

## 넓적사슴벌레(*Serrognathus platymelus castanicolor*) 유충으로부터 분리한 렉틴의 사이토카인 발현

조수현 · 김세진 · 정시련<sup>1</sup> · 전경희\*  
영남대학교 이과대학, <sup>1</sup>영남대학교 약학대학

## Effect of Lectin Isolated from *Serrognathus platymelus castanicolor* Larvae on the Various Cytokine Expressions

Su Hyun Jo, Se Jin Kim and See Ryun Chung<sup>1</sup>, and Kyung Hee Jeune\*

College of Sciences and <sup>1</sup>College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Abstract** – A lectin was purified from *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae and named as SPL. The purification was carried out by ion-exchange chromatography on DEAE Sephadex A-50 and gel filtration chromatography on Sephadex G-200. The purity of the protein was verified by polyacrylamide gel electrophoresis and the purified lectin agglutinated erythrocytes of rabbit and human A, B, O, AB. SPL was tested its ability to enhance the expressions of cytokines, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from healthy donors. mRNA analyses were performed by RT-PCR at the moment of 1, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h after stimulation of PBMC with purified SPL. The patterns of IL-2 band were slightly expressed from 24 h and the strongest band was appeared at 96 h. The expressions of IL-1 $\alpha$  and IL-6 mRNA were strong from 1 to 8 h and those of TNF $\alpha$  were from 48 to 96 h. The mRNA encoding IFN $\gamma$  were not detected. The addition of SPL for macrophage cultures induced production of nitric oxide (NO) by cells in a dose-dependent manner. NO release was partially inhibited by TNF $\alpha$  antibodies. These results suggest that SPL has the ability to enhance cytokine expressions in PBMC and to induce the NO release by TNF $\alpha$  in macrophage cultures from PBMC cultures.

**Key words** – lectin, *Serrognathus platymelus castanicolor*, cytokine, immunomodulator, nitric oxide

렉틴은 당과 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 두 개 이상의 당 결합부위를 가진다는 성질이 있다는 사실이 밝혀지며 세포표면의 당화합물을 중심으로 하는 막의 구조 연구 등에 기여하였고, 또한 혈액형의 결정, 세포 분리, 미생물의 확인 및 당화합물의 분리에 이용되었다. 그 밖에 약물수송체, 면역질환 및 암 억제효과 등 임상적 응용에도 많이 이용되고 있어 질병의 진단 및 치료에도 그 역할이 기대되고 있다.<sup>1-3)</sup> 최근 여러 가지 질병에 대응하는 하나의 방편으로서 림프구를 자극, 분열시키는 면역조정제나 항종양물질을 천연물 자원으로부터 개발하려는 노력이 대두되고 있는 바, 이 분야에서 렉틴의 연구가 주목된다. 렉틴의 면역기능 조절효과에 대해서는 세포의 성장을 조절하고 각종 면역 활성 물질을 분비하는 대식세포의 활성화, 림프구에 대한 마이트젠으로서의 역할, 종양세포를 용해시키는 산화질소(nitric

oxide, NO) 생성의 유도 인자로서의 작용, 면역감염 반응을 중재하고 세포분열의 조절자로 작용하는 사이토카인 방출 유도 등이 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup>

사이토카인은 세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절함으로써 정상 세포의 성장 및 발육에 관여할 뿐만 아니라 여러 질병의 원인물질로 작용하기도하며 질병의 발병 및 치유에 관여한다고 알려져 있다. 이들 중에서 특히 IFN $\gamma$ 와 TNF $\alpha$ 는 산화질소의 생성을 유도하는 것으로 보고되고 있다. 산화질소는 nitric oxide synthases(NOS) 같은 효소에 의해 면역계 내에서 L-arginine으로부터 면역계에서 생성 될 수 있는 물질의 하나로서 혈관 긴장의 조절, 혈소판 기능, 신경전달 및 숙주 방어기전에 중요한 역할을 하고 있다. 활성화된 대식세포에 의해 합성되는 NO는 면역계를 활성화하고 항바이러스 및 항암 활성을 발휘하는 중요한 신호물질 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>6-10)</sup>

본 연구에서는 딱정벌레목에 속하는 넓적사슴벌레 3령 유

\*교신저자(E-mail) : khjeune@ynu.ac.kr  
(FAX) : 053-810-4618

충으로부터 렉틴을 분리하여 사이토카인의 생성 양상을 조사하고, 이 렉틴의 면역조절 효과물질 및 항종양제로서의 이용 가능성을 연구 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 딱정벌레목, 사슴벌레과에 속하는 넓적사슴벌레(*serrognathus platymelus castanicolor*) 유충은 강원대학교 k-insect에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

**렉틴의 분리 및 정제** - 넓적사슴벌레 유충에서 분리한 렉틴(이하 SPL)은 이미 보고한 전보<sup>4)</sup>와 동일한 방법으로 조직을 파쇄하고 ammonium sulfate로 crude 렉틴(粗 SPL)을 추출한 후, DEAE Sephadex A-50 column으로 정제하였다. 단백질 성분은 NaCl 농도를 0.05 M에서 0.15 M까지 salt gradient법에 따라 유출시켰고 얻어진 단백질 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하고 적혈구 응집력 테스트로 렉틴 활성 시험을 하였다. 응집력이 가장 강한 0.05 M의 분획을 농축한 뒤 다시 Sephadex G-200 column에 의해서 한 단계 더 정제하였고 각 분획의 렉틴 활성을 확인하여 그 중 활성도가 가장 높은 0.1 M NaCl 분획을 SPL로 취하여 실험에 이용하였다.

