

## 화살나무 및 느릅나무 추출물이 면역계세포의 활성에 미치는 영향

김종면 · 최민순\* · 조정곤 · 정영미 · 박태욱

전북대학교 수의과대학  
군산대학교 해양산업대학\*  
(1994년 4월 9일 접수)

### Effect of *Euonymus alatus* and *Ulmus clavidiana* var *japonica* on the immune system

Jong-myeon Kim, Min-soon Choi\*, Jeong-gon Cho  
Young-mee Jung, Tae-wook Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University  
College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University\*

(Received April 9, 1994)

**Abstract** : We have previously shown that crude water extract of *Euonymus alatus* (EA) had strong prophylactic effect against chemically induced-and tumor cell implanted-cancer, and that the mechanisms responsible for its anti-tumor effects were due to nonspecific enhancement of the NK cell activities and the cell mediated immunity. However, it was unknown that any components of crude extract did work so, since it consisted of several components. In this paper, we fractionated the crude water EA-extract into several fraction such as hexane-, ethylether-, ethyl acetate-, n-butanol- and water soluble-fraction, and screened the immune regulating activities of each fraction by the evaluation of lymphokine production and activated lymphocyte proliferation. As a result of the component fraction of EA-extract, it was found that n-butanol fraction was a potent immunostimulator, and the remained water soluble fraction also contained some stimulator, But, other fraction did not showed any remarkable effect. It is therefore suggested that EA-glycosides in n-butanol fraction may be new one of the potent biological response modifiers.

The present study was also undertaken in an efforts to investigate the effects of elm-bark(EB, *Ulmus clavidiana* var *japonica*), which has been used for curing ulcer and inflammation as a folk medicine without any kind of experimental evidence to support this, on the cellular- and humoral-immune responses, lymphocyte function and NK cell activities in mice. Regardless of time and duration of EB-treatment, Arthus reaction and antibody response to SRBC were not modified by EB, but delayed hypersensitivity to SRBC was significantly enhanced only when EB was treated prior to SRBC-sensitization. EB slightly inhibited the proliferation responses of splenocytes to PHA-stimulation, but it significantly augmented the responses of these cells to *S aureus* Cowan 1 and Con A-activation, and these effects were manifested only when EB was added at culture initiation. EB did not influence Ig secretion

\*본 논문은 1990년도 교육부 대학부설 유전공학연구소연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

of spleen cells but it significantly augmented the Con A-induced IL 2 and MIF production of splenocytes. NK cell activities of splenocytes were markedly rised when effector cells were pretreated with EB and this augmentation was due to the increase of binding affinity of effector cells to target cells and the target cell lytic activities of effector cells. These results led to the conclusion that EB triggers increase of cellular immune responses, such as delayed hypersensitivity, lymphokine production and NK cell activities. Also these results suggested that EB contains potent immune stimulants, which may provide the rational basis for their therapeutic use as one of the new biological response modifiers.

**Key words** : *Euonymus alatus*, *Ulmus clavidiana* var *japonica*, immune-stimulators, DTH, NK cell activity, lymphocyte functions

## 서 론

현재까지 세계적으로 수십만종의 약용식물이 민간요법에 사용되고 있으며, 많은 연구자에 의해 그들로부터 약리 활성을 보이는 많은 약품이 이미 개발되었거나 또는 개발 중에 있다. 특히 세포분열 및 기능의 변화와 관련된 일부의 천연산물은 중요한 생물학적 반응조절제(biological response modifier, BRM)로 취급되어 그 특성은 물론 작용기전에 대해 자세히 그리고 활발히 연구되고 있다. 이에 반해 국내의 경우 BRM 효과를 보이는 것으로 알려져 전송되어 온 많은 민간약들이 있음에도 불구하고 이들에 대한 체계적인 검토가 없을 뿐만 아니라 실제로 이들 민방약들이 어떤 생물학적 활성을 가지고 있는가 하는 연구도 몇몇 연구들을 제외하고는 거의 이루어져 있지 않는 실정이다.

