

유리나방 유충 추출물이 비장 세포로부터 Cytokine 분비에 미치는 효과

안미영* · 이현아¹ · 손혜진¹ · 양영택² · 김규돈³ · 박해철 · 황재삼 · 황석조
농업과학기술원 농업생물부, ¹성균관의대 삼성서울병원 암센터
²난지농업연구소, ³주식회사 홍금

In Vitro Effects of Water and Methanol Extracts of *Melittia inouei* on Cytokine Production

Mi Young Ahn*, Hyunah Lee¹, Hye-Jin Shon¹, Young Taek Yang², Kyu Don Kim³,
Hae Cheol Park, Jae Sam Hwang, and Suk Jo Hwang

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹The Cancer center, Samsung Medical Center, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Seoul 135-170, Korea

²Jejudo Agriculture Research & Extension Service, Jeju 690-170, Korea

³Hong-Gum Company, Jeju 695-813, Korea

Abstract – *Melittia inouei* (Yuri Nabang) larvae are used as a crude drug in East Asia for treating stomach cancer and inflammation, and currently reared as a pharmaceutical insect in Jeju, Korea. This study evaluated the immuno-modulating activity of these extracts, by determining the level of, cytokine production from mouse splenocytes stimulated with the extracts. The *Melittia inouei* larvae extracts did not induce the splenocyte proliferation. On the other hand, they stimulated the splenocytes to produce cytokines such as TNF- α , whereas they did not stimulate IL10, IL12 or IFN- γ . The aqueous portion of its plant (*Trichosanthis kirilowii*) extract (sap) was found to be a potent inducer of NO production from the CPAE cells. However, it showed weak inhibitory effects on vascular endothelial growth factor (VEGF) production from splenocytes. These data suggests that a *Melittia inouei* larvae extract has immune modulatory activity in cytokine productions such as TNF- α and VEGF which might be related its anticancer effect.

Key words – *Melittia inouei* larvae extract, modulation of cytokine production, TNF- α , VEGF

하늘타리(괭류, *Trichosanthis kirilowii*)는 박과식물의 다년생 덩굴성 초본으로서 괴근은 비대하여 괭류근(천화분, *Trichosanthis radix*)이라 하여 한방에서 소염진통제로 사용되어져 왔다.¹⁾ 최근 농촌진흥청 난지농업연구소의 2004년 보고에 의하면 식중독균, 비브리오팀균, 대장균등의 증식을 억제하는 것으로 밝혀졌다.²⁾

유리나방[나비목(Lepidoptea), 유리나방과(Family Sesiidae)] 유충은 제주도에 자생하는 하늘타리 식물에 기생하는 곤충으로서 유충을 암 환자가 복용하여 효과를 볼 수 있다는 민간약재이다. 그러나 과학적 실험자료와 기전이 없어 일부곤충사육농가의 사업화를 추진하는 데 애로가 있어 이를 해결하고자 본 연구는 세포수준에서 항암작용의 기전으로 관련 가능성이 있는 면역 조절 기능을 확인하려고 한다. 이를

위해 유충 및 식물의 각 추출물이 생쥐의 비장 세포를 자극하여 사이토카인의 분비를 조절하는지 또는 혈관내피세포에서의 혈관확장 및 혈관 내피 성장 인자 분비에 관련이 있는지 관련성을 살펴보기로 한다.^{3,4)} 특히 고형암의 성장은 많은 부분 미리 존재하는 혈관으로부터 신생혈관을 만들어 나가는 혈관신생(angiogenesis)에 의존하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 암의 성장을 저지하기 위해서 혈관신생을 억제하는 접근은 암을 치료하는 데 중요한 역할을 할 수 있고, 따라서 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 분비를 조절하는 것은 항암 효과를 나타내는 물질들의 한 기전으로 파악 될 수 있을 것이다.^{6,7)}

그러므로 본 연구자들은 민간에서 하늘타리의 수액과 이를 기주식물로 하여 제주도에 주로 많이 서식하는 유리나방(*Melittia inouei*) 유충의 추출물에 대한 면역 활성 작용을 과학적으로 검증하고자 본 연구에 착수하였다.

