

한국산 겨우살이 숙주별 렉틴 함량과 지표물질로서의 특성 조사

김인보^{*,**} · 윤택준^{***} · 박춘호^{*,**} · 이우경^{***} · 이소희^{***} · †김종배^{*,**}

^{*}한동대학교 생명과학부, ^{**}(주)미슬바이오텍, ^{***}유한대학교 식품영양과

Studies on the Content of Lectin in Korean Mistletoe according to the Host Tree Species and Characterization for Its Application to the Quality Control

Inbo Kim^{*,**}, Taek Joon Yoon^{***}, Choon Ho Park^{*,**}, Woo Kyoung Lee^{***},

So Hee Lee^{***} and †Jong Bae Kim^{*,**}

^{*}School of Life Science, Handong Global University, Pohang 37554, Korea

^{**}Mistle Biotech Co., Ltd., Pohang 37668, Korea

^{***}Dept. of Food and Nutrition, Yuhan University, Bucheon 14780, Korea

Abstract

Traditionally, mistletoe is known as an effective anti-cancer medicinal plant, and lectin is recognized as a major component with cytotoxic and immuno-stimulant activity in mistletoe. A Korean mistletoe lectin (KML) has specificity to galactose and galactosamine and is distinguish from European mistletoe lectin (EML). When we examined the concentration of lectin in mistletoe originated from five different types of host trees, the result indicate that the lectin concentration is variable depending on the host tree. Noticeably, mistletoe from chestnut tree contains ten folds higher lectins than that of an oak tree. We also tested the concentration of KML and crude extract (KM-110) of Korean mistletoe that shows 90% cytotoxicity in L5178Y-ML25 lymphoma cell. In addition, the cells show 90% and 70% viability by the treatment of two neutralizing antibodies of KML, 9H7-D10 and 8B11-2C5 neutralization effect with two monoclonal antibodies of KML, 9H7-D10 and 8B11-2C5. Therefore, the result expected that the mistletoe contain some other cytotoxic components except lectin. Finally, the production of TNF- α and IL-6 by RAW 264.7 cells stimulated with lectin free-crude extract (LFKM-110) following neutralization by 9H7-D10 monoclonal antibody shows higher than that of lectin containing-crude extract (KM-110). These results suggest that the Korean mistletoe lectin ha a great potential to be developed as therapeutic agent of cancer.

Key words: mistletoe, lectin, neutralizing antibody, ELISA, cytokine

서 론

한방에서 사용되어진 약재들 중에서 겨우살이는 우리나라 및 유럽에서도 오래전부터 여러 가지 병증에 대하여 사용하여 왔고, 건강을 개선하는 기능성 식품 및 와인으로도 개발되어 있다. 겨우살이는 겨우살이과(Viscaceae)에 속하는 식물로, 숙주나무에 기생하기도 하지만, 스스로 광합성을 통해 양분을 생산하기도 하므로 반기생식물이라고 한다. 겨우살이는

주로 팽나무, 배나무, 밤나무, 느릅나무에 기생하며, 참나무 속에 가장 많이 붙어 산다(Lee 등 2003; Kang & Chung 2012). 특히 겨우살이의 물 추출액은 유럽에서 종양에 대하여 임상적으로 주사제로 사용하여 왔고, 렉틴 성분은 가장 중요한 활성성분으로 보고되고 있다(Beuth J 1997; Stein 등 1998).

그러나 겨우살이와 같은 약용식물을 임상에서 이용되는 주사제나 약제 혹은 기능성식품으로 개발할 경우, 다양한 추출방법과 단일 성분이 아닌 여러 복합성분을 가지는 추출물

† Corresponding author: Jong Bae Kim, School of Life Science, Handong Global University, Pohang 37554, Korea. Tel: +82-54-223-2485, Fax: +82-54-223-2487, E-mail: i1948@naver.com

로 구성되어지기에 동일한 활성이 나타나지 않음으로 표준화 작업에 어려움이 있다. 또한 소재의 활성 혹은 구성성분은 물질의 채취 시기나 지역에 따른 차이도 보고된 바, 이러한 천연약재를 과학적으로 인정을 받기 위하여 물질의 표준화가 선행되어야 할 것이다. 겨우살이 역시 주성분이 되는 렉틴이 숙주나무의 종류, 채취시기 및 추출방법에 따라 그 함량 차이가 있는 것으로 보고되어 있고, 이에 겨우살이 추출물의 임상적 이용에 관하여 일부 다른 문헌에서는 그 적용에 대해 일부 의문을 제기하기도 하였다(Hajto 등 2011).

물질의 표준화 차원에서 가장 높은 활성을 나타내는 지표 물질의 선정과 분리 및 그의 정량법 개발은 가장 우선적으로 고려되어야 할 사항으로 사료된다(Bocci V 1993). 한국에 비하여 먼저 겨우살이에 대한 과학적 연구를 시도하고, 이미 주사제 및 식품으로 응용하고 있는 유럽에서 겨우살이의 렉틴 성분을 항암 및 면역자극 활성을 가지는 가장 중요한 활성성분으로 인정하였고, 렉틴의 당 특이성에 따라 mistletoe lectin (ML)-I, ML-II, 그리고 ML-III로 크게 분류하고 있다(Parhami-Seren 등 1999). 또 렉틴은 A- 및 B-chain의 두 가지 단백질이 서로 공유 결합된 형태를 가지는데, 구성하는 각 chain의 분자량의 차이도 보고되고 있다(Franz 등 1981). 유럽산 겨우살이의 렉틴 성분은 주로 galactose에 특이성을 갖는 ML-I이 가장 풍부하며, 상대적으로 galactose와 galactosamine에 특이성을 갖는 ML-II 및 galactosamine에 특이성을 갖는 ML-III는 매우 소량 존재하는 것으로 보고되었다(Gabius 등 1992). 따라서 유럽에서 렉틴 성분에 대한 연구는 주로 ML-I에 대한 연구가 주류를 이루고 있다. 또한 유럽산 겨우살이의 경우 숙주의 종류별, 계절별로 렉틴 함량을 비교하였으며, 가장 효율성이 높은 숙주나무-유래 겨우살이와 시기를 선택하여 산업적으로 이용하고 있다(Jaggy 등 1995; Kirsch A 2007).

