

## 한국산 겨우살이 유산균 발효 추출물의 독성 및 면역증강 효과

윤택준<sup>1</sup> · 양웅석 · 박성민 · 정희운 · 이안나 · 정진혁 · 강태봉 · 유영춘 · 김종배\*  
한동대학교 생의학연구소, <sup>1</sup>유한대 식품영양과

### *In vivo* Toxicity and Immunoadjuvant Activity of Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) Extract Fermented with *Lactobacillus*

Taek Joon Yoon<sup>1</sup>, Woong Suk Yang, Sung Min Park, Hoe Yune Jung, An Na Lee, Jin Hyuk Jung, Tae Bong Kang, Yung Choon Yoo, and Jong Bae Kim\*

Institute for Biomedical Research, Han-Dong University  
<sup>1</sup>Department of Food & Nutrition, Yuhan University

**Abstract** In this study, Korean mistletoe extract (KM-110) was fermented with two strains of *Lactobacillus* (FKM-110) and then toxicity, lectin content, and immune activities were investigated. The lectin content of FKM-110 was about 53-71% lower than that of KM-110. When mice were subcutaneously administered with KM-110 and FKM-110, the LD<sub>50</sub> obtained for KM-110 treatment was 50-100 mg/kg as compared to 150-200 mg/mL for FKM-110. Each preparation stimulated macrophages directly and enhanced productivity of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . FKM-110 treatment resulted in lower cytokine production compared to KM-110. When mice were immunized with Keyhole limpet hemocyanin (KLH) antigen along with KM-110 or FKM-110 administration, higher antibody titers to KLH were observed in the KM-110 or FKM-110 groups compared to mice immunized with KLH alone, thereby showing no difference between KM-110 and FKM-110. Therefore, fermentation of Korean mistletoe extract with these *Lactobacillus* strains decreased toxicity *in vivo* while the enhancement of immune activity by KM-110 and FKM-110 was similar. These data suggest that KM-110 fermentation tended to decrease lectin content and *in vivo* toxicity. In addition, other components in the fermented mistletoe extract appear to stimulate immuno-adjuvant activity instead of lectin.

**Key words:** mistletoe extract, fermentation, lectin, toxicity, immuno-adjuvant

## 서 론

겨우살이(Mistletoe, *Viscum album*)는 세계 전역에서 여러 가지 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생식물이며, 우리나라를 포함한 동아시아 및 유럽에서는 예로부터 민간의학 물질로 사용하여 왔다(1-3). 여러 종류의 겨우살이 중에서 민간 약제로 이용한 것은 주로 *Viscum*속의 식물로서 유럽지역에서 서식하는 것은 *Viscum album lorantheacea*이며, 한국에서 서식하는 것은 *Viscum album coloratum*으로 분류학상 그 차별성이 인정되고 있다(4). 특히, 유럽 지역에서 서식하는 겨우살이는 1920년대부터 여러 회사에서 항암치료제/보조제로서의 주사제 및 기타 기능성 식품의 형태로 시판되고 있다(2,5). 한편, 우리나라에서도 한방에서 겨우살이(*Viscum album Coloratum*)를 숙주나무에 따라 상기생, 기생목, 해기생이 등 여러 이름으로, 요통, 고혈압, 유산방지, 치통 등에 대한 약제로 사용하여 왔고(3), 최근에 겨우살이 추출물의 항암활성이 발표되면서 겨우살이의 응용 및 주 활성성분에 대한 연구가 진행되고 있다(3,6-9).

한국산 및 유럽산 겨우살이에서 면역증강 및 세포독성 활성을 가지는 가장 중요한 성분으로 렉틴(lectin)이 관여한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(3,4,6,7,10,11). 겨우살이 렉틴 성분은 그들의 당 특이성 및 분자량의 차이에 의하여 렉틴-I, -II 및 -III로 구별하고 있으며, 이들은 당 특이성을 가지는 B-chain 및 cytotoxic A chain으로 구성되는 hetero dimer의 형태로 존재하고 있다(10,11). 렉틴에 의한 세포독성은 A-chain에 의한 60S의 ribosomal subunit의 불활성에 의한 단백질 합성의 억제가 원인(12)이며, 결국 렉틴에 의한 암세포의 사멸은 apoptosis에 의하는 것으로 알려져 있다(7,13). 또한 겨우살이 렉틴은 면역세포와 렉틴-당 결합을 유도함으로써 면역세포로부터 tumour necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 및 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )과 같은 여러 가지 염증성 cytokine들을 생산하는 비특이적 면역자극활성이 있어 생체 방어력을 증진시키는 활성이 있다(11). 겨우살이 렉틴의 염증성 cytokine들의 생산 양식은 발열반응 등의 부작용을 나타내기 위하여 렉틴을 임상에 적용하기 위한 노력을 시도하였으나, 현재까지는 주로 추출물 형태의 겨우살이가 사용되고 있다(11,14). 따라서 겨우살이 추출물을 임상에 적용할 경우 우선시 되어야 할 것은 세포독성 및 염증반응을 유도하는 적절한 양의 렉틴 함량의 결정 및 이들의 표준화이며, 이를 성취하기 위한 방법의 하나로 유럽에서는 겨우살이 추출물을 유산균으로 발효하는 방법을 사용하여 왔다(2,11,14).

