

한국산 겨우살이 Lectin B-chain의 면역증강 효과

허선미 · 안효선 · 김규대 · 김영훈 · 김인보 · 윤택준¹ · 김종배*

한동대학교 생명과학부 생명과학과, ¹유한대학교 식품영양학과

Immunoadjuvant Activity of Korean Mistletoe Lectin B-chain

Sun Mi Her, Hyosun An, Kyu Dae Kim, Young Hoon Kim, Taek Joon Yoon¹ and Jong Bae Kim*

School of Life Sciences, Handong Global University, Pohang, Gyungbuk 791-708, Korea

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

Abstract – Korean mistletoe Lectin (KML-C) is composed of A and B sub-chain. B chain binds to carbohydrates on cell surface and A chain hinders translation and induces an apoptosis as a RIP (ribosome inactivating protein). KML-C has very strong biological activities, it has seriously limits to use as a cancer therapy or adjuvant because of its toxicity to normal cells. This study is therefore conducted to see if B chain of KML-C might have immunological activity, especially adjuvant activities with less toxicity. We isolated B chain from KML-C using the lactose affinity chromatography, and examined their immunoadjuvant activity. The isolated B-chain did not show any cytotoxicity against tumor cell, RAW264.7, and P388D1 while KML-C had a very strong toxicity. This non-toxic effect was observed also by *in-vivo* study. Both humoral and cellular immunities were observed ; the antibody titer was increased when the mice were immunized with B-chain used as adjuvant like Freund's adjuvant, indicating that B chain of mistletoe lectin alone might be used for adjuvant; it also increased DTH in cellular immunity. These results suggest that B-chain of KML-C might be used for adjuvant used for the production of antibody or vaccine with less toxicity.

Key words – Korean mistletoe lectin (KML-C), B chain, Immunoadjuvant, Antibody, DTH

면역증강제(adjuvant)는 백신 항원에 대한 생체 방어 능을 증진시킬 목적으로 면역하는 항원에 대한 체액성 및 세포성 면역반응을 증진시키는 물질을 말한다. 따라서 면역증강제의 이용은 면역하는 항원의 양을 감소시키거나 면역 투여횟수를 줄일 수 있는 장점에 더하여 무엇보다 중요한 것은 재조합 단백질 항원과 같은 면역원성이 약한 항원에 대한 면역원성을 증진시키는 기능이 있어 임상에서 필히 적용하고 있는 물질이다.¹⁻³ 그럼에도 불구하고 여전히 임상에서 사용할 수 있는 면역증강제가 제한되어 있는 이유 중 가장 중요한 것은 유효한 면역증강 활성의 유도 및 안전성의 문제이다.¹⁻³ 가장 높은 면역증강 활성을 가진 세균성 면역증강제인 Freund's complete adjuvant(FCA)는 사멸된 결핵균체(*Mycobacterium tuberculosis*)의 세포벽 성분을 paraffin oil에 혼합한 것으로 항원에 대한 면역자극 효과 및 유화(emulsion)에 의한 항원의 저장성을 높임으로 여러 가지 항원에 대하여 매우 높은 면역증강효과를 유도한다.⁴ FCA는

항원에 대한 체액성 및 세포성 면역증강 효과가 매우 우수함에도 불구하고 임상에서 사용하지 못하고 주로 실험용으로만 사용이 가능한 것은 그들의 강한 염증반응에 의한 부작용 때문이다.¹⁻⁴ 그 외에도 결핵균체의 세포벽 구성단위인 muramyl dipeptide (MDP)와 그 유도체인 MDP-Lys(L18) 또는 stearyl-MDP 및 lipid-A 계열의 물질도 강한 선천적 면역자극활성이 있어 여러 가지 항원에 대한 면역증강제의 개발이 진행되어 왔다.⁵⁻⁶ 국소부위에 염증을 야기하는 등 인간에게 적용하기에는 한계가 있어 주로 동물에 대한 면역증강제로 사용하고 있다.¹⁻⁴ 한편, 식물성 물질로서는 steroid 및 당으로 구성되는 saponin류도 항원제시세포를 활성화 시키는 작용이 있다고 보고되고 있다.⁷ 현재 임상에서 사용하는 면역증강제는 aluminium함유 화합물(alum) 및 스쿠알렌(squalene)을 기본성분으로 하는 MK59와 AS03 등이 있다.⁸ Alum은 Al(OH)₃의 형태로 사용하는데 주로 항원을 흡착하는 특성에 의한 항원 저장작용을 증진시킴으로 장시간 항원을 항원제시세포에 항원을 노출시키는 기능과 함께 스스로 항원제시세포를 활성화시키는 기능에 의한 면역증