한편, 국내산 겨우살이의 렉틴 성분에 대해서는 최근에 적극적인 연구가 진행되고 있는데, 흥미로운 것은 유럽산 렉틴의 경우, 대부분 ML-I 형태인 것에 반하여 한국산은 ML-I 뿐만 아니라 ML-II 형태의 렉틴도 풍부하게 존재하는 것으로 보고되었으며, galactose-specific 렉틴인 ML-I 형태의 렉틴도 유럽산의 ML-I과 비교하여 단백질을 구성하는 아미노산의 배열(sequencing)에 차이가 있어 유럽산 ML-I의 iso-form임을 보고한 결과도 있다(Kang 등 2007). 이러한 결과는 한국산 겨우살이의 렉틴은 유럽산 렉틴과 차이를 가진다는 것을 의미하며, 이는 한국산 겨우살이를 이용하여 유럽산과 차별화된 약제 혹은 식품으로 개발 가능성이 있음을 시사하는 결과를 보여준 것이다. 그러나 아직 한국산 겨우살이의 숙주나무의 종류별 및 채취시기별 렉틴 함량의 변화에 대한 보고는 없어, 국내 겨우살이에서 가장 유용한 활성을 보이는 제품의 개발을 위한 숙주별 및 채취시기에 대한 기본 연구가 미비한 실정

이다(Choi OB 2009).

따라서 본 연구에서는 한국산 겨우살이의 산업적 이용에 대한 기초자료를 제공하고자 렉틴 함량이 숙주나무의 종류별로 어떠한 변화를 나타나는지를 sandwich ELISA 법으로 조사하였으며, 활성에 렉틴 이외에 다른 성분도 관여한다는 가능성이 있는 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 겨우살이 추출물의 제조 및 렉틴의 분리

본 연구에 사용한 겨우살이는 강원도 양양에서 서식하는 참나무(*Quercus aliena*), 돌배나무(*Pyrus pyrifolia*), 밤나무(*Castanea crenata*), 모과나무(*Chaenomeles sinensis*) 및 가중나무(*Ailanthus altissima*)를 숙주로 하여 자라며, 1월에 수집하였다. 실험에 사용한 겨우살이는 1년 및 2년생으로서 가지의 끝에서부터 두 마디까지의 잎을 사용하였다. 각각의 겨우살이 10 g에 100 mL의 증류수를 첨가하고, 믹서를 이용하여 분쇄 후, 4°C에서 16시간 교반하면서 추출하였다. 각각의 겨우살이 추출물은 원심분리(1,800 × g, 30 min: Eppendorf, NY, USA)를 통하여 상등액만을 회수한 다음, 총 단백질 함량 분석(Bio-Rad Lab. CA, USA)을 통해 100 mg/mL의 농도로 조절하였다. 겨우살이로부터 렉틴의 분리는 기 발표된 hydrolyzed Sepharose 4B column을 이용하여 분리하였다(Kang 등 2007).

2. 렉틴에 의한 적혈구 응집반응 및 당에 의한 억제 효과

렉틴 활성을 확인하기 위하여 적혈구 응집반응(hemagglutination)을 실시하였다(Kang 등 2007). 분리한 각각의 한국산 겨우살이 렉틴(Korean mistletoe lectin, KML)은 원액으로부터 2배 희석법으로 농도를 조정하여 96 well round bottom plate에 분주하였으며, human B type의 적혈구(5×10^6 cells)를 PBS에 현탁하여 각 well에 첨가하고, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 렉틴 활성을 나타내는 KML의 최대 희석비는 4배였고, 이 조건에서 galactose, N-acetyl galactosamine, lactose, glucose, mannose를 100 μM부터 2배 희석법으로 농도를 조정하여 첨가한 후 적혈구 현탁액을 첨가하였다. 렉틴의 당 특이성은 배양 1시간 후 적혈구의 응집반응을 억제하는 활성을 가지는 당이 무엇인지를 관찰하였으며, 응집반응을 억제하는 각 당의 최소농도를 측정하였다.

3. 단일클론 항체를 이용한 렉틴 제거 분획 제조

한국산 겨우살이 렉틴에 대한 단일클론항체인 9H7-D10 및 8B11-2C5는 기존에 발표한 논문에 의해 제작된 샘플을 사용하였다(Yoon 등 2001). 렉틴이 제거된 한국산 겨우살이 추출물(lectin-free-KM-110; LFKM-110)을 제조하기 위하여 KML과 특이적으로 반응하는 9H7-D10을 중화항체로 사용하였다.

한국산 참나무 유래 겨우살이 추출물(KM-110)에 9H7-D10을 처리하여 KML과 결합시킨 뒤 이를 immuno-affinity chromatography를 통과시킴으로 렉틴을 제거하였다. 동일한 시료를 최소 5회 칼럼에 적용하여 렉틴을 제거시켰다.

