

Peyer patch 세포에서 임상 빈용생약이 IgA 생산성에 미치는 영향

배은아, 한명주, 김동현*¹

경희대학교 식품영양학과, ¹약학대학

Effect of Herbal Medicines on the IgA Production in Peyer patches

Eun-Ah Bae, Myung Joo Han and Dong-Hyun Kim*¹

Department of Food and Nutrition, and ¹College of Pharmacy, Kyung Hee University,
1, Hoegi-dong, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Korea

Abstract – This study was designed to evaluate the biological activity, particularly induction of IgA in primary Peyer's patches cells, of herbal medicines for a long time in Asia. Among fifty four herbal medicines tested, *Ephedra sinica*, *Magnolia officinalis*, *Lonicera japonica* and *Lithospermum erythrorhizon* induced IgA production. The polar and high molecular weight component in *Ephedra sinica* was capable of inducing IgA in primary Peyer's patches cells. Therefore, we suggest that some herbal medicines could use for the treatment of food allergy.

Key words –Peyer's patch, IgA, *Ephedra sinica*

우리신체의 장관은 환경으로부터의 여러 가지 항원에 끊임없이 노출되고 장관내에는 막대한 양의 미생물이 항원으로 작용하게 된다. 이에 대응하여 장관에서는 면역응답반응으로 IgA항체를 생산하게 된다.^{1,2)} 이러한 면역반응에 있어서는 gut-associated lymphoreticular tissue (GALT)가 중요한 역할을 하며, Peyer's patch (PP)는 가장 중요한 GALT로써 알려져 있다.^{3,4)} 이러한 림파조직은 전신의 림파절이나 비장과는 독립한 면역 조직계를 형성하고 외부비 장기에 연결된 입파 조직과 교류하여 IgA 항체 생산을 중심으로 하는 분비형 면역계를 형성하고 있다.^{2,5,6)} 예를 들면 소화관내로 병원성 세균인 *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Cholera* sp. 등이 들어왔을 때 먼저 위에서 위산에 의해 대부분의 병원성 세균이 죽는다. 만약 병원균이 살아서 소장까지 침입했다라도 살균력이 강한 효소 라이소자임에 의해 용균된다. 이 세균의 분해산물들은 상피세포밑에 있는 점막층으로 이동하여 마크로파지에 의해 탐식되어진다. 그때 마크로파지는 림파계를 활성화 시키고 이어서 T림파구, B림파구가 활성화되고, 활성화된 B림파구는 플라즈마세포로 분화하여 항체를 생산한다. 일반적인 경우에는 IgG를 생산하나

장관 면역계에서는 특이하게 IgA를 많이 생산하여 장관내로 분비시키고, 분비된 항체는 세균이나 바이러스를 불활성화 시킨다.

이 IgA중 분비형 IgA는 병원성 세균과 알러지 유발물질에 대한 면역학적 장벽을 담당한다.^{7,8)} 특히 면역세포에서 생성된 IgA는 장간막 림파절, 흉관을 거쳐 체내 순환을 하여 장관 점막 고유층, 유선, 비노 생식기, 상기도 점막 고유층 등으로 분비되므로, 알러지 환자에게서는 IgE 항체(reagin)와 알러지의 반응을 국부에서 특이적으로 흡수를 저지하므로 차단항체로서 중요하다. 식이성 알러지의 반응기작을 생각할 경우 장관의 존재가 매우 큰 의미를 갖는다. 장관은 식품의 소화흡수에 중요한 뿐 아니라 식이성 항원이나 미생물항원의 생체내의 침입을 저지하는 데 있어서도 중요한 역할을 한다. Walker 등⁹⁾은 장관내에서 식이성 항원에 대한 특이적 분비형 IgA (sIgA)가 분비되고 식이성 항원의 생체내 흡수가 저지됨을 밝혔고, 식품알러지의 대부분은 달걀, 우유 등 단백질 기인성이며 sIgA는 이러한 단백질의 장관흡수를 억제한다고 보고하였다. 우리 신체는 일반적으로 식품 allergy를 일으키지 않는 방어기구를 갖추고 있다. 그러나, 소화관에서 allergen의 투과성이 증대하면 식품 알러지가 발증하는 것으로 생각된다. 예를 들면 식품 알러지는

