

한국산 겨우살이 추출물의 *in vivo* 독성 및 항종양 효과

윤택준¹ · 박성민 · 양승훈 · 정희윤 · 이안나 · 유영춘² · 강태봉 · 김종배*

한동대학교 생의학연구소, ¹유한대학 식품영양과, ²건양대학교 의과대학

In Vivo Toxicity and Anti-Tumor Activity of Korean Mistletoe Extracts

Taek Joon Yoon¹, Sung Min Park, Seung Hoon Yang, Hoe Yune Jung, An Na Lee, Yung Choon Yoo²,
Tae Bong Kang and Jong Bae Kim*

Institute for Biomedical Research, Han-Dong University, Pohang 795-940 Korea

¹Department of Food & Nutrition, Yuhan University, Bucheon 422-749, Korea

²Department of Biochemistry, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-801, Korea

Abstract – Antitumor activity of Korean mistletoe extract (KM-110) and European commercial mistletoe preparation (Helixor) was investigated. KM-110 showed the cytotoxic effect that it is high for various tumor cell lines and normal splenocytes in comparison with Helixor. Administration of two mistletoe extracts (100 µg) to mice did not show any significant changes on the level of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvate transaminase (GTP), blood creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN) in sera. The culture supernatant of macrophages stimulated with KM-110 inhibited effectively tumor growth whereas Helixor had little effect. Administration of KM-110 or Helixor resulted in a effective inhibition of lung metastasis after the i.v. inoculation of colon 26-M3.1 lung carcinoma, B16-BL6 melanoma and L5178Y-ML25 lymphomas. In all cases, the mice treated with KM-110 showed more effective anti-tumor metastatic activity than the mice of Helixor. These results suggest that Korean mistletoe extracts, KM-110 might be used as an alternative methods having antitumor activity like European mistletoe preparation, Helixor.

Key words – *Viscum album*, cytotoxicity, macrophage, tumor metastasis

악성종양의 극복방법 중 하나인 면역요법(immunotherapy)은 생체내의 면역세포를 이용함으로써 생체에 부작용이 적고 안전성이 높은 가장 자연적인 치료방법으로 인정되고 있다. 그러나 악성종양 환자에게 면역요법 단독치료만으로는 종양의 재발과 전이와 같은 문제로 인해 치료효과의 한계를 보인 것도 사실이다.^{1,2)}

악성종양의 극복방법 중 하나인 면역요법(immunotherapy)은 단독치료만으로는 종양의 재발과 전이와 같은 문제로 인해 치료효과의 한계를 보인 것도 사실이지만,^{1,2)} 생체내의 면역세포를 이용하기에 부작용이 적고 안전성이 높은 가장 이상적인 치료방법으로 인정되고 있다. 따라서 종양의 성장이나 전이를 억제하기 위하여 면역계를 자극시킬 수 있는 방법에 관한 여러 연구가 진행되었다. 예로서, 불활성화 시킨 bacteria나 bacteria의 대사산물인 lipopolysaccharide (LPS), *Mycobacteria spp*, *Corynebacterium paruum* 등은 면

역계를 비특이적으로 자극시켜, 종양의 증식을 억제시키는 등 유효한 생물학적 활성이 인정되었으나, 그들의 강한 독성 및 발열반응 등 심각한 부작용으로 일으키기에 임상에는 적용하지 못하는 실정이다.³⁾ 따라서 부작용이 없는 물질을 찾으려는 시도로서, 과거로부터 민간요법으로 사용되어 온 약재 등의 천연물에 대한 관심이 높아지고 있다.^{4,5)} 이러한 측면에서 겨우살이는 악성종양의 극복을 위한 면역요법 제재로서, 또한 항암제와 병용투여 할 수 있는 병용요법제 제로서도 가장 가능성이 있는 물질 중의 하나라 사료된다.^{6,9)}

겨우살이(*Viscum album*)는 고대로부터 유럽에서 여러 가지 질병에 대한 약재로 사용되어 왔고, 1921년 Rudolf, S.에 의하여 항종양제제로서의 가치가 인정된 이래, 유럽 지역에서 서식하는 *Loranthaceae*과에 속하는 겨우살이는 독일과 스위스 등의 유럽 여러 나라에서 이미 종양의 치료제로 승인되어 사용되어지고 있다.^{6,9)} 겨우살이 추출물의 항종양 효과는 여러 가지 종양세포주에 대하여 세포독성 및 면역세포를 자극 혹은 조절하는 능력에 기인하는 것으로 보

*교신저자 (E-mail): jbkim@handong.edu
(Tel): 054-260-1350

고되고 있고,^{4,9,10} 그 활성성분으로 lectins, polysaccharids 및 alkaloids 등이 알려져 있다.⁶⁻¹⁰

한편, 한국산 겨우살이(*Viscum album var. Coloratum*)의 항암 활성 연구는 유럽에 비하여 비교적 늦게 시작이 되었으나, 최근 한국산 겨우살이 추출물의 효과 및 대표활성 성분인 lectin의 분리와 작동기전에 대한 연구가 진행되면서 항종양 물질로서 개발하려는 노력이 진행되고 있다.¹¹⁻¹⁵ 즉, 한국산 겨우살이 추출물로부터 분리된 lectin 성분(KML-C)은 유럽산 lectin(ML-I)과 비교하여 당특이성의 차이가 있고 여러 종양세포에 대하여 더 높은 세포독성 활성이 있음을 보고하였다.¹¹ 이들 한국산 겨우살이의 lectin 성분은 세포독성 외에도 강력한 면역자극활성을 가지고 있어 생체 탐식세포 및 NK-cell을 활성화시킴으로 종양의 전이를 유의하게 억제하는 활성이 있음이 보고되었다.¹³ 추출물로서의 한국산 겨우살이는 세포독성 및 면역자극활성 외에도 혈관내피세포의 증식을 억제함으로써 종양의 전이를 막고,¹⁵ 항원에 대한 특이적 면역증강활성에 기인되는 adjuvant 활성도 보고되었다.¹⁴