*교신저자(E-mail) : amy@rda.go.kr
(FAX) : 031-290-8543

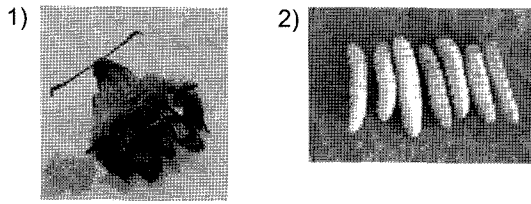


Fig. 1. *Melittia inouei* and its larvae. *Melittia inouei* larvae were collected in Jeju located in South Korea.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 추출 - 제주도 자생 하늘타리에 서식하는 유리나방(털보다리), 유리나방(*Melittia inouei*, Mellitini sp.) 유충(Fig. 1) 및 유충의 기주식물인 하늘타리 총령(*Trichosanthis gall*)과 수액은 2004년 7월에 제주도 조천읍 지역에서 채취하여 사용하였다. 유리나방 유충은 -70°C 에서 동결시킨 다음 동결 건조한 후 미세하게 분쇄한 시료(50 g)를 50% 메탄올과 증류수로 $90^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간 동안 환류냉각 추출하여 여과시킨 추출물을 진공 농축한 다음 동결 건조한 것을 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다. 또한, 하늘타리의 수액은 채취 즉시 -70°C 에서 동결시킨 다음 동결 건조한 것을 그대로 사용하였으며, 유충의 기주부위에 있는 총령은 정선, 세척, 절단 등 전처리한 다음 동결 건조(50 g)하여 미세하게 분쇄한 시료를 80% 메탄올로 $90^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 5시간 동안 환류냉각 추출하여 여과시킨 추출물을 진공 농축한 다음 동결 건조한 것을 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다. 각각 수득물은 수용성 추출물이 유리나방 유충 건조물 대비 16.8%, 유충메탄올 침전물이 유충건조물 대비 14.5%, 총령메탄올 침전물이 총령건조물 대비 12.6% 이상이었으며 하늘타리 수액을 채취하여 동결건조시 하늘타리 수액 대비 0.6%의 건조물을 얻을 수 있었다.

실험동물 - 암컷 순계인 C57BL/6 mice (5~6주령)를 대한 Bio-Link (충청북도 음성)로부터 구입하였다. 실험용생쥐는 특정 병원균이 없는 (specific pathogen-free, SPF) 동물로 삼성 서울병원 실험동물 연구실에서 ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) guideline에 따라 사육되었다. 실험 기간 중 사료와 물은 자유롭게 섭취 시켰고, 12시간 명·암 조건을 유지하였다. 모든 동물은 실험을 시작하기 전 일주일 동안 적응 기간을 거쳤다.

비장 단핵 세포 분리 - 경추 탈골로 희생시킨 쥐에서 비장을 적출하여 complete medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 medium)에서 스테인리스 스틸 망을 통과시켜 단핵세포로 만들었다. 적혈구는 0.17 M Tris-buffered 0.15 M ammonium chloride 용액 (pH 7.2)으로 용혈 시킨 후 medium으로 씻어 제거하였다. Com-

plete medium에 부유시킨 비장 유핵세포는 hemocytometer를 이용하여 숫자를 세었고, trypan blue exclusion 방법으로 생존율 (85% 이상)을 확인하였다. 모든 실험 과정은 무균 상태에서 시행되었다.

비장세포 증식효과조사 - 유리나방유충 추출물의 비장 단핵세포 증식 유도 기능을 확인하였다. 형광 물질인 carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE: Molecular Probes Europe BV, The Netherlands)를 비장 단핵 세포에 결합시킨 후 양성대조군으로 T 및 B-세포에 대한 mitogen인 concanavalin-A (CON-A) 및 lipopolysaccharide (LPS)를 최종농도가 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였으며, 시료로는 유리나방 유충 추출물, 하늘타리수액추출물을 10 mg/ml ~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 공비 10으로 처리하여 96시간 배양한 후, 분열한 세포내의 형광 발현도가 증식유도 이전에 비해 감소하는 정도를 flow cytometer로 측정하는 방법을 사용하였다. 형광 발현이 감소된 세포의 비율을 % of proliferating cell로 표현하였다. 분석할 비장세포들을 HBSS (Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA)에 5×10^6 cells/mL의 농도로 맞추어 CFSE 0.5 M을 첨가하여 37°C 압소에서 10분간 반응시킨 후, 5% FBS가 첨가된 차가운 HBSS로 2회 세척한 후 2×10^6 cells/mL의 농도로 24 well plate의 각 well에 넣고 37°C , 5% CO_2 및 가습 조건에서 96시간 배양한다. 배양 후 수확한 비장세포의 형광 발생 정도를 flow cytometer로 측정 한다.^{8,9)}

