

시라자 추출물을 함유하는 면역질환의 치료 및 예방을 위한 면역증강용 조성물

박길순^{1,2} · 장인애^{1,2} · 김윤철³ · 이무형^{1,2} · 신혜영¹ · 최두영⁴ · 윤용갑^{1,2} · 박 현^{1*}

1:원광대학교 인수공통감염병연구센터 및 의과대학 감염생물학교실, 2:한의학대학 방제학교실, 3:약학대학, 4:의과대학 소아과학교실

Composition Comprising the Extract of *Anethi Fructus* for the Treatment and Protection of Immune Activity

Gil Soon Park^{1,2}, In Ae Chang^{1,2}, Youn Chul Kim³, Moo Hyung Lee^{1,2}, Hye-Young Shin¹, Du Young Choi⁴, Yong Gab Yun^{1,2}, Hyun Park^{1*}

1:Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, Wonkwang University School of Medicine, 2:Department of Oriental Medical Prescription, College of Oriental Medicine, 3:College of Pharmacy, 4:Department of Pediatrics, College of Medicine, Wonkwang University

In the recent, increased concern has been focused on the pharmacology and clinical utility of herbal extracts and derivatives as a drug or adjunct to chemotherapy and immunotherapy. Here we investigated the role of the extract of *Anethi Fructus* in the expression of inflammatory mediators, surface molecule, and related receptors *in vitro*. In murine macrophage RAW 264.7 cells and peritoneal macrophages of C57BL/6N mice, water extract of *Anethi Fructus* increased the production of secretory tumor necrosis factor (TNF)-a and Nitric oxide (NO), and the expression level of CD14, LPS co-receptor and CD86, co-stimulatory molecule compared to negative natural extract *ex vivo*. The water extract of *Anethi Fructus* increased the production of interferon (IFN)-g from splenocytes. Also, water extract of *Anethi Fructus* increased ConA-induced cell proliferation. These results suggest that water extract of *Anethi Fructus* may enhance the immune response through immune modulation of macrophage and lymphocytes.

Key words : *Anethi Fructus*, TNF-a, Nitric oxide, co-stimulatory molecule

서론

세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응시, 대식세포 및 림프구 활성의 조절은 의약품의 치료 효과의 결정에 있어서 중추적인 역할을 한다. 활성화된 대식세포에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 (superoxide anion, O₂⁻), 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species) 및 질산(nitric acid, NO)의 생산은 비특이적 면역에 있어서 중요한 세포독성 및 세포 활성 억제기작이다¹⁾. 대식세포에 의한 ROS 및 NO의 생성에 어떤 천연화합물이 영향을 미치는지 많은 연구들이 수행되어 왔다. 대식세포는 항원을 제시하거나(antigen-presenting) 증양을 없애

거나(tumoricidal) 미생물세포를 죽이는(microbicidal) 세포로서, 세포매개(cell-mediated) 또는 체액성 면역(humoral immunity)에 중심적인 역할을 하는 조절세포로 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식억제활성을 보인다^{2,3)}.

시라자(時羅子)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 *Anethum graveolens* L.의 과실을 말하고, 일명 소회향(小茴香)이라고도 불린다. 이 식물의 높이는 60 cm-90 cm에 이르고 잎은 우상분열하고 열편은 아주 가늘어서 열핏 보기에는 매우 섬세한 초형을 지니고 있으며 여름서부터 아주 선명한 황색의 산형과가 핀다. 약용으로 하는 것은 과실인데 가을에 결실 성숙되면 과지(果枝)를 채집하여 햇볕에 말린 다음에 두드려주면 과실만이 떨어지기 때문에 적절한 크기의 눈을 갖는 채로 쳐서 협작물을 제거하고 과실만을 취하여 약용하게 된다. 이 약물은 신(辛)·온(溫)하고 방향(芳香)으로