화살나무(*Euonymus alatus*, EA)는 한반도 중심의 동북 아시아에 분포되어 있는 목본식물이며, 콜크질이 잘 발달되어 있는 그 줄기가 약용으로 사용되고 있다. EA 추출액은 소화기장애 및 종양 등의 치료에 탁월한 효과가 있다고 알려진 민간약이긴 하지만, 추출액내의 약용성분이 어떤 것인지 본태가 전혀 밝혀져 있지 않았고 그 효과의 유무 및 정도조차도 실험적으로 확인된 바 없었다. 이에 본 연구자들은 EA 추출액내의 약용성분의 화학적 특성을 밝히기 위해 EA추출물내에 세포의 증식 및 면역조절과 관련된 BRM작용물질과 항종양작용물질이 함유되어 있는지 그리고 이들 물질의 작용 정도는 어떠한지를 확인하고자 시험하였던 바 그 결과<sup>1</sup> EA는 탁월한 항종양작용을 보였으며 이와 같은 EA의 항종양작용의 기전은 EA의 종양증식에 미치는 직접적인 작용보다는 EA가 생체의 자연성 과민반응, 림프구의 증식능, 림프카인 생산능, NK세포의 활성능, 탐식세포의 유주능을 항진시키는 등 비특이적으로 생체면역제를 활성화시킴에 기인함을 제시하여 결과적으로 EA에는 우수한 항종양 및 면역조절제가 함유되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 EA의 실제적인 임상에서의 적용을

위해서는 그 작용성분의 본태를 밝히기 위한 실험이 요망되었다.

느릅나무(*elm-bark*, *Ulmus clavidiana* var *japonica*, EB)는 작은 가지에 콜크질이 발달된 쌍떡잎 갈래꽃류에 속하는 목본식물으로서 우리 나라 야산에 산재하여 서식하고 있으며, 오래 전부터 한국 전래 민간요법에서 그 근피를 고약으로 만들어 염증 및 농양 환부에 도포하여 항염제로 사용하거나 또는 종양추출하여 소화기 장애 및 종양환자에 투여하여 왔다. 그러나 EB 역시 EA와 마찬가지로 아직까지 그 효과의 진위 및 정도조차도 실험적으로 입증된 바 없으며, 근피내의 약용성분이 어떤 것인지 본태가 전혀 밝혀져 있지 않다.

본 실험은 1) EA추출물내에 BRM효과를 보이는 물질의 특성을 밝히기 위한 연구의 제 1단계로써 EA추출물을 hexane분획, ethyl ether분획, ethyl acetate분획, n-butanol분획 그리고 잔여 수용성분획으로 나누어 이들 각각의 분획이 림프구의 림포카인 생산능 및 증식능에 미치는 영향을 실험하였으며, 2) 또 다른 새로운 BRM원을 개발하기 위하여 EB 수용성 추출물을 얻은 후 이의 면역조절 작용을 평가하기 위하여 실험하였다. 그 결과, 1) EA추출물의 hexane분획, ethyl ether분획 및 ethyl acetate분획은 면역조절 활성을 보이지 않았으나, n-butanol분획과 잔여 수용성 분획에서는 강력한 면역증강활성을 보였으며, 2) EB추출물은 면역반응 특히 세포성 면역반응의 증강작용을 보였기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**EA추출물의 제조 및 분획** : EA추출물의 제조는 전보<sup>1</sup>에서와 같이 실시하였으며, EA추출물의 분획은 Ishikura et al<sup>2</sup>의 방법에 준하여 각각의 용매를 이용하여 hexane 분획, ethyl ether 분획, ethyl acetate분획, n-butanol분획 그리고 잔여 수용성 분획으로 만든 후 여

과-냉동건조하여 사용하였다.

EB추출물의 제조 : 민방에서 사용하는 방식대로 느릅나무 근피를 깨끗이 세척하여 건조한 다음 그 무게의 10배에 해당하는 증류수에 넣고 5시간 중탕하여 수용성 추출액을 얻었다. 그 후 이를 0.2 $\mu$ m pore size의 여과지로 여과한 다음 냉동건조시켜 균질한 분말로 만들었다. 추출물은 목적에 따라 생리식염수 또는 RPMI 1640(Gibco)에 적절한 농도로 용해, 재여과하여 사용하였다.

마우스 : 생후 7-8주된 ICR계 마우스를 암수 구별없이 사용하였으나 실험군 및 대조군은 동성(sex-matched)의 마우스로 하였다. 이들 동물은 수도물과 pellet사료를 공급하고 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 사육하였다.