*교신저자(E-mail): jbkim@handong.edu
(Tel): +82-54-260-1350

강작용을 유도한다.⁹⁾ 그러나 alum의 단점은 항원에 따라 활성의 유도에 많은 차이를 나타내어 폭넓은 응용이 어렵고, 일부항원에 대해서는 알레르기를 유도하는 IgE 항체를 과잉 생산하기도 한다.²⁾ 또한, alum은 항원에 대한 세포성 면역보다 주로 체액성 면역증강 활성만을 유도하기에 효과적으로 백신에 적용하기 위하여 alum을 대체할 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.²⁾ 최근에 개발된 MK59 및 AS03은 스쿠알렌 오일을 사용하며 주로 oil-in-water의 유화작용에 의한 항원저장작용에 의해 면역증강효과를 유도하며 2009년에 유행한 신종인플루엔자 바이러스에 대한 백신 면역증강제로 개발되어 항체 생산성을 높이는 활성이 있음을 확인하였다.^{8,9)}

겨우살이(Mistletoe, *Viscum album*)는 세계 전역에서 여러 가지 나무를 숙주로 하여 성장하는 반기생식물이며, 우리나라를 포함한 동아시아 및 유럽에서는 예로부터 민간의학 물질로 사용하여 왔다.¹⁰⁾ 겨우살이 추출물의 그의 분획에 대한 동서양의 많은 연구결과 겨우살이는 항암,¹⁰⁻¹²⁾ 면역증강 및 조절,^{13,14)} 동맥경화와 고혈압,^{15,16)} 항산화^{17,18)}의 활성이 인정되었기에 우리나라를 포함한 유럽에서 전통적으로 여러 가지 질병에 대하여 사용한 것이 바르다는 것을 보여주고 있다. 겨우살이의 여러 가지 활성 중 가장 잘 알려진 활성은 면역증강에 의한 항암 활성이며 이러한 활성을 가진 가장 중요한 성분은 렉틴(lectin)이다.^{19,20)} 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.¹⁹⁾ 따라서 겨우살이 렉틴은 세포독성 및 면역증강 활성을 동시에 가지고 있다.^{13,22,23)} 렉틴에 의한 세포독성은 B-chain에 의한 세포의 인식 그리고 A-chain에 의한 단백질 합성의 억제가 원인이며,²¹⁾ 결국 렉틴에 의한 암세포의 사멸은 apoptosis에 의하는 것으로 알려져 있다.^{20,22)} 렉틴의 면역증강 활성은 주로 당 결합부위를 가진 B-chain에 의한 것으로 알려져 있다.²³⁾ 겨우살이 렉틴 B-chain은 면역세포와 렉틴-당 결합을 유도함으로써 주로 대식세포와 같은 면역세포로부터 tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 interferon- γ (IFN- γ)와 같은 면역조절 cytokine들을 생산하는 면역자극 활성을 보고함으로써 B-chain의 항원 특이적인 면역증강 활성에 대한 가능성을 시사하였다.^{24,25)}

따라서 본 연구는 한국산 겨우살이로부터 분리한 렉틴(KML-C)으로부터 B-chain을 분리 후, B-chain의 세포독성 효과, *in vivo* 독성효과를 KML-C과 비교 조사하였으며, 항원에 대한 면역증강 효과의 측정은 단백질 항원을 현재 임상에서 사용하는 스쿠알렌에 혼합하여 면역한 후 항원에 대한 항체 생산능 및 세포성 면역증강 활성을 FCA의 경우와 비교함으로써 생체에 안전하고 유의한 활성을 가진 면역증

강제로의 개발가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 생후 6-8주령의 자성 BALB/c 및 ICR 마우스를 (주)대한실험동물에서 분양 받아 한동대학교 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5-10 마리씩 넣어 정수 된 물과 실험동물용 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.

겨우살이 렉틴 B-chain의 분리 - 겨우살이로부터 분리한 렉틴성분(KML-C)으로부터 A- 및 B-chain의 분리는 기 발표된 논문을 참고로 실시하였다.²⁶⁾ 약술하면, PBS(10 mM phosphate buffer containing 0.85% NaCl, pH 7.3)에 용해된 KML-C를 5% β -mercaptoethanol이 되도록 준비 후 25°C에서 16시간 동안 반응시킴으로 각 subchain들을 해리 시켰다. 이 반응물은 미리 5% β -mercaptoethanol로 평형시킨 lactose affinity column(Sigma)에 적용하였고, 동일한 완충액으로 column을 세척함으로써 비 흡착 성분을 제거하였다. Column에 흡착된 B-chain의 분리는 0.1 M lactose가 함유된 PBS를 이용하여 용출, 수집하였으며 수집 즉시 PBS에서 투석하였다. 투석 완료 후 BCA 단백질 kit(PIERCE)를 이용하여 단백질 정량하여 0.5 mg/ml로 농도를 조정 후, 실험 시까지 -20°C에 보관하였다.