4. Sandwich ELISA

숙주나무의 종류에 따른 겨우살이로부터 렉틴 성분인 KML의 분석은 기존에 발표한 Sandwich ELISA법을 일부 수정하여 실시하였다(Yoon 등 2001). 약술하면 KML에 대한 단일클론 항체(5E10, IgM)를 ELISA plate의 각 well에 분주하고, 12시간 동안 coating 하였다. 연속하여 PBS-tween 용액을 이용하여 세척, 1% skim milk 용액을 이용한 blocking, 세척 단계를 거친 후, 표준물질로 2 µg/mL부터 2배 희석법으로 15.6 ng/mL까지 희석된 KML을 첨가하고, 2시간 상온에서 반응시켰다. 세척 후, horse-radish peroxidase(HRP)가 접합된 9H7-D10 IgG 항체 희석용액(×8,000)을 첨가하여 2시간 더 반응시켰다. 세척 후 HRP의 발색을 위한 기질로 TMB 용액(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 사용하였다. 효소반응은 2N H₂SO₄ 용액을 통해 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정 후 KML에 대한 표준곡선을 완성하였고, 각 겨우살이 추출물의 KML 함량은 이 표준곡선에 대입하여 정량하였다.

5. 세포의 배양 및 세포독성 조사

마우스 림프종 세포주인 L5178Y-ML25와 마우스 유래 대식세포 RAW 264.7의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지(Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였으며, 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양하였다. 시료의 종양세포에 대한 세포 독성 조사를 위하여 5×10³/well의 밀도로 각 종양 세포를 96-well plate의 각 well에 plating한 후, 여러 농도의 시료를 첨가한 후 3일간 배양하였다. 시료의 세포 독성 효과는 WST를 이용하는 cell counting kit(EZ-Cytox, Daeil Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도(Molecular Device Co., Union City, USA)를 측정하여 계산하였다.

6. 대식세포 자극 및 Cytokine 분석

시료 자극에 의한 cytokine의 생산을 보기 위한 RAW 264.7 세포는 24 well culture plate에 1.5×10⁶ cells/mL의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 실험조건에 따라 다양한 농도의 겨우살이 시료를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양완료 후, 배양 상등액에 유도 분비된 TNF-α 및 IL-6의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Pharmingen, CA, USA)를 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 한국산 겨우살이 렉틴의 당 특이성

겨우살이 렉틴은 암세포에 대한 높은 세포독성 및 면역증강 활성으로 겨우살이에서 활성을 가지는 지표물질로 인정되고 있다. 암세포에 대한 세포독성의 측면에서 유럽산 겨우살이 렉틴(European mistletoe lectin, EML)과 한국산 겨우살이 렉틴(Korean mistletoe lectin, KML)은 세포독성 차이가 있어 KML의 경우가 더 높은 세포독성을 가진다(Yoon 등 2003).

본 연구에서는 Franz 등(1981) 및 Gabius 등(1992)의 방법을 참고하여 참나무를 숙주로 자라는 겨우살이 추출물(KM-110)로부터 hydrolyzed Sepharose-4B column을 이용하여 Korean mistletoe lectin(KML)을 분리하였고, 분리된 KML의 당 특이성을 조사하기 위하여 Kang 등(2007)의 방법을 응용한 적혈구 응집반응에 영향을 주는 특정 당에 대한 검토를 실시하였다. 먼저 적혈구 응집반응을 억제하는 여러 가지 당의 최소 농도를 조사한 결과, N-acetylgalactosamine(GalNAc)은 6.3 mM, galactose의 경우 12.5 mM로 나타났다(Table 1). 또한 lactose의 경우도 galactose와 유사한 농도에서 응집반응이 억제되었으나, glucose에 의해서는 억제되지 않은 결과를 보였다. 따라서 lactose에 의한 억제 반응은 주로 galactose에 의한 현상으로 사료되었다(Kang 등 2007).

이러한 결과를 확실히 증명하기 위하여 L5178Y-ML25 lymphoma에 대해 세포증식을 90% 이상 억제하는 농도의 KML(60 ng/mL) 및 EML(2,000 ng/mL)을 먼저 GalNAc과 galactose에 각각 반응시킨 후, L5178Y-ML25 세포독성에 미치는 효과(독성 억제능)를 검토하였다. 먼저 KML의 경우에는 두 종류의 당류에서 모두 농도 의존적인 독성억제 효과를 보였으나, GalNAc를 처리한 경우에서 galactose 보다 높은 독성억제 효과를 보여 Table 1에서 GalNAc이 저농도에서 적혈구 응집반응을 나타낸 결과와 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 한편, EML은 galactose에 대한 농도 의존적인 독성억제 효과만

Table 1. Inhibition of KML-mediated hemagglutination by sugars

Sugars	Minimum concentration (mM)
Galactose	12.5
N-Acetylgalactosamine	6.3
Lactose	12.5
Glucose	>200
Mannose	>200

Inhibition of hemagglutination of the lectin was tested by adding different kinds of sugars in various concentrations to determine specificities of the lectin.

