

사람 말초혈액 단핵세포에서 녹두 렉틴의 사이토카인 생성효과

전경희¹, 안몽기², 정수민, 최경민, 이승호, 정시련*

영남대학교 ¹이과대학, ²의과대학 부속병원, 약학대학

Effect of Mung Bean Lectin(MBL) on Cytokine Gene Expression from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Kyung Hee Jeune¹, Mong Gi An², Su Min Jung, Kyung Min Choi,
Seung Ho Lee and See Ryun Chung*

¹College of Science, ²Yeungnam University Hospital and College of Pharmacy,
Yeungnam University, Taegu/Kyongsan 712-749, Korea

Abstract – New lectins have been isolated and purified from mung bean (*Phaseolus radiatus*) through physiological saline extraction, ammonium sulfate salt fractionation and column chromatographies. Ion exchanger were eluted by linear salt gradient and then further purified through gel filtration. Thus obtained lectin named as MBL. The gene expressions of 5 cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α and IFN- γ) from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with MBL were investigated by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PBMC (1×10^6 cells/ml) isolated from healthy volunteers were stimulated with lectins (4 mg/ml) for various time intervals (1 to 96 hrs). After each of the various stimulated times, total RNA was isolated and assessed for different cytokines mRNA by RT-PCR. The mRNA encoding IL-1, IL-2 were detected continuously from 1 to 20 hrs, and IL-6 was detected up to 24 hrs. But the mRNA encoding IFN- γ and TNF- α were detected to 8 hours only and showed short time response compared with other cytokines. The significant expression of all cytokines mRNA were observed at 4 hrs. These results suggested that MBL, as inducer of cytokines could elicit detectable cytokine mRNA from PBMC.

Key words – Mung bean *Phaseolus radiatus* lectins(MBL); human peripheral blood mononuclear cells (PBMC); cytokine gene expression; RT-PCR.

녹두(綠豆)는 옛부터 한방에서 서열번갈(暑熱煩渴), 수종(水腫), 하리(下痢), 단독(丹毒), 응종(癰腫) 등의 치료와 청열(淸熱) 및 해독제(解毒劑)로 널리 사용되어져 왔다.¹⁾ 본 연구진은 이미 녹두로부터 렉틴 성분을 분리 정제한 바 있어²⁾ 이를 근거로 더욱 정제하여 이 렉틴(MBL)으로 사람의 말초혈액 단핵세포를 자극시켜 분리한 RNA로 역전사 중합효소 연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용하여 5종의 사이토카인 즉, interleukin-1(IL-1), interleukin-2(IL-2), interleukin-6(IL-6), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성유도에 미치는 영향을 알아보았다.

렉틴은 특이적인 당쇄 구조를 인식하여 결합함으로써 특정 세포를 응집시키는 단백질로서 적어도 분자내 2개 이상의 당 결합 부위를 가지며 효소 작용이 없고 항체와도 다른 물질이다.³⁾ 이는 천연물에 광범위하게 존재하는 다양한 생리 활성을 지닌 물질로 특정 구조의 당을 인식하여 결합하는 특이성으로 인하여 세포막의 구조와 기능, 혈액형, 약물 수송체, 당단백질의 분리나 세포의 분리동정 등 실험 도구로도 이용되고 있다.^{4,7)}

사이토카인은 외부 항원, 세포분열(mitosis), 세포손상 등에 관련하여 혈구세포에서 분비되며 세포의 활성화, 증식, 분화 등을 조절함으로써 면역반응에 다양한 역할을 하는 가용성 물질이며,⁸⁾ 일반적으로 분자

*교신저자 : Fax-053-812-8891

량 30 kD이하의 펩타이드나 당단백질로서 특히 수용체에 친화력 $kd=(10^{-9}\sim 10^{-12})$ 을 가지므로 $10^{-10}\sim 10^{-15}$ mol/l의 극미량에서도 강력한 효과를 나타낸다.⁹⁾ 이들은 현재 적어도 60여종 이상이 자세히 밝혀져 있으며 이들은 대개 interleukin, interferon, colony stimulating factor(CSF), chemokins, growth factor류로 나뉘어진다.^{10,11)} 사이토카인의 작용에 있어 특징적인 것은 다른 단백질 조절인자들과는 달리 지속적으로 분비되는 것이 아니라 mRNA 전사 단계에서 다양한 자극에 의해 조절되어 분비된다는 점과 호르몬과는 달리 단거리 작용으로 국소적으로 제한된다는 점, 그리고 동일 사이토카인이 여러 다른 세포에서 각기 다른 작용을 하거나 서로 다른 사이토카인들이 동일한 세포에 유사한 작용, 사이토카인간에 상승 및 길항 작용을 하는 등 그 각각의 기능이 중복되거나 작용 범위가 매우 넓다는 점을 들 수 있다.^{12,13)}