B-chain의 전기영동 - KML-C로부터 준비된 B-chain의 단백질 분석은 Weber 등의 방법²⁷⁾에 준하여 15% sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide을 이용한 전기영동을 실시하였다. 단백질 밴드의 염색은 coomassie blue법을 통해 확인하였다.

B-chain의 *in vivo* 독성 효과 - 군 당 7마리의 ICR 마우스(웅성, 5 주령)에 KML-C 혹은 그의 B-chain을 각각 100 μ g/kg, 50 μ g/kg, 25 μ g/kg씩 혈관 주사하였고, 주사 후 14일간 사육관리 하면서 매일 마우스의 외형상 변화 및 생존율을 측정하였다.

세포배양 및 세포독성 - 종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thiogly-collate 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 적용한 세포 주는 RAW264.7 및 P388D1 cell 이었으며 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양하였다. 시료의 각 세포에 대한 세포독성 조사를 위하여 5×10^3 /well의 밀도로 각 종양세포를 96-well plate의 각 well에 plating 한 후, 시료의 최종 농도가 2 mg/ml 부터 31.3 μ g/ml가 되게 조정 후 3일간 배

양하였다. 각 물질의 세포 독성 효과는 WST-1을 이용하는 cell counting kit(EZ-Cytox, Daeil Lab. Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마우스의 면역 및 항혈청의 수집 - 항체생산을 위한 실험동물로 6주령의 BALB/c 자성 마우스를 사용하였으며 항원으로 Keyhole Limpets Hemocyanin(KLH; Sigma-Aldrich)을 마우스 당 20 µg씩 면역하였다. KLH에 대한 항체 생산 능력을 측정하기 위한 대조군 각 항원에 대한 항체의 생산을 위하여 6주령의 BALB/c 마우스에 20 µg의 KLH를 시판 adjuvant인 Freund's incomplete adjuvant(FIA; Sigma-Aldrich) 혹은 스쿠알렌에 동량 혼합하여 면역하였으며, 실험군으로는 KLH를 스쿠알렌에 혼합 시 50 ng의 KMLC 혹은 100 ng의 B-chain을 혼합하여 각각 피하 주사법으로 면역하였다. 일차 면역 2주일 후에 같은 방법으로 2차 면역을 실시하였으며, 최종면역 3일 후에 각 면역 마우스를 ether를 이용하여 마취 시킨 후 안와체혈법으로 혈액을 취하여 혈청을 분리하였으며 항체가의 측정 시까지 -20°C에 보관하였다.

항체가 측정 및 항체의 subisotype의 결정 - 혈청에 존재하는 각 항원에 대한 총 항체가의 측정은 ELISA법으로 측정하였다. Flat-bottomed microtiter plate(Nunc. USA)의 각 well에 50 µg/ml의 각 항원을 well 당 100 µl씩 분주하고 항원의 coating을 위하여 4°C에서 16시간 동안 부착시켰다. PBS-Tween 20(0.05%; PBST)으로 각 well을 3회 세척 후에 3% skim milk를 이용하여 blocking하고 PBST로서 다시 세척하였다. 준비한 각각의 항원에 대한 혈청을 100배부터 2배 희석법으로 희석하여 각 well에 첨가하고 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. KLH에 대한 총 항체가의 측정을 위하여 마우스 면역글로불린에 대한 2차 항체에 HRP가 접합된 HRP conjugated goat anti-mouse Ig G+A+M (Zymed, USA)를 넣고 반응 후 각 well을 세척하였다. 그 후, 기질로 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine(TMB, Sigma-Aldrich)를 첨가하고 2N 황산용액을 이용하여 반응을 중지시켰으며 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항체의 역가는 정상 마우스의 혈청의 두 배의 흡광도를 나타내는 혈청의 희석비로 결정하였다.

자연성 과민반응의 측정 - KLH의 항체가 조사를 위하여 동일한 방법으로 항원 및 시료를 면역하고 10 주후에 각 마우스에 항원으로 사용한 KLH를 마우스의 발바닥에 50 µg씩 피하주사 하였다. 항원 감작 후, 자연성 과민반응의 정도는 항원을 재감작한 부분인 투여된 발바닥 부분의 두께를 투여 후 5일까지 측정하였고, DTH 반응은 주사 부위의 팽윤 정도를 정상마우스에 대한 백분율(%)로 나타내었다.¹⁴⁾

통계처리 - 대조군에 대한 실험군의 통계적 유의성 분석은 Student's two-tailed *t* test, ANOVA, log-rank test를 이