본 연구는 실험동물에서 항암 활성을 가지는 농도에서 한국산 겨우살이 추출물의(KM-110)의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성, 구성성분의 분석 및 생체에 대한 안전성 실험을 수행하였으며, 그 결과를 이미 우리나라에서도 수입되어 임상 적용되고 있는 유럽산 겨우살이 추출물인 Helixor와 일부 비교하였다. 이는 향후 한국산 겨우살이를 이용한 새로운 항암제 개발은 물론 현재 수입되고 있는 유럽산 겨우살이로 제조된 항암제를 대체할 수 있는 근거자료로도 활용할 수가 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

겨우살이 추출물의 제조 - 본 연구에 사용된 한국산 겨우살이(*Viscum album Coloratum*)는 강원도 양양지역에서 서식하는 참나무를 숙주로 하여 생장하는 겨우살이로서 1월에 채취하였다. 겨우살이의 추출은 기존의 방법¹¹으로 추출 후 동결건조 하였다. 약술하면, 100 g의 겨우살이 잎 및 줄기를 세절 후, 10배 volume의 증류수를 넣고 믹서기로 분쇄 후 4°C에서 16시간 교반하였다. 그 후 원심분리(10 m 000 rpm/30 min, 4°C)를 통하여 얻은 상등액을 동결건조 하였다. 제조된 동결건조물을 PBS에 용해시켜 stock solution (10 mg/ml)을 제조하였고 KM-110으로 칭하였다. 대조군으로 사용한 유럽산 겨우살이(*Viscum album Lorantheae*) 추출물인 Helixor(사과나무 유래)는 독일 Helixor사에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 - 본 실험에서 사용된 동물인 생후 6-8주령의 BALB/c 및 C57BL/6 마우스는 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 구입하였으며, 한동대학교 생의학연구소 실험

동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5-10마리씩 넣어 정수 된 물과 실험동물용 펠렛사료(삼양사료주식회사)를 자유 공급하였다.

시약 - 본 실험에 사용한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential(MEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco(USA)사에서, cell counting kit(EZ-Cytox)는 Daeil Lab(Seoul, Korea)사에서 구입하였다.

세포주 및 세포배양 - 본 실험에 사용된 종양 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma, B16-BL6 melanoma, L5178Y-ML25 lymphoma는 일본 북해도 대한 면역과학연구소로부터 기증 받아 사용하였다. Colon26-M3.1 carcinoma와 B16-BL6 melanoma는 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 MEM 배지로 배양하였으며, L5178Y-ML25 lymphoma, 마우스로부터의 lymphocytes는 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640배지로 배양하였다.

In Vitro 독성실험 - KM-110의 종양세포에 대한 세포독성 효과를 조사하기 위하여 각 종양세포를 $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ 의 세포 농도로 96 well plate(Costar, Cambridge, MA)의 각 well에 plating 하였다. 그 후 KM-110 최고농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 부터 5배 희석법으로 희석하여 종양세포가 plating된 각 well에 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂ 및 95% 이상의 습도를 유지하는 배양기에서 3일간 배양하였다. 정상 비장세포 대한 KM-110의 효과를 측정하기 위하여 6-8주령의 BALB/c 마우스에서 멸균적으로 비장(spleen)을 회수하여 $5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ 이 되도록 조정 후 96 well culture plate의 각 well에 plating 하였다. 그 후 여러농도의 KM-110 및 B 및 T세포의 자극 물질(mitogen)로 알려진 lipopolysaccharide(LPS) 및 concanavallin A(ConA)를 최종농도가 각각 5 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 각 well에 첨가 후 72시간 배양하였다. 배양종료 2시간 전에 cell counting kit의 용액을 제조사의 지침에 따라 적용하여 측정하였다.

In Vivo 독성실험 - 겨우살이 추출물의 마우스에 미치는 영향을 조사하기 위하여 KM-110과 Helixor를 정맥주사로 각각 5 mg/kg씩 투여 후, 1, 3, 5일째에 혈액으로부터 혈청을 취하여 체내 신진대사에 관여하는 두 장기인 간(liver) 및 신장(kidney)에 미치는 영향을 조사하였다. 간장의 기능은 간세포가 함유하는 glutamic-oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic-pyruvate transaminase(GPT)의 두 효소를, 신장의 기능은 blood creatinine(CRE)와 blood urea nitrogen(BUN)의 혈중농도를 조사하여 측정하였다. 각 효소 함량은 Fuji Dry Chem System(Fuji Photo Film Co. Ltd, Japan) 기기를 이용하여 측정하였다.