**적혈구 응집력 시험** - 전보<sup>4)</sup>와 동일한 방법으로 실시하였으며 U-shape microtiter plate (Falcon) 각각의 well에 생리식염수 50  $\mu$ l를 넣고, 시료를 첫 번째 well에서부터 연속 2배수 희석한 후 채혈한 혈액을 생리식염수로 세척하여 조제한 3% 적혈구 용액을 가하여 상온에서 1시간 정도 방치시킨 뒤 육안 또는 현미경으로 관찰하였다.

**Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 순도확인** - Discontinuous 완충액을 이용한 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)는 Davis<sup>11)</sup>의 방법을 응용한 것으로 pH 8.3에서 10% bis-polyacrylamide gel(0.8:30)로 실시하였다. 전기영동은 stacking gel 상에서 200 V/150 mA의 전류로 시작하여 resolving gel에 도달시 400 V/150 mA로 실시하였으며, tracking dye는 0.001% bromophenol blue를 이용하였다. 단백질 부위는 0.24% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 고정, 염색시켰다. 탈색은 5% 초산과 95% 에탄올로 2시간씩 탈색시켰다.

**단백질 함량 분석** - Lowry 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 소 혈청 알부민(BSA)을 표준품으로 사용하였으며, 각각의 시료는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검정곡선으로부터 단백질 함량을 분석하였다.

**PBMC의 분리 및 전처리 단계** - Jeune 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 건강한 성인 2인 이상의 혈액을 heparin처리(5~10 IU/ml)하여 채혈한 후, 동량의 생리식염수로 희석하고 이를 Ficoll-paque에 2~3배의 양으로 중첩한 뒤 1,800 rpm으로 30분간 원심분리하였다.

Pasteur pipette을 사용하여 PBMC층을 조심스럽게 걷어내고 생리식염수로 3번 세척한 뒤 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시킨 후 세포수를  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정하였다.

**SPL의 사용 농도 결정 및 시간별 반응** - SPL을 280 nm에서 흡광도 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005 등의 7단계로 준비하여 Jeune 등<sup>4,5)</sup>의 방법에 따라 24 well plate(flat bottom)에  $1 \times 10^6$  cells/ml로 분주되어 있는 PBMC에 농도별로 SPL을 가하여 각각 1시간과 20시간 동안 자극시킨 후, 세포들을 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하여 반응 적정 농도를 결정하였고, 시간별 반응을 위해서는 결정된 농도(O.D.=0.5)로 준비한 SPL을 각 well 당 100  $\mu$ l씩 넣어 반응시키고 37°C에서 CO<sub>2</sub> incubator를 사용하여 배양하였다. 반응 시간을 1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간의 7단계로 설정하고 각 시간별로 세포를 수거하여 RT-PCR과 전기영동을 실시하였다.

**mRNA 분리** - 본 연구진에 의해 이미 보고한 방법<sup>4)</sup>에 따라 시행하였다. 즉, 반응시킨 PBMC를 수거하여 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 가라앉은 세포를 취하고, 0.1% DEPC가 첨가된 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 TRIzol Reagent 1 ml를 넣어 실온에서 5분 동안 정치시켰다. 여기에 chloroform 200  $\mu$ l를 첨가하고 7,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어준 뒤 실온에서 10분간 정치시켰다. 다시 7,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 RNA pellet은 0.1% DEPC가 첨가된 75% EtOH로 세척하여 건조시키고 3차 증류수로 희석시켜 60°C에 10분간 배양한 후 260 nm에서 RNA를 정량하여 RT-PCR의 시료 농도(100  $\mu$ l/ml)로 조절하였다.

**RT-PCR** - 100  $\mu$ l/ml로 조정된 mRNA 1.5  $\mu$ l를 취하여 혼합된 mixture 22.5  $\mu$ l(Nuclease-Free Water 15  $\mu$ l, AMV/Tfl 5  $\times$  Reaction buffer 5  $\mu$ l, dNTP mix 0.5  $\mu$ l, 25 mM MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l, AMV Reverse Transcriptase 0.5  $\mu$ l, Tfl DNA polymerase 0.5  $\mu$ l)에 넣고, primer는 50pM의 upstream, downstream을 각각 0.5  $\mu$ l씩 준비하여 넣었다.

먼저 48°C에서 45분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고 94°C에서 2분 동안 반응시켜 역전사효소를 불활성화시킨 후, 94°C에서 30초 동안 불활성화 단계, 55°C에서 1분 동안 증합효소 연쇄 결합반응 단계, 68°C에서 2분간 핵산 증합 단계를 거치는 반응을 30회 실시하고, 68°C에서 7분간 전체의 핵산 증합 반응을 종결시켰다. RT-PCR대상 사이토카인은 IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  등이고 house keeping gene으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였다. 각 사이토카인과 GAPDH의 primer는 Bank for Cytokine Research(BCR)와 BIONEER에서 합성한 것으로 그 sequence는 다음과 같다.