용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

렉틴 B-chain의 전기영동 - Lactose affinity chromatography로 분리한 렉틴 B-chain의 전기영동 결과는 Fig. 1에 나타났다. 전기영동 결과 한국산 겨우살이에서 렉틴인 KML-C은 각각 A- 및 B-chain으로 구성되는 두 개의 isoform 즉, 64 및 60 kDa의 분자량을 가진 두 개의 렉틴성분 즉, KML-U 및 KML-L로 구성되며 두 개의 렉틴 모두 galactose 및 N-acethyl galactosamine의 당 특이성을 가지는 것으로 알려져 있다.^{20,27)} 따라서 KML-C은 β-mercaptoethanol의 존재 하에서 행해진 환원상태의 전기영동에서 4개의 밴드로 구성됨을 확인하였다. 64 kDa의 렉틴인 KML-U는 각각 당 결합 부위를 가진 약 34 kDa의 B-chain과 세포독성 효과를 가진 약 31 kDa의 A-chain으로, 60 kDa의 렉틴인 KML-L은 각각 당결합 부위를 가진 약 33 kDa의 B-chain과 세포독성 효과를 가진 약 28 kDa의 A-chain으로 구성되는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 KML-C를 β-mercaptoethanol을 이용하여 두 개의 렉틴 성분을 구성케 하는 disulfide 결합을 해리시킨 후, lactose affinity column에 적용 후 lactose로 용출하였을 경우 이론적으로는 두 개의 렉틴을 구성하는 B-chain인 34 및 33 kDa의 분자량을 가진 두 개의 단백질이 분리되어야 한다. 그러나 본 실험결과 lactose affinity column으로 분리한 B-chain은 주로 34 kDa의 단백질이 용출된 결과를 보였다. 이러한 현상에 대한 정확한 이유를 설

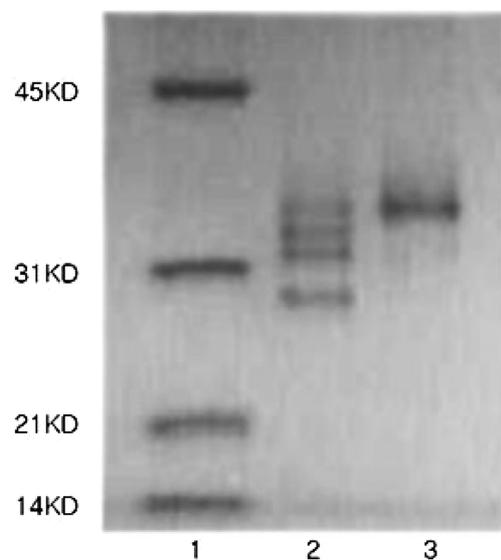


Fig. 1. Identification of the purified B-chain and separation of B chain from KML-C. Lane 1, molecular weight standards; Lane 2, KML-C; Lane 3, B chain. The samples were analyzed by 15% SDS-PAGE.

명할 수는 없었지만, 그 이유로 첫째 KML-U의 함량이 KML-L에 비하여 높기에 전기 영동상에서 주로 34 kDa의 B-chain이 검출 된 것으로 생각되고²⁷⁾ 다른 이유로는 KML-C를 구성하는 두 가지 B-chain의 알려지지 않은 생화학적 특성 차이²⁷⁾ 등에 의하여 33-kDa의 B-chain이 lactose column에 부착되는 것이 제한된 것으로 생각되었다. 그러나 본 실험에서 KML-C로부터 B-chain을 분리 후 전기영동의 결과가 보여주는 것은 최소한 당 특이 결합부위를 가지는 B-chain이 성공적으로 분리되었음을 보여주었기에 그의 생물학적 특징에 대한 실험을 진행하였다.

In vivo 독성 조사 - 락틴 B-chain의 *in vivo* 독성시험을 KML-C과 비교하며 실시하였다. 군당 5마리의 마우스에 체중 Kg당 KML-C 및 그의 B-chain을 각각 kg 체중 당 100, 50 및 25 µg을 혈관주사하고 5일간 생존율 및 체중에 미치는 효과를 검토하였다. 시료 투여에 의한 마우스의 생존여부를 조사한 결과, KML-C의 경우 100 µg/kg의 투여는 2일째에, 50 µg/kg의 투여는 4일째에, 25 µg/kg의 투여는 5일째에 실험에 5마리 모두가 사망한 반면, B-chain의 경우 100 µg/kg의 최고농도 투여의 경우에도 실험 기간이 5일 간 사망한 마우스가 없었다 (Table I, p<0.0001, log-rank test).

따라서 KML-C의 투여에 의하여 50%의 마우스가 사망할 수 있는 lethal dose(LD₅₀)값은 25 µg/kg 이하인 반면, B-chain의 경우는 100 µg/kg 이상인 결과를 보였다. 시료 투여에 의한 마우스의 체중도 유사한 결과를 보여 KML-C의 투여 후 생존 마우스의 경우 사망 시까지 극심한 체중감소를 보인 반면, B-chain의 경우 실험에 적용한 모든 농도에서 시료투여하지 않은 정상마우스와 동일하게 증가하는 결과를 보였다. 이러한 체중 감소 효과에 더하여 KML-C이 투여된 마우스의 경우 극심한 운동성이 저하 및 발열반응에 의한 입모(piloerection) 현상이 관찰되었다. KML-C의 투여에 의한 부작용은 시료에 의하여 생산되는 TNF-α와 같은 염증성 cytokines의 대량 생산에 의한 발열반응이 원인인 것으로 사료되었다.²⁸⁾ 그러나 B-chain의 경우, 실험에 적용한 최고 양인 100 µg/kg에서도 별다른 임상적 이상이 관찰되지 않음으로서 *in vivo*에서 매우 안전한 물질로 생각되었다.

