Korean mistletoe induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* 136:33-40.  
 Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB (2003) Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch. Pharm. Res.* 26(10):861-867.  
 강태봉, 채동주, 장성호, 문세환, 김종배, 허익 (2000) Macrophages로부터 TNF- $\alpha$  분비 및 전사에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (Non-Lectin Components)의 효과. *대한면역학회지,* 22(4):207-215.  
 성기태, 강태봉, 전명하, 장성호, 이준호, 김종배, 최완수, 유영춘, 성낙술, 이성태, 성현제, 허익 (2003) 한국산 겨우살이 추출물 M11C (비렉틴 구성물질)의 생쥐 비장 대식세포로부터 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  분비효과와 생쥐에 Sarcoma 180으로 유도된

쥐의 비장세포로부터 IL-1 $\beta$  분비에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (비렉틴 구성물질)의 효과

육종암의 성장 억제효과. 생약학회지, 34(3):210-217.  
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 억제작

용. 한국약용작물학회지, 11(2):89-96.  
장성호, 전명하, 강태봉, 문세환, 이준호, 성낙술, 이성태, 김종배, 허억 (2001) Macrophages로부터 IL-1 $\beta$  분비 및 전사에 있어서 한국산 겨우살이 추출물 M11C (non-lectin components)의 효과. Immune Network, 1(2):170-178.