GAPDH (250 bp)  
 (5')5'-GTC ATG AGC CCT TCC ACG ATG C-3'  
 (3')5'-GAA TCT ACT GGC GTC TTC ACC-3'

(h)IL-1 $\alpha$  (819 bp)  
 (5')5'-ATG GCC AAA GTT CCA GAC ATG-3'  
 (3')5'-GAC CTA CGC CTG GTT TTC CAG TA-3'

(h)IL-2 (395 bp)  
 (5')5'-GCA CCT ACT TCA AGT TCG ACA AAG-3'  
 (3')5'-AGT TAG TGT TGA GAT GAT GCT-3'

(h)IL-6 (648 bp)  
 (5')5'-GCT ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3'  
 (3')5'-CCC ATG CTA CAT TTG CCG AA-3'

(h)IFN $\gamma$  (438 bp)  
 (5')5'-TGT TAC TGC CAG GAC CCA T-3'  
 (3')5'-CCA TTA CTG GGA TGC TCT TCG AC-3'

(h)TNF $\alpha$  (706 bp)  
 (5')5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC C-3'  
 (3')5'-CTC CTC ACA GGG CAA TGA TCC-3'

**전기영동** - 전보<sup>4)</sup>와 같은 방법으로 1.5% agarose gel을 제조하여 100 V에서 30분간 전기영동을 실시하여 관찰하였다. 완충용액은 0.5×TBE(tris-borate EDTA)용액을 사용하였고 marker로는 123 bp DNA ladder를 사용하였으며 전기영동이 끝난 후 발색시약인 EtBr(ethidium bromide, 1  $\mu$ l/ml)로 10분간 염색하여 UV-Illuminator를 이용하여 이미지 분석을 하였다.

**대식세포의 배양 및 시료 처리** - 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받은 대식세포주(RAW 264.7)는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지에 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정하여 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 부착시킨 후 6 well plate 에 배양하였다.

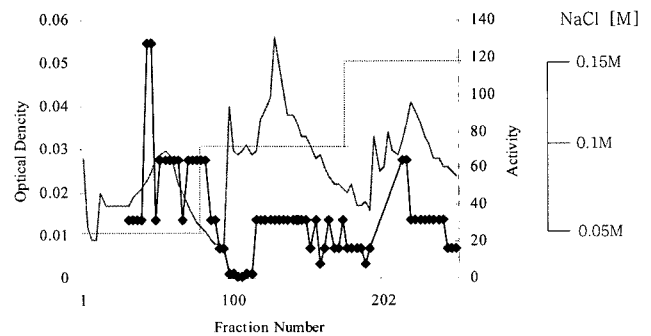
흡광도가 0.5인 SPL로 PBMC를 자극시킨 후 수거하여 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 세포배양액 중 24, 48, 72 시간 자극 된 상층액을 취해 여과시킨 뒤 각각 10, 20, 40, 80  $\mu$ l씩 주입하여 대식세포를 24시간 활성화시켰고 positive control로 내독소(lipopolysaccharide, LPS)를 사용하였으며, 또한 TNF $\alpha$ 에 의한 NO생산의 효과를 알아보기 위해 monoclonal antibody Anti-TNF $\alpha$  (30  $\mu$ l/ml)를 각 well당 20  $\mu$ l씩 주입하였다.<sup>6-10)</sup>

**Griess 시약을 이용한 NO 정량** - NO(nitric oxide)의 생성량은 세포 배양액을 이용하여 NO의 반응 산물인 NO<sub>2</sub>를

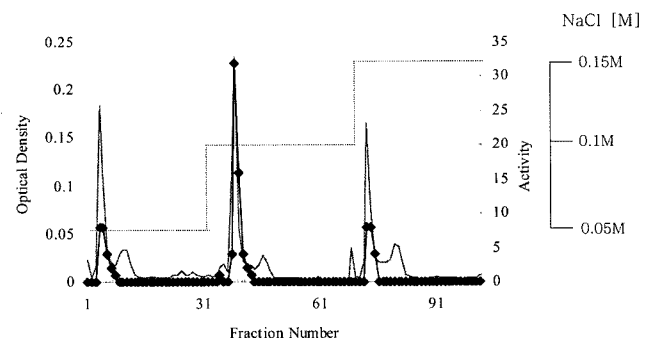
측정하는 방법으로 정량하였다. 배양액 100  $\mu$ l를 동일한 부피의 Griess 시약(0.5% sulfanilyamide, 0.05% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)으로 반응시켜 570 nm에서 plate reader를 사용하여 시료의 흡광도를 측정하였다.<sup>14)</sup> NO<sub>2</sub>의 농도는 NaNO<sub>3</sub>를 이용하여 표준검량곡선을 만들고, 이와 비교하여 NO의 생성량을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**렉틴의 분리 및 정제** - SPL을 DEAE Sephadex A-50 column으로 정제하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻은 바, 25 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 NaCl의 농도를 단계적으로 증가시켜 얻은 분획 중 0.05 M에서 가장 강한 렉틴 활성을 나타내었다. 이를 Sephadex G-200 column으로 더욱 정제하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻은 바, 0.1 M NaCl을 포함한 25 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충액 유출 분획이 가장 강한 활성을 나타내었으므로 이 분획을 넓적사슴벌레 렉틴



**Fig. 1.** Elution profile of *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae crude lectins on DEAE Sephadex A-50 column (2.6×40 cm). 0.05 M fraction showed the strongest agglutinability (absorbance at 280 nm: —, lectin activity: ◆◆, salt gradient: ····, flow rate: 24 ml/hr).