비장세포로부터 Cytokine의 분비 측정 - 비장 림프구 1×10^7 을 여러 가지 추출물 각각의 농도와 함께 24 well plate에서 37°C , 5% CO_2 및 가습 조건으로 24시간 배양한 상등액 중에서 분비된 cytokine^{3,4)}(TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) 및 암의 전이인자의 하나인 VEGF^{6,7)}를 ELISA assay kit (R&D systems, Minneapolis, USA)로 측정하였다. 비장 임파구 자극의 양성 대조군으로 T cell (ConA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 B cell mitogen (LPS, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가 되었다. 시험에 사용된 추출물은 유리나방유충(물, 메탄올) 추출물, 총령메탄올 추출물, 하늘타리 수액으로 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 mg/ml로 첨가하여 비장 면역세포 자극능을 확인하였다.

혈관내피세포에 대한 NO 산생능 조사 - NO 산생은 Griess 시약을 사용하여 세포배지로 아질산이온축적으로 측정되어진다. 즉, 소의 폐혈관내피세포(CPAE)에 유리나방 추출물을 처리하여 24시간 배양하고 VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 아질산나트륨량을 흡광도를 측정하여 계산하였다.¹⁰⁾ 대조약물로 생체 내에서 NO를 산생하여 혈관 이완에 관여하는 sodium nitroprusside, dihydrate (SNP)를 사용하였다.

통계처리 - 분석결과와 통계는 실험군 당 평균치와 표준편차로 계산하였고 군 간의 차이는 Student's t-test를 이용하였다.

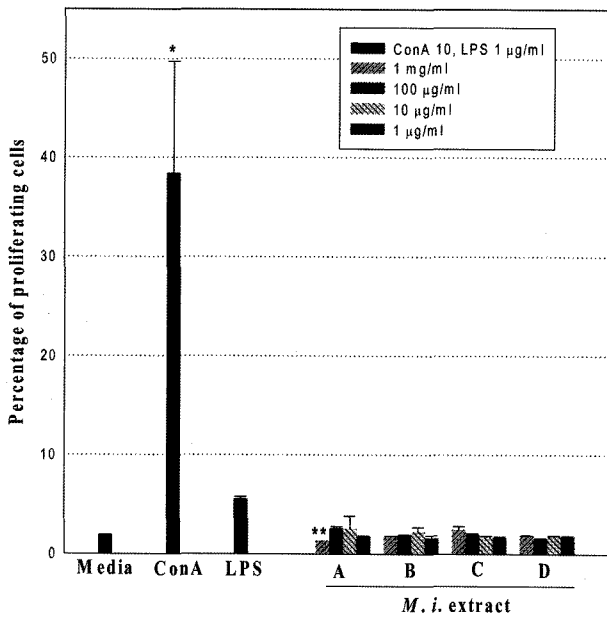


Fig. 2. Proliferative effect of *Melittia inouei* larvae extract on normal splenocytes were co-incubated with the indicated doses of the extracts for 48 h, respectively. A, *Trichosanthis* gall (*Melittia inouei* eggs on *Trichosanthis* plant) methanol extract; B, *Melittia inouei* larvae methanol extract; C, *Trichosanthis kirilowii* sap extract; D, *Melittia inouei* larvae water extract. The proliferation of these cells were measured by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) assay. LPS p<0.05, and A-1 p<0.01, compared with the untreated group by Student's t-test.

결 과

비장세포 증식효과조사 - 유리나방 (*Melittia inouei*) 및 하늘타리 추출물이 C57BL/6 마우스를 치사시켜 배양한 비장세포에 미치는 면역세포 활성을 조사한 결과 양성대조군으로 T 및 B-세포에 대한 mitogen인 concanavalin-A (CON-A) 및 Lipopolysaccharide (LPS)에 비하여 증식반응을 유도하지 못하여 면역 세포기능을 활성화시키지 못하였다(Fig. 2).

