

## 한국산 겨우살이 렉틴의 경구투여에 의한 항원 특이적 점막면역 증진 효과

김진철 · 윤택준<sup>1</sup> · 송태준 · 김영훈 · 안효선 · 김종배\*  
한동대학교 생의학연구소, <sup>1</sup>유한대학 식품영양과

### Mucosal Immunoadjuvant Activity of Korean Mistletoe Lectin-C

Jin Chul Kim, Taek Joon Yoon<sup>1</sup>, Tae Jun Song, Young Hoon Kim, Hyosun An, and Jong Bae Kim\*

*Institute for Biomedical Research, Handong University*

*<sup>1</sup>Department of Food & Nutrition, Yuhan University*

**Abstract** The adjuvant effects of Korean mistletoe lectin-C (KML-C) were investigated following the oral administration of KML-C with ovalbumin (OVA) as an antigen. Mice were orally immunized with OVA alone or admixed with various doses of KML-C or cholera toxin (CT), and the titer of OVA-specific antibody in the serum and mucosal secretions were determined. OVA+KML-C-treated mice showed high titers of IgA specific to CT in mucosal secretions. The antibody titers in the serum of OVA+KML-C-treated mice were comparable to those in the serum of OVA+CT-treated mice. When mice were immunized with OVA+KML-C or with CT alone and subsequently injected with OVA on the footpads after the primary immunization, they showed a more significant increase in delayed-type hypersensitivity reactions than when they were administered CT alone. These results suggest that KML-C is a potent immunoadjuvant that enhances both humoral and cellular immunity by the mucosal immune system.

**Keywords:** mistletoe lectin-c, mucosal immune response, immunoadjuvant, oral administration, IgA

## 서 론

점막 면역기관의 활성화는 외래물질에 의한 감염을 억제하는 면역기능에 있어서 매우 중요하다(1,2). 생체의 점막면역계는 호흡계 관련 림프조직(bronchous associated lymphoid tissue: BALT), 비강관련 림프조직(nasal associated lymphoid tissue: NALT) 및 장관관련 림프조직(gut associated lymphoid tissue: GALT)으로 구분되며, 이중에서 GALT는 생체에서 가장 큰 림프조직으로 소화기를 통하여 장관으로 이입되는 외래물질에 대한 점막면역능을 유도함으로써 외래물질에 대한 방어 기능을 담당하고 있다(3). 특히 장관면역계는 기관지 면역계와 함께 피부보다 훨씬 넓은 표면을 가지기에 감염성 외래물질의 접촉 기회가 가장 높은 기관으로서 외래물질에 대하여 전신면역반응을 유도하는 점막 면역계의 중요한 부분으로 감염에 대하여 생체방어를 담당하는 제1선의 장소이다. GALT를 구성하는 면역기관 중에서 Peyer's patch는 장관면역계를 담당하는 가장 중요한 면역기관으로 소화계를 통하여 이입된 감염성 물질의 대부분이 유입되는 inductive site로서 항원의 흡수를 담당하는 special M cells, 탐식세포(phagocytes), B cell 영역 및 T cell 영역으로 구성되어 있다(3). 감염성 미생물 혹은 면역반응을 활성화하는 성분의 이입에 의한 Peyer's patch를 구성하는 면역세포의 활성화는 근처의 2차 림프기관인 mesentric