* 교신저자 : 박 현, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학

· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6768

· 접수 : 2007/03/07 · 채택 : 2007/05/25

한사(寒邪)를 제거하고 위를 따뜻하게 하여 복중냉통(腹中冷通)과 위한구토(胃寒嘔吐)의 증상을 치료하여 왔다⁴⁾. 화학 성분은 과실 중량의 2-4%가 정유이며 주성분은 카르본(carvone)으로 되어있다. 또한 리모넨(limonene), 딜라피올(dillapiol), 베르갑텐(bergaptene), 페난프렌(phenanthrene), r-시토스테롤(r-sitosterol) 등이 있으며⁵⁾, 이들 성분 중에서 카르본을 위주로 하는 정유는 주로 구풍제 및 방향건위제로 쓰여 왔다. 약리 연구를 살펴보면, 시라자의 정유의 주성분에 해당하는 알파-카르본(α -carvone)은 기관지의 흥분을 완화시켜주기 때문에 천식의 발작을 진정시키는 효과가 크다는 약리효과가 입증되고 있다. 한편 알파-카르본은 비타민 C의 중성 작용에도 관여한다는 보고가 있다. 이것은 알파-카르본이 어떤 특수한 기전을 거쳐 비타민 C의 생합성을 돕는 것으로 예측되고 있다⁶⁾. 시라자의 전초를 추출한 역기스제를 정맥주사 한 동물실험에서는 혈압을 낮춰주는데 이는 혈관을 확장하는 작용에 기인하는 것으로 알려졌다. 또한 호흡을 흥분시키며 이뇨작용도 아울러 기대할 수가 있다고 하였으나, 상기 약물의 면역기전에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

이에 저자들은 시라자 추출물을 가지고 선천 면역과 후천 면역에 관계되는 여러 가지 인자를 연구의 대상으로 하여 실험하였으며 inflammatory mediator의 생산, cytokine의 유도활성, 세포 내 신호전달, 세포표면 molecule의 발현에 관한 연구를 통하여 시라자의 면역증강 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

한국식물추출물은행으로부터 전통적인 생약추출 방법인 약탕기를 사용하여 추출한 후 여과하여 건조 시킨 생약시료를 분양 받아 실험에 이용하였다. 시라자를 자연 건조시킨 후 잘게 절하여, 건조된 시라자 1 kg에 증류수 2 L를 가하여 70°C에서 가열추출을 3회 행한 후, 여과하고 가압 농축하여 동결건조 한 후 시라자 추출물 3 g을 수득하였다.

2. Mouse splenocytes 와 macrophages 준비

C57BL/6 마우스로부터 spleen을 분리하여 micro slide glass로 잘게 으갠 뒤, 0.4 um nylon cell strainer로 여과하였다. 1200 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 증류수를 이용하여 적혈구를 파괴하였다. Splenocytes를 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell 수를 측정하였다. C57BL/6 마우스 복강에 3% thioglycollate를 주입하고, 4일 뒤 경추 탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 PBS를 넣어 peritoneal macrophage를 분리하였다. 분리된 macrophage는 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell 수를 측정하였다.

3. Nitric oxide analysis

RAW 264.7 세포와 peritoneal macrophage를 96웰 마이크로 플레이트에 웰 당 4105씩 분주한 후 50 g/ml 또는 100 g/ml의 상기 시라자 물 추출물을 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24 시간 후에 상층액을 취하여 Griess reagent를 이용하여 550nm에

서 흡광도를 측정하여 nitric oxide의 농도를 구한다.

4. TNF- α analysis

RAW 264.7세포와 peritoneal macrophage를 96 웰 마이크로 플레이트에 웰 당 4×10⁵ cells씩 분주한 후 50 ug/ml 또는 100 ug/ml의 시라자 추출물을 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 처리하였다. LPS는 대조군으로 1 ug/ml을 처리하였다. 상층액을 취하여 sandwich ELISA 방법으로 TNF- α 의 양을 측정하였다.

5. 마우스 spleen 세포의 IFN-생산에 미치는 효과

마우스로부터 spleen을 취하여 fractionation하지 않은 splenocyte를 분리한 다음 96 웰 마이크로 플레이트에 3.5×10⁵ 세포를 분주한다. C57BL/6 마우스를 이용하여 ex vivo 연구를 실시한 결과 후천면역의 marker로써 IFN-r의 Con-A-induced splenocytic 생산을 ELISA로 확인하였다. 이때 시라자 추출물은 50 g/ml로 24시간 처리하였고 Con-A 처리 농도는 1 g/ml이었다.