단핵세포 및 림프구의 준비 : 편도적출 환자로 부터 편도를 그리고 마우스로 부터 비장을 얻어 전 보<sup>1</sup>에 준하여 단핵세포와 T 및 B림프구를 분리한 다음 이를 각각 우태아혈청(FCS, Gibco)이 10% 함유되어 있는 RPMI 1640에 1-2 x 10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 부유하여 사용하였다.

단핵세포 및 림프구의 증식능 검사 : 분리한 각각의 세포를 10% FCS이 함유되어 있는 RPMI 1640에 1-2 x 10<sup>6</sup> cells/ml되게 부유하여 자극하지 않거나 또는 PHA(5 $\mu$ g/ml, Sigma), Con A (2 $\mu$ g/ml, Sigma) 및 *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC, 0.0075%v/v, Calbiochem-Behring)으로 자극하여 flat bottomed 96-well microculture plate (Dinatech)의 각 well에 0.1ml씩 분주한 다음 여기에 여러 농도의 각 시료액을 가하여 각 well 당 총량이 0.2ml씩 되도록 조정하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 72시간 배양하였다. 배양 세포의 증식능 측정은 통상의 [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation 방법을 이용하였다.

Lymphokine 생산과 그 역가 측정 : 분리한 림프구를 5% FCS이 함유되어 있는 RPMI 1640에 1x10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 부유하여 IL 2 및 MIF생산을 위해서 Con A-sepharose (10 $\mu$ g/ml)로 자극하여 여러 농도의 각 시료액을 가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 40시간 배양하였다. 그 후 이를 원심하여 상청액을 얻어 각각의 역가검정에 공시하였다. IL 2의 역가검정은 IL 2 의존성 세포주인 CTLL 2세포를, MIF의 역가검정은 닭 백혈구를 표적세포로 사용하여 전 보<sup>1</sup>에서와 같이 실시하였다.

족적종창반응 검사와 응집소 역가 측정 : 본 실험에서는 면양적혈구를 항원으로 사용하여 전 보<sup>3</sup>에서와 같은 방법으로 측정하였다.

림프구의 Ig 생산능 측정 : 비장세포부유액을 SAC

(0.0075%v/v)으로 자극하여 전 보<sup>3</sup>에서와 같이 배양하여 배양상청액을 얻은 후 배양액내에 분비된 Ig 함량은 ELISA법을 이용하여 측정하였다.

NK세포의 활성능 측정 : 마우스 비장세포를 작동세포로, 마우스 lymphoma cell line 인 Yac 1 세포를 표적세포로 하여 전 보<sup>3</sup>에 기술한 single cell level agarose assay방법에 준하여 실시한 후 다음 공식에 의하여 NK세포의 백분율을 계산하였다.

% NK cells = % conjugated effector cells  $\times$  % conjugated target cell lysed/100

## 결 과

각 EA분획이 림프구의 증식에 미치는 영향 : 림프구의 증식능에 미치는 각 EA분획의 영향을 평가한 결과 사람 편도선 T 및 B세포(Table 1) 및 마우스 비장세포 모두 대상세포 및 자극한 마이토겐에 따라서 다소의 정도 차이는 보이나, 그 증식능이 hexane분획, ethyl ether분획 또는 ethyl acetate 분획물질을 첨가시에는 추출물을 첨가 하지 않은 대조와 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 n-butanol분획 또는 잔여 수용성 분획을 첨가시에는 미분획 추출물 첨가한 군에서와 같이 현저한 증식의 항진을 보였으며, 그 항진의 정도는 미분획 추출물 첨가군보다 n-butanol분획 첨가군에서 더욱 높았으나 잔여 수용성 분획을 첨가한 군에서는 다소 낮았다.

각 EA분획이 림프구의 lymphokine 생산에 미치는 영향 : 림프구의 lymphokine 생산에 미치는 EA 각 분획의 영향을 평가하였던 바 Table 2와 같이 Con A로 자극 유도한 IL 2 및 MIF 생산능에 ethyl acetate분획은 유의한 영향을 미치지 않았으나, 미분획 추출물, n-butanol분획 및 잔여 수용성 분획은 모두 그 생산을 현저히 항진시켰으며, 항진의 정도는 미분획 추출물에 비하여 n-butanol분획 및 잔여 수용성 분획에서 우수하였다.