lymph node(MLN)를 통하여 장관면역계를 활성화하며, MLN과 연결된 림프관 및 혈액을 통하여 전신적 면역능을 활성화시킬 수 있다(4). 그러나 경구면역에 의한 전신면역반응을 유도한다는 것은 여전히 어려운 과제이다. 왜냐하면, 경구투여 또는 비강 내 투여와 같이 항원만을 점막조직을 통해 투여하여 면역반응을 유도하는 방식은 일반적으로 면역반응을 유도하는 작용이 약하므로 면역효율을 높이기 위해서는 높은 농도의 항원 투여 혹은 항원의 빈회투여(frequent administration)가 요구된다(5). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 항원의 운반시스템(delivery system)을 이용하거나 면역 증강제(adjunct)를 도입하여 경구투여에 의한 면역유도 효과를 상승시키는 방법이 시도되고 있다(6,7). 한 예로써 항원을 봉입하거나 상피조직(epithelium)에 특정 부분을 targeting하는 방법이 있다(6). 항원을 targeting하는 방법의 하나로써 점막 상피 세포(mucosal epithelial cells)의 탄수화물과 특이적으로 반응하는 렉틴과 같은 물질을 이용할 수도 있다(5,8). 현재 임상에서 사용되는 대표적인 점막면역용 면역 증강제는 콜레라 독소(cholera toxin; CT)로서 여러 가지 항원과 동시에 경구면역 시 항원에 대한 면역반응을 증강시키는 활성이 있음은 잘 알려져 있다(8). CT는 ADP-ribosyl transferase 활성을 가지는 A-subunit 및 GM1-ganglioside receptor로서의 기능을 가지는 다섯 개의 B-subunit으로 구성되어 있다(9). CT의 점막면역 증강효과는 내피세포의 GM1 ganglioside에 CT의 B-subunit이 반응하면서 항원을 장관의 중요한 면역기관인 Peyer's patch로의 수송을 촉진시키고(10) Peyer's patch 내의 dendritic cell(DC)의 성숙에도 관여하므로 T-세포로의 항원제시 기능을 증진시키는 활성이 있음은 잘 알려져 있다(10-12).

한국산 및 유럽산 겨우살이에서 면역증강 활성을 가지는 가장 중요한 성분이 렉틴임은 이미 잘 알려진 사실이다(13-15). 겨우살이 렉틴 성분은 그들의 당 특이성 및 분자량의 차이에 의하여 렉

\*Corresponding author: Jong Bae Kim, Institute for Biochemical Research, Handong University, Pohang, Gyeongbuk 795-940, Korea  
Tel: 82-54-260-1350  
Fax: 82-54-261-6705  
E-mail: jbkim@handong.edu  
Received October 8, 2010; revised November 9, 2010;  
accepted November 15, 2010

틴-I, -II 및 -III로 구별하고 있으며, 이들은 당 특이성을 가지는 B-chain 및 cytotoxic A chain으로 구성되는 hetero dimer의 형태로 존재하고 있다(16). 따라서 겨우살이 렉틴의 구조적인 특징은 toxic A-chain 및 생체의 여러 가지 세포와 결합능력이 있는 B-chain의 존재로 이미 점막면역용 면역증강제로 사용하고 있는 CT와 구조적으로 유사한 특징을 가지고 있다. 유럽산 겨우살이는 galactose(Gal)에 대한 당 특이성을 가지는 ML-I이 주성분인 것에 비하여 한국산 겨우살이 렉틴(KML-C)은 Gal 및 N-acetyl-D-galactosamine(GalNAc) 특이성을 가지는 ML-II type의 렉틴 성분이 주성분임이 밝혀졌고(17), 이후 연구에서 KML-C는 당 특이성이 동일한 두 가지의 렉틴, 즉 KML-IIU와 KML-III로 구성됨을 확인하였다(18). 지금까지 연구결과에 의하면 KML-C는 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 있고(19,20), 동시에 선천면역계의 활성화 측면에서 KML-C는 유럽산의 ML-I에 비하여 우수한 면역자극 활성이 있다는 것과 KML-C의 전신투여는 종양 및 단백질 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역증강 작용이 있는 것으로 보고되고 있다(21,22). 또한 최근 한국산 겨우살이 렉틴은 인간의 소장 점막면역기관으로서의 수용능을 증진시키는 논문이 보고된 바(23), 그의 점막면역 면역증강제로의 활성이 충분히 있을 수 있다는 것을 생각할 수 있었다(24).

본 연구는 한국산 겨우살이추출물의 경구투여에 의한 항암작용의 유도 결과와 한국산 겨우살이 렉틴이 점막면역계의 M cell을 통과하는 작용이 있고 점막상피세포로부터 면역자극 활성이 있다는 기존의 보고를 근거로, 단백질 항원에 대한 점막면역 증강작용의 유도 가능성을 확인하고자 항원 OVA와 KML-C를 동시에 경구면역 하였을 경우 항원특이적인 면역증강 효과를 체액성 및 세포성 면역 증진효과로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 세포배양

Ovalbumin(OVA), cholera toxin(CT)은 Calbiochem(Darmstadt, Germany)사에서 구입했다. Goat anti-mouse IgGAM, G1, G2a, G2b 및 A-HRP는 Zymed(San Francisco, CA, USA)에서 구입했다. 단백질 정량 kit는 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 한국산 겨우살이 렉틴의 분리