비장세포로부터 Cytokine의 유도분비 조사 - 면역 세포인 생쥐 비장 단핵세포는 유리나방 (*Melittia inouei*) 총령추출물에 의해 TNF- α 의 분비가 촉진 되었다(Fig. 3-3). 이는 총령 추출물에 의해 내재성 면역(innate immunity)에 관여하는 대식 세포 등이 자극되었음을 시사 하는 것일 수도 있다. 추출물 1 mg/ml를 비장세포에 투여시 inflammatory cytokine인 TNF- α 의 분비를 유리나방 총령추출물(A군, 1183 pg/ml), 하늘타리 수액 추출물(C군, 1377 pg/ml), 유리나방 유충 물 추출물(D군, 574 pg/ml)로 증가시켰다. 유리나방의 기주식물인 하늘타리 수액추출물에 의한 TNF- α 분비 증가는 이 식물이 항암 효과¹¹⁾를 기대하는 민간요법으로 쓰이는

기전을 시사하는 것일 수 있다. 그러나 T helper cell의 활성화를 의미하는 IL-10 (Th2)이나 IL-12 (Th1)의 분비에 대한 영향은 미미하였다. 또한 세포 면역의 effector로 간주되는 IFN- γ 분비의 경우 양성 대조군인 콘카나발린 (Concanavalin) A에 의한 분비 자극과는 상반되게, 어떤 추출물도 비장 면역세포를 자극 하지 못했다(Fig. 3). 혈관 신생을 촉진시키고 면역 기능 억제에 관여하는 VEGF의 경우, 모든 추출물의 저용량 (10 μ g/ml) 자극에 의해 분비 억제제가 관찰되었으나, 용량 증가에 따라 분비량도 비례적으로 VEGF 분비가 최대 5배 증가함을 관찰하였다. 그러나 유의적 증가를 보이는 고용량 하늘타리 수액추출물(C군, 10 mg/ml) (대조군 대비 289%)외에는 VEGF 분비 증가 유도에 따른 면역억제, 혈관 신생 등의 부작용은 염려 하지 않아도 될 것으로 생각된다.¹²⁾ 일부 추출물의 저용량에서 보여지는 VEGF 분비 억제 현상은 이 물질에 의한 항암효과 기전의 일부로 유추되어질 수 있으리라 생각된다(Fig. 4).¹³⁾

혈관내피세포에 대한 NO 산생능 조사 - 소의 폐혈관내피세포(CPAE)에 유리나방 추출물을 처치하여 24시간 배양하여 NO 산생을 조사한 결과 혈관내피세포(CPAE)에 대한 산화질소(NO)의 산생은 하늘타리수액 10 mg/ml 투여시 현저한 증가를 보였다(Fig. 5). 이 현상은 같은 추출물 같은 용량에 의해 VEGF 및 TNF- α 의 분비가 증가 된 것과 연관하여, 하늘타리수액 추출물이 고용량(10 mg/ml)에서 혈관 신생 작용에 관여 할 수 있음을 강력히 시사하고 있다. 그러나 조추출물의 한계로 인하여, 정확한 기전 확인을 위하여 보다 정제된 물질을 이용한 실험이 요구되어진다.

고 찰

실험의 결과로부터 각 추출물이 *in vitro* system에서 면역 세포를 자극하여, 세포 면역과 관련된 cytokine을 분비하게 하는 능력은 미미한 것을 확인하였다. 그러나 총령추출물과 하늘타리 수액 추출물의 경우 염증성(inflammatory) cytokine인 TNF- α 의 분비를 증가시키는 것으로 관찰되었다. 고용량 하늘타리 수액추출물(10 mg/ml)의 VEGF 분비 증가 유도에 따른 혈관 신생의 가능성을 가져 저용량 투여가 요구되어진다. 하늘타리 변종인 노랑하늘타리(*Trichosanthes kirilpwii* var. *japonica*)의 메탄올 추출물이 HL-60 세포의 apoptosis를 유도하여 백혈병세포의 성장을 저해하여 암치료제로 이용할 수 있는 새로운 근거를 제시한다¹⁴⁾는 기존의 연구결과와도 하늘타리의 약효 구명에 상호 보완적 성격을 가진다. 또한, 혈관내피세포(CPAE)에 대한 산화질소(NO)의 생성이 하늘타리 수액 10 mg/ml 투여시 현저한 증가를 보인 것과 함께 이 결과는 내재성 면역(innate immunity)의 활성화가 민간에서 전해 내려오는 약효의 부분적 기전이 될 수 있음을 시사한다.

