

# 桑葉의 免疫 調節 作用에 대한 實驗的 研究

趙周衡 · 金東熙\*

## Abstract

### Effects of *Mori Folium* on Immunologic control function

Jo Joo-hyung O.M.D, Kim Dong-hee O.M.D., Ph. D.

Dept. of Oriental Medicine Pathology

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

In order to investigate the effect of *Mori Folium* on immunologic control function, the various immune responses were studied.

The results were obtained as follows :

1. The transformation of lymphocyte was increased significantly in all concentration of *Mori Folium* treated group as compared with negative and positive control.
2. In FACS analysis, the population of helper T cell and T cell were increased significantly in *Mori Folium* treated group as compared with control.
3. IL-12(p35) and INF- $\gamma$  were upregulated in *Mori Folium* treated group
4. NO and carbon clearance were significantly increased in *Mori Folium* treated group as compared with control.
5. The hemagglutinin titer and hemolysin titer were increased but insignificantly in *Mori Folium* treated group as compared with control.

## I. 緒 論

免疫 反應이란 生體가 非自己를 鑑別하여 自己의 恒常性을 維持하기 위하여 취하는 一連의 生體 反應으로, 크게 體液性 免疫과 細胞性 免疫으로 區分된다<sup>1)</sup>. 이러한 免疫 反應은 非自己抗原에 대하여 일으키는 免疫反應이 不足한 경우 각종 感染性 疾患내지 惡性腫瘍에 걸리기 쉽고, 免疫反應이 지나치게 강할 경우는 各種 알레르기, 스트레스

또는 自己免疫性疾患을 일으키게 된다<sup>1-3)</sup>.

桑葉은 桑科에 속한 落葉喬木인 뽕나무 *Morus alba L.* 및 同屬 近緣植物의 잎을 乾燥한 것으로<sup>4)</sup>. <神農本草經><sup>5)</sup>에서 木部 中品에 “葉主除寒熱出汗”으로 最初로 收載되었다.

性味는 寒無毒 甘苦하고 肺·肝經에 歸經하며, 發散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目의 效能으로 感冒風熱, 肺熱潤燥, 頭痛眩暈 및 目的昏花 등의 病證에 使用되고 있다<sup>5-7)</sup>.

桑葉의 대한 研究로 徐<sup>8)</sup>는 桑葉에 대한 文獻的 研究를 통하여 名稱, 起源, 性味, 歸經 및 效能에 대하여 數種의 本草書를 比較·考察하였고, 許<sup>9)</sup>는

\* 大田大學校 韓醫科大學 韓方病理學教室

桑葉이 高血壓 白鼠에 미치는 影響을 實驗的으로 糾明하였다.

이 밖에 桑科에 대한 研究로 洪<sup>10)</sup>은 桑寄生 (Viscum Celeratum Nakai)의 循環器系에 대한 藥理的 研究를, 白<sup>11)</sup>은 桑枝가 흰쥐의 血壓 및 利尿에 미치는 影響을, 許<sup>12)</sup>는 桑枝煎湯液이 家兔의 血清 總Cholesterol 및 血壓에 미치는 影響을, 申<sup>13)</sup>은 桑白皮 水性 엑기스의 血壓降下作用에 관한 影響을 報告한 바가 있다.

免疫學的 研究로는 蘇<sup>14)</sup>가 桑白皮가 白鼠腹腔 肥滿細胞에 미치는 影響을, 金<sup>15)</sup>이 桑白皮로 前處理된 白鼠 肥滿細胞에 미치는 Compound 48/80와 Saponin의 影響, 杜<sup>16)</sup>가 桑白皮의 TritonX-100에 의한 肥滿 脫顆粒 抑制 效果를 보고한 바가 있으며, 最近에는 桑寄生의 免疫 調節作用에 대한 研究가 進行되고 있다.

이에 著者는 桑科의 植物에 대한 最近 免疫作用 研究가 활발히 이루어지고 있다는 점과 과거 道家의 生食物이었다는 점<sup>17)</sup>에 準하여, 이를 試料로 淋巴球 增殖能, 脾臟 免疫細胞 變化, interleukin-10 (IL-10), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 등의 cytokine 發顯, NO 生成量, carbon clearance, 赤血球 凝集素 價 및 溶血素價 등을 통하여 免疫調節作用을 評價하여 보았다.

## II. 實 驗

### 1. 材 料

#### 1) 動 物

實驗 動物은 韓國化學研究所에서 購入한 雌性 BALB/C를 購入하여, 1週日 동안 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 動物 飼育室의 條件은 conventional system으로 22±2℃, 1日中 12時間은 200-300 Lux로 照明하고, 12時間은 모든 빛을 遮斷하였다. 飼料는 固形飼料(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 充分히 供給하였다.

### 2) 藥 材

本 實驗에 使用한 桑葉은 大田大學校 附屬韓方 病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다.

| 韓 藥 名 | 生 藥 名              |
|-------|--------------------|
| 桑 葉   | <i>Mori Folium</i> |

### 3) 試藥 및 機器

#### (1) 試 藥

實驗에 使用된 試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS, U.S.A), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A)는 Sigma社 (U.S.A) 製品을 使用하였으며, RNAzolB (Tel-Test, Inc.) Taq polymerMFe와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRMF (Japan)社 製品을, 逆轉寫酵素 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse TranscriptMFe; M-MLV RT)와 RNMF inhibitor는 Promega社 製品, 流細胞分析에 使用된 phycoerythrin(PE)-anti-CD3e, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD4, FITC-anti-CD8는 Pharmingen(U.S.A)社의 製品을, 3H-Thymidine은 Amersham에서 購入하였으며, 그리고 agarose (FMC, U.S.A) 등을 비롯한 기타 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