6. 마우스 splenocyte의 증식에 미치는 효과

마우스로부터 spleen을 취하여 fractionation하지 않은 splenocyte를 분리한 다음 96 웰 마이크로 플레이트에 1×10⁶ 세포를 분주한다. 시라자 추출물 50 g/ml을 24시간 동안 con-A 없이 혹은 con-A를 넣은 다음 mouse splenocyte의 증식을 MTS assay를 통해 조사해 보았다

7. Salmonella의 ingestion과 증식에 미치는 영향

S. typhimurium Invasion Assay 하루 전에 세포수를 1×10⁵으로 맞추고 1% penicillin/streptomycin 및 10% FBS(GIBCO, USA)를 포함하는 DMED(GIBCO, USA) 배지를 접종 후 5% CO₂, 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양한다. 배양한 배지는 제거하고 항생제를 함유하지 않은 배지로 교환한 후 Standard curve에 의해 4 × 10⁵으로 맞춘 S. typhimurium을 접종한다. 5% CO₂, 37°C 항온기에서 2시간 동안 배양 후 세포를 1× PBS로 2~3번 씻는다. 항생제를 함유하지 않은 배지를 접종하고 gentamicin이 50 ug/ml 되도록 처리한 후 5% CO₂, 37°C 항온기에서 2시간 동안 배양 한다. 배양 후 세포를 1× PBS로 2~3번 씻고 항생제를 함유하지 않은 배지를 접종하고 시라자 100 ug/ml가 되게 처리한 후 5% CO₂, 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양 한다. 세포 증식을 측정하기 위해서 20 μ l CellTiter 96 (Promega, USA)를 첨가하고 5% CO₂, 37°C 항온기에서 1시간 동안 배양 후 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 또한 배양한 배지를 제거, 1% Triton X-100을 접종하고 LB broth에 희석하여 LB Agar (ACROS, USA)에 도말 한 다음 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 집락을 계수하여 CFU/ml를 구하였다.

8. 마우스 macrophage의 세포표면분자의 발현에 미치는 영향

마우스 primary macrophage를 분리하여 1×10⁶ 세포에 시라자 추출물 100 g/ml을 24시간 처리 한 뒤 1% BSA로 blocking을 하고 다양한 세포 표면 항체로 FACS 분석을 실시하였다. 각 항

체의 양은 0.25 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ 로 처리하였고, 양성대조군인 LPS는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였다.

결 과

1. 시라자 추출물의 NO 및 TNF-a 분비 효과 확인

RAW 264.7 세포와 peritoneal macrophage에 시라자 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 24시간 처리한 후 Griess 반응으로 NO 생성을 측정하였고 ELISA 방법으로 TNF-a를 측정하였다. 시라자 추출물이 NO 생성에 미치는 효과와 염증 매개 물질(inflammatory mediator)인 TNF-a 분비 능력을 알아보기 위해 실험을 실시 한 결과 Fig. 1 과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포와 primary peritoneal macrophage 모두에서 공통적으로 NO와 TNF-a의 생성이 증가하였다. TNF-a의 경우, 시라자를 처리한 세포가 음성 대조군인 천궁에 비해서 많은 양의 TNF-a를 분비하였다.

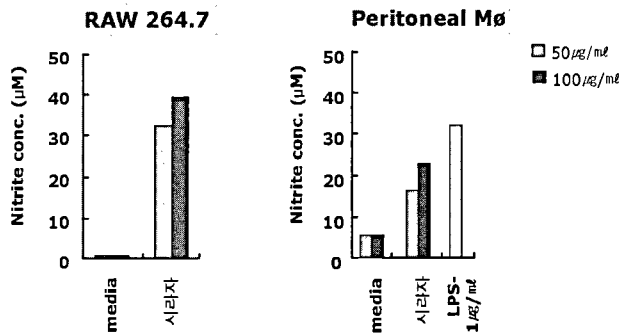


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *Anethi fructus* of NO production in RAW264.7 cells and murine peritoneal macrophages. NO production was determined by the Griess as nitrite accumulation in the medium after 24hr in RAW264.7 cell (A) and murine peritoneal macrophages (B).