유럽에서 암환자에게 직접 사용되는 겨우살이 추출물 중의 하나인 Iscador는 *Lactobacillus plantarum*으로 발효시킨 겨우살이로

\*Corresponding author: Jong Bae Kim, Institute for Biomedical Research, Han-Dong University, Pohang, Gyeongbuk 795-940 Korea  
Tel: 82-54-260-1350  
Fax: 82-54-261-6705  
E-mail: jbkim@handong.edu  
Received June 20, 2009; revised August 11, 2009;  
accepted August 12, 2009

서 많은 연구를 통하여 렉틴 함량을 표준화시킨 것으로 알려져 있다(11,14). Iscador와 관련된 보고에 의하면, 유산균 발효에 의하여 렉틴 성분의 함량은 발효를 시키지 않은 것에 비하여 약 10배 정도 적게 함유되어 있으나, 겨우살이가 가지는 가장 중요한 고유한 활성인 면역증강 활성은 그대로 유지하는 것으로 보고되고 있다(2,11,14,15). Iscador의 독성관련 연구결과, 유산균 발효에 의한 세포독성 효과가 감소되는 이유는 유산균 발효에 의하여 dimer 형태인 렉틴이 A 및 B chain으로 분리됨으로서 독성 효과를 나타내지 못한다는 것과 렉틴 단백질을 peptides로 분해 시킴으로서 세포독성과 관련된 부위가 변형되는 것으로 설명하고 있다(15). 또한, 유산균 발효 이후에도 면역증강 효과가 유지되는 것은 겨우살이 성분에 의한 효과와 더불어 유산균에 의한 면역증강 효과가 같이 작용하는 것으로 설명하고 있다(5,11,14). 이러한 Iscador의 항암 활성을 요약하면 첫째, macrophage 및 natural killer cell(NK-cell)과 같은 종양에 대항하는 선천면역계의 활성화, 둘째, 종양 특이적 체액성 및 세포성 면역 증강활성의 유도, 셋째, 겨우살이 성분에 의한 직접적인 세포독성 효과에 의한 것으로 요약되고 있다(11,14,15). 결국 Iscador는 인간에 대한 임상 실험 결과, 종양세포에 대하여 직접적인 세포독성 효과 및 면역계의 활성화에 의한 암세포의 성장억제에 의하여 암환자의 생존율을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고하였다(11,16,17).

최근에 국내에서도 겨우살이 추출물 및 그 활성성분에 의한 항암, 면역증강 활성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며(3,6-9,13), 이미 본 연구실에서는 한국산 겨우살이 추출물의 항종양 효과를 종양세포 비특이적 및 특이적인 관점에서 조사하였으며(3,8) 그 활성 성분으로 한국산 겨우살이 렉틴이 관여한다는 것을 보고한 바 있다(9,18). 따라서 본 연구는 한국산 겨우살이 추출물의 강한 항종양 활성을 근거(8,9,18)로 유산균으로 발효된 겨우살이 추출물의 *in vivo* 독성효과 및 면역증강효과를 발효되지 않은 겨우살이 추출물과 비교 조사함으로써, 발효된 겨우살이 추출물의 기능성 재료로서 응용가능성을 검토하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 겨우살이 추출 및 발효

본 실험에 사용한 겨우살이는 강원도 지방에서 참나무를 숙주로 하여 자라는 겨우살이로서 12-1월에 채취하였고, 겨우살이의 추출에 의한 추출물(KM-110)은 기 보고된 방법(21)과 동일하게 실시하였다. KM-110의 발효는 한국세포주은행에서 분양받은 2종의 유산균주를 이용하여 실시하였다. 약술하면, *Lactobacillus casei* KCTC 2180, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3103을 1%가 되도록 20 mg/mL의 KM-110에 접종 후, 그 균주의 최적 온도인 37°C 및 30°C에서 각각 1일, 2일 및 3일간 배양하였다. 배양 완료 후, 각 유산균주로 발효된 겨우살이를 동결건조하였고, 편의상 각각 FKM-LC 및 FKM-LP로 칭하였다. 이 동결건조물은 PBS를 이용하여 50 mg/mL의 stock solution으로 만든 후 -20°C에 저장하면서 실험에 사용하였다.