#### (2) 機 器

使用된 機器는 cytometer (Becton Dickinson, U.S.A), imager system (Kodak, U.S.A), microcentrifuge (韓一科學, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Turbo Thermal-cyclerTM (Bioneer Co., Korea), CO2 incubator (Napco, U.S.A), cleanbench (KMC- 14001, vision scientific Co., Korea) rotary vacuum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan) 그리고 blood cell counter (Minos, Sweden) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

桑葉(이하 MF로 칭함) 300g에 蒸溜水 1,000ml을 添加하여 熱湯 抽出器에서 3時間 동안 抽出하여 抽出液을 얻고, 이를 吸入 濾過하여 濾液을 減壓蒸溜裝置(Rotary evaporator, Buchi 461, switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結乾燥器(Freeze dryer, FDU-540, Eyela, U.S.A)를 이용하여 完全 乾燥하여 84.5g을 얻어 冷凍 保管하였으며, 實驗에 適當 溫度로 溶液을 製造하여 使用하였다.

2) 脾臟細胞 培養

脾臟細胞를 分離하고 RPMI 배지를 添加하여 細胞懸濁液을 만들었다. 이 懸濁液을 4℃에서 10분간 靜置한 후 上層液을 취하고 3회 水洗하여 組織切片과 細胞 덩어리를 除去하고, 이를 10ml의 cold RPMI 배지에 懸濁시켰다. 이 懸濁液을 ficoll (Pharmacia) 溶液 3ml 위에 가볍게 올려놓고, 2,000 r.p.m 에서 20분간 遠心分離하여, ficoll 溶液層 위에 걸려 있는 細胞를 回收하여 培地로 3회 水洗 後 細胞 數字를 計算하였다. 이 脾臟 細胞를 96 well plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cells씩 添加하고, 檢液과 Con A를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37℃에서 48時間 培養하였다.

3) 淋巴球의 增殖反應 測定<sup>18)</sup>

檢液과 mitogen 등을 處理한 細胞의 增殖程度를 測定하기 위하여 各 群의 生쥐의 脾臟細胞를 96 well plate의 각 well에  $5 \times 10^5$  cell씩 添加하고, 檢液과 Con A를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37℃에서 48시간 培養 後 50uCi/ml의 [methyl -3H] Thymidine 을 添加하고 다시 18時間 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線 同位元素의 量을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集器(Cell harvester)를 使用하여 유리섬유 여지(GIMFs microfiber filter, Whatman)위에 捕獲하고 乾燥한 후 放射線 測程器(Liquid scintillation counter)를 이용하여 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

4) 流細胞 螢光分析器(FACS)를 이용한 免疫調節作用 分析

(1) 脾臟 淋巴球 懸濁液 造製

BALB/C mouse를 cervical dislocation으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고 Scheme 3, 4에서와 같이 脾臟 淋巴球 懸濁液을 製造하였다. 細胞 處理 및 螢光染色用 緩衝液으로는  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 이 들어 있지 않은 staining buffer를 使用하였다. 摘出した 脾臟을 100 mesh (sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5분간 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83 %  $NH_4Cl$  溶液을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고 RPMI 1640-2% FBS(Sigma)로  $5 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 稀釋하였다.

(2) 免疫 螢光染色 (immunofluorescence staining)

免疫 螢光染色은 全 過程을 0-4 ℃에서 실시하였고, 培養한 脾臟 細胞를 回收하여 PBS로 3회 洗滌한 후 5ml FACS tube (Becton Dickinson, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 遠心分離(1300 r.p.m, 5min)하였다. 各 各의 1차 抗體 culture sup.을  $100 \mu l$  씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 얼음에서 反應시켰다. 使用한 1차 抗體는 3회 洗滌 後, fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat IgF(ab)<sub>2</sub> fragment 1:100 (Tago, U.S.A) 稀釋液  $50 \mu l$ 을 가하여 40분간 反應시키고, 3회 洗滌 後 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACS can(Becton dickinson, U.S.A)으로 分析하였다.

(3) 免疫細胞 分析

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACS-can (Becton dickinson, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며, consort 30 프로그램을 이용하여 분석하였다. data의 분석은 forward scatter (FSC)와 side scatter (SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast

영역을 구분하여 비율(gated,%)을 산출하였다.

Table 1. Monoclonal Antibody used for Immunofluorescence Staining

| Immune cell types | Markers  | Monoclonal antibody |
|-------------------|--|---------------------|
| T cells           | Thy1,2   | J1j                 |
| helper T cells    | CD4  | G.K.1.5             |
| Second antibody   | F(ab') <sub>2</sub> FITC-goat anti rat Ig (Pharmingen) |                     |

Scheme 1. Preparation of splenic leukocyte suspension

ICR mouse  
 Sacrifice of mouse by cervical dislocation  
 Excise the spleen out  
 Spleen  
 Transfer onto a prewetted 100 mesh stainless-steel screen  
 Cut into pieces  
 Squeeze through the screen  
 Transfer to a 15ml conical tube  
 Keep it for 5 min on ice  
 Take the upper layer  
 WMFh 2 times with buffer (PBS w/o Ca<sup>2+</sup>&Mg<sup>2+</sup>)  
 Hemolysis with 0.83 % NH<sub>4</sub>Cl  
 Adjust the cell concentration to 5x10<sup>6</sup> cells/ml in 10% FCS-RPMI 1640  
 Splenic leukocyte suspension

Scheme 2. Staining with fluorescein conjugated antibody

Cell culture  
 Pool the cells into 5 ml tube  
 WMFh 3 times with the staining buffer  
 Resuspend in 0.5ml of the staining buffer  
 Cell suspension (80μl)  
 Add 80μl of the primary Ab

Incubate for 30 min  
 WMFh 3 times with the staining buffer  
 mAb-bound cells  
 Add 50μl of F(ab)<sub>2</sub> fragment of FITC-conjugated goat anti-rat Ig  
 Incubate for 30min on ice  
 WMFh 2 times with the staining buffer  
 Resuspend in 0.5ml of staining buffer  
 IF-stained cell