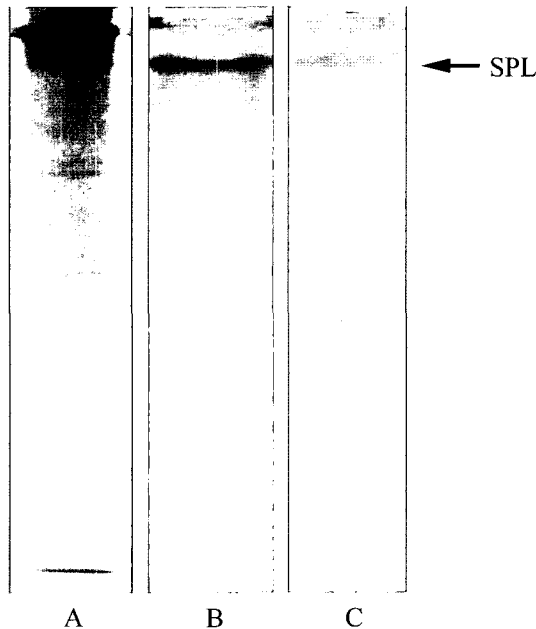
**Fig. 2.** Elution profile of active material eluted from DEAE Sephadex A-50 column with 0.05 M fraction on Sephadex G-200 column (1.6×40 cm). 0.1 M fraction showed the strongest agglutinability (absorbance at 280 nm: —, lectin activity: ◆◆, salt gradient: ····, flow rate: 24 ml/hr).

(SPL)으로 명명하였다.

**적혈구 응집력 시험** - SPL에 대하여 사람 및 토끼 적혈구로 력틴 활성도를 조사한 결과 crude 력틴에서는 모든 혈액에 용혈을 일으켰으나 정제됨에 따라 용혈작용이 없어졌고, 적혈구 중에서 사람 A형에 대해 가장 강한 활

**Table I.** Erythrocytes agglutinations of crude SPL, A-50 fraction and G-200 fraction

Erythrocytes	Cell agglutinating activity [HU]		
	SPL crude	A-50	G-200
Human A	16H	64	128
B	16H	32	64
O	16H	32	64
AB	16H	32	64
Rabbit	32H	8	16



**Fig. 3.** Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae lectins. Lane C showed one single band.

Lane A: Crude lectins, B: 0.05 M fraction from DEAE Sephadex A-50 column, C: 0.1 M fraction from Sephadex G-200 column.

성을 나타내었다(Table I). 이는 정제되기 전에 력틴 외의 다른 독성 물질이 적혈구 응집 반응 시 용혈현상을 야기하는 것으로 해석되며 정제과정을 거치면서 독성 물질이 제거되어 적혈구 응집반응은 원활히 이루어지는 것으로 사료된다.

**순도확인** - 각각의 정제 단계에서 얻은 분획에 대해 10% PAGE(pH8.3)를 실시하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 정제가 진행됨에 따라 band 수가 감소하였으며 최종 정제단계인 DEAE Sephadex G-200의 0.1 M 분획에서는 한 개의 band가 확인되어 순수함이 입증되었다.

**단백질 함량분석** - 정제과정 중의 력틴 단백질 함량을 알아본 결과 넓적사슴벌레 유충 81.9 g을 extraction한 뒤 얻은 crude 력틴은 1523 mg이 함유되어 있었으며 DEAE Sephadex A-50의 0.05 M분획에서는 546 mg의 력틴이 검출되었고, 최종 정제된 SPL은 18 mg이었으며, 정제율은 1369.86이었고, 회수율은 9.41%였다(Table II). 이는 전보<sup>5)</sup>에서 발표한 장수 풍뎅이 유충의 정제된 력틴(ADL) 단백질 함량이 0.18 mg인 것과 비교할 때 100배의 더 많은 최종 력틴 단백질을 얻을 수 있음을 확인하였고, 또한 최종 력틴 단백질이 0.84 mg이 함유된 BML보다도 21.43배 더 많은 단백질이 있음을 확인한 것으로서 넓적사슴벌레 유충의 력틴 단백질이 다른 곤충유충 력틴에 비해 비교적 많은 양이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