### 실험동물

생후 6-8주령의 자성 BALB/c 및 ICR 마우스를 (주)대한실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 한동대학교 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 각 군별로 5마리씩 넣어 정수된 물과 실험 동물용 펠렛사료(Samyang Co Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

### 시약 및 세포배양

종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 종양세포주인 clon26-M3.1 lung carcinoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를, lymphocytes의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 항원으로 사용한 keyhol Lympet hemocyanin (KLH)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### Lecin의 정량

한국산 겨우살이 렉틴(KML-C) 정량을 위하여 기 발표된 two-site sandwich ELISA법을 이용하였다(19). 약술하면, KML-C에 대한 단일클론항체 8E12-3E9(10 µg/mL)를 50 mL씩 ELISA plate (Rochester, NY, USA)의 각 well에 coating 후, washing 및 BSA 용액을 이용한 blocking를 실시한 후, 표준물질로 50 ng-5 µg/mL의 KML-C를 첨가하여 반응시켰다. KML-C의 정량을 위한 detection 항체로는 표지물질로 horseradish peroxidase(HRP: Sigma, St. Louis, MO, USA)가 접합된 8B11-2C5-HRP 항체를 첨가하여 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 HRP의 발색을 위한 기질로 3,3',5,5' tetramethylbenzidine(TMB; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 반응 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### In vivo 독성 조사

독성 조사는 group당 7마리의 ICR 마우스(웅성, 7 주령)에 KM-110, FKM-LP 또는 FKM-LC를 각각 200, 150, 100 및 50 mg/kg의 농도로 피하 주사하였고, 주사 후 5일간 사육관리하면서 매일 마우스의 외형상 변화 및 생존율을 측정하였다.

### Macrophage로부터 Cytokine의 유도 분비 조사

BALB/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 3일 후 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지를 이용하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells, PEC)를 수집하였다. 수확한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10<sup>6</sup>/mL의 농도로 조정하여 분주하였다. 그 후 각 시료를 첨가(10 µg/mL)하고 24시간 동안 배양하였다. 각 cytokine의 생산을 위한 대조군으로는 동일 농도의 lipopolysaccharide(LPS: Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 배양완료 후, macrophage의 배양 상등액을 회수하고, 배양 상등액에 유도 분비된 TNF-α 및 IL-1β는 각 cytokine에 ELISA kit(Pharmingen, CA, USA)을 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

### 마우스에 대한 면역 및 항체가 측정

항체생산을 위한 항원으로 KLH를 사용하였다. 6주령의 BALB/c 마우스에 10 µg의 KLH 단독 혹은 KLH에 100 µg의 KM-110 및 두 가지 유산균으로 각각 발효된 겨우살이인 FKM-110을 혼합하여 2주 간격으로 총 2회 피하주사법으로 면역하였다. 첫 번째 면역 후 1주일부터 7주까지 2주 간격으로 마우스로부터 채혈하였고, 혈청을 분리 후 항체가 측정 시까지 -20°C에 보관하였다. 혈청내의 KLH에 대한 총 항체가는 기 보고된 indirect ELISA 법(20)으로 측정하였고, 항체가는 정상마우스의 혈청에 대한 OD 값의 2배가 되는 희석비로 결정하였다.

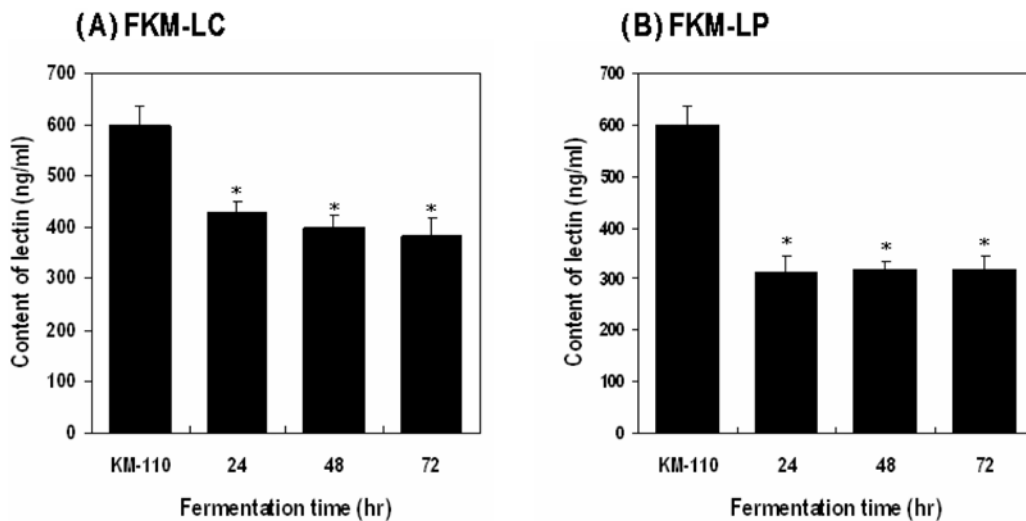


Fig. 1. Concentration of lectin in fermented KM-110 determined by two-site Sandwich ELISA. (A) FKM-LC; fermented with *Lactobacillus casei* KCTC 2180, (B) FKM-LP; fermented with *Lactobacillus plantarum* KCTC 3103. \* $p < 0.01$  compared with the KM-110 group by student's two-tailed *t*-test.