5) RT-PCR을 이용한 遺傳子 發顯 分析

正常 BALB/C 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟 細胞를 分離한 後 우태아 혈청 결핍 RPMI-1640 培養液에서 1시간 동안 培養한 後 MF(100μg/ml, 10 μg/ml, 1μg/ml)을 處理하고 3時間 동안 培養器(3 7°C, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 培養하였다. 培養한 後 2,000 r.p.m에서 5分間 遠心 分離하여 上層液을 除去한 後 RNAzol<sup>B</sup>를 이용하여 細胞膜을 티트린 후 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다. Oligonucleotide의 鹽基 配列은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Oligonucleotide Sequence of Primers

| Gene    | Primer    | Sequence                          |
|---------|-----------|-----------------------------------|
| β-actin | Sense     | 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'   |
|         | Antisense | 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'   |
| IL-12   | Sense     | 5'-ATCTGCTGCTCCACAAGAAG-3'        |
|         | Antisense | 5'-TGATGAAGAAGCTGGTGTCTG-3'       |
| INF-γ   | Sense     | 5'-AGCGGCTGACTGAAGCTCAGATTGTAG-3' |
|         | Antisense | 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'   |

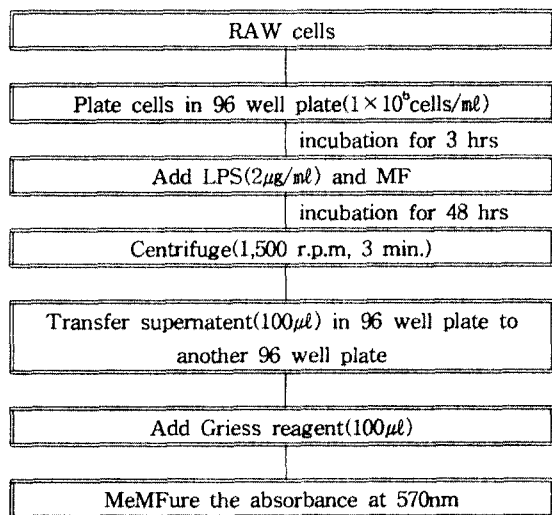
PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 測定하였다.

6) 大食細胞 活性에 미치는 影響

(1) Nitric oxide(NO) 生成量 測定<sup>19)</sup>

Macrophage를 活性化시키는 物質인 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma 社에서 購入하였다. RAW cell을 1회용 滅菌 注射器(26gauge, Boin

Medica Co., Korea)를 利用하여 單一細胞(single cell) 狀態의 細胞 懸濁液을 만들어 96 well plate 의 각 well에  $1 \times 10^6$  cells/ml의 細胞懸濁液  $100 \mu\text{l}$ 씩 加한 뒤 3시간 培養하였다. 檢液은 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml 濃度로 稀釋한 뒤에 96 well plate의 각 well plate에  $20 \mu\text{l}$ 씩 넣었고, 同時에 각 well plate에  $2 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 加하였으며, 48時間 培養한 後 1,500 r.p.m에서 3分동안 遠心分離하여 細胞浮遊物만을  $100 \mu\text{l}$  取한 다음 새로운 96 well plate 에 옮겨 놓고 griess reagent를  $100 \mu\text{l}$ 씩 添加하였다. 10分後 ELISA leader을 통하여 570nm에서 吸光度를 測定하였다(Scheme 3)



Scheme 3. The experimental scheme for effect of MF extracts on NO production in RAW cells stimulated by lipopoly- saccharide

(2) Carbon clearance의 測定

Carbon clearance는 생쥐에 10日間 MF를 經口 投與한 후 thorbecke 等의 方法에 準하여 測定하였으며, carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 retroorbital venous plexus로부터 heparin 處理된 capillary로  $25 \mu\text{l}$ 씩 1分, 5分 동안 각각 採血하여 각 血液 sample을 0.1% sodium carbonate 2 ml에 溶血시켜 spectrophotometer (UV2100, Shimadzu, Japan)를 使用하여 625nm에서 carbon

의 濃度를 測定하였다. Carbon clearance는 아래 의 公式에 의해 phagocytic index인 K값을 구했다.

$$\text{Phagocytic index } K = \log C_1 - \log C_2 / T_2 - T_1$$

$C_1$ 은  $T_1$  시간에서의 sample 血中の carbon 濃度이고,  $C_2$ 는 時間  $T_2$ 에서의 sample 血中の carbon 濃度이다.

7) 赤血球 凝集素價 및 溶血素價 促進

(1) 抗原

抗原으로는 綿羊 赤血球(sheep red blood cell; SRBC)을 使用하였다. 綿羊 赤血球는 綿羊의 頸靜脈에서 採血한 血液을 同量의 Alsever's Solution (glucose 20.5g/l, sodium citrate 8.0g/l, citric acid 0.55g/l, sodium chloride 4.2g/l)을 加한 것을 한국 메디아에서 供給받아 4℃에서 保管 使用하였으며 使用 전에 HBSS(Hank's balance salt solution)로 1回 세척하였다.

MF를 10日間 投與한 後 各 BALB/C 생쥐의 尾靜脈에  $4 \times 10^8$  cells/ml 濃度의 綿羊 赤血球 混濁液을 0.2ml 注射하여 4일 후 採血하여 血清을 얻어 凝集素價 및 溶血素價의 測定에 使用하였다.