임상적으로는 CSF, IFN- γ , IL-2가 조절작용을 자극시키거나 암 면역성을 조절하는 등 또한 AIDS치료에 있어서도 기존 치료제에 사이토카인을 병용한 보조요법이나 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 활성을 높이는 등의 시도가 이루어지고 있다. 또한 TNF- α , IL-1 수용체 길항제와 같은 사이토카인 저해제들도 항염증제로 개발하여 임상단계에 있으며 IL-2 수용체를 이용해 자가면역 질환에 있어 증가하는 T 세포를 증화시키려는 연구가 진행되고 있다.^{14,15)}

렉틴에 의해 자극된 세포는 대단히 독특한 생리적 효과를 나타내는데 대표적인 것으로는 IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 등의 lymphokine을 생성 분비시킨다는 점이며^{16,17)} 이 때문에 많은 면역학적 연구에서 렉틴은 사이토카인 유도 물질로 사용되어져 왔다.¹⁸⁻²⁴⁾ 이런 관점에서 렉틴의 면역 조절제 혹은 면역 기능항진제로서의 역할이 기대되므로 본 연구는 궁극적으로는 새로운 의약자원으로서의 신 물질 개발을 목표로 렉틴이 정성적으로 어떤 사이토카인 유도와 분비에 관여하며 어느 정도까지 지속되는지를 알아보고자 Arnold²⁵⁾와 Lee²⁶⁾의 보고를 참조하여 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 녹두 (*Mung bean*, *Phaseolus radiatus*, Leguminosae)는 영남대학교 약초원에서 재배한 것을 수집하여 실험 재료로 사용하였다.

시약 - DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-100,

Acrylamide(N, N-methylene-bisacrylamide), TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine), SDS (sodium dodesyl sulfate) 등은 Sigma, USA에서, Coomassie brilliant blue R-250, Aquacide I은 Calbiochem Behring Corp., USA에서, Ficoll-Hypaque은 Pharmacia Biotech, Sweden에서, Ultraspec II는 Biotec Laboratories INC., USA에서, RT-PCR kit는 Perkin Elmer, USA에서, 123bp DNA ladder는 Gibco BRL, USA에서, Interleukin-1 beta human, ELISA system은 Amersham, England에서, 그리고 Primer는 연세대학교 의과대학 생화학 교실 및 한국 생공(대전)에서 합성한 것을 구입하였으며 그 Primer Sequence는 다음과 같았다.

human Glyceraldehyde-3-Phosphatedehydrogenase (GAPDH, 250bp)

(5')5'-GTCAT GAGCC CTTCC ACGAT GC-3'

(3')5'-GAATC TACTG GCGTC TTCAC C-3'

human Interleukin-1 (IL-1, 420bp)

(5')5'-GTCTC TGAAT CAGAA ATCCT TCTAT C-3'

(3')5'-CATGT CAAAT TTCAC TGCTT CATCC-3'

human Interleukin-2 (IL-2, 458bp)

(5')5'-ATGTA CAGGA TGCAA CTCCT GTCTT-3'

(3')5'-GTTAG TGTTG AGATG ATGCT TTGAC-3'

human Intereukin-6 (IL-6, 628bp)

(5')5'-ATGAA CTCCT TCTCC ACAAG CGC-3'

(3')5'-GAAGA GCCCT CAGGC TGGAC TG-3'

human Tumor necrosis factor- α (TNF- α , 695bp)

(5')5'-ATGAG CACTG AAAGC ATGAT CCGG-3'

(3')5'-GCAAT GATCC CAAAG TAGAC CTGCC C-3'

human Interferon- γ (IFN- γ , 494bp)

(5')5'-ATGAA ATATA CAAGT TATAT CTTGG

CTTT-3'

(3')5'-GATGC TCTTC GACCT CGAAA CAGCA T-3'

그 외의 모든 시약들은 특급내지 일급 시약을 사용하였다.

기기 - 실험에 사용한 주요 기기는 Chromatography system : Gradifrac, Pharmacia, Sweden; Ultrafiltration apparatus : Minitan, Millipore, USA; Electrophoresis apparatus : Hoefer, USA & LKB 2001, Sweden; Spectrophotometer : Ultraspec III, Pharmacia, Sweden; Clean bench : Vision, Korea; CO₂ Incubator : Shel-Lab, USA; Thermal cycler : Perkin Elmer, USA; UV-transilluminator : TFX-20M, France; Autoclave : Vision, Korea; Plate reader : Bio-rad, USA; Plate

washer: Bio-rad, USA 등이었다.

렉틴 활성 시험 - 이미 보고된 방법^{27,28)}에 따라 사람 및 생쥐의 적혈구를 분리하고, 생쥐의 비장에서 림프구를 분리하여 각각 3% 혈구로 조제하여 U type microtiter plate에서 여러농도의 녹두 렉틴과 응집력 시험을 실시하였다.