한국산 겨우살이로부터 렉틴(KML-C)의 분리는 기 발표된 방법에 준하여 분리하였다(6). 약술하면, 겨우살이 추출물을 70% ammonium sulfate로 침전 후 PBS에 대하여 투석을 실시함으로써 겨우살이 조단백질 분획을 얻었다. 이 단백질 분획을 0.2 M HCl이 처리된 sepharose-4B column에 적용 후, sepharose-4B와 반응하지 않은 단백질을 PBS를 이용하여 세척함으로써 제거하였다. 그 후 column을 0.1 M lactose를 이용하여 sepharose-4B와 반응한 단백질을 용출하였다. 이 단백질을 PBS에 대하여 투석함으로써 정제된 KML-C를 얻었다. KML-C 용액은 0.2  $\mu$ m의 pore size를 가지는 여과지(Whatman, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 여과하고 단백질 정량 후 -20°C에 저장하며 사용하였다.

### 실험동물 및 면역

성후 6-8주령의 자성 BALB/c를 (주)대한실험동물(Seoul, Korea)

에서 분양받아 한동대학교 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 각 군별로 10마리씩 넣어 정수된 물과 실험 동물용 펠렛사료(Sam-yang Co Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다. 항체 생산을 위한 항원으로 OVA(100  $\mu$ g)를 사용하였고, OVA에 대한 항체 생산을 위하여 OVA 단독 혹은 OVA에 KML-C를 혼합(1, 10, 100  $\mu$ g)하여 경구투여로 면역하였다. 경구투여 면역 증강 효과를 측정하기 위한 대조군으로는 OVA에 CT(10  $\mu$ g)를 혼합하여 면역하였다. 마우스에 대한 면역은 1일, 21일 및 42일째에 총 3회 실시하였다.

### 시료채취

OVA의 항체가 측정을 위한 혈액의 채취는 1차 면역 후 2주, 4주 및 7주에 실시하였다. IgA 항체가 결정을 위한 점막분비물인 질과 분변은 최종 면역 7일 후에 준비하였다. 혈액으로부터 혈청의 준비는 원심분리(6000 rpm, 10 min)를 통하여 얻었고, 항체 분석 시까지 -20°C에 보관하였다. 질 분비물은 생식기를 50  $\mu$ L의 버퍼로 두 번 세척하여 수거하였고, 원심분리(1000 rpm, 10 min)를 통해 상등액을 수집 후, -20°C에서 사용할 때까지 보관하였다. 분변은 무작위로 수거하여 37°C에서 5시간 건조 후, 10 mg/mL의 농도로 PBS+0.01% NaN<sub>3</sub> 완충용액으로 현탁 후, 원심분리(6000 rpm, 10 min)하여 상등액을 수집 후 -20°C에서 사용할 때까지 보관하였다.

### 항체 역가 측정

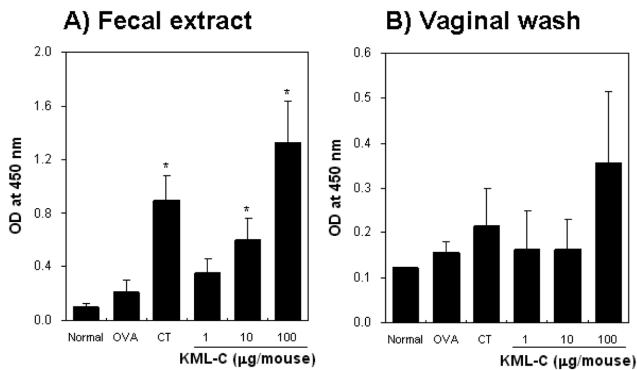
OVA에 대한 항체 역가는 혈청과 점막 분비물에서 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 요약하면, 96 well plate에 항원으로 사용한 OVA를 코팅용액(50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 9.6)에 50  $\mu$ g/mL로 용해 후, 각 well 당 100  $\mu$ L씩 첨가하고 4°C에서 16시간 동안 코팅하였다. 세척용액(PBS+0.05% Tween20)을 이용하여 plate를 세척 한 후, 10% 탈지분유를 이용하여 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. 세척용액으로 plate를 세척 후 혈청 혹은 점막분비물을 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 항체의 역가 혹은 항체의 isotype의 측정을 위하여 효소 HRP가 표지된 2차 항체를 첨가하여 반응시켰으며, HRP의 기질로는 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Calbiochem(TMB)을 사용하였다. 항체가 측정을 위하여 질 분비물의 경우는 3배 희석용액을, 분변 추출액은 7배 희석된 용액을 처리 후 흡광도로 표시하였다. 혈청 항체 역가는 정상 마우스 혈청과 반응하는 흡광도의 2배가 되는 혈청 희석 비로 결정하였고, 항체의 subisotype 결정을 위한 항혈청은 3배 희석된 혈청의 흡광도로 표시하였다.