#### 통계처리

대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Microsoft Excel 프로그램(Redmond, WA, USA)의 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 유산균으로 발효한 한국산 겨우살이의 lectin의 변화

2종의 유산균주를 이용하여 한국산 겨우살이를 1-3일간 발효시킨 후, lectin 함량 변화를 조사하였다(Fig. 1). 10 mg/mL의 KM-110의 경우 약 600 ng/mL의 lectin 성분이 함유되어 있었고, KM-110을 *Lactobacillus casei* KCTC 2180로 24, 48, 72시간 발효된 FKM-LC들의 경우 lectin 함량은 각각 428, 398, 383 ng/mL인 결과를 보임으로 발효시간에 따라 lectin 함량이 감소하는 경향이 나타났으나, 군 간에 통계적인 유의성은 보이지 않았다. 한편, KM-110을 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3103 유산균을 이용하여 24-72시간 발효시킨 FKM-LP의 경우, 발효시간에 상관없이 모두 약 320 ng/mL의 lectin이 함유된 결과를 보였다. 결론적으로 FKM-LC의 lectin의 함량은 KM-110에 비하여 71.3-63.8%의 수준이었고, FKM-LP의 경우는 약 53.3%인 결과를 보였다. 유산균 발효에 의한 겨우살이 lectin 함량과 관련된 이전의 보고에서 유산균의 종류에 따라 발효 후에도 lectin 함량에는 변화가 없는 결과를 보여준 경우도 있고, lectin의 함량이 감소와 비례하여 면역 자극 효과도 감소된 경우도 있었다(5,17,21). 따라서 겨우살이를 발효시킬 경우, 유산균의 선택은 그들의 생리활성 및 독성 효과에 많은 영향을 줄 수 있는 가장 중요한 요인이 될 것으로 생각한다. 겨우살이에서 lectin의 존재가 중요한 것은 그들이 면역기구를 활성화시키는 가장 중요한 성분으로 보고되고 있기 때문이다(5,10,17,18). 그러나 한편에서는, lectin에 의한 강한 염증반응의 유도 문제 때문에 임상의 적용 시 일부 논란이 있는 것도 사실이다(11). 따라서 현재 겨우살이 추출물을 임상에 적용하고 있는 유럽지역의 시판되는 겨우살이 추출물 주사제는 제한된 농도의 lectin이 함유된 표준화 제품으로 생각되고 있다. 이러한 추측의 근거는 실제로 현재 유럽에서 주사제로 사용하고 있는 발효된 겨우살이 추출물인 Iscador의 경우 lectin 함량이 감소한 것임은 이

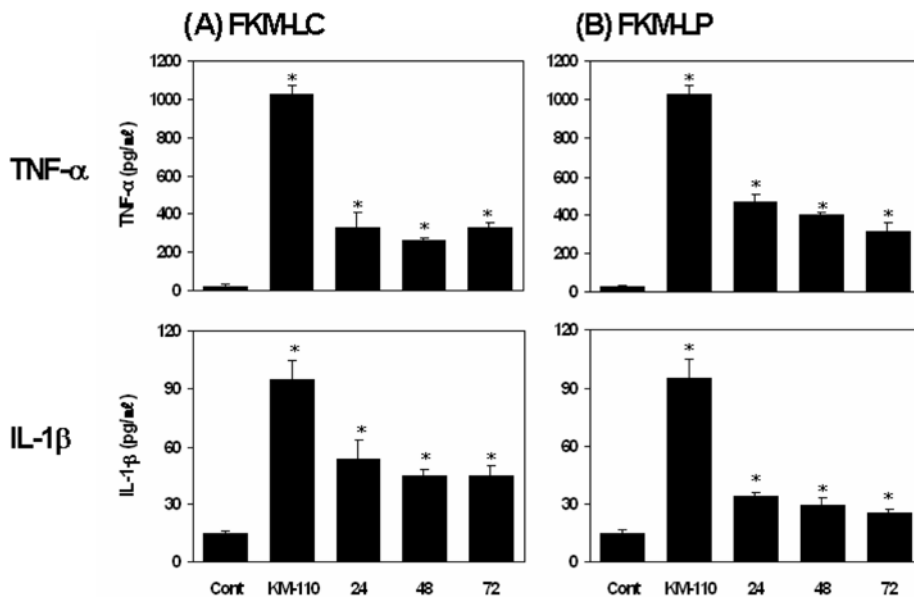
미 보고(11,14)되어 있고, 본 실험실에서 유럽산의 비발효 제품인 Isorel 및 Helixor 등에 대한 lectin 함량을 비교한 결과 한국산 겨우살이 추출물에 존재하는 lectin 함량에 비하여 매우 낮은 결과가 나타났다(미발표 결과). 따라서 겨우살이 성분중에서 면역증강 효과를 가지는 성분은 발효에 의하여 구조적으로 변형된 lectin 성분 및 lectin 외의 다른 성분이 관여함을 강하게 시사하고 있다. 따라서 본 실험에서는 1차적으로 겨우살이 lectin 성분의 면역학적 특성 보다는 독성문제에 중점을 가지고 두 가지 유산균에 의하여 lectin 성분이 감소한 겨우살이 추출물의 *in vivo* 독성 효과를 KM-110과 비교한 실험을 진행하였다.