(2) 赤血球 凝集素價의 測定

凝集素價(hemagglutinin titer)의 測定은 Kitamura 의 方法에 準하여 하였다. 分離한 血清을 56℃ 30分間 非動化해서 microtitration plate (Falcon, USA)의 各 well에 PBS로 2倍 系列 稀釋(원액, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 배 稀釋)한 血清  $25 \mu\text{l}$ 에 綿羊 赤血球 浮遊液( $1 \times 10^8$  cells/ml)  $50 \mu\text{l}$ 씩 加하여 잘 混和한 다음 덮개를 하고 37℃ incubator에서 24時間 培養 후 凝集程度를 判讀하였으며 判定은 赤血球 凝集을 일으키는 血清의 最高 稀釋倍數를  $\log_2$  값으로 計算하여 凝集素價를 定하였다.

(3) 赤血球 溶血素價의 測定

溶血素價(hemolysin titer)의 測定은 分離한 血清을 56℃ 30分間 非動化해서 microtitration plate (v bottom)의 各 well에 PBS로 2倍 系列 稀釋(원액, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 배 稀釋)한 血清  $25 \mu\text{l}$ 에 綿羊 赤血球 浮遊液( $1 \times 10^8$  cells/ml)  $50 \mu\text{l}$ 씩 加하여 잘 混化하고 guinea

pig complement를 20 $\mu$ l 각각에 加하고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1時間 培養 후 溶血을 判定하였다.

8) 統計處理

多様な 實驗으로부터 얻은 結果는 mean  $\pm$  standard error로 記錄하였다. 有意性 檢證은 Student's t-test 分析 方法을 이용하여 決定하였다.

III. 實驗成績

1. 淋巴球의 增殖 反應에 對한 效果

[3H] Thymidine uptake MFsay를 通하여 MF의 免疫細胞에 對한 作用을 檢索한 結果에서는, Con A를 處理한 陽性對照群(positive control)에서 3,800  $\pm$  23.5(CPM)으로 나타났고, Con A와 MF를 동시에 처리한 實驗群에서는 9,600  $\pm$  32.2(p<0.001)로 나타나 陰性·陽性對照群에 比하여 有意性있는 淋巴球 增殖效果를 나타내었다(Table 3, Fig. 1)

Table 3. Effect of MF on Proliferation of Splenic Lymphocyte by Thymidine Uptake

| Group                   | Conc.( $\mu$ g/ml) | thymidine uptake (CPM) |
|-------------------------|--------------------|------------------------|
| Control (negative con.) |                    | 400 $\pm$ 16.9         |
| Con A (positive con.)   | 2.5                | 3,800 $\pm$ 23.5***    |
| MF                      |                    | 9,600 $\pm$ 32.2***    |

\* P-value : Statistically significant MF compared with data of negative control group (\*\*P<0.001)

Control : negative control

Con A : positive control

MF : MF treated group

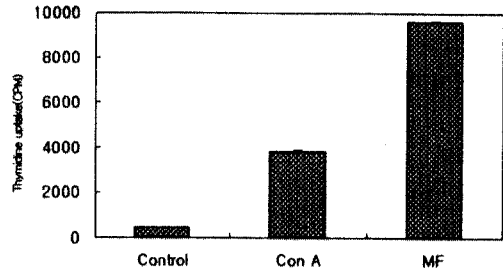


Fig. 1. Effect of MF on proliferation of splenic lymphocyte by thymidine uptake.

Control : negative control

Con A : positive control

MF : MF treated group

2. 脾臟 免疫細胞에 미치는 效果

BALB/C 생쥐의 脾臟細胞를 FACS calib.를 이용하여 流細胞를 分析한 結果, helper T cell에 對한 效果에서는 對照群이 5.7(% positive cell), MF 投與群이 18.2(% positive cell) 對照群에 比하여 3배 이상 增加하였다(Table 4, Fig. 2).

T cell에 對한 效果에서는 對照群이 2.1(% positive cell), MF 投與群이 6.7(% positive cell)로 이 역시 helper T cell에 對한 效果에서처럼 對照群에 比해, positive cell이 3배 이상 增加하였다 (Table 5, Fig. 3).

Table 4. Effects of MF on the Expression of CD3e and CD4 in Splenic Cell Culture

| Group   | Dosage (g/kg) | % Positive Cell | Increasing % |
|---------|---------------|-----------------|--------------|
| Control | 0             | 5.7             |              |
|         | 0.1           | 18.2            | 319%         |

a) : Mean  $\pm$  Standard Error.

Normal : Not-treated group

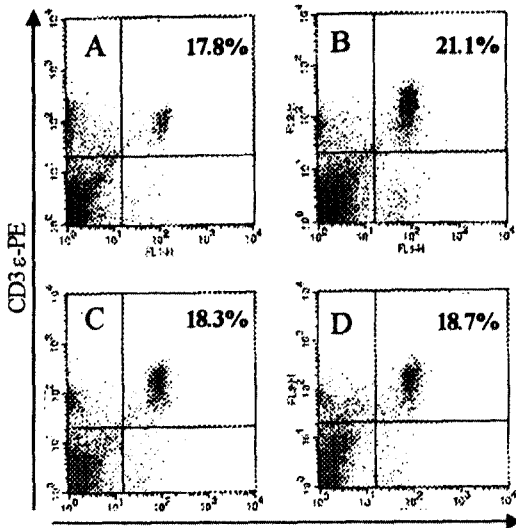


Fig. 2. Effects of MF on the expression of CD3e and CD4 in splenic cell culture.

BALB/C splenic cell were cultured with MF (100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml) for 48 hrs. The splenic cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. A, Not treatment, control; B, 100 µg/ml MF; C, 10 µg/ml MF, D, 1 µg/ml MF were stained with CD3e-PE/ CD4-FITC. Two group treated with MF showed increased number of CD4+ T cells.