Crude 렉틴의 분리 - Crude 렉틴 (crude MBL)의 분리는 Chung등의 방법²⁾에 따라 생리식염수 추출, 황화암모늄침전, 원심분리, 투석 등의 방법으로 시행하였다.

DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography - 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 미리 평형시켜둔 DEAE Sephadex A-50 column (Pharmacia, 2.6×40 cm)에 crude MBL을 주입하고 같은 완충액으로 세척하였다. 단백질 성분은 Gradifrac System을 이용하여 linear gradient로 유출시켜 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하고 림프구에 대한 렉틴 활성을 조사하였다.

Sephadex G-100 gel filtration - 0.1 M NaCl을 함유한 25 mM Tris-HCl 완충액으로 미리 평형시켜둔 Sephadex G-100 column (Bio-rad, 1.8×100 cm)에 전향에서 얻은 렉틴 활성 분획을 ultrafiltration과 Aquacide I 등을 이용하여 농축하고 같은 완충액으로 투석시킨 후 주입 유출시켜 얻은 각 분획은 전향과 동일한 방법으로 흡광도와 활성을 조사한 뒤 농축하였다. 이 과정에서 얻은 렉틴을 MBL이라 하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis - Laemmli와 King²⁹⁾의 방법으로 discontinuous buffer system으로 실시하였다. stacking gel과 running gel은 각각 4%, 12.5% polyacrylamide gel로 하였으며 완충액은 0.1% SDS를 함유한 0.15M Tris-glycine (pH 8.6)을 사용하였다. 시료와 standard protein marker는 sample buffer(0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol)와 1 : 1 혼합하고 100°C에서 3분간 가열하여 변성시킨 뒤 gel에 주입하였다. 전류와 염색 및 탈색은 PAGE와 같은 방법으로 실시하였으며 standard protein marker로는 phosphorylase B(97,400), serum albumin(66,200), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(31,000), trypsin inhibitor(21,500), lysozyme (14,400)을 사용하였다 (unit; Dalton).

말초혈액 단핵세포(PBMC)의 분리 - Lee등의 방법²⁶⁾을 응용하여 건강한 성인 2~3명으로 부터 채취한 혈액을 heparin(10IU/ml) 처리 한 뒤 동량의 생리식염수로 희석하여 Ficoll-Hypaque에 중첩시킨 것을

1800 rpm에서 30분간 원심분리시켰다. 비중에 따라 분리된 PBMC (peripheral blood mononuclear cells) 층을 생리 식염수로 수 차례 세척하고 10% FBS (fetal bovine serum)을 함유한 RPMI 1640 배양액에 1×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켰다. 세포의 생존은 최종 단계에서 trypan blue로 확인하여 생존율 95% 이상임을 확인하고 실험에 사용하였다.

렉틴의 농도 및 시간 반응 - 먼저 사이토카인 유전자 발현을 위한 렉틴의 적정 농도를 결정하기 위해서 280 nm에서 흡광도가 각각 4.0, 2.0, 0.5가 되도록 조정된 렉틴 용액을 준비하여 PBMC와 반응시켰다. 24-well plate (flat bottom)의 각 well에 PBMC 1ml씩을 분주한 뒤 농도별 렉틴(100 μ l/well)을 첨가하여 37°C에서 1~20 시간동안 반응시키고 수거하여 이들로부터 RNA를 분리하였다. 시간차이에 따른 반응은 4 mg/ml 농도에서 위와 동일한 방법으로 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 시간으로 정하였다.

RNA의 분리 - 농도 및 시간별로 수거한 PBMC로부터 RNA의 분리는 Ultraspec-II RNA isolation system을 이용하였다.³⁰⁾ 수거한 PBMC를 0.1% DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 함유한 PBS로 3~4회 세척한 뒤 원심분리하여 얻어진 세포에 Ultraspec-II RNA 900 μ l를 가해 완전히 현탁시킨 후 CHCl_3 100 μ l을 넣고 -20°C에서 15분간 방치하였다. 12000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 수층을 취하고 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 약 1시간 방치하였다. 다시 원심분리하여 RNA 침전을 얻은 뒤 75% ethanol을 함유한 DEPC 용액으로 세척하고 진공하에서 건조시켜 0.1% DEPC 처리한 증류수에 녹였다. 조제한 RNA는 260 nm에서 정량하여 농도 규정 후 실험에 사용하였다.

cDNA의 합성과 증합효소 연쇄반응 - RNA는 다음과 같이 cDNA로 역전사시켰다. 즉 100 μ g/ml이 되도록 조정된 RNA 1.5 μ l를 취해 RT-reaction mixture와 혼합한 뒤 그위에 반응 진행동안의 수분 증발을 막기 위해 mineral oil 50 μ l를 중첩시키고 thermal cycler내에서 42°C에서 15분, 99°C에서 5분, 5°C에서 5분의 단계로 반응시켰다. RT-reaction mixture는 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3) 1 mM의 dNTP 4종, RNase inhibitor(1 U/ μ l), murine leukemia virus reverse transcriptase(2.5 U/ μ l), 2.5 μ M Oligo[dT](16 mer)로 구성된 전체 8.5 μ l가 되도록 혼합하였다.