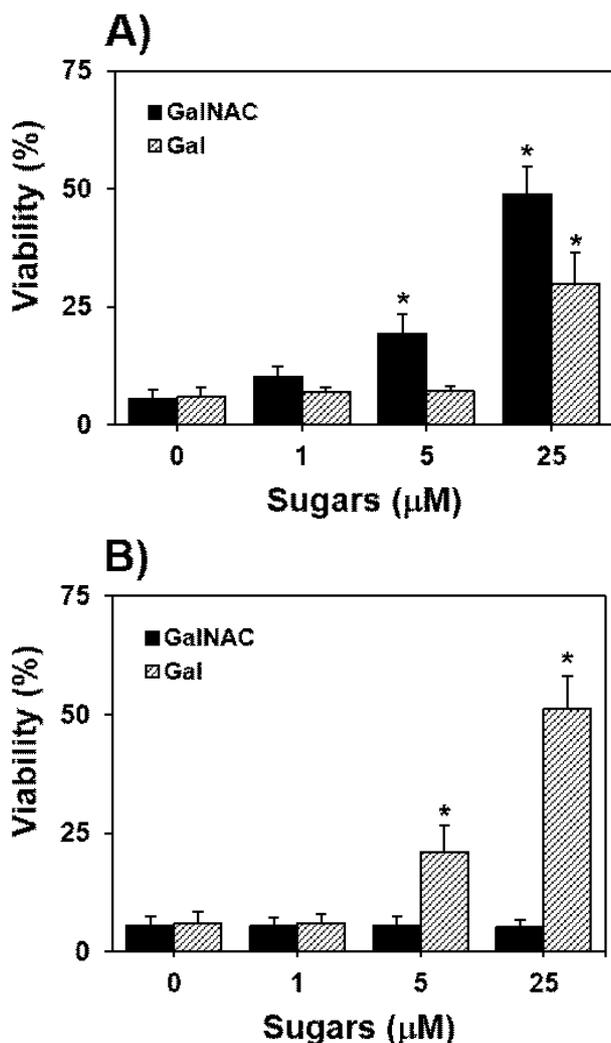


Fig. 1. Neutralizing effect of sugars on lectin-mediated cytotoxicity. A) Viability (%) of Korean mistletoe lectin and B) viability (%) of European mistletoe lectin. GalNAc: N-acetylgalactosamine, Gal: galactose. *Significant difference compared with untreated group by student's *t*-test ($p < 0.01$)

을 나타냈는데, 이는 galactose에 대한 당 특이성만을 나타내는 결과로 EML이 주로 ML-I으로만 구성된다는 보고와 일치하는 것으로 사료되었다. 결론적으로 KML은 GalNAc와 galactose에 대하여 특이성을 가지는 렉틴으로 확인되었으며, 이는 유럽산 겨우살이에 주로 함유되어 있는 galactose에 대한 당 특이성을 가지는 ML-I과는 다른 ML-II의 특성을 가지는 결과를 보였다.

2. 숙주나무에 따른 겨우살이의 총 렉틴 함량 분석

본 연구진은 기존에 한국산 겨우살이 렉틴에 대한 단일클론 항체를 생산 후 그 특성을 조사한 결과, 한국산 겨우살이 렉틴에 특이성을 가지는 9H7-D10 단일클론 항체 및 한국산

과 유럽산 겨우살이 렉틴에 모두 교차반응성을 가지는 특성을 지닌 8B11-2C5 단일클론 항체의 생산을 보고한 바 있다 (Yoon 등 2001). 생산된 각각의 단일클론 항체의 특이성 및 교차 반응성(cross-reactivity)은 Table 2에 나타내었다. KML에 존재하는 총 렉틴 함량을 측정하기 위하여 한국산 겨우살이에 특이성을 가지는 9H7-D10 항체를 이용한 sandwich ELISA법을 실시하였고, 표준곡선을 작성 후, 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴의 양을 측정하였다(Fig. 2).

숙주나무의 종류를 달리하여 채집한 겨우살이의 총 단백질 함량을 측정한 후, 그 속에 포함된 렉틴 함량을 도출한 결과, KML의 함량은 그들이 각각 자라는 숙주나무에 따라 상당히 많은 함량 차이를 보였다(Table 3). 흥미롭게도 숙주나무에 따른 겨우살이의 총 단백질 함량과 KML의 함량은 비례하지 않는 결과를 보였다. 겨우살이 추출물에서 세포독성과 면역자극 활성이 가장 큰 성분은 렉틴 성분이지만, 그 외에도 다양한 단백질 성분을 함유하고 있다고 알려져 있다(Kuttan & Kuttan 1992; Tabiasco 등 2002; Hajto 등 2011). 비록 현재까지의 결과로서 숙주나무에 따른 KML의 함량 차이가 나는 것을 정확하게 설명할 수는 없지만, 이미 항암 주사제로 사용하는 유럽산 겨우살이 추출물의 경우, 다양한 숙주나무로부터 유

Table 2. Characterization of monoclonal antibodies against lectin

Clones	Cross-reactivity (OD value)		Subisotype
	KML	EML	
Poly Ab	1.524	0.660	-
9H7-D10	1.196	0.004	IgG1
8B11-2C5	0.775	0.496	IgG1

Cross-reactivity of KML and EML was expressed by optical density in ELISA. Poly Ab is a polyclonal antibody of Korean mistletoe lectin. 9H7-D10 and 8B11-2C5 are monoclonal antibodies of Korean mistletoe lectin. KML: Korean mistletoe lectin, ELM: European mistletoe lectin.