Gel Filtration - KM-110 및 Helixor의 분석 실험을 위한 gel filtration은 Sephadex LH-20 gel(Pharmacia Ltd, Sweden)

을 제조사의 지침에 따라 swelling 한 후, bead를 1.5×110 cm의 column에 PBS를 이용하여 충전 하였다. 그 후, 50 mg/ml의 각 겨우살이 추출물 2 ml을 column에 apply한 후 PBS를 이용하여 1 ml/min의 속도로 용출하였으며 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Macrophage 배양상등액에 의한 종양세포의 증식억제 효과 - 시료에 의한 macrophage의 자극은 기존의 방법을 이용하였다¹³⁾. 약술하면, C57BL/6 마우스에 3% thioglycollate를 1 ml 복강주사하고 3일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 ml를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수확한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10⁶/ml의 농도로 조정하여 분주하였다. 그 후 시료로서 100 µg/ml의 KM-110과 700 µg/ml의 농도로 조정된 Helixor를 첨가하고 24시간 배양하였다. Macrophage 배양상등액의 종양세포 증식억제 효과를 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 5×10³ cells/50 µl로 조정된 B16-BL6 melanoma에 각 시료로 자극된 macrophages 배양상등액 50 µl을 첨가하고 2일간 배양 후, cell counting kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 종양세포의 증식억제 효과를 조사하였다.

Colon26-M3.1 Lung Carcinoma의 종양전이 모델 - 시료의 항종양 효과는 colon26-M3.1 lung carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다¹⁵⁾. 실험동물로 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 2.5×10⁴의 colon26-M3.1 lung carcinoma 세포를 정맥주사(i.v.) 하였다. 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 균집 수를 측정하였다. 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였다.

통계처리 - 그룹들 간의 통계적 유의성은 student's two-tail *t* test로 결정하였다.

결과 및 고찰

겨우살이의 종양세포 및 정상세포에 대한 세포독성효과 - KM-110과 Helixor 종양세포 및 정상세포에 대한 직접적인 세포독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다. 실험에 사용된 종양세포는 마우스 유래의 L5178Y-ML25 lymphoma, B16-BL6 melanoma와 colon26-M3.1 lung carcinoma이고, 정상 세포는 BALB/c 마우스의 비장세포를 사용하였다. Fig. 1은 KM-110의 마우스 유래의 종양 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma, B16-BL6 melanoma 및 L5178Y ML25 lymphoma에 대한 세포독성 효과를 나타낸 것이다. 각 세포독성 효과를 대조군에 비하여 50%의 성장 억제를 보이는 시료의 농도인 ED₅₀ 값은 각각 31.6, 20.6 및 3.5 µg/ml으로 나타난 반면 Helixor는 ED₅₀ 값은 모든 세포주에 대하여 100 µg/ml

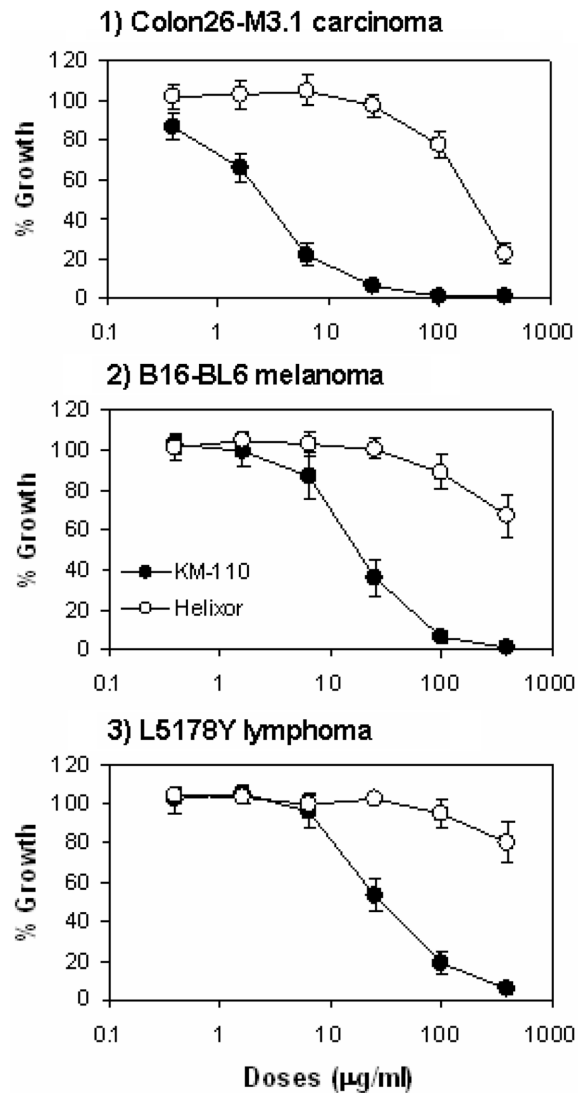


Fig. 1. Cytotoxic effect of mistletoe preparations on variety of murine tumor cell lines. Tumor cells (1×10⁴/well) were plated into 96 well plate. Serial diluted KM-110 or Helixor added into the plate and the cells were incubated for 72 hr. The viability of the cells was measured by colorimetric assay as described in Materials and Methods.