RNA로부터 역전사된 cDNA에 PCR master mix-

ture 39 μ l와 5종의 사이토카인에 대한 0.2 μ M의 primer를 각각 첨가하여 증합효소 연쇄반응을 실시하였다. PCR master mixture의 구성은 2 mM Mg Cl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), taq polymerase(1.25U/50 μ l)와 멸균 증류수로 전체 39 μ l가 되도록 혼합하였다. House keeping gene으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였으며 증합효소 연쇄반응은 thermal cycler 내에서 35회 증폭되었고 각 cycle의 구성은 94°C에서 1분간의 불활성화 (또는 변성화) 단계, 60°C에서 1분 동안의 결합반응 단계와 72°C에서 1.5분간의 증합반응 단계로 하였다.

증폭된 cDNA는 1.5% agarose gel(ethidium bromide 1 μ l/ml첨가) 상에서 전기영동을 실시하였다. 이때 완충용액으로는 0.5 \times TBE(Tris-Borate)를 사용하여 100 volt에서 45분간 전기영동을 실시하였으며 marker로는 123 bp DNA ladder를 이용하였다.

결 과

렉틴 활성 - Crude MBL에 대하여 사람 및 토끼의 적혈구와 생쥐 비장의 림프구로부터 렉틴 활성을 조사한 결과 사람의 A, B, O, AB 형 모두와 토끼의 적혈구에 대하여는 trypsin 처리 전후에 관계없이 응집을 나타내지 않았고 생쥐 비장의 림프구에 대해서는 응집 반응을 나타내어 Chung 등²⁾의 연구 결과와 일치하였다.

DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography 정제 - Crude MBL을 DEAE Sephadex A-50 column에 적용하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 이는 25 mM Tris HCl 완충액에 0~0.3M NaCl에 이르도록 연속적으로 증가시켜 유출시킨 결과를 나타내며 두 곳의 활성 분획을 얻을 수 있었다(이하 MBL-I, MBL-II).

Sephadex G-100 gel filtration 정제 - Fig. 1에서 활성을 나타낸 MBL-II를 농축시킨 후 0.1M NaCl을 함유한 25 mM Tris-HCl 완충액에 투석시켜서 Sephadex G-100 column에 주입하여 유출시킨 결과는 Fig. 2와 같았으며 이때 활성부분을 MBL이라 하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 분자량 측정 - MBL의 소단위 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같았으며 표준 단백질에 대한 calibration curve로부터 약 34000 dalton으로 추정할 수 있었다.

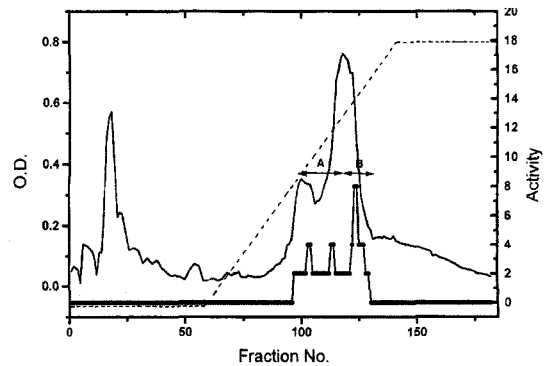


Fig. 1. Gradient elution profile of Crude MBL on DEAE Sephadex A-50 column chromatography. A, MB L-I; B, MBL-II; Absorbance at 280 nm, —; Lymphoagglutinating activity, - - -; NaCl gradient, ●-●.

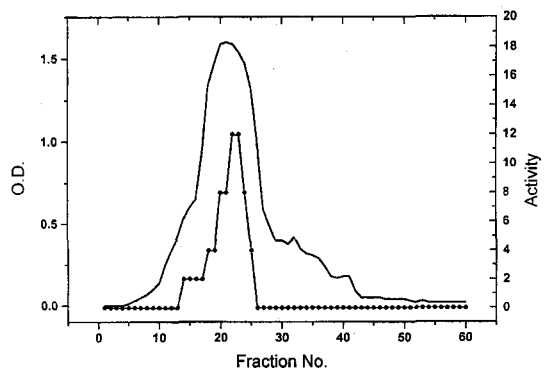


Fig. 2. Elution profile of MBL-II on the Sephadex G-100 column chromatography. Absorbance at 280 nm, —; lectin activity, - - -.