Table 5. Effects of MF on the Expression of CD3e and CD4 in Splenic Cell Culture

| Group   | Dosage (g/kg) | % Positive Cell | Increasing % |
|---------|---------------|-----------------|--------------|
| Control | 0             | 2.1             |              |
|         | 0.1           | 6.7             | 319%         |

a) : Mean ± Standard Error.  
Normal : Not-treated group

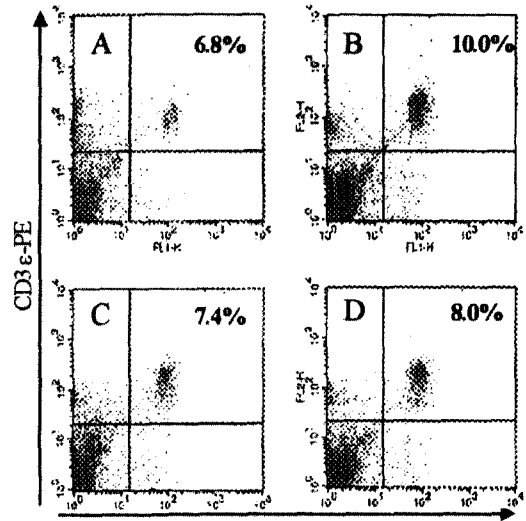


Fig. 3. Effects of MF on the expression of CD3e and CD8 in splenic cell culture.

BALB/C splenic cell were cultured with MF (100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml) for 48 hrs. The splenic cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. A, Not treatment, control ; B, 100µg/ml MF; C, 10µg/ml MF, D, 1µg/ml MF were stained with CD3e-PE/CD8-FITC. Two group treated with MF showed increased number of CD8+ cytotoxic T cells

3. IL-12(p35) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-12(p35)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β-actin이 使用되었다. IL-12(p35) NC(C) Ht 값은 38로 나타났고, 陽性 對照群인 ConA 投與群은 45로 나타났으며, MF 100µg/ml(lane 3) 濃度 投與群에서는 69, 10µg/ml(lane 5) 濃度 投與群에서는 59로, IL-12(p35) PCR product가 모든 濃度에서 큰 폭으로 增加하였다(Fig. 4).

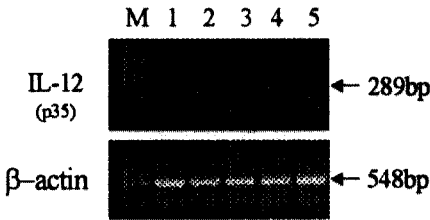


Fig. 4. Effects of MF on IL-12 (p35) gene expression in splenic cell culture.

BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10 $\mu$ g/ml ConA (line 2), 100 $\mu$ g/ml MF (lane 3), 50 $\mu$ g/ml MF (lane 4), 10 $\mu$ g/ml MF (lane 5) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized b-actin cDNA products by RT-PCR wMF used in internal control. M ; 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

4. IL-12(p40) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-12(p40)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IL-12(p40) NC(C) Ht 값은 182로 나타났고, 陽性 對照群인 ConA 投與群은 10 $\mu$ g/ml 濃度에서 180으로 나타났으며, MF 100 $\mu$ g/ml(lane 3) 濃度 投與群에서는 181, 10 $\mu$ g/ml (lane 5) 濃度 投與群에서는 190로 나타나 低濃度에서 IL-12(p40) PCR product가 NC(lane 1)와 소폭의 차이를 나타내었다(Fig. 5).

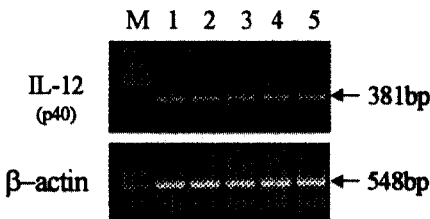


Fig. 5. Effects of MF on IL-12(p40) gene expression in splenic cell culture.

BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10  $\mu$ g/ml ConA (line 2), 100  $\mu$ g/ml MF (lane 3), 50  $\mu$ g/ml MF (lane 4), 10  $\mu$ g/ml MF (lane 5) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized b-actin cDNA products by RT-PCR wMF used in internal control. M ; 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

5. IFN- $\gamma$  遺傳子 發顯에 미치는 效果

IFN- $\gamma$  標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IFN- $\gamma$  NC(C) Ht 값은 71로 나타났고, 陽性 對照群인 ConA 投與群은 10 $\mu$ g/ml 濃度에서 156으로 나타났으며, MF 100 $\mu$ g/ml (lane 3) 濃度 投與群에서는 70, 10 $\mu$ g/ml (lane 5) 濃度 投與群에서는 101로, 低濃度에서 IFN- $\gamma$  PCR product가 NC(C) Ht에 비하여 增加하였다(Fig. 6).

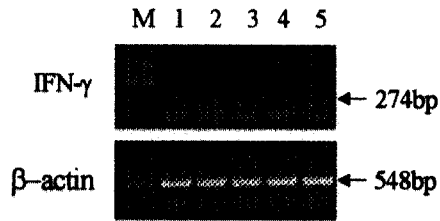


Fig. 6. Effects of MF on IFN- $\gamma$  gene expression in splenic cell culture.

BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10  $\mu$ g/ml PHA-M (line 2), 100  $\mu$ g/ml MF (lane 3), 50  $\mu$ g/ml MF (lane 4), 10  $\mu$ g/ml MF (lane 5) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized b-actin cDNA products by



RT-PCR wMF used in internal control. M ; 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

6. NO 生成量에 對한 效果

MF 投與群이 大食細胞 活性에 미치는 影響을 알아보기 위하여 NO MFsay를 實施한 結果, 陰性 對照群(negative control)에서는 16±1(uM/L)로 나타났는데, LPS만 投與한 陽性對照群(positive control)에서는 29±3.2(uM/L)로 陰性對照群에 有意性있게 증가하였으며, MF, LPS의 併用 投與群은 31±2.2(uM/L)로 나타나 이 역시 陰性對照群에 비해 有意性있는 結果가 나타났다(Table 6).