이상인 결과를 보임으로서 실험에 적용한 종양세포주들에 대하여 유의한 세포독성 효과를 나타내지 않았다. 한편, Fig. 2의 결과에 제시한 바와 같이 정상세포에 대한 KM-110의 ED₅₀ 값은 14-20 µg/ml을 나타냈으며, Helixor의 경우는 100 µg/ml 미만의 농도에서는 정상세포에 대하여 직접적인 세포 독성효과가 없는 결과를 보였다. 결론적으로 참나무 유래의 한국산 겨우살이 추출물인 KM-110의 경우 암세포 및 정상세포에 대한 *in vitro* 세포독성 효과를 측정한 결과 ED₅₀ 값은 3.5-31.6 µg/ml인 결과를 보였으나 사과나무 유래의 유럽산 겨우살이 추출물인 Helixor의 경우는 100 µg/ml의 농도까지는 유의한 세포독성 효과가 없는 결과를 보였다.

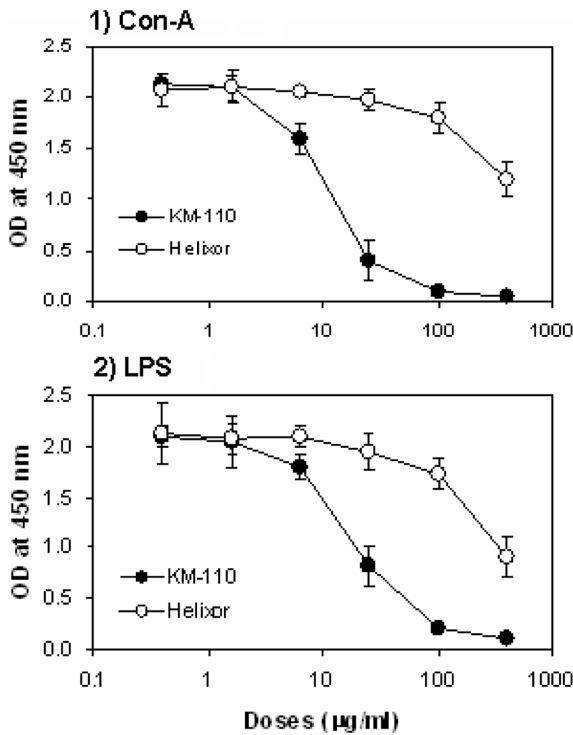


Fig. 2. Cytotoxic effect of mistletoe preparations on normal cells. Spleen cells (1×10^6 /well) from BALB/c were plated into 96 well plates. Serial diluted KM-110 or Helixor were added into the plate and the cells were incubated for 72 hr. The viability of the cells was measured by cell counting kit.

현재까지 겨우살이 세포독성에 관한 연구결과에 의하면 이들의 대표적인 세포독성물질은 lectins으로 보고되고 있다.^{10,11)} 참나무 유래의 한국산 겨우살이인 10 mg의 lectin 함량은 약 500 ng인 결과를 보인바 있고,¹⁵⁾ 겨우살이 추출물의 *in vitro* 세포독성 효과는 lectin에 대한 항체로 증화되는 보고가 있었던 바,¹⁵⁾ 사과나무 유래의 유럽산 겨우살이 추출물인 Helixor의 경우 100 µg/m의 농도세포독성 효과가 나타나지 않는 가장 큰 이유는 Helixor에는 lectin 함량이 적은 것으로 사료되었다. 앞으로 한국산 겨우살이 추출물의 응용을 위하여 숙주나무에 따른 lectin 함량 및 그에 의한 세포독성 효과 등에 관한 비교 연구가 필요할 것으로 생각된다.

KM-110과 Helixor의 Gel Filtration - KM-110과 Helixor를 Sephadex LH-20 gel filtration column으로 분리하였을 때 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻었다. KM-110의 경우 34번, 40번, 70번 및 90번 중심으로 하는 4개의 분획(각각 분획 K1, K2, K3, K4)으로 구성된 반면, Helixor의 경우는 40번 및 87번을 중심으로 하는 2개의 분획(분획 H1 및 H2) 구성되는 결과를 보였다. 이 결과로 KM-110의 K2 분획과 Helixor의 H1번 분획은 동일한 분자량을 가지는 물질로 추

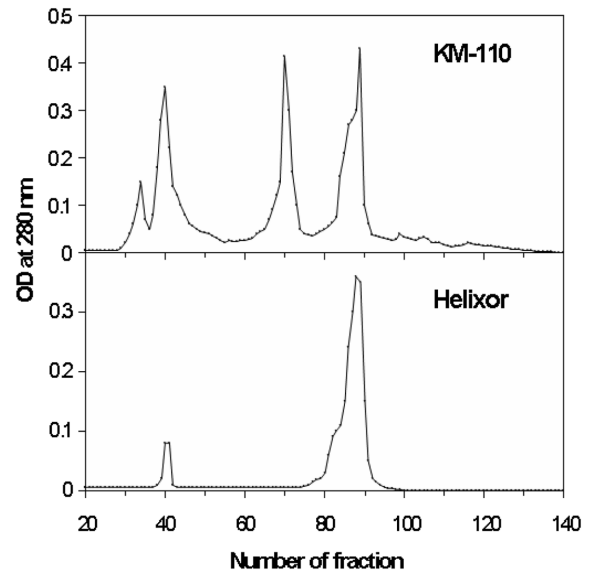


Fig. 3. Chromatograms of gel-filtration of KM-110 and Helixor.