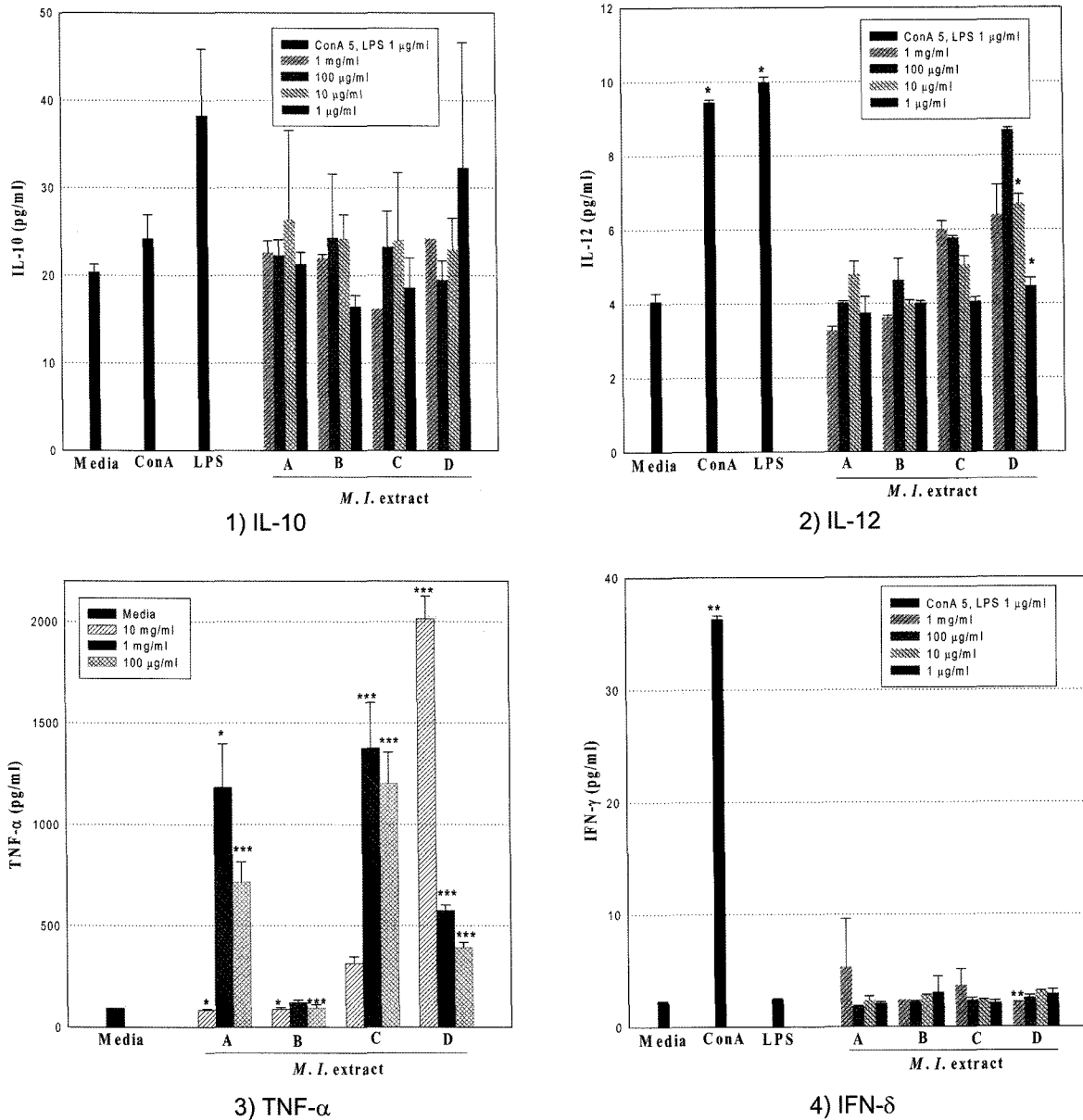


Fig. 3. Production of cytokine from normal splenocytes stimulated by crude extracts from *Melittia inouei* larvae extract in 96 well plate for 24 h. The level of each cytokine (pg/ml) in the supernatant of the cultures was determined by ELISA kits. A, *Trichosanthis* gall methanol extract; B, *Melittia inouei* larvae methanol extract, C, *Trichosanthis kirilowii* sap extract; D, *Melittia inouei* larvae water extract. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.001$ compared with the untreated group by Student's t-test.