*교신저자 : Fax : 02-957-5030

유아에 있어서 발증빈도가 높고 나이가 들어감에 따라 개선되는 경우가 많이 관찰되는 데 이는 유아의 소화관이 이중단백의 흡수가 용이하고 면역계가 충분히 발달하지 않았기 때문이다. 그러므로 장관 면역이 활성화가 되면 여러 가지 잇점이 있다고 볼 수 있다. 이러한 점을 고려하여 본 연구에서는 primary Peyer's patch 세포를 이용하여 임상 빈용생약소재의 IgA 생산유도효과를 검색하고 활성성분을 분리하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료 및 시약 - MEM Eagle's medium (MEM), phosphate buffered saline (PBS), IgG, IgA, anti-mouse IgG, anti-mouse IgA, percoll, bovine serum albumin (BSA), lipopolysaccharide는 Sigma Co. (U.S.A.)에서 구입하였고 fetal bovine serum (FBS)은 Biofluids Inc. (U.S.A.)에서 구입하였다. Sodium bicarbonate는 Wako Pure Chem. Co. (Japan)에서 antibiotics-antimycotics는 Gibco Co. (U.S.A.)에서 각각 구입하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

실험방법 및 시료의 추출 - 생약재료는 서울 경동시장에서 구입하여 감정을 받아 본 실험에 사용하였다. 먼저 생약을 적당히 절단하여 약 300g에 5배의 물을 가하여 수욕상에서 6시간동안 추출하여 여과한 후 시료로 사용하였다.

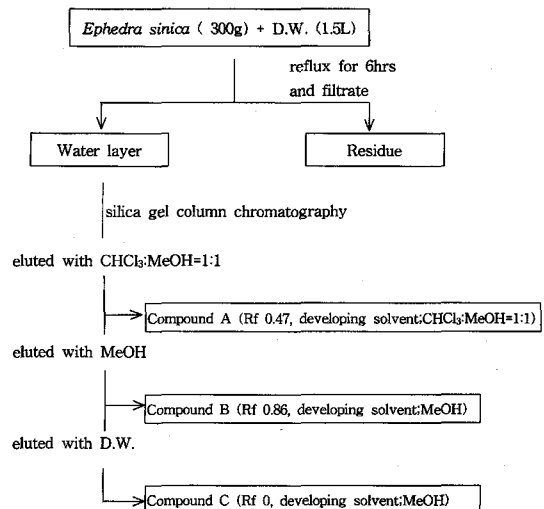
Peyer's patch로부터 lymphocyte의 분리¹⁰⁾ - Schoenbeck 등이 이미 보고한 방법¹⁰⁾에 따라 먼저 생쥐의 소장에서 Peyer's patch를 취해 점액질을 가아제로 제거하여 10% FBS를 보강한 MEM 배지에 담가둔 것을 sieve로 형체를 알아볼 수 없을 정도로 부수어 lymphocytes를 나오게 하고 MEM 배지와 현탁한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 침전물을 45% percoll의 MEM 배지에 현탁하고, 67.5% percoll이 함유된 PBS액을 45% percoll이 함유된 배지의 아래층에 들어가도록 넣은 후 2000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 45% percoll층과 67.5% percoll층 경계선사이에 형성된 cell층을 모아서 MEM 배지로 현탁하여 1500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전을 다시 배지로 현탁하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 cell을 lymphocyte로 사용하였다.