정되었고, H2 분획이 K4 분획의 분자량이 유사할 것으로 생각되었다. KM-110의 Chromatogram에서 86번 분획부터 90번 분획을 포함하는 K4분획의 경우 87번 및 90을 정점으로 하는 최소한 두 가지 분자량을 가지는 물질이 혼합되는 양상을 보인 바, Helixor의 H2분획은 KM-110의 K4 분획의 87번 분획과 분자량이 같은 성분일 것으로 관찰되었고, 예리한 피크를 보여준 90번 분획은 분자량을 달리하는 성분일 것으로 생각되었다. 동일한 조건에서 분자량 66KDa의 bovine serum albumin(BSA)은 38-40번 분획에서 peak를 나타냄으로서 KM-110의 K2번 및 Helixor의 H1 분획은 분자량 6만정도의 lectin을 함유하는 분획인 것으로 생각되었다. 한편 chromatogram 60번 이후의 물질은 분자량 1만 이하인 것으로 추정되었다. 따라서 Fig. 1 및 Fig. 2의 세포독성 효과가 Helixor의 경우 KM-110에 비하여 낮은 이유는 독성을 가지는 lectin이 KM-110에 비해 소량 함유되어 있을 뿐만 아니라 KM-110 및 Helixor 내에 존재하는 lectin의 독성 효과 정도가 차이가 있기 때문인 것으로 사료된다¹¹⁾. 향후 한국산겨우살이를 이용한 항암제 개발에 있어서는 정상세포에 대한 독성을 줄일 수 있는 방법을 고려하여야 하겠지만, Khwaja등^{10,16)}이 이미 보고한 것처럼 한국산이 유럽산에 비해 항암효과가 더 큰 것은 분명한 것으로 사료되며 한국산이 유럽산을 대체할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다.

KM-110의 *in vivo* 독성실험 - *In vivo*에서 KM-110은 정상세포에 대하여 비교적 강한 세포독성 효과를 나타낸 반면, Helixor는 유의한 세포독성 효과를 나타내지 않았다. *In vitro*에서의 세포독성 결과는 항암제로의 개발을 위한 항종양 활성의 지표로 중요한 결과 중의 하나로 판단되나, 이러

한 독성이 생체에서 항암 유효농도에서 부작용을 나타낸다면 임상에의 적용은 어려울 것으로 판단되었다. 따라서 *in vivo* 실험결과 가장 유효한 항암 활성을 가진 농도인 100 µg의 투여에 의한 KM-110의 독성 효과를 조사하였다. 대조군으로는 동일한 농도의 Helixor를 사용하였으며 시료의 투여 방법은 정맥주사 하였으며 실험 항목으로 간독성의 지표물질인 GOT 및 GPT의 두 효소와 신장으로부터의 대사산물인 CRE 및 BUN의 혈중농도를 조사하였다. 실험 결과, KM-110 및 Helixor의 경우 모두 간으로부터의 GOT 및 GPT 및 신장으로부터의 CRE 및 BUN 혈중농도 수치가 유의하게 상승하지 않는 것을 보아 두 장기 세포에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다(Fig. 5). 더욱이 육안소견으로 입모(수축에 의하여 피지선을 눌러 분비를 촉진시키며 또 털을 꼳꼳이 바로 서게 함) 등의 발열반응에 기인하는 부작용은 관찰되지 않았고, 체중의 감소도 보이지 않았다. 따라서 KM-110이 Helixor에 비하여 *in vitro* 실험에서 정상세포에 대하여 높은 세포독성을 가지나, 각각 100 µg을 혈관주사로 실험동물에 투여하였을 경우 유의한 독성활성이 없는 결과를 보였다. 기존의 연구보고에서 lectin 성분은 겨우살이 추출물에서 염증반응 등의 독성효과를 나타내는 주성분으로 알려져 있다^{4,6,13}. 본 실험에 적용한 100 µg의 KM-110내에 함유된 lectin의 농도는 5 ng 정도로 추정되었고¹⁵, 마우스를 이용한 lectin의 대한 독성실험 결과 LD₅₀ 값은 31~62.5 µg/kg인 것으로 보고되었다¹⁷. 따라서 본 실험에 적용한 100 µg의 KM-110 투여는 마우스에서 부작용을 가지지 않는 안전한 농도로 사료되었다.

Macrophages 배양상등액의 종양증식 억제 효과 - 종양에 대하여 활성화된 macrophages는 TNF-α 혹은 활성산소 등의 액성인자를 유도하고, 종양과 접촉하여 종양의 증식을 억제하거나 살해하는 활성을 가지게 된다.⁶ Fig. 4에서 100 µg/ml의 KM-110 및 700 µg/ml의 Helixor에 의하여 자극된 macrophages 배양상등액은 B16-BL6 melanoma의 증식을 억제 하였다. Helixor의 경우 KM-110의 유효농도인 100 µg/ml의 자극으로는 종양의 증식을 억제하지 못하였으며, KM-110에 비하여 7배 높은 농도인 700 µg/ml를 자극한 경우에서도 KM-110의 자극에 의한 배양상등액의 종양증식 억제율(45.5%)에 미치지 못하였다(21.6%). 따라서 macrophages를 자극하는 기작은 KM-110의 경우가 Helixor에 비하여 우수한 결과를 보였다. KM-110은 macrophage를 자극하여 TNF-α 등 여러 가지 항종양 활성을 가지는 cytokines을 유도하였고,^{13,15} 이들 배양상등액은 혈관내피세포를 자극함으로써 혈관신생을 억제하여 암의 전이를 억제하는 활성이 있음이 보고된 바가 있다.¹⁵ 따라서 본 결과에서 KM-110에 의한 macrophage의 배양상등액에 의한 B16-BL6 세포의 증식 억제능을 가지는 이유 중의 하나는 KM-110에 의한 cytokines의 유도능력일 것으로 사료되며,¹³⁻¹⁵