렉틴 농도에 따른 사이토카인 유전자 발현 - 5종의 사이토카인에 대해서 반응 1 시간에서는 정도의 차이는 있으나 PBMC를 자극시킨 렉틴의 모든 농도에서 사이토카인 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). IL-6, IL-1, TNF- α 의 경우에는 비교적 발현 정도가 강하게 나타남에 비하여 IL-2, IFN- γ 는 발현 정도가 상대적으로 약하게 나타났으며 IL-1, IL-6에 대하여 농도의존성 양상이 나타났으므로 이들의 차이는 앞으로 구명할 대상이라 생각된다.

반응 시간 20시간대에서는 상이한 결과를 나타내었다. IFN- γ , TNF- α 의 경우는 반응 20시간대에서는 어떤 농도에서도 유전자 발현을 찾아볼 수 없었으나 IL-1, IL-6는 전 농도에서, IL-2의 경우는 최고 농도 4 mg/ml에서만 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 전반적으로 발현 정도가 강하게 나타난 농도는 4 mg/ml이었음을 알 수 있었다.

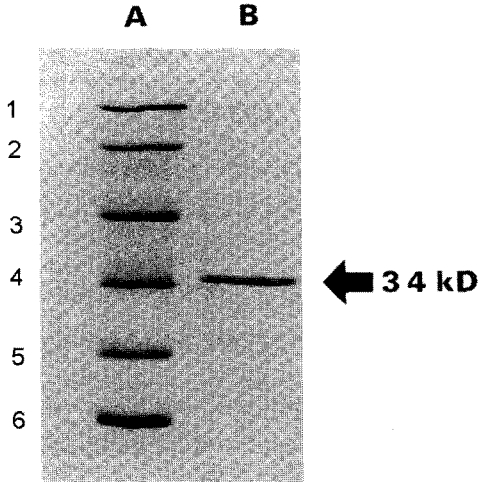


Fig. 3. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of MBL.

Lane A : Molecular mass of standards (unit, dalton). 1, Phosphorylase B (97400); 2, Serum albumin (66200); 3, Ovalbumin (45000); 4, Carbonic anhydrase (31000); 5, Trypsin inhibitor (21500); 6, Lysozyme (14400); Lane B : MBL. (←) indicate the mass of MBL.

반응 시간에 따른 사이토카인 유전자 발현 - 렉틴
 (4 mg/ml)과 PBMC를 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96시간 반응 후 각각의 반응 시간에 따른 사이토카인의 유전자 발현 양상을 비교 관찰하였다 (Fig. 5). 먼저 IL-1의 경우는 반응 1시간대부터 발현이 나타나기 시작하여 8시간 이후까지 지속되었다. 24시간대부터는 band를 관찰할 수 없었지만 전항 농도별 반응의 20시간째에도 그 발현을 관찰한 바 있었으므로 적어도 반응 20시간째까지는 어느정도 지속되고 있음을 알 수 있었다. IL-2의 경우는 8시간까지 발현됨을 알 수 있었고, IL-6는 반응 1시간째부터 반응 24시간대까지 발현이 지속되었는데 4시간째에 가장 뚜렷한 발현 양상을 보였으며 점차 약하게 발현되다가 24시간대에는 미미하나마 band를 확인할 수 있었다. IFN- γ 의 경우 8시간대까지 미약한 유전자 발현이 지속되었으며 TNF- α 역시 8시간대까지만 발현되었고 4시간째에 가장 강하게 나타났다. 이상을 종합적으로 볼 때 녹두 렉틴에 의한 사이토카인 유도는 대체적으로 초기에 마무리됨을 알 수 있었다(Table I).