### DTH test

그룹별로 4마리의 BALB/c 마우스를 이용하여 항원으로 OVA 단독 혹은 CT, KML-C와 혼합하여 3회 경구면역하였다. 최종면역 7주 뒤에 각각의 마우스 뒷다리 발바닥에 50  $\mu$ g의 OVA를 피하주사 함으로써 감작시켰다. 항원 감작 후, 지연성 과민반응의 정도는 항원을 재감작한 부분인 투여된 발바닥 부분의 두께를 투여 후 5일까지 측정하였고, DTH 반응은 주사 부위의 팽윤 정도를 정상마우스에 대한 백분율(%)로 나타내었다(25).

### 통계처리

대조군에 대한 실험군의 통계적 유의성 분석은 Student's two-tailed *t*-test를 이용하여 분석하였다.



**Fig. 1. IgA response in serum and mucosal secretion of mice after oral administration of KML-C.** Seven days after the final immunization, the titers of IgA were determined by ELISA using antibodies specific for IgA. \* $p < 0.005$ , compared with the OVA-treated group by Student's two-tailed  $t$ -test.

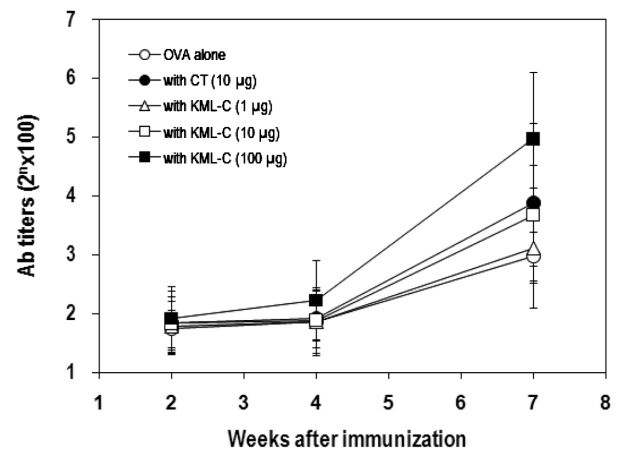
## 결과 및 고찰

### OVA 특이적 IgA 형성에 미치는 역할

KML-C의 경구투여에 의한 점막면역계의 활성화, 즉 면역증강제로서의 활성을 측정하고자, 항원 OVA와 KML-C를 혼합하여 경구투여 후, 분변 추출물, 질 세척액에 생성된 IgA의 역가(titer)를 조사하였다(Fig. 1). 분변 추출물에 함유된 OVA에 대한 IgA 항체의 역가를 측정한 결과, KML-C 농도 의존적으로 역가가 증가되었고, 100 µg의 투여에서 가장 우수한 결과를 얻었다. 매우 흥미로운 것은 현재 점막면역증강제로 가장 널리 사용되는 CT와의 비교에서 100 µg의 KML-C 투여 군에서 CT에 비하여 더 높은 OVA 특이적 항체 역가를 나타내었다. KML-C와 당 특이성이 다른 유립산 렉틴인 ML-1를 사용한 유사한 연구에서도 본 연구 결과와 비슷한 결과를 보였다(8). 즉, 항원 OVA와 면역증강제로서 CT(10 µg) 혹은 ML-1(100 µg)을 혼합하여 경구 투여한 결과, 항원 OVA에 대하여 혈청 IgG 생산 및 침, 질 세척액, 비강세척액 등에 분비된 항체 IgA의 역가가 유의하게 증가된 결과를 보여줌으로써 ML-1이 점막면역을 증진시키는 면역증강제로서의 활성이 있음을 보고하였다(8). KML-1를 면역증강제로 사용한 본 연구에서도 유립산 겨우살이 렉틴인 ML-1을 면역증강제로 사용한 실험에서 사용한 같은 항원 OVA와 KML-C(100 µg)을 경구 투여한 결과 분변 혹은 질세척액에서 항원 OVA 단독 면역군에 비하여 더 높은 IgA 항체가 높게 나타난 것은 KML-1도 ML-1과 유사하게 점막면역 면역증강제로서의 활성이 충분히 있음을 보여주는 결과로 평가된다. 본 실험에 사용한 KML-C는 KML-IIU 및 KML-IIL로 구성되는 두 가지 렉틴이 혼합된 것이며 KML-IIU 및 KML-IIL을 분리 후 면역자극 활성을 조사한 결과 KML-IIL이 KML-IIU에 비하여 10배 이상의 높은 활성이 있는 것으로 보고되었다(18). 그러나 KML-IIL과 KML-IIU를 분리하기가 용이하지 않고, KML-IIL의 양이 상대적으로 매우 낮아 본 연구에서는 lactose-affinity column으로 쉽게 분리할 수 있는 KML-C로 조사하였다(6). KML-IIL만을 사용할 시 더 강한 면역증강제의 활성을 나타낼 수 있는 가능성이 있을 것으로 예상되어 보다 강한 면역 증강제를 탐색하기 위하여 이 두 가지의 활성을 비교 연구하는 것도 매우 흥미로운 연구가 될 것으로 생각된다.