##### *In vivo* 독성 조사

유산균으로 발효시킨 겨우살이 추출물의 *in vivo* 독성시험을 실시하였다. 독성시험에 적용한 시료는 3일간 발효된 겨우살이 추출물을 이용하였다. 군당 7마리의 마우스에 체중 kg당 KM-110, FKM-LC 및 FKM-LP를 각각 200, 150, 100 및 50 mg을 피하주사하고 5일간 관찰하였다(Table 1). KM-110의 경우 200 및 150 mg/kg의 농도를 적용한 결과, 투여 2일 만에 실험에 7마리 모두가 사망하였으며, 100 mg/kg의 경우 투여 1일에 1마리, 2일에 3마리, 투여 3일에 2마리가 사망하여 실험종료 시 결국 1마리가 생존하였다. 50 mg/kg 투여 경우 2일 만에 1마리만 사망하였으며 나머지 6마리는 모두 생존하였다. 따라서 KM-110의 투여에 의하여 50%의 마우스가 사망할 수 있는 lethal dose(LD<sub>50</sub>)값은 50 mg/kg에서 100 mg/kg인 것으로 추정되었다. 한편, FKM-LC 및 FKM-LP의 경우 200 mg/kg의 투여 경우 각각 1 및 3마리가 생존하였고, 150 mg/kg의 경우에는 각각 1 및 2마리가 사망하였다. 따라서 겨우살이 추출물을 발효시킨 겨우살이 추출물의 경우 LD<sub>50</sub>은 150 mg/kg에서 200 mg/kg 사이인 것으로 생각되었다. 사망한 마우스를 관찰한 결과, 주사 6시간 이후부터 운동성이 저하되면서 발열반응에 의한 입모(piloerection)이 관찰되었으며 눈에서도 진물이 분비되는 현상이 관찰되었다. 이러한 현상은 시료에 의하여 생산되는 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 cytokine들의 대량 생산에 의한 발열반응이 원인인 것으로 사료되었다(22). 생존한 마우스에서도 LD<sub>50</sub>에 가까운 농도의 투여의 경우 운동성 저하 및 일부 입모 현상이 관찰되었으나, 투여 3일 이후에는 모두 정상적인 활

**Table 1. Mortality in mice administered subcutaneously with KM-110 or FKM-110s**

Dose (mg/kg)		Days after treatment					Final mortality
		1	2	3	4	5	
200	KM-110	4/7	7/7	0	0	0	7
	KM-LC	2/7	5/7	6/7	6/7	6/7	6
	KM-LP	1/7	3/7	4/7	4/7	4/7	4
150	KM-110	3/7	7/7	0	0	0	7
	KM-LC	0/7	2/7	2/7	2/7	2/7	2
	KM-LP	0/7	1/7	1/7	1/7	1/7	1
100	KM-110	1/7	4/7	6/7	6/7	6/7	6
	KM-LC	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0
	KM-LP	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0
50	KM-110	0/7	2/7	2/7	2/7	2/7	2
	KM-LC	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0
	KM-LP	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0



**Fig. 2. Comparison on the induction of cytokines from peritoneal macrophage stimulated with mistletoe and fermented mistletoe extracts.** Each mistletoe extracts was co-cultured with macrophage for 24 h. The content of cytokines in cultured supernatant was assayed by ELISA. (A) FKM-LC; fermented with *Lactobacillus casei* KCTC 2180, (B) FKM-LP; fermented with *Lactobacillus plantanum* KCTC 3103

동성을 보였다. KM-110의 경우 25 mg/kg 이하에서, FKMs의 경우 100 mg/kg 이하의 농도에서는 별다른 임상적 이상이 관찰되지 않았다. 여러 보고에서 겨우살이 성분 중에서 염증성 cytokine을 분비하는 가장 중요한 성분은 렉틴임을 지적하고 있고(10,11,18), 본 연구에서 발효된 겨우살이의 경우 렉틴 함량이 억제된 결과를 보였다(Fig. 1). 겨우살이의 유산균 발효와 관련된 이전의 연구보고에서 겨우살이 렉틴은 유산균 발효에 의하여 A 및 B chain으로 분리되거나, 여러 peptides로 바뀌어 독성과 관련된 부위가 변형될 수 있음을 시사하였다(5,15). 따라서 *in vivo* 독성결과에서 발효된 겨우살이의 독성효과가 낮아진 것은 기 발표된 내용과 같이 첫째, 발효 중에 렉틴을 구성하는 A- 및 B-chain의 분리에 의한 독성 감소 둘째, 염증성 cytokine을 생산하는 렉틴구조의 변형이 주요한 원인일 것으로 생각되었다.