Table 3. Concentration of KML in crude extracts of mistletoes originated from different host trees

Host trees (100 mg/mL)	Total proteins (μg/mL)	KML (μg/mL)	KML/Total Proteins (%)
<i>Quercus aliena</i>	1,864	65.2±11.2	3.5±0.6
<i>Pyrus pyrifolia</i>	748	94.2±7.5	12.6±1.0
<i>Castanea crenata</i>	1,471	460.1±22.1	31.3±1.5
<i>Chaenomeles sinensis</i>	1,755	112.3±10.5	6.4±0.6
<i>Ailanthus altissima</i>	935	88.8±8.4	9.5±0.9

Concentration of mistletoe extract from each host tree is 100 mg/mL. KML: Korean mistletoe lectin.

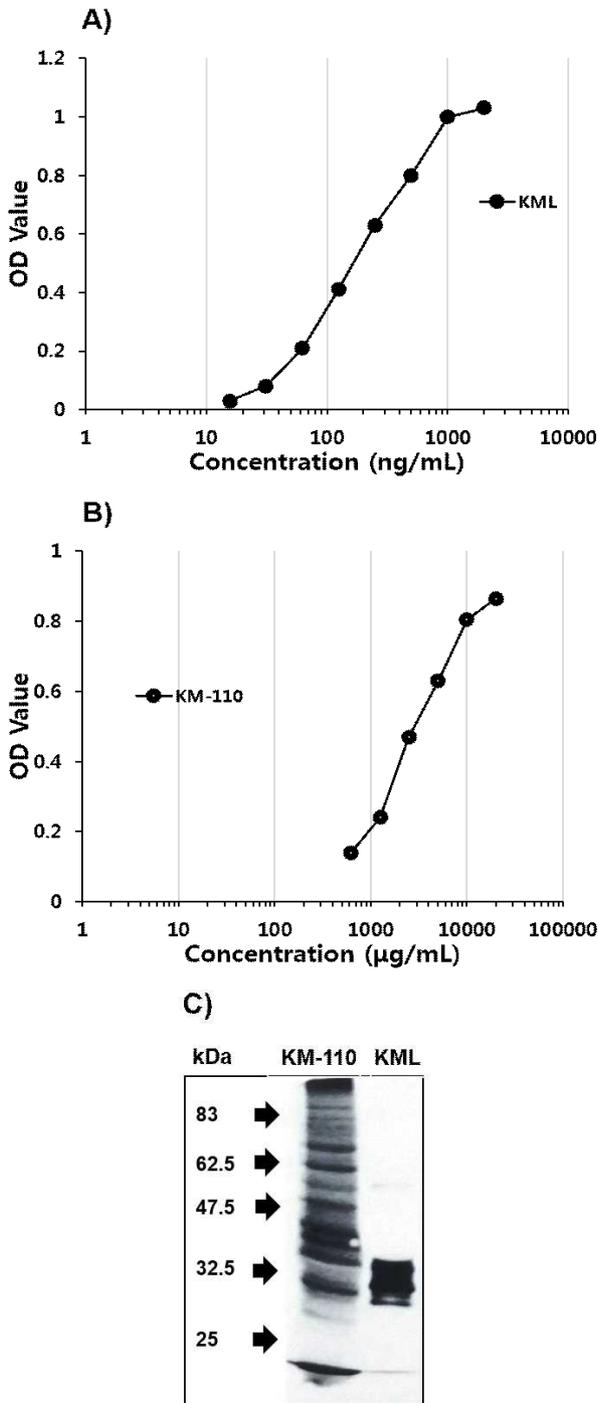


Fig. 2. Determination of lectin by ELISA. A) Standard curve of KML, B) standard curve of KM-110 and C) SDS-PAGE analysis of KM and KML. KM: Korean mistletoe extract, KML: Korean mistletoe lectin.

래된 겨우살이 추출물을 사용하고, 그 적용은 암과 암의 진행 상태에 따라 선택할 수 있게 제조된 것은 숙주나무별 겨우살이 추출물에 함유된 렉틴의 양과 관련이 있는 것으로 추정되

고 있다(Jaggy 등 1995; Choi OB 2009). 이러한 사실을 확인하기 위하여 겨우살이 추출물에서 KML을 제거한 후 활성을 검토하였다.

3. 숙주별 겨우살이 추출물의 세포독성 효과

참나무(*Quercus*), 돌배나무(*Pyrus*), 밤나무(*Castanea*), 모과나무(*Chaen*) 및 가중나무(*Ailanthus*)를 숙주로 자라는 겨우살이 추출물의 세포독성 효과를 조사하였다. 신선한 각 숙주별 겨우살이 잎을 세척하고, 물기를 제거 후 50 g의 잎을 50 mL 증류수에 이용하여 추출하였다. 다양한 농도로 희석된 각각의 추출물을 L5178Y-ML25 lymphoma 세포주에 적용 후 세포