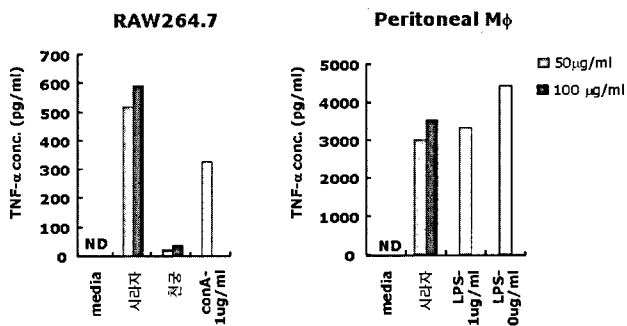


Fig. 2. Effect of the aqueous extract of *Anethi fructus* of TNF-a production in RAW264.7 cells and murine peritoneal macrophages. TNF-a secretion was subsequently analyzed by ELISA in the medium after 24hr in RAW264.7 cell (A) and murine peritoneal macrophages (B).

2. 시라자 추출물의 IFN-g 분비 효과

마우스로부터 분리한 splenocytes(3×10^5 cell/well)에 시라자 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 후 24시간 후에 IFN-g의 분비를 ELISA로 측정하였다. 이때 Con-A 처리 농도는 1 g/ml 이었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 음성대조군인 천궁은 IFN-g를 생산하지 않았으나,

시라자 처리 세포는 IFN-g를 con-A에 의해 유도된 splenocytes로부터 생산하였다.

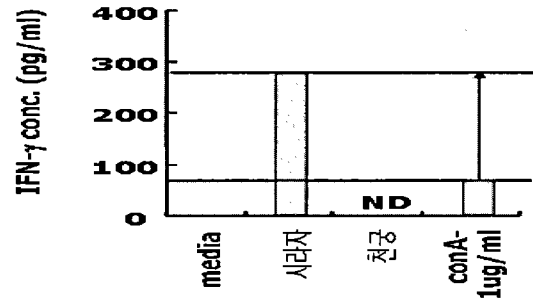


Fig. 3. Effect of the aqueous of *Anethi fructus* on IFN-r production in murine splenocytes. Splenocyte ($1 \times 10^6/\text{ml}$) of C57BL/6N mice were cultured with *Anethi fructus* at five concentration at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 24 hr. IFN-g measurements in the culture supernatant were performed by a Mouse OptEIAM ELISA IFN-g set.

3. 시라자 추출물의 세포 증식에 미치는 효과

시라자가 적응 면역 반응에 영향을 주는지 알아보기 위해, 마우스로부터 분리한 splenocytes(1×10^6 cells/well)에 시라자 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 24시간 동안 con-A 없이 혹은 con-A를 넣은 다음 mouse splenocyte의 증식을 MTS assay를 통해 조사해 보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 시라자 추출물은 세포증식을 증가시켰다. 그러나 지금까지의 음성 대조군으로 이용한 천궁의 경우 약간의 영향을 미치는 것으로 분석된다.

- Unfractionated spleen cells 4.5 X 10⁵ cells/well
- 24hr treatment

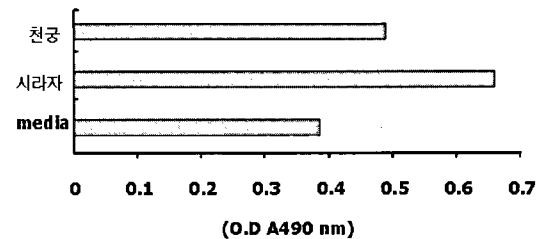


Fig. 4. Effect of the aqueous of *Anethi fructus* on proliferation in murine splenocytes. Splenocytes ($1 \times 10^6/\text{ml}$) of C57BL/6N mice were cultured with *Anethi fructus* at five concentration at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 24hr. Proliferation of splenocytes was performed by MTS assay.

4. 시라자 추출물의 S. typhimurium 성장에 미치는 영향

24시간 배양한 *S. typhimurium* 를 세포에 접종한 후 시라자 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하여 5% CO_2 , 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양한다. 세포 증식을 측정하기 위해서 20 μl CellTiter 96 (Promega, USA)를 첨가하고 5% CO_2 , 37°C 항온기에서 1시간 동안 배양 후 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 또한 배양한 배지를 제거, 1% Triton X-100을 접종하고 LB broth에 희석하여 LB Agar (ACROS, USA)에 도말 한 다음 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 집락을 계수하여 CFU/ml를 구하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 시라자를 투여한 세포군의 살모넬라균 증식량이

투여하지 않은 군에 비해 적은 것을 확인할 수 있었다.