B-chain의 세포독성 효과 - KML-C 및 그의 B-chain의 세포독성 효과는 마우스 대식세포주인 RAW264.7 및 P388D1 세포주에 대하여 실시하였다. 시험 결과 KML-C의 처리에 의하여 50%의 세포독성 효과를 나타내는 시료의 농도인 ED₅₀ 값은 RAW264.7 및 P388D1에서 각각 40 ng/ml

Table I. Mortality in mice administrated intravenously with KML-C

Days after treatment	Dose (µg/kg)					
	25		50		100	
	KML-C	B-chain	KML-C	B-chain	KML-C	B-chain
1	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
2	0/5	0/5	3/5	0/5	5/5	0/5
3	1/5	0/5	4/5	0/5	5/5	0/5
4	1/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
Final mortality (%)	100	0	100	0	100	0

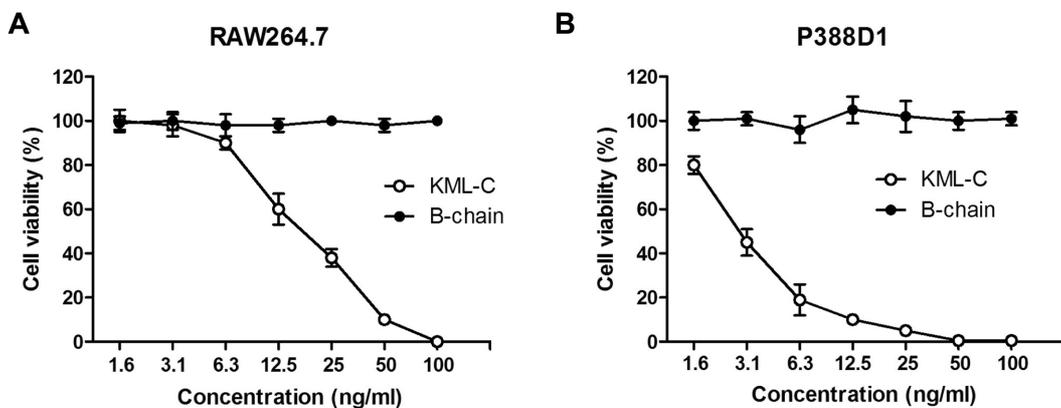


Fig. 2. Cytotoxicity test of B chain compared with KML. **A.** After RAW264.7 (2×10^4 /well) was seeded into 96 well plate, incubated the cells with samples for 48 hrs, and then treated XTT and detected with ELISA reader. **B.** P388D1 (2×10^4 /well) is same with A.

및 3 ng/ml인 결과를 보인 반면, B-chain의 경우 각각 100 ng/ml 이상에서도 세포독성 효과가 없었다 (Fig. 2). 여러 가지 세포에 대한 렉틴의 세포독성 효과는 A-chain에 의하여 이루어지며 이 경우 세포를 인식하는 부위가 있는 B-chain이 존재할 경우 이루어진다. 따라서 겨우살이 렉틴을 구성하는 각각의 subunit인 A- 및 B-chain 단독으로는 유의한 세포독성을 유도하지 못한다는 기존의 결과와 일치하였다.²⁷⁾ 즉, B-chain에 의한 세포독성 효과의 소실은 세포독성 효과를 가지는 A-chain의 소실이 원인이며 본 실험을 위하여 분리한 B-chain이 성공적으로 수행되었음을 암시하였다. 이전의 연구에서 한국산 겨우살이 렉틴으로부터 분리된 B-chain을 RAW264.7 대식세포의 동시배양 할 경우, 대식세포를 활성화시켜 nitric oxide(NO)를 생산하는 기능이 있다고 보고하였다.²⁸⁾ 항원의 자극에 의하여 활성화된 대식세포는 NO의 생산 외에도 다른 반응성 산소 종(reactive oxygen species; ROS)을 생산하여 탐식한 항원을 살해하는 기능을 획득하게 된다. 즉, 활성화된 탐식세포가 생산하는 NO는 대식세포의 고유한 기능중의 하나인 항원제거 능력을 조절함으로써 항원 특이적 면역반응의 가교역할을 수행하게 된다.²⁹⁻³⁰⁾ 이러한 근거는 KML-C로부터 분리한 B-chain이 항원에 대한 항원 특이적 면역증강 효과를 발휘할 수 있는 가능성이 있음을 암시하였고, 따라서 이미 항원에 대한 면역증강 효과가 인정된 KML-C의 강한 염증반응과 같은 부작용을 극복할 수 있는 가능성을 제시하였다.