IgG 및 IgA 측정 - Peyer's patch 세포로부터 분

리한 lymphocytes를 96-well plate에 well당 5×10^5 이 되도록 180 μ l를 깔고 생약의 물추출물을 최종농도가 0.5 mg/ml이 되도록 20 μ l를 넣어 5일간 5% CO₂가 공급되는 CO₂ incubator에서 배양한 후 IgG 및 IgA생산성을 측정하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의하여 Anti-LPS IgG, IgA의 경우는 96well plate에 먼저 증류수에 현탁한 *E. coli* LPS를 1 μ g/well이 되도록 coating buffer와 함께 100 μ l 넣어 1시간 동안 coating한 후 털어내고 0.1% BSA 용액을 200 μ l 넣어 5분간 방치하고 털어낸 후 시료와 함께 5일간 배양한 lymphocyte 배양여액을 100 μ l 넣어 1시간 동안 실온에서 방치하였다. 이 plate에 anti-mouse IgG 또는 anti-mouse IgA(peroxidase labeled)를 첨가하고 1시간 동안 방치 후 O-phenylenediamine(OPD) solution(4 mg/5 ml)과 0.02% H₂O₂ 혼합액을 100 μ l 넣어 40분 방치하고 2.5M H₂SO₄로 반응을 정지시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

***Ephedra sinica* (마황)로부터 활성성분의 분리** - *Ephedra sinica* (마황)의 물추출물에 대하여 silica gel column chromatography를 이용하여 활성성분의 분리를 시도하였다. 마황의 물추출물을 농축하여 silica gel column(2.5×25 cm)에 loading하였고 전개용매로 CHCl₃:MeOH=1:1, MeOH, D.W를 이용하여 Rf 0.47 (전개용매, CHCl₃:MeOH=1:1), Rf 0.86 (전개용매, MeOH), Rf 0 (전개용매, MeOH)을 나타내는 물질을 각각 분리하였다(Scheme 1).



Scheme 1. The isolation of active component from *Ephedra sinica*.

Table I. Inducible effect of herbal medicines on IgG and IgA of Peyer's patch cells

Herbal foods ^{a)}	Korean name	Induction (%)	
		IgA	IgG
<i>Achyranthes japonica</i> (radix)	우슬	99	138
<i>Amomum xanthioides</i> (seed)	샤인	1410	927
<i>Angelica dahurica</i> (radix)	백지	93	79
<i>Angelica gigas</i> (radix)	당귀	95	109
<i>Angelica koreana</i> (radix)	강활	118	145
<i>Angelica tenuissima</i> (radix)	고본	156	146
<i>Anthriscus sylvestris</i> (radix)	전호	118	80
<i>Artemisia capillaris</i> (herba)	인진	755	426
<i>Astragalus membranaceus</i> (radix)	황기	212	127
<i>Atractylodes japonica</i> (rhizome)	창출	28	42
<i>Atractylodes japonica</i> (rhizome alba)	백출	111	67
<i>Bupleurum falcatum</i> (radix)	시호	320	179
<i>Cassia obtusifolia</i> (seed)	결명자	291	210
<i>Chrysanthemum indicum</i> (flower)	감국	51	52
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> (rhizome)	승마	269	164
<i>Cinnamomum cassia</i> (ramulus)	계지	572	482
<i>Citrus aurantium</i> (fruit)	지각	187	127
<i>Citrus aurantium subsp. nobilis</i> (pericarpium)	진피	107	74
<i>Cnidium officinale</i> (rhizome)	천궁	54	37
<i>Coptis japonica</i> (rhizome)	황련	357	176
<i>Cyperus rotundus</i> (rhizome)	향부자	166	139
<i>Ephedra sinica</i> (herba)	마황	1735	1264
<i>Eugenia caryophyllata</i> (flower)	정향	1036	972
<i>Forsythia viridissima</i> (fruit)	연교	713	315
<i>Fritillaria thunbergii</i> (bulbus)	패모	96	89
<i>Gardenia jasminoides</i> (fruit)	치자	238	131
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (radix)	감초	149	152
<i>Hordeum vulgare</i> (seed)	맥아	93	112
<i>Liriope platyphylla</i> (tuber)	맥문동	182	169
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (radix)	자근	200	103
<i>Lonicera japonica</i> (flower)	금은화	385	185
<i>Lycium chinense</i> (fructus)	구기자	126	133
<i>Magnolia officinalis</i> (cortex)	후박	547	261
<i>Massa medicata fermentata</i>	신곡	109	82
<i>Mentha arvensis var. piperascins</i> (herba)	박하	587	349
<i>Paeonia albiflora pallas var. trichocarpa</i> (radix)	백작약	241	169
<i>Paeonia moutan</i> (cortex radice)	목단피	549	421
<i>Panax ginseng</i> (radix alba)	인삼	238	185
<i>Perilla sikokiana</i> (herba)	소엽	790	367
<i>Phellodendron amurense</i> (cortex)	황백	123	88
<i>Pinellia ternata</i> (tuber)	반하	143	145
<i>Platycodon grandiflorum</i> (radix)	길경	93	127
<i>Poncirus trifoliata</i> (fruit)	지실	345	242
<i>Poria cocos</i>	백복령	45	22
<i>Prunus armeniaca var. ansu</i> (seed)	행인	91	82
<i>Pueraria thunbergiana</i> (radix)	갈근	383	230
<i>Rheum palmatum</i> (rhizome)	대황	870	704
<i>Rhus javanica</i> (galla rhois)	오배자	1318	851
<i>Saussurea lappa</i> (radix)	당목향	75	54
<i>Schizandra chinensis</i> (fruit)	오미자	122	88
<i>Scutellaria baicalensis</i> (radix)	황금	313	197