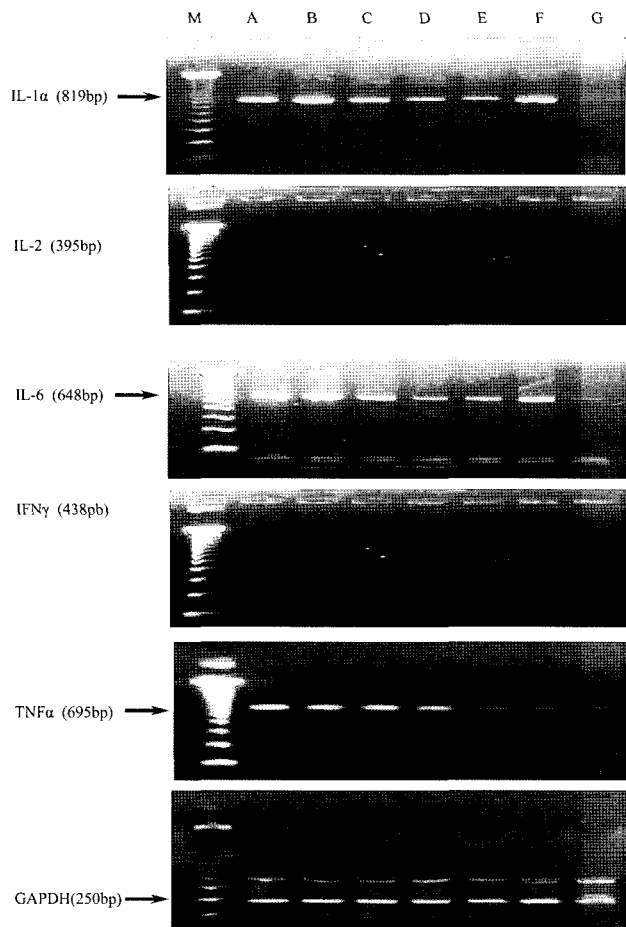
**SPL의 농도별 및 시간별 반응** - SPL의 흡광도를 7단계 (2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005, 0.0005)로 조정하여 PBMC와 반응시킨 후 1시간과 20시간 이후에 mRNA를 분리하고 정량하여 RT-PCR을 실시한 결과 IFN $\gamma$ 를 제외한 모든 사이토카인 유전자가 발현되었다.

반응 1시간 후 사이토카인 유전자 발현을 관찰한 결과 IL-1 $\alpha$ 와 IL-6는 흡광도 0.005부터 반응이 미약해졌으며 TNF $\alpha$ 는 최저농도인 흡광도 0.0005까지 뚜렷한 band를 나타내었으나 IL-2와 IFN $\gamma$ 는 발현이 되지 않았다(Fig. 4). 20시간 후의 농도별 사이토카인 유전자 발현을 관찰한 결과, IL-1 $\alpha$ 과 IL-6 그리고 TNF $\alpha$ 는 최저 농도인 흡광도 0.0005까지 비교적 고른 band를 나타내었고 IL-2는 최고 농도인 흡광도 2에서 가장 강하게 나타났으나 점차 감소하여 흡광도 0.5까지만 발현이 나타나는 것으로 농도 의존적임을 알 수 있었다. IFN $\gamma$ 는 반응 20시간에서도 발현을 관찰 할 수 없었다

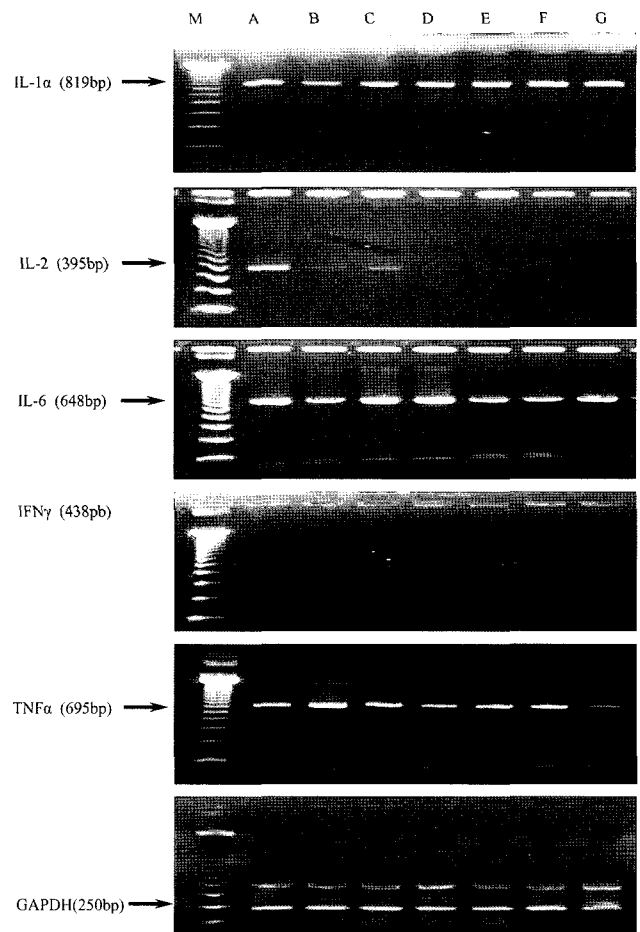
**Table II.** Purification of the lectin from *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae

	Total protein (mg)	Total activity (unit $\times 10^{-2}$ )	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude	1523	244	0.07	1	100
DEAE Sephadex A-50	546	175	22.86	313.11	71.68
Sephadex G-200	18	23	100	1369.86	9.41

The procedure started with 81.9 g of alive *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae.



**Fig. 4.** Dose dependent effects of SPL on mRNA expressions for various cytokines in PBMC cultured for 1 h. M: 123 bp DNA ladder, A: O.D.=2, B: O.D.=1, C: O.D.=0.5, D: O.D.=0.1, E: O.D.=0.05, F: O.D.=0.005, G: O.D.=0.0005