**Macrophage로부터 염증성 cytokines의 유도분비 조사**

한국산 혹은 유럽산 겨우살이 추출물이 macrophage를 활성화

시키는 능력이 있음은 잘 알려져 있다(3,8,14,16). 활성화된 macrophage는 면역반응과 염증반응을 매개하는 여러 가지 cytokine을 생산함으로써 면역 세포가 외래물질에 대한 방어력을 유도할 수 있게 작용하여 항원에 대한 작동세포로 분화 및 증식시키는 역할을 담당한다(8,11,23). 따라서 외래물질에 대항하는 면역기구의 활성화 기전에서 일부의 염증반응은 필수적으로 수반되나, cytokine의 분비가 적절히 조절되지 못하여 과량 생산되면 cachexia, autoimmune disorder 및 생명에 치명적인 septic shock(패혈성 쇼크)를 일으키는 부작용이 수반되기도 한다(24). 대식세포가 생산하는 염증성 cytokine의 대표적인 것은 TNF-α 및 IL-1β이며, 특히 TNF-α는 염증반응을 유도하는 가장 중요한 cytokine으로 알려져 있다(24,25). 본 실험은 Table 1에 제시한 발효된 겨우살이의 *in vivo* 독성 감소 효과를 해석하기 위하여 macrophage로부터 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-1β 생산에 미치는 각 겨우살이 추출물의 효과를 검토하였다(Fig. 2). 실험결과 *Lactobacillus casei* KCTC 2180 유산균으로 발효된 FKM-LP 및 *Lactobacillus plan-*

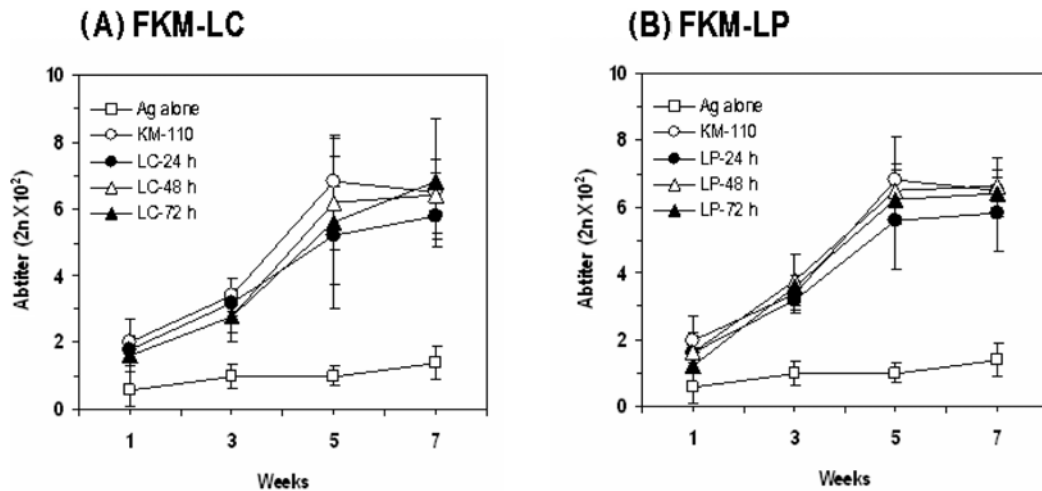


Fig. 3. Comparison on the production of KLH-specific antibody between mistletoe and fermented mistletoe extracts. Five Balb/c mice per group were immunized *s.c.* twice at the interval of 2 weeks with KLH with or with each mistletoe extracts. (A) FKM-LC; fermented with *Lactobacillus casei* KCTC 2180, (B) FKM-LP; fermented with *Lactobacillus plantarum* KCTC 3103. The fermentation time by each *Lactobacillus* was adjusted to 24, 48, and 72 hr.

*tarum* KCTC 3103 유산균주로 발효된 FKM-LP은 KM-110에 비하여는 낮은 cytokine의 생산성을 보였고, 이유 중 하나는 앞서 언급한 바와 같이 발효에 의하여 렉틴 성분이 감소되었기 때문일 것으로 사료되었다(11,14,16). 따라서 발효된 겨우살이 추출물의 염증성 cytokine의 생산 양식이 감소된 결과는 Table 1의 발효된 겨우살이의 *in vivo* 독성 효과의 감소를 설명할 수 있는 주요한 기구로 생각되었다(11,16,24).