단백질 항원에 대한 항체생산 증진 효과 - KML-C로부터 분리한 B-chain의 단백질 항원인 KLH에 대한 체액성 면역계에 미치는 효과를 검토하였다. 생체에 들어간 물질은 체내에서 효소 및 탐식작용에 의해 빠른 시간에 제거되기에 살아있는 단백질과 같은 항원에 대한 면역반응을 유도하기 위하여 항원을 유화하거나 alum에 흡착하는 방법을 이용하여 생체 저장작용을 증진시키는 방법을 사용하게 된다.²⁴⁾ 따라서 단백질 항원에 대한 B-chain의 항체생산에 미치는 효과의 검토는 시판 면역증강제인 squalene에 항원과 함께 유화시키는 방법을 선택하였고, B-chain의 면역증강 효과는 squalene에 B-chain을 혼합하여 항원을 유화시켜 면역한 마우스와 비교하였다. 양성 대조군으로는 parapin oil 성분에 결핵균체를 함유한 Freud's complete adjuvant (FCA)를 사용하였다.⁴⁾

실험결과 항원 KLH 단독 면역군과 KLH에 B-chain을 혼합하여 면역한 군은 항체 생산효과에서 유의한 차이가 인정되지 않았다. 임상에서 사용하는 squalene에 KLH를 유화시켜 면역한 마우스는 KLH 단독 면역군에 비하여 최초 면역 3주째부터 증가되는 경향을 보였으며 7주째의 결과에서 통계적 유의성을 보였다. 그리고 squalene에 B-chain을 혼합 후 항원 KLH와 함께 유화시켜 면역한 마우스는 squalene으로 항원을 혼합하여 면역한 마우스는 최초 면역 3주째부

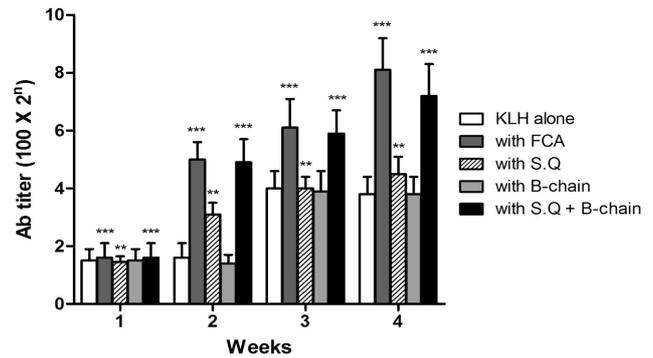


Fig. 3. Effect of B chain on the production of KLH-specific antibody. Five Balb/c mice per group were immunized s.c. twice at the interval of 2 weeks with KLH, KLH+FCA, KLH+Squalene, KLH+B chain or KLH+Squalene+B chain. Data are shown as mean relative antibody titer \pm SD (** p <0.003, *** p <0.0001, n =7).

터 통계적으로 유의한 항체생산 증진 능을 보였으며 이러한 현상은 면역 5주째까지 양성대조군으로 사용한 FCA 유화군과 유사한 결과를 보였다 (Fig. 3). 강력한 면역증강제인 FCA는 강한 항체 생산능 및 세포성 면역증강효과를 가짐에도 불구하고 임상에서 사용하지 못하는 가장 큰 이유는 그 구성체인 결핵균체의 강력한 대식세포 자극활성에 의한 염증반응유도로 인하여 극심한 발열, 체중감소, 육종형상 및 쇼크 등의 부작용에 기인한다¹⁻⁴⁾. 따라서 최근 생체에서 항원의 저장작용을 증진시키기 위한 방법으로 squalene oil 성분을 항원과 유화시킨 방법을 이용하고 있는데^{8,9)}, 이때 생체에 안전한 B-chain을 squalene oil에 혼합하여 항원을 유화시켜 면역할 경우, FCA와 유사한 면역증강 활성을 나타낸 것은 면역증강제 개발과 관련하여 중요한 기초연구 결과로 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

지연성과민반응(DTH) 유도에 미치는 영향 - B-chain의 세포성 면역반응에 미치는 효과를 조사하기 위하여 항원에 대한 지연성 과민반응효과(DTH)로 조사하였다. 지연성 과민반응의 유도는 항체 생산 효과를 측정된 마우스와 동일한 방법으로 면역 후 최종면역 10주 후에 항원 KLH를 재감작한 후 재감작 부위의 swelling 정도를 측정하였다. 실험 결과, 항원 KLH에 squalene 및 B-chain을 유화시켜 면역한 마우스는 항원을 squalene만으로 유화시켜 면역한 마우스에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 DTH 반응이 관찰되었으며, 효과는 2일간 지속되었다 (Fig. 4). 그러나 항원 KLH에 B-chain 만을 혼합하여 면역한 마우스는 유의한 DTH 상승효과가 인정되지 않았다(결과 미 제시). DTH는 세포매개 면역반응의 대표적인 사례로서 생체에서 항원에 의하여 감작된 생체가 동일한 항원자극에 의하여 활성화된 Th1-세포가 생산하는 cytokine에 의하여 항원을 제거하기 위한 대식세포가 침윤됨으로 유도되는 기작이다.^{14,31,32)} 동