EB가 족적종창반응과 항체생산에 미치는 영향 : EB추출물을 마우스에 SRBC로 면역하기 전 또는 후 4일간 복강내로 투여하고 면역 4일에 야기주사하여 발현되는 족적종창반응과 혈청항체를 측정하였던 바 Table 3에서와 같은 성적을 얻었다. 즉 야기주사 3시간에 측정된 Arthus반응은 면역 전 EB를 투여한 군에서는 대조와 차이를 보이지 않았으나 면역 후 4일간 투여한 군에서는 대조보다 다소 감소되었으며, 면역 전 및 후 8일간 투여한 군에서는 약간 증가되었다. 그러나 야기주사 24시간에 측정된 지연성과민 반응은 EB를 면역 전 4일간 투여

**Table 1.** Effect of *Euonymus alatus* extract on the proliferation responses of human tonsillar T and B lymphocytes

Fraction	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	[ $^3\text{H}$ ] TdR uptake(cpm)			
		B lymphocytes		T lymphocytes	
		Medium	SAC	PHA	Con A
Medium		912	12,618	42,452	36,841
Crude extract	0.1	878	22,369	52,127	42,647
	1	958	30,245	77,614	58,216
Hexane	0.1	967	13,006	40,248	37,288
	1	752	12,982	39,910	35,916
Ethyl acetate	0.1	765	12,084	44,315	36,462
	1	875	11,782	44,045	37,166
Ethyl ether	0.1	1,052	12,286	41,199	38,244
	1	810	10,914	43,085	37,862
n-Butanol	0.1	1,105	27,698	65,202	46,736
	1	972	30,862	80,914	59,222
Water soluble	0.1	927	18,627	46,637	39,948
	1	1,014	24,338	60,478	45,695

Purified human tonsillar T and B cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were activated with *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC, 0.0075% V/V), PHA ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Con A ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and cultured for 72hrs in the presence or absence of varying concentrations of each EA-fraction. [ $^3\text{H}$ ] TdR( $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) was pulsed into each well at last 12hr before culture-termination.

**Table 2.** Effect of *Euonymus alatus* extract on Con A-induced lymphokine production of mouse spleen cells

Fraction	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	% of control	
		IL 2	MIF
Crude extract	10	132.2	131.7
	1	140.7	138.5
	0.1	124.6	91.1
Ethyl acetate	10	106.1	105.2
	1	107.5	100.0
	0.1	103.9	93.4
n-Butanol	10	129.4	186.2
	1	157.9	134.6
	0.1	138.2	105.1
Water soluble	10	135.3	184.1
	1	146.3	173.6
	0.1	140.8	137.9

Mouse splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in RPMI 1640 with 5% FCS and  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  Con A-sepharose for 48 hrs in the presence of varying conc. of each fractionated extract. The culture sup was harvested and assayed for lymphokine content using corresponding target cells. Results are normalized as % of control.

**Table 3.** Effect of *Ulmus clavidiana*(EB) extract on the footpad swelling reaction and antibody production to sheep erythrocytes (SRBC) in ICR mice

Time of extract treatment relative to SRBC-sensitization	Footpad thickness ( $\mu\text{m}$ )		Hemagglutination titer ( $\log_2$ )
	3hr(Arthus)	24hr(DTH)	
Untreated control	$33.2 \pm 2.1$	$24.3 \pm 2.4$	$6.8 \pm 1.6$
4 days before SRBC	$32.8 \pm 3.5$	$41.2 \pm 3.8$	$6.5 \pm 1.8$
4 days before/after SRBC	$37.2 \pm 1.9$	$26.2 \pm 2.9$	$7.2 \pm 2.1$

Mice were sensitized with  $1 \times 10^7$  SRBC on day 0 and challenged with 0.03ml of 20% SRBC on day 4. EB extract (daily 1mg/mouse) was injected ip for the indicated days. Footpad thickness was measured at 3 and 24 hr after challenge. All mice were assayed for hemagglutinin antibodies at 7 days after SRBC-sensitization.