Table 6. Effect of MF on the NO Production in RAW 264.7 Cells

| Stimulus               | NO Production(uM/L) |
|------------------------|---------------------|
| Control(negative con.) | 16±2.2              |
| LPS(positive con.)     | 29±3.2              |
| LPS+MF                 | 31±2.2*             |

\* RAW 264.7 cells were incubated with 1µg/ml LPS and 0.25mg/ml MF at 37°C for 48hr. The result were expressed MF micromples per liter and mean ±SE of triplicated cultures.

\* P-value : Statistically significant MF compared with data of control group (\* : P<0.05)

7. Carbon clearance에 對한 效果

Carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 1분, 5분 후 採血하여 carbon의 濃度를 測定한 結果, phagocytic index K가 對照群에서는 2.132±0.102로 나타난 反面 MF 投與群은 3.564±0.121로 對照群에 比하여 有意性있는(p<0.001) 增加를 나타내었고, α 數値는 對照群이 3.247±0.375, MF 投與群은 5.132±1.001로 各各 나타났다(Table 7).

Table 7. Effect of MF on Phagocytic Index K in BALB/C Mice

| Group   | K              | α           |
|---------|----------------|-------------|
| Control | 22.132±0.102   | 3.247±0.375 |
| MF      | 3.564±0.121*** | 5.132±1.001 |

$K = \log OD_{t1} - \log OD_{t2/t2-t3}$

$\alpha = \sqrt[3]{K \times \text{body weight} / (\text{spleen} + \text{liver}) \text{weight}}$

8. 抗體 生成能에 對한 效果

MF 投與群이 抗體生成能에 미치는 影響을 알아보기 위하여 正常群과 MF 投與群에 SRBC를 注射하고, 이들 抗原에 대한 抗體價를 調査한 結果, 凝集素價에 있어서 對照群은 6±0.4(titer), MF 投與群은 7±0.4(titer)로 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았고, 溶血素價에 있어서는 對照群이 6±0.1(titer), MF 投與群은 7±0.5(titer)로 이 역시 對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 8).

Table 8. Effect of MF on Hemagglutinin Titers and Hemolysin Titers

| Group   | Hemagglutinin Titer (log) | Hemolysin Titer(log) |
|---------|---------------------------|----------------------|
| Control | 6.0±0.4                   | 6±0.1                |
| MF      | 7.0±0.4                   | 7±0.5                |

IV. 考 察

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 鑑別하는 것으로, 非自己 成分을 抗原으로 認識하고 特異하게 抗體를 形成하여, 外部 病原菌의 除去, 毒性物質의 無毒化와 癌細胞를 破壞시키는 것 등의 反應으로, 크게 非特異的인 先天的 免疫反應과 特異的 免疫反應으로 나눌 수 있으며, T 細胞, B 細胞 및 大食細胞間의 相互作用이 免疫反應의 中心을 이루고 있다<sup>1)</sup>.

免疫系를 構成하는 宿主細胞의 network은 自己 (self)와 非自己(non-self)의 認知한 後 外部 病原菌의 除去, 毒物質의 無毒化와 癌細胞를 破壞시키는 것 등의 여러 過程을 包含하고 있으며, T 細胞, B 細胞 및 大食細胞間의 相互作用이 免疫反應의 中心을 이루고 있다<sup>1)</sup>.

最近 韓醫學에서 多樣한 韓藥材와 處方을 試料로 免疫調節 및 增強作用을 實驗的으로 糾明하였으며, 이 밖에도 鍼灸 및 水鍼의 免疫增強效果 등 免疫調節作用에 對한 많은 實驗的 研究가 報告되고 있다<sup>20-22)</sup>.

桑葉은 蠶나뭇목(桑科 Moraceae)에 속한 落葉 灌木 또는 喬木인 蠶나무 *Morus alba* Linne. 및 同屬 近緣植物의 잎을 乾燥한 것이다<sup>4)</sup>.

《神農本草經》<sup>5)</sup>에 “葉主除寒熱出汗”이라고 최초로 記載된 이래, 《名醫別錄》<sup>23)</sup>에서는 葉汁解蜈蚣毒., 《千金翼方》<sup>24)</sup> 《經史證類大觀本草》<sup>25)</sup>에서는 葉主除寒熱出汗, 汁解蜈蚣毒 등으로 記載되었고, 《申氏本草學》<sup>26)</sup>에서는 除寒熱, 出汗, 利大小腸, 解蜈蚣毒, 止渴, 利五臟, 通關節 效能으로 脚氣, 水腫, 金瘡, 霍亂, 腹痛, 吐下, 咳嗽, 明目, 盜汗, 瘀血 등을 治한다고 記述되어 있다.

桑葉의 대한 研究로 徐<sup>9)</sup>는 桑葉에 대한 文獻的 研究를 통하여 名稱, 起源, 性味, 歸經 및 效能에 對하여 數種의 本草書를 比較·考察하였고, 許<sup>9)</sup>는 桑葉이 高血壓 白鼠에 미치는 影響을 實驗的으로 糾明하였다.

이 外에 桑科에 대한 研究로 洪<sup>10)</sup>은 桑寄生 (*Viscum Celeratum* Nakai)의 循環器系에 대한 藥理的 研究를, 白<sup>11)</sup>은 桑枝가 흰쥐의 血壓 및 利尿에 미치는 影響을, 許<sup>12)</sup>는 桑枝煎湯液이 家兔의 血清 總Cholesterol 및 血壓에 미치는 影響을, 申<sup>13)</sup>은 桑白皮 水性 液의 血壓降下作用에 관한 影響을 報告한 바가 있다.