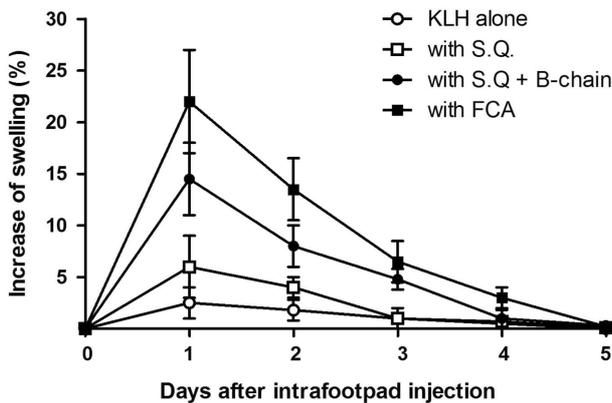


Fig. 4. Effect of B chain on cellular immune response raised by KLH. Mice were immunized twice with KLH, KLH+FCA, KLH+KML-C, KLH+Squalene, KLH+B, KLH+B+Squalene, and subsequently injected i.f. with KLH at footpads 10 weeks after the primary immunization. Data are shown as mean relative swelling percent \pm SD ($p < 0.0001$, $n = 10$).

시에 DTH가 주로 Th1 세포에 의하여 유도되는 기전이기에 바이러스와 같은 세포성 면역반응을 증진시키는 활성이 있을 것으로 사료되었다.^{31,32} 이상의 결과로서 한국산 겨우살이 렉틴인 KML-C로부터 분리한 B-chain은 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응을 증진시키는 면역증강제로서의 응용 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 따라서 그의 임상적 이용을 위하여 앞으로 B-chain 분리의 용이성을 포함하여 그의 생물학적 연구에 대하여 보다 더 자세한 검토가 요구되었다.

결론

한국산 겨우살이 렉틴은 A와 B-chain으로 구성되어 있으며 B-chain은 세포표면에 위치한 탄수화물과 결합하지만 A-chain의 경우 단백질 생합성 과정을 억제하며 RIP (ribosome inactivating protein) 와 같이 세포자살을 유도 한다. KML-C은 면역반응이나 항암효과와 같이 다양한 생리활성효과를 가지고 있으나 일반 세포에까지 독성을 보이기 때문에 항암치료나 면역증강제로 사용하기에는 많은 제약을 가지고 있다. 본 연구에서는 KML-C의 B-chain의 면역 반응, 특히 세포독성을 줄인 면역증강제 효과를 중심으로 실험을 진행 하였다. KML-C로 부터 lactose affinity chromatography를 사용하여 B-chain을 분리한 후, 면역증강제로서의 활성을 확인하였다. KML-C이 강한 독성을 보인 것에 반해 분리된 B-chain은 RAW264.7이나 P388D1과 같은 암세포나 동물실험 모두에게서 독성을 보이지 않았다. 또한 마우스에 B 체인을 면역증강제로 사용하여 면역반응을 유도시킨 결과 항원 특이적 항체의 역가가 증가하였으며 DTH 또한 증가하는 것으로 확인된 바 B-chain이 체액성 면역과 세포성 면역

모두 증진시키는 것을 확인 할 수 있었다. 본 결과들을 바탕으로 KML-C의 B-chain을 활용하여 독성이 적은 항체 생성을 위한 면역증강제 및 백신 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

사사

본 연구는 지식경제부 지역산업 선도 기술 개발 사업 (2009.10.~2011.09., 사업번호: 70007480)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Audibert, F. M. and Lise, L. D. (1993) Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today* **14**: 281-284.
2. Gupta, R. K. and Siber, G. R. (1995) Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1276.
3. Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C. K. (1993) Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**: 293-306.
4. Bennett, B., Check, I. J., Olsen, M. R. and Hunter, R. L. (1992) A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Methods* **153**: 31-40.
5. Tamura, M., Yoo, Y. C., Yochimatsu, K., Yoshida, R., Oka, T., Ohkuma, K., Arikawa, J. and Azuma, I. (1995) Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. *Vaccine* **13**: 77-82.
6. Rickman, L. S., Gordon, D. M., Wistar, R., Jr., Krzych, U., Gross, M., Hollingdale, M. R., Egan, J. E., Chulay, J. D. and Hoffman, S. L. (1991) Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A, and squalene in malaria circumsporozoite protein vaccine. *Lancet*. **337**: 998-1001.
7. Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. and Marciani, D. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* **146**: 431-437.
8. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. and Rappuoli, R. (2010) New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**: 411-416.
9. Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B. C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D. T., De Gregorio, E., Seubert, A. and Wack, A. (2011) Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* **29**: 1812-1813.
10. Kienle, G. S., Glockmann, A., Schink, M. and Kiene, H.