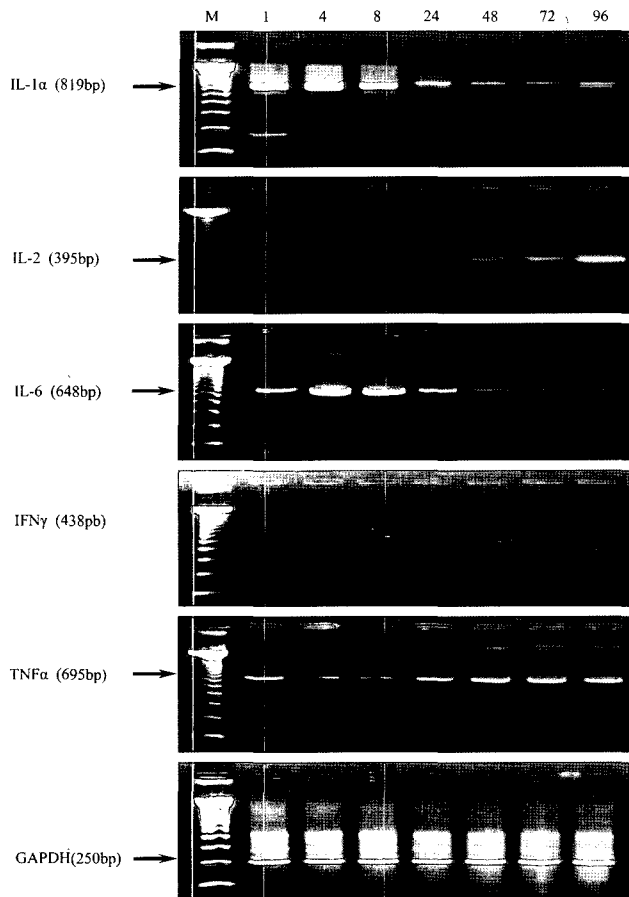
**Fig. 5.** Dose dependent effects of SPL on mRNA expressions for various cytokines in PBMC cultured for 20 h. M: 123 bp DNA ladder, A: O.D.=2, B: O.D.=1, C: O.D.=0.5, D: O.D.=0.1, E: O.D.=0.05, F: O.D.=0.005, G: O.D.=0.0005

(Fig. 5). 이러한 결과에 따라 SPL의 사이토카인 발현의 유도제로서는 흡광도 0.5가 적절한 것으로 판단하고 이후 실험에 사용하였다.

다른 렉틴의 사이토카인 발현유도 농도와 비교해 볼 때 SPL은 LEL(*Lentinus edodes* Lectin, O.D=3)<sup>15)</sup>이나 MBL (*Phaseolus radiatus* Lectin, Mung Bean Lectin, O.D=4)<sup>16)</sup>에 비해서는 훨씬 낮은 농도로 간주되지만, ADL(*Allomyrina dichotoma* Lectin, O.D=0.2)과 BML(*Bombyx mori* Lectin, O.D=0.1)<sup>4)</sup>에 비해서는 비교적 높은 적정농도가 요구되는 것으로 밝혀졌다.

결정된 적정농도로 SPL을 조정후 PBMC에 시간별 7 단계(1, 4, 8, 24, 48, 72 및 96시간)로 반응시킨 후 각 사이토카인의 유전자 발현 양상을 관찰하였다. 그 결과 IL-1α와 IL-6는 8시간까지 발현이 강하게 나타났으나 이후 점차 감소하기 시작하였으며 96시간까지는 지속되었다. IL-2는 반응 8시간부터 발현이 미약하게 나타나기 시작한 후 점차 증

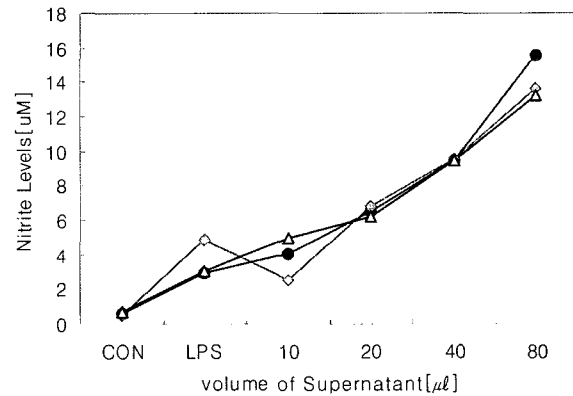
가되어 96시간에 가장 강한 발현이 이루어지는 양상을 보였다. TNFα는 반응 1시간에서 발현이 되어 점차 소멸하는 듯 하였으나 24시간부터 다시 증가하기 시작하여 48시간에 강하게 발현되어 이후 계속 유지되는 양상을 나타내었다. 농도별 반응에서 발현되지 않았던 IFNγ는 시간별 반응에서도 전혀 발현 되지 않았다(Fig. 6). 이는 앞서 보고된 ADL과 BML의 유전자 발현 양상<sup>4)</sup>과 상이함을 알 수 있었는데, 즉 임상학적으로 많은 연구가 이루어져있고 이미 활용화 단계에 있으며 항암연구에 응용되는 등 다기능 사이토카인이라고 보고<sup>17)</sup>된 IL-2와 IFNγ에 있어서 ADL과 BML의 발현 유도는 장시간까지 강한 발현을 유도하는 것과는 다르게 SPL은 IL-2와의 반응에서는 48시간 이후에 비로서 발현을 유도하는 가하면 IFNγ의 경우 전혀 발현을 유도하지 못하였다. 항암활성과 항염증 효과를 가진 TNFα의 경우 단기간 반응 사이토카인이라고 보고<sup>18)</sup>되어져 있으나 SPL을 자극원으로 작용했을 때 시간이 지날수록 발현이 강해지는 양



**Fig. 6.** PCR-assisted amplifications of IL-1 $\alpha$  (819 bp), IL-2 (395 bp), IL-6 (648 bp), IFN $\gamma$  (438 pb), TNF $\alpha$  (695 bp) and GAPDH (250 bp) in PBMC according to increased reaction times with SPL. M: 123 bp DNA ladder (123~4182 bp).