### 혈청 내 항원 OVA 특이적 항체의 역가에 미치는 영향

국산 겨우살이 렉틴인 KML-C를 단백질 항원인 OVA와 경구

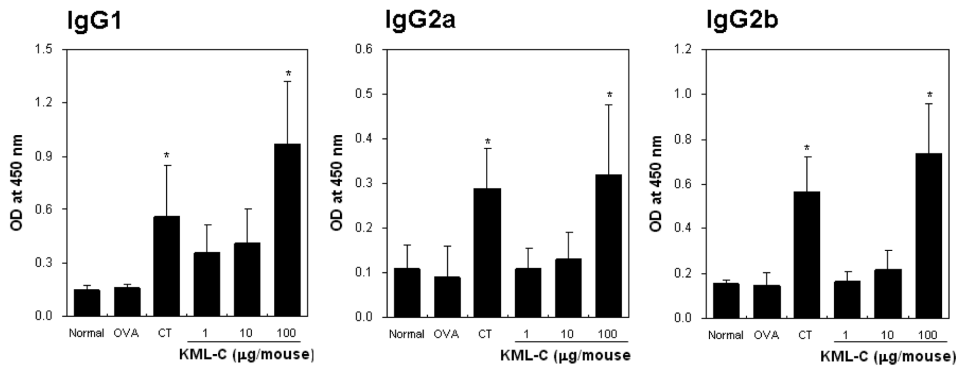


**Fig. 2. Effect of KML-C on the induction of OVA-specific antibody in the serum.** Five BALB/c mice per group were immunized orally 3 times at 1, 14, and 35 days under the indicated conditions. Seven days after the final immunization, the serums were harvested from the immunized mice. The OVA-specific antibody titers in the serum were measured by ELISA kits. \* $p < 0.01$ , compared with the OVA-treated group by Student's two-tailed  $t$ -test.