Table I. Continued

Herbal foods ^{a)}	Korean name	Induction (%)	
		IgA	IgG
<i>Sophora japonica</i> (flower)	괴화	164	124
<i>Vitex rotundifolia</i> (fruit)	만형자	559	274
<i>Zingiber officinale</i> (dried rhizome)	건강	51	88

^{a)} Final concentration of each extract was 0.5 mg/ml.

결과 및 고찰

임상빈용생약의 IgA 생산유도효과 - PP로부터 분리한 lymphocyte를 이용하여 임상빈용생약의 항체생산효과를 측정된 결과를 Table I에 나타내었다. IgA생산이 대조군에 비해 가장 많이 증가한 것은 *Ephedra sinica* (마황)로 약 1700%의 증가효과를 나타내었으며 IgG의 생산성에 비해 IgA의 생산성이 높게 나타난 것은 *Ephedra sinica* (마황), *Magnolia officinalis* (후박), *Lonicera japonica* (금은화), *Lithospermum erythrorhizon* (자근)로써 IgG에 비해 IgA의 생산성을 약 2배정도 증가시키는 효과를 나타내었다. IgA생산성이 뛰어난 것으로 나타난 *Ephedra sinica* (마황)에 대해서는 농도를 달리하여 그 효과를 살펴보았다. Table II에 나타난 바와 같이 농도를 0.5, 0.17, 0.06, 0.02 mg/ml로 하여 항체생산증가효과를 측정된 결과

Table II. Inducible effect of *Ephedra sinica* on IgG and IgA production of Peyer's patch cells

Concentration (mg/ml)	Antibody Productivity (%)	
	IgA	IgG
0.5	738	566
0.17	443	382
0.06	191	216
0.02	145	178
0	100	100

항체생산성은 *Ephedra sinica* (마황)이 높게 나타났으며 IgG항체에 대한 IgA항체의 생산비율은 약 1.5배 정도 높게 나타났고 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났다.

Ephedra sinica (마황)으로부터 활성성분의 분리 및 항체생산효과 측정 - *Ephedra sinica* (마황)의 물추출물에 대하여 silica gel column chromatography를 이용하여 Rf 0.47 (전개용매, CHCl₃:MeOH=1:1), Rf 0.86 (전개용매, MeOH), Rf 0 (전개용매, MeOH)을 나타내는 세가지 물질을 각각 분리하여 항체생산효과를 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 전개용매로 MeOH를 이용하여 TLC를 전개시켰을 때 원점에 나타나는 물질이 항체생산효과가 크게 나타났으며 대조군에 비해 226%의 증가효과를 나타내었다. 또한 IgG에 대한 IgA의 생산성은 약 2배의 증가효과를 나타내었으며 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 이 물질은 물에 용해되며 MeOH에는 용해되지 않는 극성이 매우 큰 고분자물질인 것으로 생각되어진다. 이러한 효과는 생약중의 항원이 PP의 분비를 자극해서 투여 항원에 대한 항체 생산 세포의 증식과 함께 IgA의 전구세포의 IgA switching을 자극하는 lymphokine의 생산을 자극한 것에 기인한다고 생각된다. 장관면역계에서 분비되는 분비형 IgA의 경우 식품 알러지 원인 물질의 흡수를 저해하여 식품 알러지를 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 이러한 효과를