免疫學的 研究로는 蘇<sup>14)</sup>가 桑白皮가 白鼠腹腔 肥滿細胞에 미치는 影響을, 金<sup>15)</sup>이 桑白皮로 前處理된 白鼠 肥滿細胞에 미치는 Compound 48/80와 Saponin의 影響, 杜<sup>16)</sup>가 桑白皮의 TritonX-100에 의한 肥滿 脫顆粒 抑制 效果를 보고한 바가 있으며, 最近에는 桑寄生의 免疫 調節作用에 대한 研

究가 進行되고 있다.

이에 著者는 桑科에 속하는 桑葉(MF)을 試料로 淋巴球 增殖能, 脾臟 免疫細胞 變化, interleukin-12 (IL-12), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 등의 cytokine 發顯, NO 生成量, carbon clearance, 赤血球 凝集素 價 및 溶血素價 등을 통하여 免疫調節作用을 評價하여 보았다.

脾臟은 血液循環系內의 가장 큰 末梢 淋巴組織으로, 생쥐와 기타 動物에서 免疫細胞를 위주로 한 血球와 血小板의 貯藏機關으로 알려져 있고, 사람에 있어서는 成人의 경우 造血機能이 대부분 骨髓에서 일어나지만, 胎兒期때나 骨髓의 非正常的 擴張에 의한 疾患의 경우, 脾臟에서도 造血作用이 일어나는 까닭에 脾臟은 免疫, 造血機能의 實驗材料로서 이용되고 있다.

本 實驗에서는 먼저 正常 BALB/C의 脾臟細胞를 이용하여 淋巴球 增殖效果를 測定하였는데, Con A를 處理한 陽性對照群(positive control)에서는 모든 濃度에서 陰性對照群에 比하여 큰 폭으로 有意性있는 增加를 나타내었고, MF 投與群도 역시 陰性·陽性對照群에 比하여 有意性있는 淋巴球 增殖效果를 나타내었다(Table 3, Fig. 1)

一般的으로 림프구는 末梢血液, 白血球中 正常에서는 약 20%를 차지하며 機能上 대개 T 림프구, B 림프구 및 null 細胞로 分類되고 있다<sup>1)</sup>.

이러한 淋巴球를 비롯한 免疫細胞들은 lymphokine 또는 cytokine을 分泌하여 각 細胞에 信號를 보내면서 細胞間에 相互情報를 傳達하거나 仲介하여 細胞增殖 및 細胞分化에 關與함으로써 免疫調節에 參與한다는 점<sup>1)</sup>에서 免疫實驗에서 重要한 尺度로 使用되어지고 있는데, 本 實驗에서는 FACS를 이용하여 脾臟內 helper T cell, T cell의 sub-population 比率를 測定하였다.

먼저, 다른 免疫細胞의 activation과 proliferation을 調節하는 細胞으로써 全體 免疫을 增加시키는데 重要한 役割을 하는 helper T cell에서는 對照群에 比하여 對照群에 比하여 3배 이상 增加하였고 (Table 4, Fig. 2), T cell에서도 對照群에 比해, positive cell이 3배 이상 增加함으로써 (Table 5, Fig. 3), 淋巴球 增殖能의 結果와 附合되었다.

Cytokine은 免疫 反應의 調節이 主機能인 peptide로써, 각각 固有의 收容體를 通하여 免疫 細胞의 成長과 分化의 complex network에서 多様な 機能을 나타낸다. 즉 細胞의 活性, 增殖 및 分化를 調節함으로써 正常人の 成長 및 發育에 關與할 뿐만 아니라, 여러 疾病의 pathogenic mediator로서 作用하여 疾病의 發生 및 治愈에 關與함이 알려져 있다.

本 實驗에서는 多様な cytokine중 IL-12(p35), IL-12(p40) 및 IFN- $\gamma$  發顯을 PCR을 통하여 探索하여 보았다.

IL-12는 p35-197 a.a 와 p40-306 a.a, heterodimer로 IL-2와 같이 處理했을때 NK 細胞, LAK 細胞 및 cytotoxic T 細胞를 活性化시키고 B lymphoblastoid 細胞로부터 生産된다. 本 實驗에서는 p40에서는 對照群과 큰 差異를 보이지 않았으나(Fig. 5), p35에 對하여서는 陽性對照群과 더불어 큰 폭으로 遺傳子 發顯이 增加하였다(Fig. 4).

IFN- $\gamma$ 는 T 細胞와 NK 細胞에서 生産되고 Class II MHC 發顯과 B細胞 增殖分化, 大食細胞의 活性化에 關與하며 IL-2 및 IL-4의 生産을 抑制하고 IgE 抗體와 IgG<sub>1</sub> 抗體를 抑制하나 IgG<sub>2a</sub> 抗體 生産은 促進하는 것으로 알려져 있는데, 本 實驗에서는 低濃度에서 큰 폭의 增加를 나타내었다(Fig. 6).

다음으로 大食細胞의 活性에 미치는 效果에 대한 實驗으로 ConA로 誘發한 RAW 細胞의 NO 生成量を 測定하였다. NO 生成量 測定은 大食細胞에 의해 生成된 NO와 같은 RNI (Reactive Nitrogen Intermediate)가 眞菌, 原生動物 및 腫瘍細胞 등에 강한 細胞毒性을 附與하는 防禦因子로, 食菌된 細胞의 殺害作用중에 하나가 窒素酸化物 生成에 의한 酸化作用으로 認識되고 있는 까닭에 大食細胞의 活性能의 測定方法으로 活用되고 있는데, 本 實驗에서는 MF와 ConA 並用 投與時 陰性 對照群에 比하여 有意性있는 增加를 보였다(Table 6).

Macrophage의 貪食能을 評價하는 實驗方法인 carbon clearance 測定은 細網內皮系(RES)의 貪食作用이 單核細胞나 大食細胞에 의해 主로 이루어

지기 때문에, 注入된 carbon이 細網內皮系(RES)에 의하여 貪食되는 程度를 評價하는 方法이다.