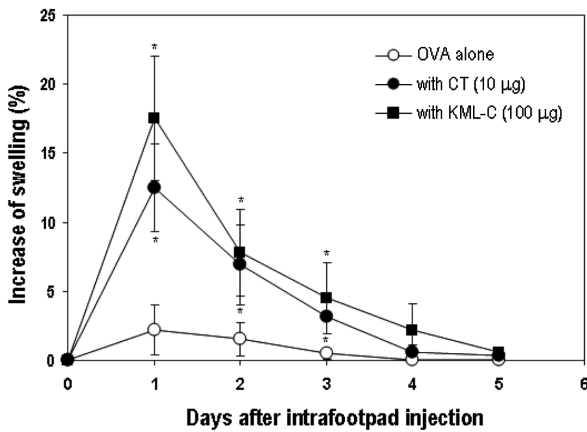
투여 방법으로 총 3회 면역 후(재료 및 방법 참조), 혈청에 생성된 OVA에 대한 총 항체(IgG+A+M) 생산 효과를 검토하였으며 대조군의 점막면역 증강제는 CT를 이용하여 상호 결과를 비교하였다(Fig. 2). 실험결과, 혈청에 생성된 OVA 특이 총 항체 역가는 OVA 단독 투여군에 비하여 유의성 있게 항체생산이 증가된 군은 100 µg의 KML-C를 OVA와 혼합하여 경구투여 한 경우에서만 나타났다. 그러나 CT(10 µg) 혹은 10 µg 및 1 µg의 KML-C를 투여한 군의 경우, 실험에 사용한 10마리의 마우스에서 1-2마리의 경우에서는 항체 생산이 유도되지 않아(10,26) 통계적으로 유의성은 인정되지 않았으나 이 결과가 점막면역 증진 효과가 없음을 의미하는 결과는 아닌 것으로 사료되었다. 다른 논문에서도 혈청 내 항체의 역가가 분변 추출물이나 질 세척액 내 IgA의 항체 역가에 비해 유의성 있는 결과를 나타내지 않았는데 이는 점막면역과 일반 체계적인 면역(systemic immune system) 경로가 다르기 때문인 것으로 사료된다(8). 대조군으로 사용한 CT의 경우, 항원과 함께 경구 혹은 경비투여의 경우 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역증강효과를 가지는 매우 우수한 성분임을 잘 밝혀져 있고(5,8), CT의 경우도 KML-C와 동일한 결과를 보여주고 있어 점막면역증강제로서 큰 문제는 없을 것으로 판단된다.

### OVA 특이적 항체에 대한 Isotype 결정

KML-C는 항원 OVA와 함께 경구투여법으로 면역할 경우, 항원에 대한 점막면역뿐 아니라 전신적인 면역증강 효과를 유도하는 기능이 있음을 확인한 바, KML-C에 의한 면역반응이 Th1 성향인지 Th2 성향의 면역반응을 유도하는지에 대한 검토를 위하여 생산된 항체의 subisotype 결정을 실시하였다(Fig. 3). 실험 결과 대조군으로 사용한 10 µg의 CT 및 100 µg의 KML-C의 경우에서만 OVA 단독 투여군에 비하여 높은 IgG1 및 IgG2 type 항체의 생산활성이 증진되었고, 두 군간의 유의성은 인정되지 않았다. 대조군으로 사용한 CT는 항원과 함께 투여하였을 경우 비장 및 점막면역기관인 Peyer's patch의 Th2-type 면역반응을 증진시키는 활성이 있음을 잘 알려져 있고(23), 또한 항원과 함께 경비투여시 항원에 대한 IgG1 type 항체 및 IgG2 type 항체생산을 증



**Fig. 3. Determination of antibody titers according to the isotype.** Five BALB/c mice per group were immunized orally 3 times at 1, 14, and 35 days under the indicated conditions. Seven days after the final immunization, the serums were harvested from the immunized mice. The OVA-specific IgG1, IgG2a, and IgG2b titers in the serum were determined by ELISA. \* $p < 0.05$ , compared with the OVA-treated group by Student's two-tailed *t*-test.



**Fig. 4. Effect of KML-C on the induction of OVA-specific DTH reaction.** DTH reaction was carried out using mice immunized 3 times under the indicated conditions (described in materials and methods). DTH reaction was represented as the percentage increase in footpad swelling. \* $p < 0.01$ , compared with the OVA-treated group by Student's two-tailed *t*-test.

진시키는 기능이 있음도 보고되었다(5). 본 연구에서도 항원 OVA와 KML-C를 경구투여 결과 CT와 유사한 면역반응을 유도하였다. 특히 IL-4와 같은 Th2 type cytokine에 의하여 생산되는 IgG1 type 뿐 아니라, IFN- $\gamma$ 와 같은 Th1 type cytokine의 영향으로 생산되는 IgG2 type의 항체 생산이 증진되었다는 사실은 KML-C가 CT와 동일하게 항원에 대한 면역반응을 조절하는 기능이 있음이 시사되었다(27,28). 현재까지 밝혀진 점막면역 증강제는 주로 박테리아에서 추출한 독소인 CT, LT, PT 등이 대부분이다. 이러한 독소들은 구조적으로 두가지 단백질이 결합된 dimer 형태이며 그 중 하나의 chain은 세포 표면 수용체에 결합하는 특징을 가진다. 겨우살이 렉틴 역시 동일하게 하나의 toxic A-chain과 세포표면의 당과 결합 site가 있는 특성을 가지기에 면역활성의 기전 면에서도 CT등과 유사한 경로를 갖는 것으로 추측되나 각 chain과 활성과의 관계는 추가적인 연구가 요구된다(5,8)