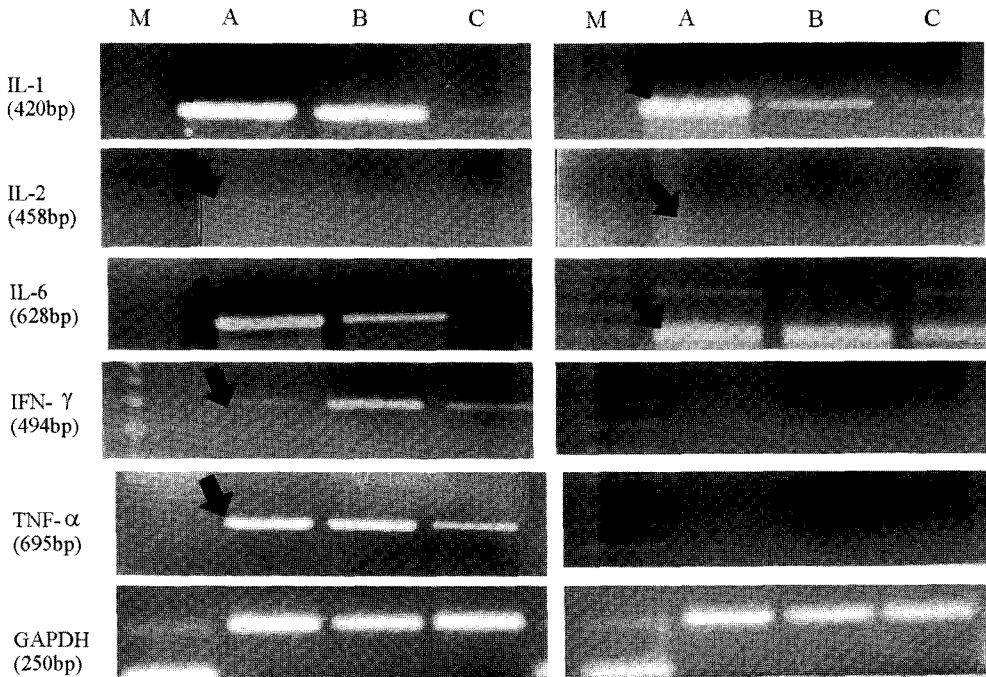


Fig. 4. (Left) PCR-assisted amplification of cytokine mRNA from PBMC stimulated with various concentration of MBL for 1 hour. The bands for all cytokines were detected at all concentrations.

(Right) PCR-assisted amplification of cytokine mRNA from PBMC stimulated with various concentration of MBL for 20 hours. The bands for IL-1 and IL-6 were detected at all concentrations, no bands for IFN- γ and TNF- α were detected. In the case of IL-2, faint band was only detected at 4mg/ml. A ; 4 mg/ml, B ; 2 mg/ml, C ; 0.5 mg/ml, M ; 123 bp DNA ladder (123 bp~4182 bp)

고찰

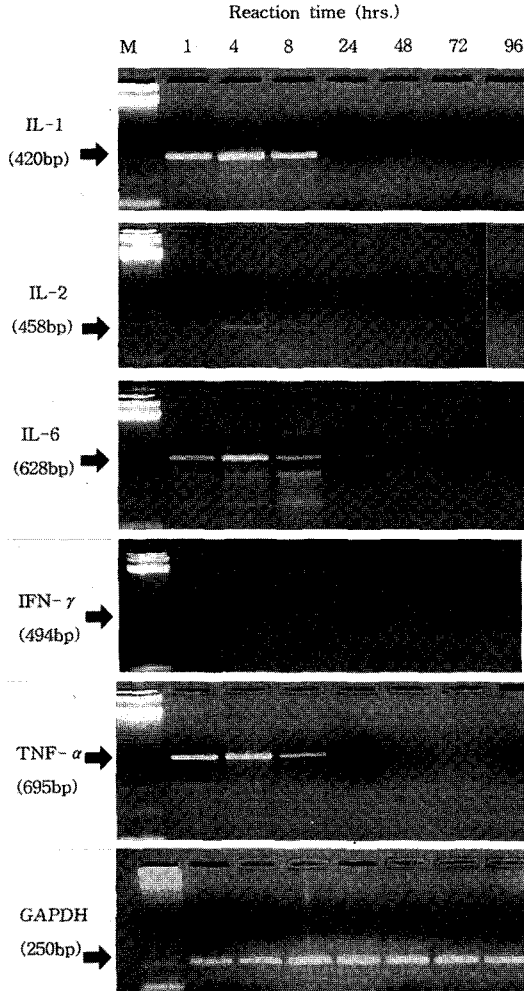


Fig. 5. PCR-assisted amplification of cytokines mRNA from PBMC according to the increased reaction times (4 mg/ml). M ; 123 bp DNA ladder.

Table I. Kinetics of cytokine mRNA expression in PBMC stimulated with MBL

Cytokine	Reaction times (hrs.)						
Primer	1	4	8	24	48	72	96
IL-1	++	+++	++	-	-	-	-
IL-2	+	++	+	-	-	-	-
IL-6	+	++	+	±	-	-	-
IFN-γ	+	+	+	-	-	-	-
TNF-α	+	++	+	-	-	-	-
GAPDH	++	++	++	++	++	++	++

The semiquantitative scores can be used only for comparing the amounts of product from sample obtained with the same primer. The PCR products were scored by the intensity of bands as follows: - : negative; ± : very weak band; + : weak band ++ : strong band; +++ : very strong band.

녹두로부터 얻은 렉틴은 각종 적혈구에는 응집 현상이 없었으며 생쥐 림프구에 대해 특이적으로 응집 현상을 나타내어 콩과 식물 렉틴은 α-galactosidase 특이성을 나타낸다는 보고를 뒷받침해 주었다.^{31,32)}

농도에 따른 여러 종류의 사이토카인 유도능을 조사한 결과 IL-1, IL-6에 대해서는 농도 의존성 양상을 볼 수 있었고 특히 IFN-γ의 경우는 흡광도 2.0인 시료에서 가장 뚜렷한 발현을 확인할 수 있었다. 전반적으로 280 nm에서 흡광도 4.0인 시료(100 μl/ml)로 자극하였을 때 최고의 유도능을 얻을 수 있었다. 농도에 따른 사이토카인 유도능은 Ronnblom²²⁾에 의한 LCL(Lens culinaris lectin) 농도가 50~100 μl/ml이었고 Lee²⁶⁾의 연구에서 LEL(Lentinus edodes lectin) 농도와 비교했을 때 다소 높긴 하였으나 순수 정제된 것이 아니므로 단순히 농도와 비교할 수는 없을 것이라 사료되었다. 농도별 실험에서 반응 20시간째에는 IFN-γ와 TNF-α는 유전자 발현을 관찰할 수 없어 반응 초기 단계에 특이성을 보이며 지속적인 발현을 유도하지 못하는 것으로 생각되었다.