- (2009) *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancer: a systemic review of clinical and proclinical research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**: 79.
11. Kienle, G. S. and Kiene, H. (2007) Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. *Eur. J. Med. Res.* **12**: 103-119.
 12. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Choi, O. B., Do, M. S., Kang, T. B., Lee, S. W., Azuma, I. and Kim, J. B. (1995) Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice. *Cancer Lett.* **97**: 83-91.
 13. Fidan, I., Ozkan, S., Gurbuz, I., Yesilyurt, E., Erdal, B., Yobakan, S. and Imir, T. (2008) The efficiency of *Viscum album ssp. album* and *Hypericum perforatum* on human immune cells in vitro. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **30**: 519-528.
 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. Ojewole, J. A. and Adewole, S. O. (2007) Hypoglycaemic and hypotensive effect of *Globimetula cupulata* (DC) Van Tieghem (Loranthaceae) aqueous leaf extract in rat. *Cardiovasc. J. S. Afr.* **18**: 9-15.
 16. Deliorman, D., Cali, I., Ergun, F., Doan, B. S., Buharaliolu, C. K., Kanzik, I. (2000) Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album ssp. album*. *J. Ethnopharmacol.* **72**: 323-329.
 17. Sobern, J. R., Sgariglia, M. A., Sampietro, D. A., Quiroga, E. N. and Vattuone, M. A. (2010) Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *J. Ethnopharmacol.* **130**: 329-333.
 18. Kim, B. K., Choi, M. J., Park, K. Y. and Cho, E. J. (2010) Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1152-1158.
 19. Gabius, S., Joshi, S. S., Kayser, K. and Gabius, H. J. (1998) The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier. *Int. J. Oncology* **1**: 705-708.
 20. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Shimazaki, K. I., 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.
 21. Endo, Y., Tsurugi, K. and Franz, H. (1988) 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.
 22. Lyu, S. Y., Choi, S. H. and Park, W. B. (2002) 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.
 23. Ye, W., Nanga, R. P., Kang, C. B., Song, J. H., Song, S. K. and Yoon, H. S. (2006) Molecular characterization of the recombinant A-chain of a type II ribosome-inactivating protein (RIP) from *Viscum album coloratum* and structural basis on its ribosome-inactivating activity and the sugar-binding properties of the B-chain. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**: 560-70.
 24. Hajto, T., Hostanska, K., Rordorf, C. and Gabius, H. J. (1990) Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β -galactoside lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* **50**: 3322-3326.
 25. Lu, T. L., Chuang, J. Y., Yang, J. S., Chiu, S. T., Hsiao, N. W., Wu, M. C., Wu, S. H. and Hsu, C. H. (2011) Production of active nonglycosylated recombinant B-chain of type-2 ribosome-inactivating protein from *Viscum articulatum* and its biological effects on peripheral blood mononuclear cells. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2011**: 283747.
 26. Grtler, L. G. and Horstmann, H. J. (1973) Subunits of toxin and agglutinin of *Ricinus communis*. *Biochim. Biophys. Acta* **295**: 582-594.
 27. Kang, T. B., Song, S. K., Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Lee, K. H., Her, E. and Kim, J. B. (2007) Isolation and characterization of two Korean mistletoe lectins. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**: 6959-6965.
 28. Kang, T. B., Yoon, T. J., Kim, J. B., Song, S. K., Lee, K. H. and Kwak, J. H. (2001) Preliminary toxicity and general pharmacology of KML-IIU, a purified lectin from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). **45**: 251-257.
 29. van der Veen, R. C., Dietlin, T. A., Pen, L., Gray, J. D. and Hofman, F. M. (2000) Antigen presentation to Th1 but not Th2 cells by macrophages results in nitric oxide production and inhibition of T cell proliferation: interferon-gamma is essential but insufficient. *Cell Immunol.* **206**: 125-135.
 30. Niedbala, W., Wei, X. Q., Campbell, C., Thomson, D., Komai-Koma, M. and Liew, F. Y. (2001) Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 16186-16191.
 31. Li, L., Elliott, J. F. and Mosmann, T. R. (1994) IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* **153**: 3967-3978.
 32. Pelletier, R. P., Bickerstaff, A. A., Adams, P. W. and Orosz, C. G. (2007) Evaluation of immune regulation in transplant patients using the trans vivo delayed type hypersensitivity assay. *Hum. Immunol.* **68**: 514-522.

(2011. 6. 2 접수; 2011. 8. 11 심사; 2011. 8. 11 게재확정)