결론

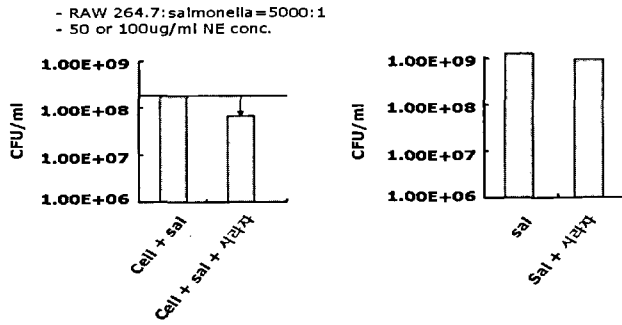


Fig. 5. Effect of the aqueous of *Anethi fructus* on CFU of *S. typhimurium*. *S. typhimurium* infected-Raw 264.7 cells were cultured for 24h in the absence or presence of the aqueous of *Anethi fructus*. The growth of *S. typhimurium* was examined spectrophotometrically at 490 nm. Colony forming unit, values are presented as the mean of three independent experiments.

5. 시라자 추출물의 세포표면 분자의 발현에 미치는 영향

C57BL/6N mouse로 부터 분리한 primary macrophages(1×10^6 cells/tube)에 시라자 100 μ g/ml을 24시간 처리 한 뒤 co-stimulatory molecules과 TLR-4 수용체 발현을 FACS 분석을 이용하여 측정하였다. Co-stimulatory molecules과 TLR-4 수용체 발현에서 각 항체의 양은 0.25 μ g/ 1×10^6 으로 처리 하였으며, LPS 10 μ g/ml을 처리한 양성 대조군과 비교하여 결과를 분석하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이, 항원존재세포(antigen presentation cell)에서 발현하는 B7 분자인 CD86과 CD80의 발현이 시라자 추출물 처리 시 음성대조군(전공)에 비해 증가하였고 TLR4와 LPS와 LBP complex의 공동수용체(co-receptor)인 CD14의 발현이 현저히 증가 하였다.

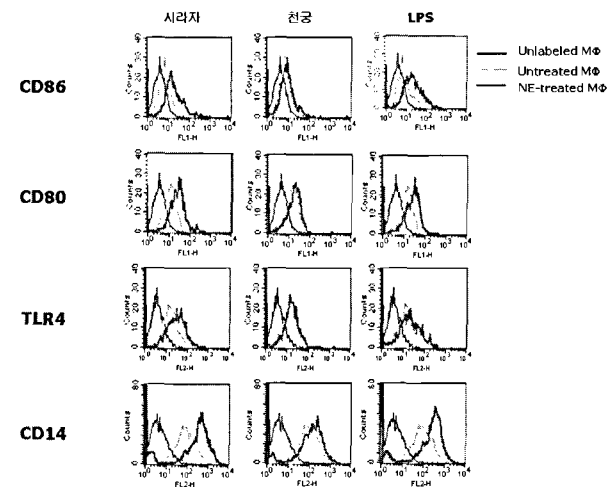


Fig. 6. Effect of the aqueous extract of *Anethi fructus* on the expression of co-stimulatory molecules and TLR-4 receptor in murine peritoneal macrophages *in vitro*. Peritoneal macrophages were treated for 24hr at 37°C with PBS, *Anethi fructus* extracts and LPS. After washing 1×10^6 cells/tube were stained for 30min at 37°C with FITC-labeled monoclonal antibodies to CD86, CD80, CD14 and TLR-4. These cells were also stained with isotype-matched control antibody (black line). The expression levels of cells surface molecules were determined using FACS analysis. Data are representative of at least three independent experiments.

지금까지 현존하는 모든 생물체들은 자기와 생물학적으로 구별되는 비자기 감염원과의 끊임없는 상호작용을 통하여 자신을 감염원으로부터 방어할 수 있는 면역체계를 발전시켜왔다.

대식세포는 외부 병원균의 감염 시 다양한 염증인자 및 항균물질 분비, 식균작용 등을 통해 host defense에 중요한 역할을 수행한다. 대식세포는 선천면역계 및 적응면역계 모두에서 중요한 역할을 수행하여 secondary lymphoid organ 뿐 아니라 거의 모든 조직에 광범위하게 분포한다⁷⁾.