반응 시간에 따른 사이토카인 유도능을 살펴보면 IL-6는 반응 24시간까지, 그리고 IL-1과 IL-2는 반응 8시간까지만 유도되었다. IL-1과 IL-2의 경우는 이미 농도별 반응에서 20시간대에 그 발현을 확인한 바 있으므로 20시간 이후에 발현이 마무리될 것이라 추정되었다.

특히 IL-1은 예비적인 실험으로 ELISA를 시행한 결과 PBMC로 부터 그 분비능을 측정된 결과 반응 24시간에 최고 농도에 이르는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 RT-PCR 결과를 뒷받침해 주었다(미발표논문, 1999). IFN-γ의 경우 다른 사이토카인들에 비해 그 발현 정도가 매우 약하게 나타났으며 이미 확인한 바와 같이 반응 8시간까지만 유도되어 지속적인 발현을 보이지는 못했다. Tamura²⁴⁾와 Ronnblom²²⁾의 보고에 따르면 SPL(Sarcophaga peregrina lectin)과 LCL에 의한 IFN-γ의 분비능은 3~4일째에 최고 농도에 이른다고 하였는데 녹두 렉틴에 의한 IFN-γ 유도는 이와는 상이한 결과를 나타내었다. TNF-α 역시 반응 8시간까지 발현을 보임으로써 Gifford³³⁾ 보고의 TNF-α의 생성 양상은 다른 사이토카인에 비해 빠르게 생성된다고 함에 비추어 그 결과가 유사하였다. 5종의 사이토카인 중 IL-2와 IFN-γ는 발현정도가 매우 약하게 나타났는데 이는 IL-1, IL-6, TNF-α가 단핵세포, 대식세포등 다양한 종류의 여러 세포에서 조절

및 분비되는데 반해 이들 사이토카인의 생산원이 T 세포나 NK 세포로 한정되어 있다는 점을 고려해야 할 것이라 사료된다.

이상으로 녹두 렉틴은 실험 대상으로한 5가지 종류의 사이토카인을 유도할 수 있음을 확인하여 마이토젠으로서의 역할을 수행함과 동시에 면역기능 항진 및 조절제로서 개발될 수 있는 가능성을 보여 주었다. 또 반응 초기 단계에 특이성을 가져 Lee²⁶⁾에 의해 밝혀진 표고렉틴(LEL)에 비해서는 지속적인 발현을 유도함이 아니라 대체적으로 4~8시간대의 발현이 가장 강력함을 확인할 수 있었다.

결 론

녹두(Mung bean, *Phaseolus radiatus*)로부터 생리 식염수추출, 황화암모늄 침전등을 거쳐 Gradifrac System을 이용하여 DEAE Sephadex A-50 와 Sephadex G-100 column에서 정제된 MBL은 SDS-PAGE 결과 34000 dalton의 소단위를 갖는 것으로 추정되었다. 이렇게 정제한 렉틴 성분을 건강인의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)와 반응시켜 IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ , 및 TNF- α 의 사이토카인을 어떻게 유도하는가에 대해서 역전사 중합효소 연쇄반응법(RT-PCR)으로 그 발현 양상을 조사하여 본바 렉틴의 농도에 따른 사이토카인의 유전자 발현은 IL-1, IL-6에서 농도 의존적 양상을 나타내었으며 흡광도 4.0으로 조정된 렉틴 용액에서 가장 강한 band를 관찰할 수 있었다. 또한 렉틴 성분은 흡광도 4.0으로 조정된 뒤 세포 현탁액 (1×10^6 cells/ml) 1 ml 당 렉틴용액 100 μ l씩을 취하여 자극한 뒤 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 시간동안 반응시켰을 때 4~8 시간대에 가장 강한 발현을 나타내었으며 5종의 사이토카인 모두 24 시간 내에 발현이 종료되었다.

이상의 결과에서 녹두로부터 분리된 렉틴은 5종의 사이토카인 생성을 유도할 수 있음이 확인되었다.