Table 4. Effect of *Ulmus clavidiana*(EB) on the proliferation of mouse splenocytes

Extract (mg/ml)	[ <sup>3</sup> H] TdR uptake (cpm)			
	Medium	SAC	PHA	Con A
0	140	38,645	53,966	27,495
0.01	195	40,761	51,002	59,657
0.1	260	46,380	49,106	66,850
1	281	45,744	46,083	49,146
10	198	37,425	36,287	32,239

Spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were activated with *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC, 0.0075%), PHA( $5 \mu\text{g/ml}$ ) or Con A ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), and cultured for 72hrs in the presence of varying conc. of EB extract. [<sup>3</sup>H] TdR was pulsed at last 12 hr before culture termination.

Table 5. Effect of *Ulmus clavidiana*(EB) on the Con A-induced lymphokine production of mouse spleen cells

Extract (mg/ml)	% of control	
	IL 2	MIF
0.01	121	142
0.1	136	158
1	95	123

Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in RPMI 1640 with 5% FCS and  $10 \mu\text{g/ml}$  of Con A-sepharose for 48 hr in the presence of varying conc. of EB-extract. The culture sup was harvested and assayed for lymphokine content using corresponding target cells such as IL 2 dependent CTLL 2 cells (for IL 2) and chicken leucocytes (for MIF). Results are normalized as % of control.

Table 6. Effect of *Ulmus clavidiana*(EB) extract on the NK cell activities of mouse spleen cells against target Yac 1 cells

Extract (mg/ml)	% of conjugated effector cells	% of conjugated target cell lysed	% of NK cells*
Control	1.8±0.08	42.3±6.83	0.97
0.01	2.7±0.10	46.2±8.76	1.25
0.1	2.9±0.11	49.6±9.12	1.44
1	2.2±0.09	48.2±7.96	1.06

Results were the average percent and standard error of the values from 10 experiments below for 1:1 effector-target cell ratio. Effector cells were pretreated for 1 hr at 37°C with above conc. of EB extract just before the addition of target cells. \*% of NK cells=% of conjugated effector cells × % of conjugated target cell lysed/100.

한 군에서는 대조에 비하여 현저히 증강된 반응을 보였으나 면역 후 또는 면역 전후에 투여한 군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편 면역 7일에 측정된 SRBC에 대한 응집체형성은 추출물의 투여시기 및 기간에 관계없이 대조와 유의한 차이를 보이지 않았다.

EB가 비장세포의 증식에 미치는 영향 : 비장세포를 SAC, PHA 및 Con A 등으로 자극배양시 여러 농도의 EB추출을 첨가하였던 바 Table 4와 같이 EB는 SAC 자극 비장세포의 증식능은 다소 항진시켰으나 PHA 자극 세포의 증식능은 오히려 다소 억제시켰다. Con A 자극

비장세포의 증식능은 EB를 10mg/ml로 첨가시에는 대조와 차이를 보이지 않았으나 낮은 농도로 EB를 첨가배양시에는 현저히 항진되어 0.1mg/ml 농도로 첨가시에는 대조에서의 증식능에 비하여 약 2.4배 항진되었다. 한편 비장세포의 증식능에는 EB가 영향을 미치지 않아 EB자체의 mitogenic effect는 보이지 않았다. 또한 mitogen자극 비장세포의 증식능에 미치는 EB의 영향은 추출물을 배양중에 첨가시에는 관찰되지 않았고 추출물을 배양초기에 첨가시에만 발현되었다.

EB가 비장세포의 Ig 생산에 미치는 영향 : SAC자극 비장세포를 IL 2의 존재 또는 부재하에서 배양하여 Ig 생산을 유도시 여러 농도의 EB추출물을 첨가하였던 바, Ig 생산능은 IL 2 첨가 및 비첨가군 모두에서 EB에 의하여 영향을 받지 않았다.

EB가 비장세포의 lymphokine생산에 미치는 영향 : 마우스 비장세포를 Con A로 자극배양하여 lymphokine생산을 유도시 여러 농도의 EB를 첨가하였던 바 Table 5에서 보는 바와 같이 배양액내의 IL 2 및 MIF는 공히 대조에 비하여 EB를 첨가한 군에서 유의하게 증가되었는데 그 증가의 정도는 0.1mg/ml 농도의 EB를 첨가시에 더욱 현저하였다.