상을 보였다는 점이 대단히 다른 점이였다. 이는 TNF $\alpha$ 의 발현에는 SPL이 더 좋은 자극원이 될 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. 또한 IFN $\gamma$  발현 유도를 하지 않는다는 실험 결과는 사이토카인 유도능에 있어 SPL이 매우 이례적인 물질임을 시사하는 것으로서 앞으로 SPL과 TNF $\alpha$ 의 면역학적 상관관계를 연구해야 할 것이다.

**대식세포(macrophage)의 산화질소(NO) 생산 측정** - SPL에 의해 시간대별로 자극된 PBMC 상층액(SPL-SN)을 대식세포에서 그 양을 달리하여 처리하였을 때 농도 의존적으로 NO의 생성량이 모든 시간대별에서 증가하는 것을 볼 수 있었으며 positive control인 LPS군보다 더 많은 양이 생성되었음을 확인하였다(Fig. 7, Table III). 또한, 이러한 NO 생성 유도가 상층액에 포함되어 있는 TNF $\alpha$ 에 의한 것 인지를 알아보기 위해 상층액과 anti-TNF $\alpha$  antibody를 함께 주입한 뒤 대식세포로부터 NO 생성량의 변화를 관찰하였다. 그 결과 anti-TNF $\alpha$  antibody 처리 시 NO 생성량이 일부



**Fig. 7.** Enhancement of NO production by macrophage treated SPL supernatants from culture with TNF $\alpha$  *in vitro*. Various volumes of SPL supernatants were used. 3  $\mu$ l of LPS solution (1  $\mu$ g/m) was administered (●-●: SPL supernatants harvested after 24 h culture by PBMC. ◇-◇: SPL supernatants harvested after 48 h culture by PBMC. △-△: SPL supernatants harvested after 72 h culture by PBMC).

**Table III.** NO concentrations produced by macrophages treated SPL supernatants from culture with TNF $\alpha$  *in vitro*, compared with those of LPS

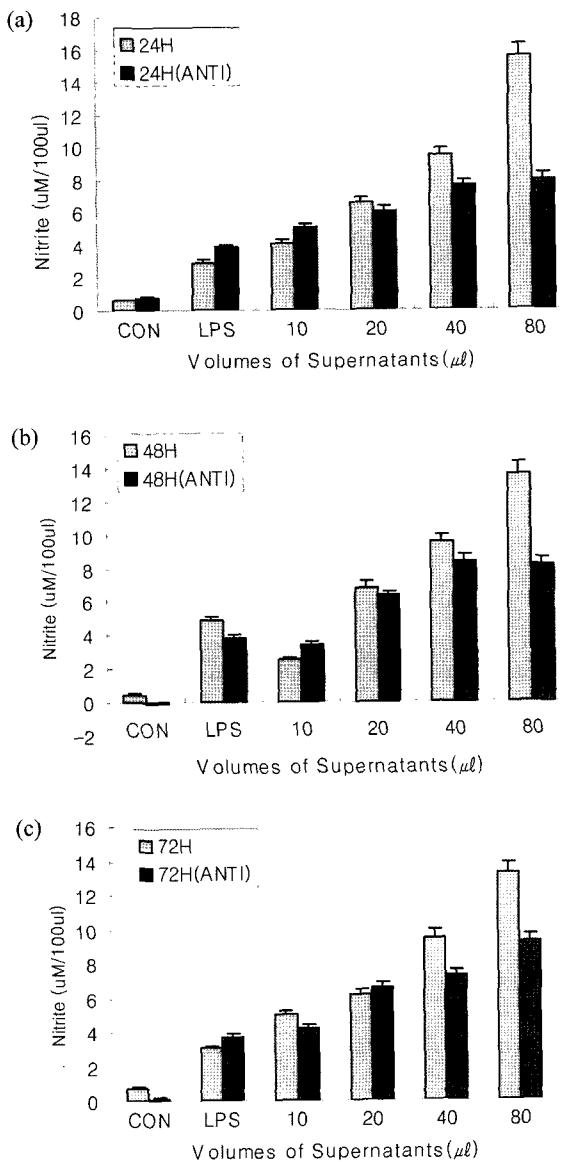
1 $\mu$ l/mg	$\mu$ l/100 $\mu$ l		
	SPL-SN 24H	48H	72H
CON	0.599	0.473	0.757
LPS	2.930	4.831	3.063
10	4.073	2.557	5.020
20	6.536	6.820	6.157
40	9.441	9.536	9.441
80	15.536	13.610	13.199

SPL-SN 24H : SPL supernatants harvested after 24 h culture by PBMC.

SPL-SN 48H : SPL supernatants harvested after 48 h culture by PBMC.

SPL-SN 72H : SPL supernatants harvested after 72 h culture by PBMC.