本 實驗에서는 phagocytic index K가 對照群에 對照群에 比하여 有意性있는( $p < 0.001$ ) 增加를 나타내었는데(Table 7), 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 結果로 비추어 보아 本 試料가 특히 大食細胞의 活性에 效果的으로 關與함을 알 수 있다.

B cell의 抗體形成能을 評價하는 方法으로, 赤血球 表面抗原과 그에 대한 抗體와의 結合에 의하여 생기는 凝集反應을 보는 赤血球凝集素價와 赤血球의 表面 抗原과 抗體의 結合體에 異種의 補體를 加함으로써 생기는 赤血球의 溶血反應을 보는 溶血素價 評價에서는, 모두 對照群에 비하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았다(Table 8).

以上の 結果로 보아 桑葉은 특히 大食細胞 活性에 效果的으로 作用한 것으로 보인다. 특히 上記한 結果와 本草學의 效能으로 볼 때, 免疫 增強뿐만 아니라 免疫 調節作用이 있을 것으로 思料되어 알려져 등의 免疫 過剩 反應에 대한 研究가 追加的으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

## V. 結 論

桑葉의 免疫 調節 作用을 評價하기 위하여 淋巴球 增殖能, 脾臟 免疫細胞 變化, interleukin-12 (IL-12), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 發顯, NO 生成量, carbon clearance, 赤血球 凝集素價 및 溶血素價 등을 測定하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. [3H] Thymidine uptake assay에서는 陰性·陽性 對照群에 比하여 有意性있는 淋巴球 增殖效果를 나타내었다.
2. FACS에 의한 脾臟 免疫細胞 測定에서 helper T cell, T cell 모두에서 對照群에 비해, positive cell이 3배 이상 增加하였다.
3. IL-12의 遺傳子 發顯은 p40에서는 對照群과 큰 差異를 보이지 않았으나, p35에 對하여서는 陽性對照群과 더불어 모든 濃度에서 큰 폭으로 遺傳子 發顯이 增加하였다.
4. IFN- $\gamma$ 의 遺傳子 發顯은 低濃度에서 큰 폭

의 增加를 나타내었다.

5. NO 生成量은 ConA 併用 投與時 陰性對照群에 비하여 有意性있게 NO 生成이 增加되었다.

6. Carbon clearance에 對한 效果에서는 phagocytic index K가 對照群에 比하여 有意性있는 增加를 나타내었다.

7. 赤血球凝集素價와 溶血素價 測定에서는 모두 對照群에 비하여 增加하였으나 有意성은 나타나지 않았다.

### 參 考 文 獻

1. 서울대학교의과대학 : 腫瘍學, 서울, 서울大學校出版部, p.137, pp.1-3, 214-215, 225-234, 1989.
2. 豫防醫學과 公衆保健 編輯委員會 : 豫防醫學과 公衆保健, 서울, 癸丑文化社, p.426, 1987.
3. 金春元 : 病理學, 서울, 新光出版社, p.84, 1989.
4. 李尙仁 : 本草學, 서울, 修書院, p.219, 1981.
5. 孫星衍輯 : 神農本草經, 臺北, 文光圖書有限公司, p.167, 1979.
6. 全國韓醫科大學教授共編著 : 本草學, 서울, 永林社, pp.145-146, 1991.
7. 李時珍 : 圖解本草綱目(下卷), 臺北, 文光圖書有限公司, pp.1180-1183, 1982.
8. 徐榮培 : 桑葉에 관한 文獻的 研究, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集2(2), pp.47-81, 1994.
9. 허균 : 桑葉(Mori Folium) 장기섭취시 자연 발생성 고혈압 백서의 고혈압 발생과정에 관한 연구, 한양대학교 석사학위논문, 1983.
10. 洪承喆 : 桑寄生(Viscum Celeratum Nakai)의 순환기계에 대한 약리적 연구, 부산대학교 박사학위논문, 1974.
11. 백창봉 : 桑枝가 원위의 血壓 및 利尿에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 1978.
12. 許鍾會 : 桑枝煎湯液이 家兔의 血清 總 Cholesterol 및 血壓에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 1978.
13. 申興秀 : 桑白皮 水性 엑기스의 血壓降下作

用에 관한 研究, 조선대학교 석사학위논문, 1980.

14. 蘇淳南 : 桑白皮가 白鼠腹腔 肥滿細胞에 미치는 影響에 관한 細胞 形態學的 變化에 미치는 Dimethyl Sulfoxide의 影響, 전북대학교 석사학위논문, 1986.

15. 金性洙 : 桑白皮로 前處理된 白鼠 肥滿細胞에 미치는 Compound 48/80와 Saponin의 影響, 전북대학교 석사학위논문, 1988.

16. 杜鴻序 : 桑白皮의 TritonX-100에 의한 肥滿 脫顆粒 抑制 效果, 전북대학교 석사학위 논문, 1987.

17. 蘇敬撰·尙志均輯校 : 新修本草, 安徽省, 安徽科學技術出版社, p.335, 1981.

18. Hill R.P. : The basic science of oncology, (eds) Tannock IF and Hill EP., New York, Pergamon Press, pp.259-301, 1992.

19. 李文鎬 : 內科學, 서울, 금강출판사, pp.167-168, 1989-1999, 1979.

20. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.

21. 邢雪梅 : 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況, 한글판 中醫雜誌, No.3, pp.85-90, 1994.

22. 李仲守 : 扶正則積自除, 新中醫, 第10期, p.39, 1984.

23. 陶弘景集 尙志均點校 : 名醫別錄, 北京, 人民衛生出版社, p.68, 1986.

24. 孫思邈 : 千金翼方, 臺北, 自由出版社, p.38, 1982.

25. 唐慎微 : 經史證類大觀本草, 서울, 崇文社, pp.358-359, 1976

26. 申信求 : 申氏本草學(各論), 서울, 壽文社, pp.259-261, 1982.