EB가 NK세포의 활성에 미치는 영향 : 비장세포를 여러 농도의 EB로 전처리하여 NK세포의 활성에 미치는 EB의 효과를 평가하였던 바 Table 6에서 보는 바와 같이 EB를 첨가함으로써 작동세포의 표적세포와의 결합능 및 표적세포의 용해능이 모두 유의하게 항진되어 결과적으로 NK세포의 활성도가 대조에 비하여 유의하게 증가되었다.

## 고 찰

전 보<sup>1)</sup>에서 본 연구자들은 EA추출물을 대상으로 항종양작용 및 면역계 세포의 증식과 기능을 변조시키는 생물학적 활성을 추적한 결과 EA내에 미지의 그러나 강력한 BRM물질이 함유되어 있음을 밝혔다. 따라서 본 실험에서는 EA추출물내에 함유되어 있는 BAM물질의 화학적 본태를 밝히기 위하여 우선 이 BRM 활성 물질이 추출액의 어떤 분획내에 존재하는가를 확인코자 EA추출물을 몇가지 분획으로 나누어 각 분획이 림프구 증식능 및 lymphokine 생산능에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 EA추출물내의 면역활성물질은 주로 n-butanol분획에 존재하며 일부는 잔여 수용성 분획내에 잔존함을 알 수 있었다. 이와 같은 성격은 EA의 면역증강 활성물질이 배당체일 가능성을 강력히 시사

하고 있어 현재 구체적인 화학적 본태를 밝히기 위한 실험이 진행중에 있으며 그 결과 머지 않아 새로운 BRM이 개발될 수 있으리라고 굳게 믿는다.

저자들은 서론에서 언급한 바와 같이 다른 새로운 BRM을 개발하기 위하여 그리고 현재 민방에서 항염 및 항종양 물질로 간주되어 사용되어 오고 있는 느릅나무 근피(EB)의 임상적용에 실험적 근거를 제시하고자 EB가 면역계 세포의 활성화에 관여하는가를 알아보기 위한 몇가지 실험을 하였다. EB가 생체내에서 특이항원에 대한 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 직접적인 영향을 평가하고자 마우스를 대상으로 T세포 의존성 항원인 SRBC로 면역하고 즉척종창반응으로 발현되는 지연성 과민반응과 항체반응을 측정하였다(Table 3). 그 결과 지연성 과민반응은 EB를 항원감작 전에 투여하면 항진되었으나 항원감작 전후 또는 감작 후에 투여하면 대조와 차이를 보이지 않았으며, 항체생산은 투여시기와 무관하게 대조와 차이를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 Con A 자극 비장세포의 증식능(Table 4)이 추출물을 배양초에 첨가하면 현저히 항진되었으나 세포를 mitogen으로 자극하여 배양하는 도중에 추출물을 첨가하면 유의한 영향을 미치지 못한 시험관내 성적과 부합되는 결과로써 EB의 면역조절작용은 시간 의존성 반응임을 알 수 있었다. 그러나 그 명확한 작용과 기전은 면역반응 특히 생체내 면역반응은 대식세포, T세포, B세포 그 외의 수종의 세포와 여러 인자에 의해 좌우되는 복잡한 현상이기 때문에 본실험성적만으로는 이를 설명하기에는 미흡하다. 면역조절제에 의한 면역활성의 유도는 작동세포 및 항원감작 시기에 따라 영향을 받으며, 세포분화 자극을 통하여 다양한 시기에 발현된다.<sup>4</sup>

Nowell<sup>5</sup>에 의하여 mitogen에 의한 림프구 증식능이 최초로 보고된 이래 림프구 증식능 측정은 면역학적 지표로서 응용되고 있으며, 항원 특이적 반응 및 비특이적 자극에 의하여 IL 2의존성 T림프구의 증식이 발현된다고 하였다. 본 실험(Table 5)에서 EB는 비자극 세포의 증식능에는 영향을 미치지 못하여 EB자체의 mitogenic effect는 검출할 수 없었으나, SAC자극 세포와 Con A 자극세포의 증식능은 추출물을 배양초에 첨가시에 한정하여 촉진되었으며, PHA자극 세포의 증식능에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 추출물의 작용이 세포활성화 초기단계에 작용함과 림프구의 어느 특정 아집단에만 한정적으로 작용함을 시사한다. 특히 EB에 의한 Con A 자극세포의 증식 촉진은, EB 존재하에서 Con A 자극세포의 IL 2분비(Table 5)와 IL 2의존성 세포의 IL 2에 대한 감수성(도표 생략)이 현저히 항진된 본 실험성적으로 미루어 EB가 T전구세포를 성숙 변화시켜