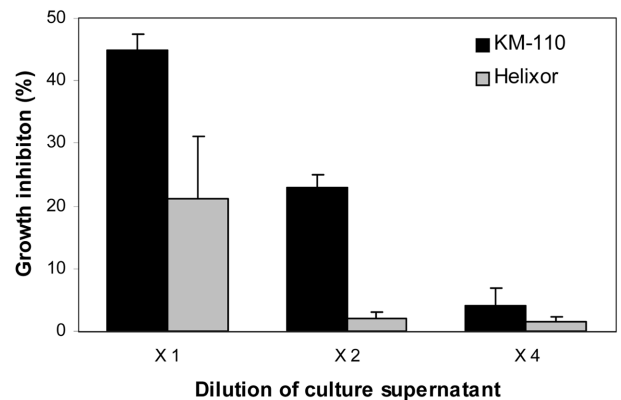


Fig. 4. Growth inhibition of B16-BL6 cells by the culture supernatant of murine macrophages treated with mistletoes. B16-BL6 melanoma cells (3×10^5) were plated into 96 well plate and added macrophages cultured supernatant and incubated for 72 hr. The viability of the cells was measured by cell counting kit.

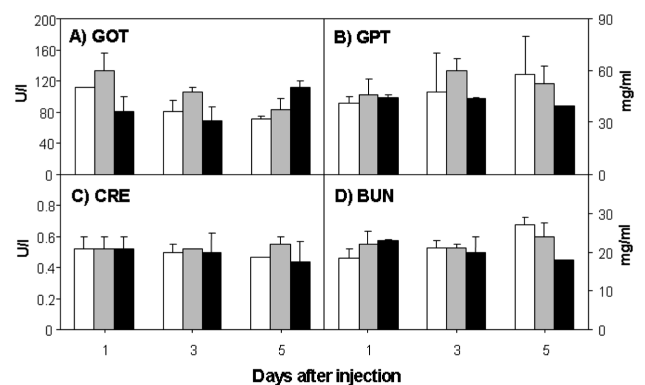


Fig. 5. Level of GOT, GPT, CRE and BUN in sera of mice injected with mistletoe preparations. BALB/c mice were injected i.v. with mistletoes and bled on the days indicated. □, control; ■, injected with 100 µg of Helixor; ■, injected with 100 µg of KM-110

이 결과는 종양세포에 대한 KM-110의 세포독성 효과와 더불어 Table I 및 II의 KM-110이 Helixor에 비하여 우수한 종양전이 억제능이 유도된 이유 중의 하나로 생각된다.

KM-110과 Helixor의 종양전이 억제 효과의 비교 - 성숙 마우스에 있어서 100 µg의 KM-110 및 Helixor의 투여는 생체에 부작용이 없는 것으로 밝혀졌기에 동일한 농도의 투여에서 두 겨우살이 추출물의 치료적 투여에 의한 종양전이 억제활성을 직접 비교하였다. Table I은 colon 26-M3.1 carcinoma 및 B16-BL6 melanoma에 의한 실험전이 모델에서 각 겨우살이의 혈관주사에 의한 치료적 암전이 억제활성에 대한 결과이다. Colon26-M3.1 carcinoma에 의한 전이 모델에 적용한 결과, 한편, 혈관주사(i.v.)를 할 경우, KM-

Table I. Comparison on therapeutic effect of mistletoe extracts by i.v. administration on lung metastasis model

Treatment Range	Dose	No. of lung metastasis (inhibition %) of			
		Colon 26-M3.1		B16-BL6	
		Mean±SD	range	Mean±SD	range
Control (Challenge only)		127±9	116-139	79±13	63-102
KM-110	100	64±27** (49.6)	37-85	46±13* (39.5)	32-59
Helixor		81±27* (36.2)	52-115	56±5* (26.3)	48-60
KM-110	10	75±18* (40.9)	55-96	69±19	51-94
Helixor		109±20	52-115	78±15	63-105

Groups of five BABL/c or C57BL/6 mice (7 weeks, female) were inoculated i.v. with colon26-M3.1 and B16-BL6 cells and injected i.v. with Helixor or KM-110 one day after tumor challenge. Mice were killed 14 days after tumor challenge for evaluation. The values in parenthesis represent % inhibition of compared with control group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ by Student's two-tailed t test, compared with control group.

Table II. Comparison on therapeutic effect of mistletoe extracts by s.c. administration on lung metastasis model

Treatment Range	Dose	No. of lung metastasis (inhibition %) of			
		Colon 26-M3.1		B16-BL6	
		Mean±SD	range	Mean±SD	range
Control (Challenge only)		127±9	116-139	79±13	63-102
KM-110	100	72±32** (43.3)	40-89	60±5* (24.1)	53-64
Helixor		101±19	82-130	76±18	51-92
KM-110	10	84±13	70-100	80±8	71-99
Helixor		131±15	114-149	77±15	61-110

Groups of five BABL/c or C57BL/6 mice (7 weeks, female) were inoculated i.v. with colon26-M3.1 and B16-BL6 cells and injected i.v. with Helixor or KM-110 one day after tumor challenge. Mice were killed 14 days after tumor challenge for evaluation. The values in parenthesis represent % inhibition of compared with control group. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ by Student's two-tailed t test, compared with control group.