**지연성 과민반응(DTH) 유도에 미치는 영향**

KML-C의 세포성 면역반응에 미치는 효과를 조사하기 위하여 항원에 대한 지연성 과민반응효과(DTH)로 조사하였다. 지연성 과민반응의 유도는 OVA단독 혹은 면역증강제로서 KML-C를 혼합

하여 3회 경구면역 후 최종면역 7주 후에 항원으로 사용한 OVA를 intra-footpad 주사 후, footpad swelling을 측정함으로써 조사하였다. 실험 결과, OVA와 KML-C 혹은 CT를 동시에 투여한 군에서 OVA 단독 면역군에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 DTH 반응이 관찰되었으며, 효과는 2일간 지속되었다. KML-C와 CT간의 높은 DTH 유도 활성의 차이는 유의성은 인정되지 않았으나 혈청의 항체생산 활성과 동일하게 평균 값은 KML-C가 CT에 비해 높은 경향을 보였다. DTH는 세포매개 면역반응의 대표적인 사례로서 생체에서 항원에 의하여 감작된 생체가 동일한 항원 자극에 의하여 활성화된 Th1-세포가 생산하는 cytokine에 의하여 항원을 제거하기 위한 대식세포가 침윤됨으로 유도되는 기작이다(29,30). 동시에 DTH가 주로 Th1 세포에 의하여 유도되는 기전 이기에 바이러스감염 및 암의 제거와 같은 세포성 면역반응의 유도 가능성을 간접적으로 시사하는 결과로 평가된다(31,32). 따라서 한국산 겨우살이 렉틴인 KML-C는 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응을 증진시키는 새로운 점막 면역 증강제로서의 응용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

**결 론**

본 연구에서는 마우스를 이용하여 한국산 겨우살이에서 분리한 렉틴(KML-C)의 점막면역 증강효과를 조사하여 그 이용 가능성을 실험동물을 통하여 검토하였다. 항원으로서 OVA를 사용하였으며, OVA 단독 또는 KML-C와 혼합하여 경구투여 한 후 혈청과 점막분비액 내의 OVA에 대한 항체 생산능력을 Ig class별로 측정하였다. 그 결과 KML-C는 점막분비물의 IgA 및 혈청 IgG 값을 증진시켰다. 혈청 IgG의 subisotype를 조사한 결과, IgG1, IgG2a 및 IgG2 type의 항체 생산이 증진된 결과를 얻었다. 항원 OVA와 KML-C를 경구 면역한 마우스에 항원으로 사용한 OVA를 제각각한 결과 KML-C를 혼합하여 면역한 마우스에서 유의한 DTH 반응이 유도되었다. 따라서 KML-C는 단백질 항원과 혼합하여 경구면역 할 경우 점막면역반응을 증진시키며 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역반응을 촉진시키는 면역 증강활성이 있음을 확인하였다.

**감사의 글**

본 연구는 2009년 지식경제부 지역산업선도기술개발사업(70007480)에 의해 수행된 결과이므로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