또한 병원균 유래 위험인자 등에 반응하여 이들을 제거하고 각종 cytokines, chemokine 및 inflammatory mediators를 생성하여 개체의 다른 면역체계에 생체 내 감염이나 injury가 있음을 알리는 일차적인 역할을 수행한다⁸⁾. 대식세포는 INF-g등의 사이토카인 수용체를 가지고 있다. 이들은 보체성분, 인터페론, IL-1 및 종양괴사인자와 같은 사이토카인을 생산하여 T-세포로부터 생산되는 여러 가지 사이토카인에 의해 기능이 증강될 수 있다⁹⁾. 대식세포는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주 방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식억제활성을 보인다. 또한 TNF- α 와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 반응에도 관여한다¹⁰⁾.

여러 위험인자의 인식에는 다양한 면역 수용체들이 관여하는데 이중에서도 TLR가 가장 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. TLR은 현재까지 10여 종류가 선천면역 반응에 관여한다는 것이 알려져 있으며 흥미롭게도 이들 각각 혹은 서로의 조합에 의해 거의 모든 병원균을 인식할 수 있다¹¹⁾. 여러 가지 천연물질 중 시라자의 추출물이 macrophage cell line인 RAW264.7 세포와 primary peritoneal macrophage에서 NO와 TNF-a의 생산을 증가시켰다. 마우스에서 splenocyte를 분리하여 IFN-g의 생산을 확인한 결과 상기 한약재는 IFN-g의 생산을 증가시켰으며 이것은 cell-mediated 면역반응의 중심 세포인 T 세포의 활성화에 관여함을 의미하고 이때 세포의 proliferation에도 영향을 미침을 증명하였다.

또한 시라자 추출물은 박테리아 증식 억제 효과를 나타내고 있음을 확인하였다. 이러한 선천면역세포, 즉 macrophage의 활성화는 mitogen-activated kinase의 활성을 통해 이루어지면 상기 한약재의 처리는 antigen presentation에 관여된 molecule과 T 세포를 자극할 수 있는 co-stimulatory molecule (특히 CD86 & CD80)의 발현을 증가시켰으며 시라자 처리시 TLR4와 CD14 molecule의 증가는 시라자 추출물의 처리로 인한 초기 면역 반응의 자극에 관련되어 있음을 나타내고 있다.

이 연구를 통해 시라자 추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 조성물을 함유하는 건강 식품 보조제 또는 약재 조성물 개발로 동물을 비롯한 사람에게도 면역 증강을 유도 할 수 있음을 시사하며 인수 공통감염 모델에의 적용에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

참고문헌

1. Kroncke, K.D., Fehse, I.K., Suschek, C., Kolb, B.V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol* 1: 1407-1420, 2001.
2. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginene-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolitic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 144(4):1425-1431, 1990.
3. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350, 1997.
4. Fleming, T. PDR for Herbal Medicines. Medical Economics Company. 252-253, 2000.
5. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Nikiforov, A. Comparative Analysis of Different Dill herb and Dill seed oils constituent by Means of GC/FID and GC/MS. *Ernahrung/Nutrition.* 18: 534-536, 1994.
6. Baumann, C.A., John, B.F., Ralph, S.O., Karl, P.L. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. X. induced vitamin excretion in the rat and its effect on the hypoprothrombinemia caused by 3,3'-methylenebis (4-hydroxycoumarin). *J. Biol. Chem.* 146: 7-14, 1942.
7. Janeway, C.J., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002.
8. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296: 301-305, 2002.
9. Nacy, C.A., Meltzer, M.S. T-cell-mediated activation of macrophages. *Curr. Opin. Immunol.* 3(3):330-335, 1991.
10. Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A., Yamazaki, S. Secretino of TNF-a, IL-8 and Nitric oxide by Macrophages Activated with *Aguricus blazei* Murill Fractions in vitro. *Cell structure and function.* 26(2):103-108, 2001.
11. Akira, S. and Takeda, K. Toll-like receptor signaling. *Nature Rev. Immunol.* 4: 499-511, 2004.
12. 은재순, 이경아, 박 훈, 권 진. 오가피·지골피 병용투여가 면역반응에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 20(3):657-662, 2006.