110은 100 및 10 μg 에서 각각 49.6 ($p < 0.01$) 및 40.9% ($p < 0.05$)의 종양전이 억제 활성을 보인 반면 Helixor의 경우는 100 μg 의 경우에서만 유의한 종양 전이 억제활성(36.2%; $p < 0.05$)을 보였다. B16-BL6 melanoma를 이용한 전이모델에서의 결과도 KM-110이 Helixor에 비하여 높은 종양전이 억제 효과를 보였다. 한편, 각 겨우살이 추출물의 피하주사 (s.c.) 결과 KM-110 100 μg 의 투여는 colon26-M3.1 및 B16-BL6 melanoma 모델에서 각각 43.3% ($p < 0.01$) 및 21.7% ($p < 0.05$)의 종양전이 억제효과를 보인 반면, Helixor의 경우는 유의한 항종양전이 효과가 인정되지 않았다. 결론적으로 colon26-M3.1 carcinoma 및 B16-BL6 melanoma에 의한 종양전이 모델에서 Helixor는 혈관주사에 의한 경우만 치료효과를 보인 반면, KM-110의 경우 피하 및 혈관주사 모두 유의한 항종양전이 활성을 보임으로 KM-110이 주사방법 및 종양세포주에 관계 없이 Helixor에 비하여 높은 항종양 활성을 가진 결과를 나타냈다. 한편, 각 겨우살이 추출물의 예방적 투여에 의한 lymphoma 세포주의 전이 억제 활성도 유사한 경향을 결과를 나타냈다. 즉, Table III의 결과에 제시한 바와 같이 종양접종 2일전에 KM-110의

혈관투여는 간(liver) 및 비장(spleen)의 종양전이를 각각 78.4% ($p < 0.01$) 및 58.3% ($p < 0.05$) 정도로 억제한 반면, Helixor의 경우는 유의한 억제활성이 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 고찰 한 결과, KM-110의 경우, 비혈액암(colon26-M3.1 및 B16-BL6) 및 혈액암(L5178Y-ML25)에 모두 유의한 항종양 활성을 가지는 반면, Helixor의 경우 혈액암에는 유의한 활성이 나타나지 않았고 colon26-M3.1 carcinoma 및 B16-BL6 melanoma와 같은 암세포주에 대하여 혈관주사법으로 투여한 경우에서만 한국산 겨우살이와 비교되는 종양전이 억제 활성이 있는 것으로 보였다.

면역자극물질에 의한 항종양 면역능의 유도에서 종양에 대하여 살해활성을 가지는 작동세포(effector cell)로서 macrophages나 NK-세포의 기능은 잘 알려진 사실이며,⁷⁾ 실제로 Helixor를 포함하는 유럽산 겨우살이 및 한국산 겨우살이가 함유하는 lectins, polysaccharides 및 peptides등의 물질들은 면역세포의 증식 및 억제를 조절하는 cytokine을 유도하며, 종양세포에 대한 살해활성을 가지는 NK-cell 및 macrophage를 활성화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 자극물질에 의하여 활성화된 macrophage가 생산하는

Table III. Effect of Mistletoes on liver and spleen metastasis produced by i.v. inoculation of L5178Y-ML25 lymphoma cells

Treatment			weight±SD (Inhibition %)	
On day	Route	Mistletoes	Liver	Spleen
		Normal	1.07±0.02	0.09±0.02
		Untreated (tumor control)	3.48±0.65	0.21±0.05
-2	i.v	HELIXOR	3.11±0.63	0.16±0.06
-2	i.v	KM-110	1.59±0.22**(78.4)	0.14±0.02*(58.3)

Groups of five CDF1 mice (6 weeks, female) were inoculated i.v. with 4×10^4 L5178Y-ML25 cells and injected i.v. with 100 μ g of mistletoes on the indicated days after tumor challenge. Mice were killed 14 days after tumor challenge for evaluation. The value in parenthesis represent % inhibition of compared with control group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by Student's two-tailed *t* test, compared with challenge only group.

cytokine들은 NK-세포의 활성화를 유도하고,¹⁸⁾ 활성화된 NK-세포는 종양세포에 대한 살해능을 증진시키는 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁾ 이전의 연구에서, KM-110은 우수한 cytokine inducer로서의 작용이 있다고 보고된 바,¹³⁻¹⁵⁾ 동물 실험 모델에서 KM-110의 경우가 Helixor보다 종양 전이를 유의하게 억제한 이유 중의 하나는 Helixor에 비하여 KM-110의 경우 종양세포에 대한 높은 세포독성 효과²⁰⁾ 및 우수한 macrophage의 자극효과가 높은 항종양 활성을 유도하였을 것으로 사료되었다.¹⁴⁾