1. Stern ME, Schaumburg CS, Dana R, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC. Autoimmunity at the ocular surface: Pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunol.* 3: 425-442 (2010)
2. Kelsall BL. A focus on dendritic cells and macrophages as key regulators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 1: 423-424 (2008)
3. Flo J, Elias F, Benedetti R, Massouh E. Reversible effects on B and T cells of the gut-associated lymphoid tissues in rats malnourished during suckling: Impaired induction of the immune response to intra-Peyer patches immunization with cholera toxin. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80: 147-154 (1996)
4. Hibi M, Hachimura S, Ise W, Sato A, Yoshida T, Takayama T, Sasaki K, Senga T, Hashizume S, Totsuka M, Kaminogawa S. Dendritic cells from spleen, mesenteric lymph node, and Peyer's patch can induce the production of both IL-4 and IFN-gamma from primary cultures of naive CD4(+) T cells in a dose-dependent manner. *Cytotechnology* 43: 49-55 (2003)
5. Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. *Immunology* 99: 30-37 (2000)
6. Kuhara T, Iigo M, Itoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, Okamura H, Tsuda H. Orally administered lactoferrin exerts an anti-metastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr. Cancer* 38: 192-199 (2000)
7. Ghose C, Kalsy A, Sheikh A, Rollenhagen J, John M, Young J, Rollins SM, Qadri F, Calderwood SB, Kelly CP, Ryan ET. Transcutaneous immunization with *Clostridium difficile* toxoid A induces systemic and mucosal immune responses and toxin A-neutralizing antibodies in mice. *Infect. Immun.* 75: 2826-2832 (2007)
8. Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, Pfuller U, O'Hagan DT. The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology* 102: 77-86 (2001)
9. Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K, Flach CF, George-Chandy A, Harandi AM, Lebens M, Lehner T, Lindblad M, Nygren E, Raghavan S, Sanchez J, Stanford M, Sun JB, Svennerholm AM, Tengvall S. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol. Lett.* 97: 181-188 (2005)
10. Anosova NG, Chabot S, Shreedhar V, Borawski JA, Dickinson BL, Neutra MR. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol.* 1: 59-67 (2008)
11. Elmore SA. Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Pathol.* 34: 687-696 (2006)
12. Gong Z, Jin Y, Zhang Y. Oral administration of a cholera toxin B subunit-insulin fusion protein produced in silkworm protects against autoimmune diabetes. *J. Biotechnol.* 119: 93-105 (2005)
13. Mueller EA, Anderer FA. Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnolacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells. *Immunopharmacology* 19: 69-77 (1990)
14. Mueller EA, Anderer FA. A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer Immunol. Immunother.* 32: 221-227 (1990)
15. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. 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 (1990)
16. Metzner G, Franz H, Kindt A, Fahlbusch B, Suss J. The *in vitro* activity of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells. *Immunobiology* 169: 461-471 (1985)
17. Debray H, Montreuil J, Franz H. Fine sugar specificity of the mistletoe (*Viscum album*) lectin I. *Glycoconjugate J.* 11: 550-557 (1994)
18. Kang TB, Song SK, Yoon TJ, Yoo YC, Lee KH, Her E, Kim JB. Isolation and characterization of two Korean mistletoe lectins. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40: 959-965 (2007)
19. Boneberg EM, Hartung T. Mistletoe lectin-1 increases tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated whole blood via inhibition of interleukin-10 production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 996-1000 (2001)
20. Lyu SY, Park WB. Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes. *Arch. Pharm. Res.* 30: 1252-1264 (2007)
21. 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)
22. 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)
23. Lyu SY, Park WB. Transport of mistletoe lectin by M cells in human intestinal follicle-associated epithelium (FAE) *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.* 31: 1613-1621 (2008)
24. Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin modulates intestinal epithelial cell-derived cytokines and B cell IgA secretion. *Arch. Pharm. Res.* 32: 443-451 (2009)
25. Yoo YC, Yoshimatsu K, Koike Y, Hatsuse R, Yamanishi K, Tanishita O, Arikawa J, Azuma I. Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus-inactivated vaccine. *Vaccine* 16: 216-224 (1998)
26. Sjoblom-Hallen A, Marklund U, Nerstedt A, Schon K, Ekman L, Bergqvist P, Lowenadler B, Lycke NY. Gene expression profiling identifies STAT3 as a novel pathway for immunomodulation by cholera toxin adjuvant. *Mucosal Immunol.* 3: 374-386 (2010)
27. Eriksson K, Fredriksson M, Nordstrom I, Holmgren J. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect. Immun.* 71: 1740-1747 (2003)
28. Su SB, Silver PB, Wang P, Chan CC, Caspi RR. Cholera toxin prevents Th1-mediated autoimmune disease by inducing immune deviation. *J. Immunol.* 173: 755-761 (2004)
29. Li L, Elliott JF, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 153: 3967-3978 (1994)
30. Pelletier RP, Bickerstaff AA, Adams PW, Orosz CG. Evaluation of immune regulation in transplant patients using the trans vivo delayed type hypersensitivity assay. *Hum. Immunol.* 68: 514-522 (2007)
31. Kim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BB, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Vet. Immunol. Immunop.* 73: 331-341 (2000)
32. Phumiamorn S, Sato H, Kamiyama T, Kurokawa M, Shiraki K. Induction of humoral and cell-mediated immunity to hepatitis B surface antigen by a novel adjuvant activity of Oka varicella vaccine. *J. Gen. Virol.* 84: 287-291 (2003)