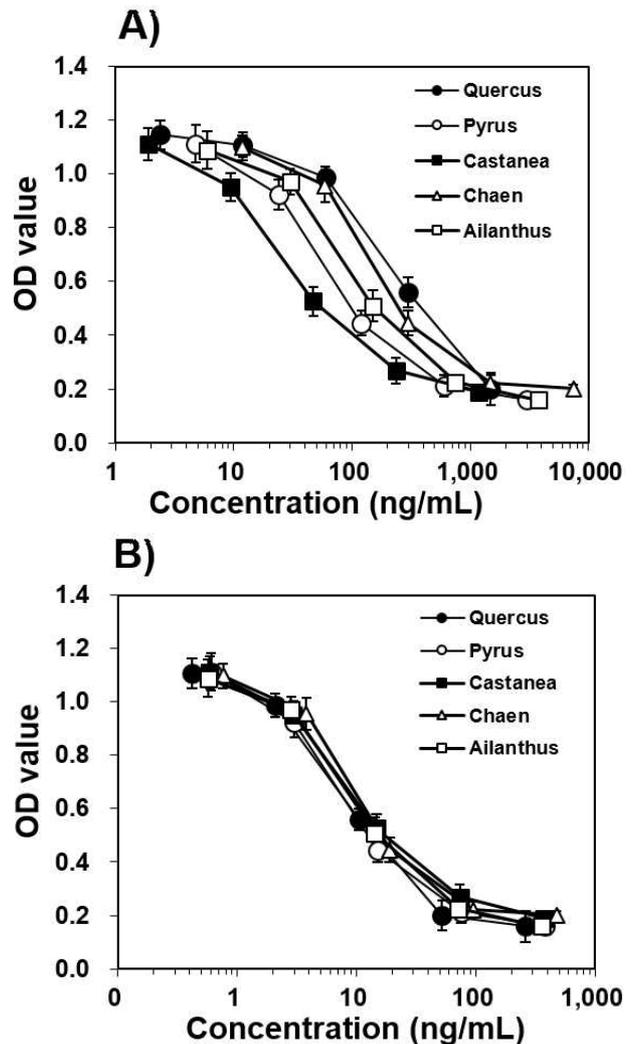


Fig. 3. Cytotoxic effect of crude extracts of mistletoes originated from different host trees on L5178Y-ML25 lymphoma cell line. A) The results calculated against the total protein and B) the results calculated against the concentration of KML. KML: Korean mistletoe lectin.

독성 효과를 조사하였다. 그 결과, 세포독성 효과는 각 추출물의 단백질 함량 의존적인 세포독성 효과를 나타냈으며(Fig. 3A), 추출물의 KML의 농도로 환산하여 정리한 결과(Fig. 3B), 총 단백질 함량으로 계산한 결과와 유사한 세포독성 효과를 보여 겨우살이 추출물에서 세포독성을 가지는 성분은 주로 KML일 것으로 사료되었다.

4. 렉틴이 제거된 겨우살이의 세포독성 및 항체에 의한 중화 효과

렉틴이 제거된 겨우살이 추출물을 준비하기 위하여 한국산 참나무 유래 겨우살이 추출물(KM-110)에 KML에 특이적인 항체인 9H7-D10을 처리한 후, immuno-affinity chromatography를 통해 렉틴을 제거하였다. 1회의 분리만으로는 추출물로부터 렉틴을 완전히 제거할 수 없었기에 동일한 시료를 5회 affinity column에 적용하였다. KM-110로부터 렉틴을 제거시킨 분획(LFKM-110)에서 렉틴의 함량은 1 ng KML equivalent/mL 이하의 농도로 나타났다(data not shown). 암세포에 대하여 세포독성 효과를 나타내는 KM-110에서 KML는 중요한 세포독성 성분으로 알려져 있다(Jaggy 등 1995; Beuth J 1997). 따라서 KM-110과 LFKM-110의 세포독성을 비교하였다. 암세포주인 M5178Y-KL25 lymphoma에 대한 세포독성 실험 결과, 31.25 µg/mL의 농도에서 KM-110과 LFKM-110은 대조군에 비해 생존율이 각각 44.5% 및 85.1%인 결과를 나타내어, LFKM-110이 KM-110에 비하여 약 2배 정도 낮은 세포독성 효과를 보였다(Fig. 4A).

KM-110의 세포독성 효과가 렉틴 외에 다른 성분이 관여함을 확인하기 위하여 L5178Y-ML25 세포주에 대한 KML, LFKM-110 및 KM-110의 세포독성 및 세포독성 중화 효과를 두 가지 단일클론 항체인 9H7-D10 및 8B11-2C5 처리를 이용하여 비교하였다. Fig. 4B에 제시한 바와 같이 KML의 세포독성 효과는 9H7-D10 및 8B11-2C5 항체에 의하여 억제되어, 세포 생존율이 각각 53.6% 및 50.6%로 증가하였고, 두 가지 항체를 동시처리할 경우 거의 90%의 세포가 생존하는 결과를 나타냈다. 따라서 9H7-D10 및 8B11-2C5 항체는 KML의 세포독성 효과를 중화하는데 같이 관여하는 결과로 사료되었다. 한편, 참나무 유래 겨우살이 KM-110의 세포독성 효과도 KML의 효과와 유사한 경향을 보여 9H7-D10 및 8B11-2C5 항체 중화에 의해 각각 일정 부분 억제되었으며, 두 가지 항체를 동시에 처리한 결과 더 높은 중화효과를 보이기는 했으나, KML의 경우에 비하여 낮은 중화효과(약 70%)를 나타냈다. 또한 KM-110으로부터 렉틴이 제거된 LFKM-110의 경우, 9H7-D10과 반응하는 KML이 제거되었기에 9H7-D10 항체에 의한 세포독성 중화효과는 나타나지 않았지만, 8B11-2C5 항체에 의한 세포독성 중화 효과는 나타났다. 그리고 동시에 두 항체를