또한 쥐의 비장세포를 자극하여 VEGF 분비 및 혈관내피 세포(CPAE)의 산화질소(NO)의 생성을 현저히 증가시킨 하늘타리수액 10 mg/ml의 조 추출물이 고 용량에서 혈관 신생에 관여 할 가능성을 시사하고 있다. 반면 저용량에서 보여지는 이들 물질, 즉 총령의 VEGF 분비 억제 효과는 혈관 신생 억제 등을 통한 항암효과의 기전이 될 수 있음을 시사한다. 그러나 이들 추출물에 의한 항원 특이 세포 면역 활성화에 의한 약효는 기대 할 수 없을 것으로 생각 된다.

결론

유리나방 유충 시료를 동결 건조하여 마우스 비장세포에 대하여 시료를 처리하여 배양한 결과 세포 면역 관련 cytokine (IL-10, IL-12, IFN- γ)의 분비에는 아무런 영향을 나타내지 못하는 것으로 확인 되었다. 또한 혈관 신생과 관련하여 VEGF의 분비를 1 mg/ml 이하의 저용량 농도에서 조절하였다. 다만 총령추출물 및 하늘타리수액이 비장 단핵 세포를 자극하여 TNF- α 및 NO의 분비를 증가 시키는 것

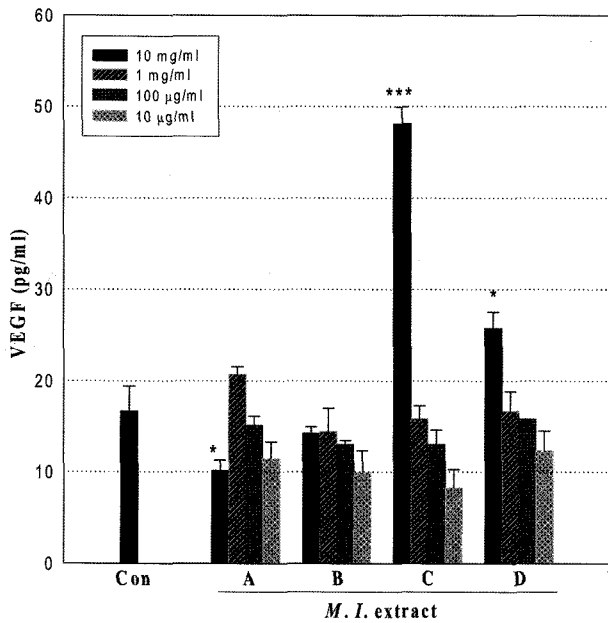


Fig. 4. Effects of the *Melittia inouei* larvae extract on mouse VEGF immunoassay. *Trichosanthis kirilowii* aqueous fraction from the *Melittia inouei* larvae extract (10 mg/ml) appeared the remarkable binding of mouse VEGF polyclonal antibody. A, *Trichosanthis* gall methanol extract; B, *Melittia inouei* larvae methanol extract, C, *Trichosanthis kirilowii* sap extract; D, *Melittia inouei* larvae water extract. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with the untreated group by Student's t-test.