IL 2등의 lymphokine에 대한 수용체의 발현이 촉진됨으로써 결과적으로 그 증식이 촉진되었을 가능성도 생각할 수 있다.

Morgan et al<sup>6</sup>에 의해서 최초로 발견된 IL 2는 T림프구 증식인자로서 주로 항원 특이적 및 비특이적인 자극을 받은 CD4 cell 및 large granular lymphocyte에서 생산되는 lymphokine의 일종으로 그 기능은 T림프구의 성장 이외에 B세포의 분화인자유도, 세포독성 림프구, NK세포 및 대식세포 등의 증식 및 활성화에 관여하며,<sup>7</sup> 생성기전은 IL 2 수용체의 발현활성과 autocrine system에 의하여 증폭된다.<sup>8</sup> 본 실험에서 비장세포를 Con A로 자극배양시 EB를 가하면 IL 2 생성능이 현저히 촉진되었는데, 이와 같은 결과는 EB가 T세포의 특정 아집단에 작용하여 세포주기를 IL 2에 감수성이 높은 세포주기로 변화시켜서 IL 2의 autocrine system이 증폭되거나 또는 EB에 의하여 T세포의 표면이 수식되어 IL 2 및 타 lymphokine에 대한 감수성이 항진되거나 분비가 촉진되었으리라고 생각할 수 있다. 또한 IL 2 생성이 calcium mobilization 과 protein kinase C의 활성이 동시에 이루어 질 때 최대의 활성을 보인다는 보고<sup>8</sup>로 미루어 EB가 관여세포의 signal transduction을 변조시킴으로써 유발되었으리라고 생각할 수 있다.

본 실험에서 EB는 B세포의 증식은 다소 항진시켰으나 Ig 생산에는 영향을 미치지 못하였다. 이와 같이 EB에 의하여 B세포의 증식이 촉진됨은 물론 IL 2의 생산이 항진되었음에도 불구하고 Ig 생산이 촉진되지 않은 이유는 IL 2에 의한 B세포의 증식 및 분화는 타 BCGF 및 BCDF의 존재하에서 활성화된다는 보고<sup>9</sup>와 B세포 분화의 최종 단계에서 IL 6가 필수인자로 작용한다는 보고<sup>10</sup> 그리고 EB에 의하여 IL 6의존성 세포의 IL 6에 대한 감수성이 영향을 받지 않은 점 등으로 미루어 EB에 의하여 IL 2 생성은 촉진되나 B세포 자체에서 유도되는 IL 6와 같은 BCDF의 분비가 영향을 받지 않았거나 또는 이들 BCDF에 대한 수용체의 발현에 변조를 보이지 않았기 때문일 것이라 사료된다. 또한 이와 같이 EB가 시험관내 림프구의 Ig 생산에 영향하지 않은 성적은 항체생산에 영향을 미치지 못한 생체내 성적과 일치하였다.

NK세포는 여러 종양에 대한 자연 살해능을 보여 소위 T 비의존성 면역 감시기전에 관여하며, 바이러스 및 세균에 감염된 세포를 파괴하는 활성을 가지며, interferon, IL 2 등에 의하여 활성이 증가된다.<sup>11</sup> NK세포가 표적세포를 파괴하는 기작에 관해서는 명확하지는 않으나, 1) 표적세포를 인식하여 결합하는 시기, 2)

음해기전을 활성화 시키는 시기, 3) NK lymphotoxin 이 유리되는 시기, 4) 표적세포의 사멸시기로 나눌 수 있다.<sup>12</sup> 본 실험에서 EB로 전처리시 NK세포의 표적세포와의 결합능은 물론 결합된 표적세포의 음해능이 모두 촉진된 성적(Table 6)을 보였는데 이는 EB가 NK세포가 표적세포를 파괴하는 4단계의 과정 전체를 항진시킨 결과로 인정된다.