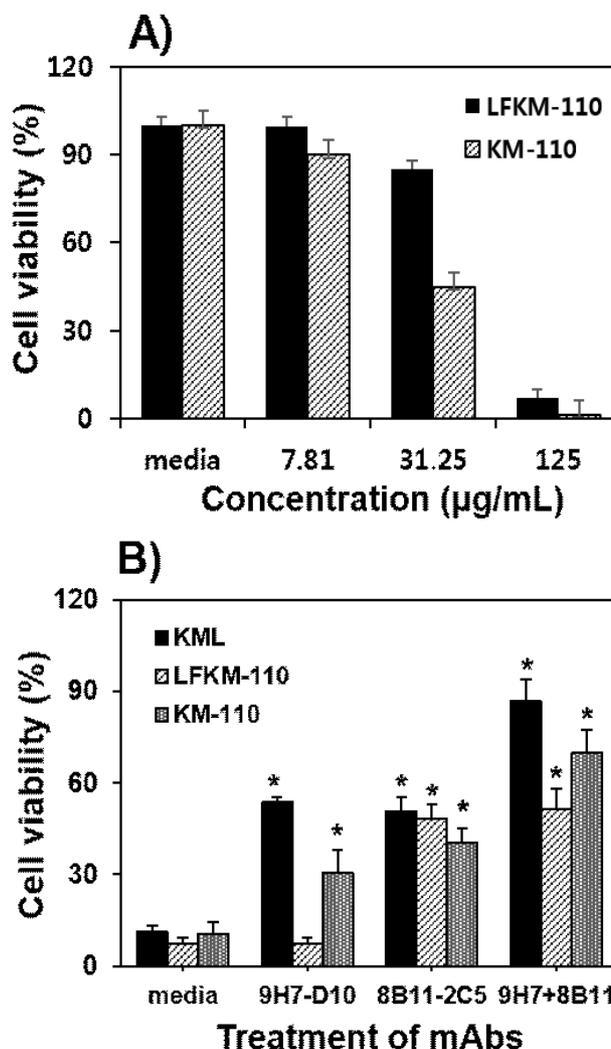


Fig. 4. Cytotoxic effect (A) and inhibitory effect of cytotoxicity followed by neutralization (B) of LFKM-110 and KM-110 on L5178Y-ML25 lymphoma cell line. KML: Korean mistletoe lectin, KM-110: crude extract of mistletoe originated from *Quercus aliena*, LFKM-110: lectin free-crude extract of mistletoe originated from *Quercus aliena* followed by neutralization using 9H7-D10 monoclonal antibody, 9H7-D10: monoclonal antibody that specifically bind to the Korean mistletoe lectin, 8B11-2C5: monoclonal antibody that specifically bind to both Korean and European mistletoe lectin. *Significant difference compared with untreated group by student's t-test ($p < 0.01$).

같이 처리한 경우도 8B11-2C5 항체 단독의 처리와 유사한 세포독성 중화효과를 보였다. 8B11-2C5 항체는 ML-I type 렉틴과 ML-II type 렉틴 모두 중화작용을 하는 항체이기 때문에 (Yoon 등 2001), KML에는 8B11-2C5와 특이하게 반응하는 유럽산의 ML-I과 동일한 특성을 가지는 렉틴의 존재 가능성과 함께 세포독성 효과로는 9H7-D10이 반응하는 렉틴 성분인

KML이 주로 관여하는 것으로 사료되었다(Yoon 등 2001; Kang 등 2007).

결론적으로 KM-110과 KML 단독의 세포독성 효과는 유사하게 높게 나타났으나, 두 가지 항체로 동시에 중화시켰을 경우 KM-110이 KML에 비하여 낮은 세포독성 중화 효과를 보인 것은 KM-110 내에 다른 독성 성분이 관여하고 있다는 것을 시사하였다(Choi OB 2009; Hajto 등 2011). 실제로 유럽산 겨우살이 연구에서 세포독성 및 면역자극 활성화에 관여하는 성분으로 렉틴 성분 외에도 분자량 5 kDa 정도의 viscotoxin (Tabiasco 등 2002)이나 polypeptides(Kuttan & Kuttan 1992)와 다당체 성분(Stein 등 1999)에 대하여 보고한 바가 있다. 따라서 KM-110에서 세포독성을 가지는 성분으로 KML 외에 다른 활성성분에 대한 자세한 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

5. KM-110 및 LFKM-110의 대식세포 자극활성

동일한 농도(10 µg/mL)의 KM-110 및 LFKM-110 대식세포 자극에 의한 cytokine 생산능력을 검토하였다. Fig. 5의 결과에 제시한 바와 같이 각각의 시료는 대식세포를 직접 자극하여 TNF-α 및 IL-6와 같은 cytokine의 생산에서 유효한 활성을 보였으며, 특히 렉틴 성분이 제거되어 세포독성 효과가 낮은 LFKM-110의 경우가 더 우수한 cytokine 생산 활성을 보였다.

이 결과는 겨우살이 추출물에서 면역세포를 자극하는 성분은 KML과 같은 렉틴 성분 외에도 다른 성분이 대식세포를

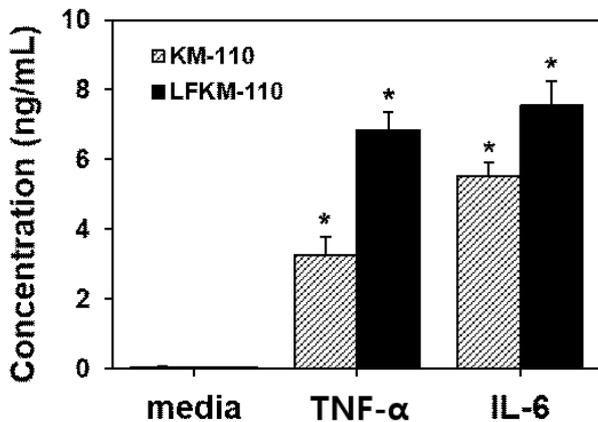


Fig. 5. Effect of KM-110 and LFKM-110 on the production of TNF-α and IL-7 by RAW 264.7 murine macrophage cell line. KM-110: crude extract of mistletoe originated from *Quercus aliena*. LFKM-110: lectin free-crude extract of mistletoe originated from *Quercus aliena* followed by neutralization using 9H7-D10 monoclonal antibody, Media: negative control treated with only media, TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-6: interleukin-6. * Significant difference compared with untreated group by student's *t*-test ($p < 0.01$).