사 사

이 연구의 일부는 1998년도 약품개발연구소 연구 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1997) 완역 중

약대사전, 1016-1020. 도서출판 정담, 서울.
 2. Chung, S. R., Hong S. S. and Jeune K. H. (1983) Isolation and purification of lectin from *Phaseolus radiatus*. *Yakhak Hoeji (J. Pharm. Soc. Kor.)* 27 : 221-227.
 3. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa T. and Sharon N. (1980) What should be called a lectin? *Nature* 285 : 66.
 4. Green, E. D. and Baenziger, J. U. (1989) Characterization of oligosaccharide by lectin affinity high-performance liquid chromatography. *Trends in Biochem. Sci.* 14 : 168-172.
 5. Kituo, T. and Hattori, K. (1977) Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature* 265 : 81-82.
 6. Laurent, G., Pris J., Farcet, J. P., Carayon P., Blythman H., Casellas P., Poncelet P. and Tansen F. K. (1986) Effect of therapy with T 101 ricin A-chain immunotoxin in two leukemia patients. *Blood* 67, 1680-1687.
 7. Sharma, S. K. and Mohendroo, P. P. (1980) Affinity chromatography of cell and membranes. *J. Chromatogr.* 184 : 471-499.
 8. Thomson, A. (1991) *In* The cytokine handbook. 241-256. Academic Press, Sandiego.
 9. Pick, E. (1987) *In* Lymphokines. 1984, Vol. 9, Academic Press.
 10. Aggarwal, B. B. and Guttermann, J. U. (1991) Human cytokines, *In* Handbook for basic and clinical research. Blackwell Scientific Publication.
 11. Callard, R. E. and Gearing, A. J. H. (1994) *In* The cytokine facts book. Academic Press.
 12. Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Cytokines, co-ordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* 59 : 783~836
 13. Kim, S. J. (1994) *In* Immunology. Korea Medical Publishing Co. 147~161. Seoul 1st ed.
 14. Chung, S. R. and Jeune, K. H. (1996) Immunomodulator for the 21st Centuries : Lectins from natural products. *New Drug News* 4, 12, 3-6.
 15. Oppenheim, J. J., Rossio, J. and Gearing, A. J. H. (1993) Role in diagnosis, pathogenesis and therapy, *In* Clinical application of cytokines. Oxford University Press.
 16. Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. (1986) Properties, function and application in biology and medicine. *In* The lectins. 1~600. Academic Press, New York.
 17. Robb, R. J. (1984) Interleukin-2; the molecule and its function. *Immunol. Today* 5 : 203-209.

18. Crane, I., Leung, H., Barwick, S., Parti, S. and Meager, A. (1984) The preparation of interferon gamma producing T cell hybridomas from jaculin-stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. *Immunol.* 53 : 855-858.
19. Dalmau, S. R., da Silva, L. C. M. and Freitas, C. S. (1987) Jaculin-induced production of human interleukin-2. *In Mem rias do Instituto Oswaldo Cruz, (Suppl II) : Abstract II, 82*
20. Gills, S. and Watson, J. (1980) Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of interleukin 2 producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* 152 : 1709.
21. Itoh, A., Iizuka, K. and Natori, S. (1985) Antitumor effects of *Sarcophaga* lectin on murine transplanted tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 76 : 1027-1033.
22. Ronnblom, L., Funa, K., Ersson, B. and Alm G. V. (1982) Lectins as inducers of interferon gamma production in human lymphocyte.; lentil lectin is highly efficient. *Scand. J. Immunol.* 16 : 327-331.
23. Schrader, J. W. and Clark-Lewis, I. (1981) T cell hybridoma-derived regulatory factors. I. Production of T cell growth factor following stimulation by Con A. *J. Immunol.* 126 : 1101~1107
24. Tamura, M. and Natori, S. (1984) Induction of human interferon- γ by *Sarcophaga peregrina* lectin. *FEBS Lett.* 175 : 325-328.
25. Arnold, R., Scheefer, J., Konig, B. and Konig, W. (1993) Effects of *Listeria monocytogens* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEP-2) cells. *Infect. Immunol.* 61 : 2545-2552.
26. Lee, I. K. Kim, H. S., Jeune, K. H., Kim, S. K. and Chung, S. R. (1995) Effect of *Lentinus edodes* lectin on cytokine gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *Korean Soc. Microbiol.* 30 : 473-481.
27. Chung, S. R., Jeune K. H. and Kim K. A. (1980) Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.* 3 : 31-36.
28. Jeune, K. H. and Chung S. R. (1981) Lymphostimulation by PHA lectins. *J. Natural Sciences* 1 : 183-191.
29. Laemmli, G. U. K. and King, J. (1971) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62 : 465-477.
30. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159
31. Hankins, C. N., and Shannon, L. M. (1978) The physical and enzymatic properties of a phytohemagglutinin from mung beans. *J. Biol. Chem.* 253 : 7791-7797.
32. Hankins, C. N., Kindinger, J. and Shannon, L. M. (1980) Legume α -galactosidase which have hemagglutinin properties. *Plant Physiol.* 65 : 618-622
33. Gifford, G. E. and Flick, D. A. (1988) Tumor necrosis factor. *Microbiol. Science* 5 : 104-108.

(1999년 10월 19일 접수)