결론적으로 Helixor는 본 실험에 적용한 여러 종양전이 모델에서 KM-110에 비하여 낮은 항종양 활성을 보였으나 추출방법 및 숙주나무의 상이성 때문에 항종양 활성을 직접 비교함에 일부 무리가 있다고 생각한다. 그러나 암세포에 대한 세포독성 효과 및 gel filtration 분석 결과 암시된 것은 Helixor에 lectin 성분이 미량 존재함에도 불구하고 실험동물을 통한 종양의 전이에 몇몇 암주에 대하여 유의한 항종양 활성을 보여주었다는 것이다. 이는 겨우살이 추출물을 종양에 대한 면역요법 제제로서의 응용시 세포독성 및 염증반응과 더불어 면역자극활성을 보여주는 lectin의 존재에 대한 필요성에 대한 자세한 연구가 필요하다는 것을 제시하였다. 따라서 앞으로 한국산 겨우살이 추출물을 암의 치료에 대한 면역요법제제로 응용하기 위하여 여러 가지 암종에 따른 겨우살이 성분의 항암효과 및 lectin 성분 외에 면역기구를 자극하는 다른 성분들에 대한 물질의 규명과 그 기전에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

종양의 증식 및 전이에 있어 한국산 겨우살이 추출물인 KM-110과 유럽산의 추출물로 제조된 Helixor의 암전이 억제 활성 및 세포독성효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 두 시료의 직접적인 세포독성을 조사한 결과, KM-110은 Helixor에 비하여 여러 가지 종양세포주 및 정상세포에 대하여 높은 세포독성 효과를 보였다. 세포독성의 차이를

규명하기 위한 gel filtration 결과 Helixor는 KM-110과 비교하여 lectin 성분으로 추정되는 물질이 적은 결과를 보였다. 면역자극활성의 비교로서 두 시료로 자극된 macrophages의 배양상등액을 B16-BL6 melanoma 세포주에 적용한 결과 KM-110에 의하여 자극된 배양상등액은 Helixor의 경우에 비하여 높은 종양세포 살해활성을 나타내었다. 시료의 안전성 검사 중 하나로 혈관투여에 의한 혈액검사를 조사한 결과 100 μ g의 KM-110 및 Helixor 모두 간과 신장에 유의한 영향을 미치지 않았다. Colon26-M3.1 carcinoma, B16-BL6 melanoma 및 L5178Y-ML25 lymphoma에 의한 실험전이 모델을 이용하여 항암 활성을 조사한 결과 KM-110의 경우가 Helixor에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 항암효과가 인정되었다.

인용문헌

1. Fidler, I. J. (1991) Cancer metastasis. *Br. Med. Bull.* **47**: 157-177.
2. Liotta, L. A., Steeg, P. S. and Stetler-Stevenson, W. G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* **64**: 327-336.
3. Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., Gupta, C. A. (1993) Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**: 293-306.
4. Jurin, M., Zarkovic, N., Hrzenjak, M. and Ilic, Z. (1993) Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album L.* preparation Isorel. *Oncology* **50**: 393-368.
5. 윤택준, 성지연, 유광원, 이호, 이광호. (2007) 가시오가피 다당체에 의한 항종양면역의 유도. *생약학회지*. **38**: 117-122.
6. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H. J. (1990) Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* **50**: 3322-3326.
7. Klett, C. Y. and Anderer, F. A. (1989) Activation of natural

- killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract. *Arzneimittelforschung* **39**: 1580-1585.
8. Kuttan, G. and Kuttan, R. (1992) Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistletoe extract (NSC 635089) cellular proliferation. *Cancer Lett.* **66**: 123-130.
 9. Bocci, V. (1993) Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J. Biol. Regul. Homeost Agents* **7**: 1-6.
 10. Khwaja, T. A., Dias, C. B. and Pentecost, S. (1986) Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* **43** (Suppl 1): 42-50.
 11. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Shimazaki, K., Song, S. K., Lee, K. H., Kim, S. H., Park, C. H., Azuma, I. and Kim, J. B. (1999) Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* **136**: 33-40.
 12. 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* **12**: 215-220.
 13. Yoon T. J., Yoo Y. C., Kang T. B., Song S. K., Lee K. B., Her E., Song K. S., and Kim J. B. (2003) Antitumor Activity of the Korean Mistletoe Lectin is Attributed to Activation of Macrophages and NK Cells. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 861-867.
 14. 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**: 881-889.
 15. Yoon, T. J. (1998) Study on the biological activities of lectin purified from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extracts and its characterization. Ph. D. Thesis in Department of Animal science Graduate School KonKuk University. 115-118.
 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.* **36**: 599-600.
 17. 강태봉, 윤택준, 김종배, 송성규, 이관희, 광진환 (2001) 한국산 겨우살이 (*Viscum album coloratum*)로부터 정제된 렉틴 성분 KML-IIU의 예비 독성 및 약리 시험. *약학회지*, **45**: 251-257.
 18. Lee, J. C., Truneh, A., Smith, M. F. Jr. and Tsang, K. Y. (1987) Induction of interleukin 2 receptor (TAC) by tumor necrosis factor in YT cells. *J. Immunol.* **139**: 1935-1938.
 19. Colombo, M. P. and Trinchieri, G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**: 155-168.
 20. 윤택준, 유영춘, 조영호, 이석원, Azuma, I., 유보림, 김종배. (1994) 마우스 Macrophage 의 IL-1 및 TNF- α 의 분비유도에 있어서 한국산 겨우살이 추출물이 미치는 영향. *생약학회지* **25**: 132-139.

(2009년 8월 6일 접수)