#### FKMs-110의 체액성 및 세포성 면역 증진 효과

겨우살이 추출물의 주요한 활성성의 하나는 항원에 대한 면역증강효과를 유도하는 것이다(5,20). 본 실험은 겨우살이 혹은 발효된 겨우살이 추출물의 항체생산과 관련된 체액성 면역계에 미치는 효과를 비교 검토하기 위하여 항원 KLH와 각 겨우살이 추출물을 동시에 면역 후 KLH에 대한 항체 생산능을 마우스에서 검토하였다(Fig. 3). 이전의 연구결과, 마우스에서 항원에 대한 적응면역을 높이는 KM-110의 농도는 마우스당 100 µg의 투여에서 높은 결과를 보였기에 본 실험에서도 KM-110 및 발효된 겨우살이의 농도는 동일한 농도를 적용하였다(20). 즉, 항원 KLH 단독 혹은 각 겨우살이 추출물과 혼합하여 면역 후 7주까지 마우스로부터 채혈 후, 항혈청의 KLH에 대한 항체가를 ELISA 방법으로 측정하였다. Fig. 3의 결과에 제시한 바와 같이 각 겨우살이 추출물과 항원으로 KLH를 동시에 면역한 후, KLH에 대한 항체가를 측정한 결과 발효된 겨우살이의 경우 발효되지 않은 겨우살이 추출물인 KM-110과 유사한 면역증강 효과를 보였다. 동시에 본 실험에 적용한 겨우살이 발효 유산균주 및 발효시간에 비례하는 차이도 인정되지 않았다. 이 결과는 유럽산 유산균 발효 겨우살이 추출물인 Iscador의 연구 결과와 유사한 경향의 결과를 보인 바, 발효 이후에도 면역증강 효과가 유지되는 것은 겨우살이 성분에 의한 효과 외에도 유산균에 의한 면역증강 효과가 같이 관여될 수 있을 것으로 생각되었다(5,15). 본 연구에서도 유산균 발효에 의한 렉틴 성분의 감소가 유도됨에도 불구하고 면역증강 활성을 나타내는 성분이 렉틴의 발효산물인지에 혹은 비 렉틴 성분에 의한 것인지 확인하지는 못하였기에 이 부분에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것이다. 결론적으로 Fig. 3의 결과는 겨우살이 추출물 중의 렉틴 성분이 면역증강효과를 가지는 주 활

성성분으로 보고되고 있음(6,10,14,18)에도 불구하고, 발효에 의하여 렉틴 함량이 감소된 발효물이 발효되지 않은 KM-110과 유사한 면역증강활성을 나타낸 것은 첫째, 면역증강 효과를 유도하기 위하여 원래형태(native form)의 렉틴 성분 외에도 변형된 렉틴 성분도 관여할 수 있음과 둘째, 면역자극활성을 가지는 겨우살이 성분은 비 렉틴 성분이 관여할 수 있음을 강하게 제시하였다(16,26-28). 따라서 겨우살이 성분 중에서 가장 중요한 면역자극활성을 가진 성분이 렉틴이라 할지라도, 본 연구결과 겨우살이가 가지는 면역학적 활성을 렉틴 성분에 국한하여 설명하기는 어려울 것으로 사료되었다(26-28). 일반적으로 겨우살이의 생리활성을 나타내는 성분으로 렉틴 외에 polysaccharides, oligosaccharides, peptides 및 alkaloids 등이 보고되어 있다(4,26-28). 이들 중에서 생체 면역능을 매개하는 성분으로 polysaccharides 혹은 oligosaccharides 성분에 대한 연구결과도 보고(26,28)되고 있으나, 겨우살이 추출물의 경우 렉틴의 강한 활성 때문에 겨우살이 다당체에 관한 연구는 비교적 적었다.

앞으로 유산균으로 발효된 겨우살이 추출물의 임상으로 혹은 기능성 식품으로 응용하기 위하여 선행되어야 할 사항으로 발효균주의 선정 및 발효 방법의 확립을 통하여 렉틴 및 비 렉틴 성분에 대한 표준화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 동시에 유산균은 항암뿐만이 아니라 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있는 등 다양한 생리활성을 갖고 있음은 이미 널리 알려져 있고(29-31) 오랫동안 전통식품으로 동서양에서 이용되고 있는 우수한 식품인 바, 본 연구의 결과는 기능성을 부여한 새로운 유산균 기능성 식품개발에 겨우살이가 유용하게 사용될 수 있는 근간자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 요 약

*Lactobacillus casei* KCTC 2180 및 *Lact. plantarum* KCTC 3103으로 발효된 한국산 겨우살이 추출물인 FKM-110의 렉틴 성분의 함량 변화, 독성 및 면역증강 효과를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 두 가지 유산균을 이용하여 KM-110을 1-3일간 발효시킨 결과, 렉틴 성분은 발효 전에 비하여 53-71% 정도의 함량을 나타냄으로서 감소되는 경향을 보였다. 마우스에 대한 시

료의 독성시험을 위하여 각 시료를 피하 주사하고 LD<sub>50</sub> 값을 측정한 결과, KM-110은 50-100 mg/kg인 반면 유산균으로 발효된 겨우살이 추출물인 FKM-110은 150-200 mg/kg인 결과를 보임으로 발효에 의하여 *in vivo* 독성효과는 감소하는 경향을 보였다. 각 시료를 macrophage에 직접 자극하여 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 생산능력을 조사한 결과, FKM-110이 KM-110에 비하여 낮은 cytokine의 생산양식을 나타냈다. 그러나 FKM-110의 항원 KLH에 대한 면역증가 효과를 항체 생산능으로 조사한 결과, KM-110과 차이 없이 항원 단독 투여군에 비하여 높은 역가의 항체가 생산되었다. 따라서 겨우살이 추출물을 유산균으로 발효시킨 결과, *in vivo* 독성은 감소하였으나 면역증강 활성은 KM-110과 동일하게 유지되는 결과를 얻었다. 따라서 겨우살이의 면역증강 활성에 관여하는 성분으로 렉틴 이외에 물질이 관여할 수 있음을 강하게 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년 과학기술부 지역기술개발연구사업의 지원에 의한 결과이므로 이에 감사를 드립니다.