이상의 EB에 대한 실험결과 그 작용기전은 불명하나 EB추출물은 생체 면역반응 뿐만 아니라 시험관내 면역관여세포의 활성화에도 작용하는 중요한 면역조절제가 함유되어 있으며, 특히 이 활성물질은 T 및 NK세포의 활성을 현저히 증강시켜 항종양제로서 우수한 효능을 지닌 새로운 BRM으로 개발될 가능성이 높으리라고 사료되어 앞으로 그유효 성분의 규명은 물론 구체적인 작용기전을 밝히기 위한 후속적인 연구가 이루어져야 되리라고 사료된다.

## 결 론

본 실험은 화살나무(EA) 추출물내의 면역항진 물질이 어떤 화학적 특성을 가지고 있는지를 밝히기 위하여 EA수용성 추출물을 몇개의 분획으로 나누어 각 분획물질이 림프구의 증식 및 lymphokine생산에 미치는 영향을 평가하였고, 아울러 새로운 BRM을 개발하고자 느릅나무근피(EB) 추출물이 면역계에 미치는 영향을 평가하였던 바 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. Mitogen으로 자극한 림프구의 증식능 및 lymphokine 생산능은 EA의 hexane분획, ethyl acetate 분획 및 ethyl ether분획을 첨가시에는 영향을 받지 않았으나, n-butanol 분획 물질을 첨가시에는 유의하게 항진되었다.

2. EB는 마우스의 체액성 면역반응에는 영향을 미치지 못하였으나 지연성 과민반응은 추출물을 항원감작 전에 투여하면 유의하게 항진되었다.

3. EB는 SAC 또는 Con A 자극 림프구의 증식은 유의하게 항진시켰으나 PHA자극 세포의 증식은 다소 저하시켰으며, 이와 같은 EB의 림프구 증식촉진작용은 EB를 배양초기에 첨가시에만 관찰되었다.

4. EB는 시험관내 림프구의 Ig 생산능에는 영향을 미치지 않았다.

5. EB는 비장세포의 IL 2 및 MIF 생산능을 현저히 항진시켰다.

6. EB는 NK세포의 표적세포와의 결합능과 결합된 표적세포의 음해능 모두를 현저히 항진시켰다.

이상의 결과로 EA의 면역조절 활성물질은 n-butanol 분획내에 존재하며, EB는 EA와 같이 면역계 세포에 직간접으로 작용하여 생체 면역반응을 조절하는 활성물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Kim JM, Yang HH, Choi MS. Effect of *Euonymus alatus* on the tumorigenesis and immune responses. *Kor J Vet Publ Hlth* 18(1):in press, 1994.
2. Ishikura N, Sato S, Kurosawa K. Kaempferol 3-rhamnossylyxoside from *Euonymus alatus*. *Phytochemistry* 1976; 15:1183.
3. 최민순, 이정호, 소준노, 김종면. Lentinan이 면역활성에 미치는 영향. *대한면역학회지* 1990; 12:235.
4. Debbert G, Tucker D. T cell interaction in humoral and cell-mediated immunity. *Nature(New Biol)* 1972; 238:114.
5. Nowell PL. Phytohemagglutinin and indicator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res* 1960; 20:462.
6. Morgan DA, Rusecetz FW, Galla RCY. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bonemarrow. *Science* 1976; 193:1007.
7. Runin BY, Gupta SI. Differential efficiency of human type 1 and II interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77:5928.
8. Ayssek C, Marry D, Peyron JF, et al. Inhibition and activation of IL 2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate binding proteins. *J Immunol* 1988; 140:215.
9. 이정호, 조강주, 하대유. Interleukin 2의 사람 림프구 분화작용. *대한면역학회지* 1988; 10:13.
10. 이정호, 김종민, 하대유. Interleukin 6의 B세포 분화작용. *대한면역학회지* 1988; 10:105.
11. Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cell, their role in defence against disease. *Science* 1981; 214:24.
12. Targan S, Brivan L, Dorey E. Activation of human NKCA by moderate exercise: Increased frequency of NK cells with enhanced capability of effector-target lytic interaction. *Clin Exp Immunol* 1981; 45:452.