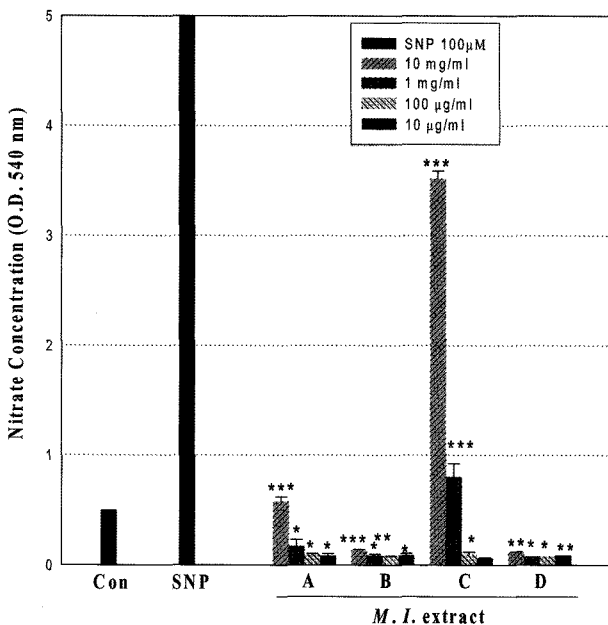


Fig. 5. Measurement of NO production of *Melittia inouei* larvae extract in CPAE cells. A, *Trichosanthis* gall methanol extract; B, *Melittia inouei* larvae methanol extract, C, *Trichosanthis kirilowii* sap extract; D, *Melittia inouei* larvae water extract. *** $p < 0.001$ compared with the untreated group by Student's t-test.

으로 관찰되었고, 이는 이들 물질이 대식세포 활성화 등 내재성 면역(innate immunity) 자극을 유도 하는 것을 시사한다. 이 기전이 민간에서 향암 요법에 하늘타리수액을 사용하는 과학적 근거의 일부가 될 가능성을 시사한다. 그러나 본 실험을 *in vitro*에서 행해진 것이며, 조추출물을 사용하였고 비장 면역 세포도 T, B 및 대식 세포가 섞여있는 상태로 사용하였으므로, 좀 더 정확한 기전을 찾기 위해서는, 추출물의 purification과 각 면역세포의 분리, 그리고 *in vivo* 실험을 통한 깊은 고찰이 요구된다. 본 연구진은 이를 위해 실험을 계획하고 있다.

인용문헌

- Kim, J. G. (1996) Traditional drugs of the East. pp. 82. YoungLimSa Press, Seoul.
- 장기창, 김성철, 송은영, 김공호, 박기훈 (2004) 2004년 보고서, 난지 지원식물 상품화 및 기능성물질 탐색, 93-115, 농촌진흥청 난지농업연구소, 제주.
- Young, H. and Hardy K. (1995) Role of interferone-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.*, **58**, 373-381.
- Thomson A. (1994) The Cytokine Handbook 2nd Ed., Academic Press.
- Ruddon, R. W. (1987) Cancer Biology, Biology of tumor metastasis, 443-467, Oxford University Press, New York.
- Lee, S. J. and Lee, H. K. (2005) Sanguinin H-6 blocks endothelial cell growth through inhibition of VEGF binding receptor. *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1270-1274.
- Carmeliet, P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, **69**(suppl 3), 4-10.
- Weston, S. A. and Parish, C. R. (1990) New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies : Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy, *J. Immunol. Method*, **133**, 87-97.
- Hasbold, J., Gett, A. V., Rush, J. S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. and Hodgkin, P. D. (1999) Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation *in vitro* using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 516-522.
- Nims, R.W., Darbyshire, J.F., and Saavedra, J.E. (1995) Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. *Methods*, **7**, 48-54.
- Suh, K. S. Muto, M., Gerdes, M., Crutchley, J. M., Mutoh, T., Edwards, L. E., Dumont, R. A. Sodha, P., Cheng, C., Glick, A. and Yuspa, S. H. (2005) Antisense suppression of the chloride intracellular channel family induces apoptosis, enhances tumor necrosis factor α -induced apoptosis, and inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, **65**, 562-571.
- Buanecl, H. L., D'Anna, R., Lachgarl, A., Zagury, Bernard, J., Ittele, D., d'Alessio, P., Hallez, S., Giannouli, C., Burny, A., Bizzini, B. GalW, R.C., and Zaguryl, D. (1999) HPV-16

- E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed & Pharmacother*, **53**, 424-31.
13. Strauss, L., Volland, D., Kunkel, M. and Reichert, T. E. (2005) Dual role of VEGF family members in the pathogenesis of head and neck cancer (HNSCC): Possible link between angiogenesis and immune tolerance. *Med. Sci. Monit*, **1**, BR280-292.
14. Kim, S. C., Park, S. Y., Hyoun J. H., Lee Y. K., Park, D. B. Kang S. Y., Yoo, E. S. and Kang, H. K. (2003) Induction of apoptosis by extract of *Trichosanthes kirilpwii* var. *japonica* in HL-60 leukemia cells. *Yakhak Hoeji*, 319-324.

(2006년 5월 15일 접수)