Table III. Inducible effect of compounds isolated from *Ephedra sinica* on IgG and IgA of Peyer's patch cells

Concentration (mg/ml)	Antibody Production (%) ^{a)}					
	IgA			IgG		
	Compound A	Compound B	Compound C	Compound A	Compound B	Compound C
0.17	64	109	226	31	44	109
0.06	76	116	144	70	89	92
0.02	84	78	118	95	97	105
0	100	100	100	100	100	100

^{a)} Antibody production was indicated compared to control group untreated with *E. sinica*.

Compound A, B and C were isolated from *E. sinica* according to the Method previously described and their Rf's values were 0.47(developing solvent, CHCl₃:MeOH=1:1), 0.86(developing solvent, MeOH) and 0 (developing solvent, MeOH), respectively.

가장 많이 기대해 볼 수 있는 임상 반응 생약은 *Ephedra sinica* (마황)으로 생각되어지며 마황의 활성 성분은 극성이 매우 큰 고분자 물질인 것으로 생각된다.

결 론

임상 반응 생약의 항체생산효과를 측정된 결과, IgA 생산이 대조군에 비해 가장 많이 증가한 것은 *Ephedra sinica* (마황)로 약 1700%의 증가효과를 나타내었다. IgG의 생산성에 비해 IgA의 생산성이 높게 나타난 것은 *Ephedra sinica* (마황), *Magnolia officinalis* (후박), *Lonicera japonica* (금은화), *Lithospermum erythrorhizon* (자근)으로서 IgG에 비해 IgA의 생산성을 약 2배정도 증가시키는 효과를 나타내었다. IgA 생산성이 뛰어난 것으로 나타난 *Ephedra sinica* (마황)에 대해서는 농도를 달리하여 그 효과를 살펴본 결과, 항체생산성은 *Ephedra sinica* (마황)이 높게 나타났으며 IgG 항체에 대한 IgA항체의 생산비율은 약 1.5배 높게 나타났다. *Ephedra sinica* (마황)으로부터 IgA 항체생산을 유도하는 물질을 분리하였고 이 물질은 극성이 매우 높은 물질이었다.

인용문헌

1. Bienenstock J. and Befus A.D. (1980) Mucosal immunology. *Immunology*, 41: 249-270.
2. Harriman, G.R., Kunimoto, D.Y., Elliott, J.F., Paet-

- kau, V. and Strober, W. (1988) The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.*, 140: 3033-3039.
3. Mowat, A.M.(1987) : The regulation of immune responses to dietary protein antigen. *Immunol. Today*, 8: 93-98 .
4. Ghee, M.C. (1984) Mucosal immunoregulation. *Microbiol. Immunol.*, 28: 261-280 .
5. Begly, K.W., Eldridge, J.H., Klyono, H., Everson, M.F., Koopman, W.J., Honjo, T. and McGhee. J.R. (1988) Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in eyeling IgA positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.*, 141: 2035-2042 .
6. Kishimoto, T. and Hirano, T. (1988) Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu. Rev. Immunol.*, 6: 485-512.
7. Andre, C., Lambert, R., Bazin, H. and Heremans, J.F. (1974) Interference of oral immunization with the intestinal absorption of heterologous albumin. *Eur. J. Immunol.*, 4: 701-704.
8. Stokes, C.R., Soothill, J.F. and Turner, M.W. (1975) Immune exclusion is a function of IgA. *Nature (London)*, 255: 745-746.
9. Walker, W.A., Isselbacher, K.J. and Blos, K.J. (1972) Intestinal uptake of macromolecules; Effect of oral immunization. *Science*, 117: 608-610.
10. Schoenbeck, S., McKenzie, D.T. and Kagnoff, M.F. (1989) IL-5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur. J. Immunol.*, 19: 965-969.

(2000년 7월 12일 접수)