자극하는 활성이 있음을 강하게 시사하였다(Stein 등 1999). 유럽산 겨우살이 활성과 관련된 기존의 보고에서 렉틴 외에 면역세포를 자극하는 후보성분으로 다당 성분의 면역자극 활성화(Choi OB 2009)도 보고된 바 있기에 현재 한국산 겨우살이 추출물에서 분리한 다당 성분의 면역세포에 미치는 효과를 검토 중에 있다.

요 약

겨우살이는 전통적으로 항암활성이 있는 약용식물의 하나로 알려져 왔고, 렉틴은 세포독성 및 면역자극 자극 활성을 가지는 대표성분으로 인정되고 있다. 한국산 겨우살이에 함유되는 렉틴은 유럽산의 그것과는 달리 galactose와 N-acetyl-galactosamine(GalNAc) 특이성을 동시에 가지는 렉틴 성분인 KML인 것으로 나타났다. Sandwich ELISA법을 이용하여 각기 다른 종류의 숙주나무에서 유래된 5종의 겨우살이로부터 렉틴 함량을 비교한 결과, 숙주나무별 차이가 인정되어 밤나무 겨우살이는 참나무 겨우살이에 비하여 약 10배 많은 렉틴을 함유하고 있었다. L5178Y-ML25 lymphoma 세포에 약 90%의 세포독성을 나타내는 농도의 KML과 한국산 참나무 유래 겨우살이 추출물인 KM-100에 두 종류의 단일클론 항체(9H7-10 and 8B11-2C5)를 동시처리한 후 세포독성 중화효과를 조사한 결과, KML의 경우 약 10%, KM-110의 경우 약 30%의 세포독성을 보였다. 이러한 결과는 겨우살이에서 렉틴 외에도 세포독성을 가지는 다른 성분이 존재할 것으로 사료되었다. RAW 264.7 대식 세포주에 KM-110과 KM-110으로부터 렉틴이 제거된 분획인 LFKM-110을 자극시킨 결과, LFKM-110에서 TNF-α 및 IL-6와 같은 cytokine의 생산을 증진시키는 결과를 보였다. 따라서 KM-110에서 면역 세포를 자극하는 다른 성분의 존재하고 있음을 강하게 제시되었다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다. [SA114125, 국내산 자생식물을 이용한 체력증진용 기능성 제품 개발 및 산업화, 한국산 겨우살이를 이용한 기능성 음료 개발]

References

- Beuth J. 1997. Clinical relevance of immunoreactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* 8(Supple 1):S53-S55
- 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

- Choi OB. 2009. The importance of clinical mistletoe cancer therapy and Korean mistletoe pharmacopuncture preparation development and application possibility for oriental medicine. *J Pharmacopuncture* 12:77-89
- Franz H, Ziska P, Kindt A. 1981. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem J* 195:481-484
- Gabius S, Joshi SS, Kayser K, Gabius H. 1992. The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier. *Int J Oncol* 1:705-708
- Hajto T, Fodor K, Perjesi P, Nemeth P. 2011. Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* 8:1-6
- Jaggy C, Musielski H, Urech K, Schaller G. 1995. Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations. *Arzneimittelforschung* 45:905-909
- Kang SJ, Chung SK. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) extracts against food poisoning bacteria. *Korean J Food Preserv* 19:919-924
- Kang TB, Song SK, Yoon TJ, Yoo YC, Lee KH, Her E, Kim JB. 2007. Isolation and characterization of two Korean mistletoe lectins. *J Biochem Mol Biol* 40:959-965
- Kirsch A. 2007. Successful treatment of metastatic malignant melanoma with *Viscum album* extract (Iscador M). *J Altern Complement Med* 13:443-445
- Kuttan G, Kuttan R. 1992. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract (NSC 635 089). *Immunol Invest* 21:285-296
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Yu CY, Roh SK, Kim JD, Lee HY, Lee JH. 2003. Growth enhancement and cytotoxicity of Korean mistletoe fractions on human cell lines. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11:62-70
- Parhami-Seren B, Bell C, Margolies MN, Hauptert GT Jr. 1999. Monoclonal antibodies that distinguish between two related digitalis glycosides, ouabain and digoxin. *J Immunol* 163:4360-4366
- Stein GM, Edlund U, Pfuller U, Bussing A, Schietzel M. 1999. Influence of polysaccharides from *Viscum album* L. on human lymphocytes, monocytes and granulocytes *in vitro*. *Anticancer Res* 19:3907-3914
- Stein GM, Schietzel M, Bussing A. 1998. Mistletoe in immunology and the clinic (short review). *Anticancer Res* 18:3247-3249
- Tabiasco J, Pont F, Fournie JJ, Vercellone A. 2002. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem* 269:2591-2600
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Kim SH, Kim KS, Kim JB. 2001. Production of monoclonal antibodies to Korean mistletoe lectin (KML-C) and their characterization. *J Pharm Soc Korea Yakhak Hoeji* 45:180-189
- 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* 26:861-867

Received 6 November, 2015

Revised 17 November, 2015

Accepted 28 December, 2015