## 문헌

- Bussing A. Mistletoe: A story with an open end. *Anticancer Drugs* 8: S1-S2 (1997)
- Rentea R, Lyon E, Hunter R. Biologic properties of iscador: A *Viscum album* preparation I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. *Lab. Invest.* 44: 43-48 (1981)
- Yoon TJ, Yoo YC, Hong EK, Cho YH, Lee SW, Yoo BL, Kim JB. Effect of Korean mistletoe extracts on the induction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  from mouse macrophages. *Korean J. Pharmacogn.* 25: 132-139 (1994)
- Khwaja TA, Dias CB, Pentecost S. Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* 43 (Suppl. 1): 42-50 (1986)
- Blocksmas N, Dijk HV, Korst P, Willers JM. Cellular and humoral adjuvant activity of mistletoe extract. *Immunology* 156: 309-319 (1979)
- Park WB, Kim HS. Changes of lectin from *Viscum coloratum* by fermentation with *Lactobacillus plantarum*-isolation and purification. *Yakhak Hoeji* 38: 418-424 (1994)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Shimazaki KI, Song SK, Lee KH, Kim SH, Park CH, Azuma I, Kim JB. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* 136: 33-40 (1999)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 20: 163-172 (1998)
- Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do MS, Kang TB, Lee SW, Azuma I, Kim JB. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogeneous tumor cells in mice. *Cancer Lett.* 97: 83-91 (1995)
- Gabius S, Joshi SS, Kayser K, Gabius HJ. The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier. *Int. J. Oncol.* 1: 705-708 (1998)
- Hajto T, Hostanska K, Rordorf C, Gabius HJ. Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50: 3322-3326 (1990)
- Endo Y, Tsurugi K, Franz H. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eucaryotic ribosomes-the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* 231: 378-380 (1988)
- Lyu SY, Choi SH, Park WB. Korean mistletoe lectin induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch. Pharm. Res.* 25: 93-101 (2002)
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vitro*, in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49: 4803-4808 (1989)
- Gilles RG, Jung ML, Dominique DS, Beck JP. Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology* 43 (suppl. 1): 35-41 (1986)
- Hajto T. Immunomodulatory effects of Iscador: A *Viscum album* preparation. *Oncology* 43 (suppl. 1): 51-65 (1986)
- Holtskog R, Sand K, Olsnes S. Characterization of a toxic lectin in Iscador, a mistletoe preparation with alleged cancerostatic properties. *Oncology* 45: 172-179 (1988)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch. Pharm. Res.* 26: 861-867 (2003)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Kim SH, Kim KS, Kim JB. Production of monoclonal antibodies specific to Korean mistletoe lectin(KML-C) and their characterization. *Yakhak Hoeji* 45: 180-189 (2001)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Do MS, Kim JB. Immunoadjuvant activity of Korean mistletoe extract (*Viscum album coloratum*) to enhance humoral and cellular immune response. *Korean J. Immunol.* 21: 63-70 (1999)
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Lee KH, Kwak JH, Baek YJ, Huh CS, Kim JB. Fermented extracts of Korean mistletoe with *Lactobacillus* (FKM-110) stimulate macrophage and inhibit tumor metastasis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 838-847 (1999)
- Kang TB, Yoon TJ, Kim JB, Song SK, Lee KH, Kwak JH. Preliminary toxicity and general pharmacology of KML-IIU, a purified lectin from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Yakhak Hoeji* 45: 251-257 (2001)
- Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger W, Krause S, Meerpohl HG, Leser HG, Engler H, Lohr GW. Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated *in vitro* from circulating monocytes: A new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 50: 7450-7456 (1990)
- Hawiger J. Innate immunity and inflammation: A transcriptional paradigm. *Immunol. Res.* 23: 99-109 (2001)
- Sato K, Yoo YC, Fukushima A, Saiki I, Takahashi TA, Fujihara M, Tono-Oka S, Azuma I. A novel synthetic lipid A analog with low endotoxicity, DT-5461, prevents lethal endotoxemia. *Infect. Immun.* 63: 2859-2866 (1995)
- Mueller EA, Hamprecht K, Anderer FA. Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* 17: 11-18 (1989)
- Kang TB, Chae DJ, Chang SH, Mun SH, Kim JB, Her E. The effect of Korean mistletoe extract M11C (non-lectin components) on TNF- $\alpha$  release and expression from macrophage. *Korean J. Immunol.* 22: 207-215 (2000)
- ZarkoviN, Kalisnik T, Loncaril, BoroviS, Mang S, Kissel D, Konitzer M, Jurin M, Grainza S. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth *in vitro* and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Biother. Radio.* 13: 121-131 (1998)
- Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi, N. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18: 833-841 (1997)
- Kim Y, Lee D, Kim D, Cho J, Yang J, Chung M, Kim K, Ha N. Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. *Arch. Pharm. Res.* 31: 468-473 (2008)
- Ataie-Jafari A, Larijani B, Alavi-Majd H, Tahbaz F. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 54: 22-27 (2009)