감소하였으며 상층액의 양이 많아질수록 anti-TNF $\alpha$  antibody에 의한 NO 생성 저해효과가 뚜렷해지는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 8). 이는 RT-PCR 결과에서 나타난 것처럼 TNF $\alpha$ 가 시간이 지남에 따라 그 발현이 증가한다는 것을 뒷받침하는 결과로서 SPL은 면역조절물질로서 작용할 수 있다는 것을 확인하였고, 단시간 발현 양상을 가진다고 알려져 있던 TNF $\alpha$ 가 시간의존적으로 발현이 강해지는 예외적 사실의 발견이 있었고, 또한 SPL에 의해 유도된 TNF $\alpha$ 는 종양세포주를 용해시키는 능력이 있는 산화질소 생성을 유도하는 실험결과에서 SPL의 항종양물질로서의 이용가능성을 확인할 수 있었다.



**Fig. 8.** Effects of TNF $\alpha$  antibodies (30  $\mu$ l/ml) on the production of NO by macrophage stimulated with supernatants from PBMC incubated with SPL for (a) 24 h, (b) 48 h and (c) 72 h : NO production induced by various volumes of SPL supernatants. Each bar shows the mean $\pm$ S.D. of duplicate determination.

**결론**

넓적사슴벌레(*Serrognathus platymelus castanicolor*)유충으로부터 DEAE Sephadex A-50과 Sephadex G-200 column을 사용하여 정제한 lectin(SPL)은 1369.86배 정제되었고 9.41% 회수되었으며 토끼와 쥐의 적혈구에 모두 응집 현상을 나타내었고 사람 적혈구 중에서는 A type에 가장 강한 응집능을 보였다. SPL을 말초혈액 단핵구(PBMC)에 농도별, 시간별로 자극하여 5종의 사이토카인(IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$

와 TNF $\alpha$ ) 생성양상을 RT-PCR로 관찰한 결과 IFN $\gamma$ 를 제외한 모든 사이토카인이 발현되었다. 적정 농도를 결정하고 시간별 변화를 관찰한 결과 IL-1 $\alpha$ 와 IL-6는 8시간까지 발현이 강하게 나타났다가 점차 감소하며 약하게 96시간까지 지속되는 양상을 보인 반면, IL-2는 반응 8시간부터 미약하게 나타난 뒤 점차 강해져서 96시간에서 최고로 강한 발현이 이루어짐을 관찰하였다. 또한 TNF $\alpha$ 는 1시간대에 발현되었다가 점차 약해졌으나 24시간 이후부터 시간이 지남에 따라 그 발현 정도가 강해지는 양상을 보였다. 그러나 IFN $\gamma$ 는 전혀 발현이 되지 않았다.

SPL에 의해 시간대별로 자극된 PBMC의 상층액을 자극원으로 사용하여 대식세포로부터 산화질소(NO) 생성이 유도됨을 확인하였고, 한편 anti-TNF $\alpha$ 는 산화질소 생성을 저해시키는 현상이 관찰되었으므로 SPL에 의해 유도된 TNF $\alpha$ 는 산화질소 생성에 관여하였음이 입증되었다.

이러한 결과는 *in vitro*에서 SPL이 사이토카인 발현과 산화질소 생성유도 능력이 있음을 나타냄으로서 면역기능조절제와 항종양물질로서의 이용 가능성이 있음을 시사한다.

**인용문헌**

- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. (1980) What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66.
- Elgavish, S. and Shaanan, B. (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochem. Sci.* **22**: 462-467.
- Chung, S. R. and Jeune, K. H. (1986) Lectins. *Review of Biochem. Biochem. Soc. Kor.* **1**: 371-382.
- Jeune, K. H., Kim, S. J. and Chung, S. R. (2005) Cytokine expressions with lectins from *Allomyrina dichotoma* and *Bombyx mori*. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 129-135
- Jeune, K. H., Jung, M. Y., Choi, S. J., Lee, J. W., Park, W. H., Cho, S. H., Lee, S. H. and Chung, S. R. (2001) Immunomodulating effect of the lectin from *Allomyrina dichotoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 31-38.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 682.
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 6711.
- Knoxles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S. (1990) Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**: 1042.
- Rees, D. D., Celletk, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. (1990) Dexamethasone prevents the induction by endotoxin

- of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 541.
10. Kim, J. Y., Lee, H. J., Kim, J. S., Ahn, H. N. and Ryn, J. H. (2005) A ginseng saponin induces production of nitric oxide in macrophages, *Yakhak Hoeji* **49**: 80-85.
  11. Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404.
  12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
  13. Jeune, K. H., Choi, S. J. and Chung, S. R. (1999) Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on cytokine production. *Yakhak Hoeji* **43**: 474-480.
  14. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131.
  15. Lee, I. K., Kim, H. S., Jeune, K. H., Kim, S. K. and Chung, S. R. (1995) Effects of *Lentinus edodes* lectin on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Korean Soc. Microbiol.* **30**: 473-481.
  16. Jeune, K. H., An, M. G., Jung, S. M., Choi, K. M., Lee, S. H. and Chung, S. R. (1999) Effect of mung bean lectin (MBL) on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 355-362.
  17. Ma, J. J. and Byun, K. H. (1994) Immune Response Regulation and Immunotherapy. *Genetic Engineering Research Institute KIST.* 5-15.
  18. Kim, H. S., Sung, Y. O., Lee, Y. S. and Kim, S. K. (1995) Candida albicans-induced TNF $\alpha$  production from human peripheral blood lymphocytes. *Korea J. Microbiol.* **30**: 1-12.

(2006년 7월 31일 접수)