

원저

桑椹子가 3T3-L1 전지방세포 분화시 cytokine에 미치는 영향

박병철 · 차윤엽

상지대학교 한의과대학 한방재활의학과 교실

Effects of *Mori Fructus* on cytokines of 3T3-L1 Cell Line

Byung-Cheol Park, O.M.D., Ph.D., Yun-Yeop Cha, O.M.D., Ph.D.

Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University

Objectives

In recent years, we are concerned about anti-aging and longevity. And I heard that *Mori Fructus* has been used for promotion of health in local clinics. So I wanted to know immuno-ability of *Mori Fructus* and carried out this experiment.

Methods

We cultivated 3T3-L1 Preadipocytes and Protein chip used for ProteoPlex™ 16-Well Murine Cytokine Array Kit.

Results

We know the immunity of *Mori Fructus* about 3T3-L1 Preadipocytes and gained the increase of Cytokines(IL-2, IL-4, IL-12p70, GM-CSF, INF- γ , TNF- α).

Conclusions

So I guess that *Mori Fructus* has effect of immuno-ability, etc.

Key Words : *Mori Fructus*, 3T3-L1 cell Line, Cytokine, immuno-ability

■ 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원 한방재활의학과 (033) 741-9260, omdcha@sangji.ac.kr

I. 序 論

최근 들어 생활수준의 향상으로 질병예방 및 노화방지, 장수를 추구하는 경향이 더욱 두드러지고 있으며 이를 해결하기 위한 수단으로 다양한 치료 방법들이 제시되고 있다¹⁾.

그 중 건강을 위협할 수 있는 비만은 고혈압, 성인성 당뇨병, 고지단백혈증, 담석증, 암, 뇌졸중, 협심증 및 변성관절질환 등의 중요한 素因이 되므로²⁾ 임상가에서 많은 관심을 가지고 있으며, 그 중 여러 치료법 중 桑椹子를 많이 사용한다고 하여 그에 대한 연구 결과를 살펴본 바, 抗脂血 효과³⁾, 항산화 작용⁴⁾, 유전자 발현연구⁵⁾ 등은 있었으나, 비만 치료 시 면역력 증강에도 도움이 되는 지 알아보고자 이 실험을 하게 되었다.

사용된 전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포는 3T3 세포로부터 유래된 세포주로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있고, 인슐린이나 그와 유사한 유도물질의 존재 하에서 지방세포(adipocyte)로 분화하는 성질을 갖고 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는데 널리 사용되고 있다⁶⁾.

이에 저자는 桑椹子の protein chip에서의 변화양상을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 방법

桑椹子(*Mori Fructus*)는 원주 제일약품사에서 얻어진 약재를 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 桑椹子를 다려서 filtration하는 방법

먼저 桑椹子 100g을 세척하여, 5,000ml 등근 플라스크에 증류수를 3,000ml와 함께 넣어 3시간 동안 전탕하였다. 전탕액을 16겹의 거즈로 거르고, 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 회수율은 13.97%였다.

2) Cytokines 실험

(1) sample 준비

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주를 2×10^5 cells/ml 농도로 부유시켜 48시간 배양한 뒤 DMEM 배지로 교체하였다. 이를 더 배양한 뒤 confluent 상태가 되었을 때 분화배지 (10% FBS, 1% Penicillin/streptomycin, $5 \mu\text{g/ml}$ insulin, $1 \mu\text{M}$ dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine)로 교체하여 2일간 배양하였다. 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해 $5 \mu\text{g/ml}$ insulin이 포함된 DMEM와 한약재를 처리하여 3일간 배양하고 배지 상등액을 취해, $5,000 \times \text{g}$, 4°C , 5분 동안 원심분리해서 cell debris를 제거하고 상등액을 가지고 실험하였다.

(2) Cytokines protein chip array

Protein array chip은 Proteoplex™ 16-Well Murine Cytokine Array Kit(Novagen, U.S.A)를 사용하였고, 실험방법은 제조사의 기준으로 수행하였다.

1.25ml 1×Sample Diluent를 Murine Cytokine Standard Mix 1 powder와 섞어 Cytokine Standard를 대조군으로 준비하고 serial dilution해서 용량을 800, 400, 133, 44, 15pg/ml 이 되도록 준비하였다. PBST로 2번 slide를 wash하고 배지상등액과 Sample Diluent를 1:1 비율로 희석하였다. sam-

ple과 standard 100 μ l를 well에 loading하고 1 시간 동안 실온에서 incubation하였고 PBST로 4 번 wash하였다. reconstituted Murine Detection Antibody Cocktail 1을 slide의 각 well에 80 μ l loading하고 1시간 동안 실온에서 incubation하였다. PBST로 4번 wash하고 reconstituted Sensi-Light PBXL-3을 slide의 각 well에 100 μ l loading 하였다. 1시간 30분 동안 실온에서 incubation하고 PBST로 4번 wash하고 slide를 분리하였다. 1×Rinse Solution으로 채워진 Slide Rinser에 10초 동안 slide를 넣었고 Slide Dryer에 slide를 넣고 200× g, 1분 동안 원심분리하며 말린 후 slide를 scan (GenePix 4000B, Axon Instruments, U.S.A)하였다. excitation은 635nm, emission은 660nm, resolution은 10 μ m 이었다.

3. 통계분석

桑椹子가 3T3-L1 지방세포 분화시 cytokine에 미치는 영향에 관한 유의성 평가는 SPSS7.5 for windows(SPSS, Inc.)를 이용하여 Student T-test를 실시하여 P<0.05를 유의성 있다고 하였다.

III. 實驗結果

1. 桑椹子가 3T3-L1 지방세포 분화시 cytokine에 미치는 영향

발현되는 cytokine은 대조군에 비하여 모두 증가하는 경향의 결과를 얻었다. 모두 유의하게 증가하였으나 IL-12p 70에서는 유의하게 증가하지는 않았다(Fig. 1, 2).

IV. 考 察

桑椹子是 桑科에 속한 낙엽교목인 뽕나무 *Morus alba* L. 및 同屬 近緣植物의 열매가 紅紫色을 나타낼 때 채취하여 晒乾한 것을 말하며, 性은 寒 無毒하고, 味는 甘酸하다. 補血滋陰, 生津潤燥의 효능이 있다⁷⁾.

桑椹子の 약리작용에 대한 연구에 의하면 면역기능을 증강시키고, Na⁺, K⁺, ATP의 효소활성을 저하시키는 것으로 보고되어 있다⁸⁻¹⁰⁾.

면역이란 외부로부터 미생물, 동물의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응



Mori Fructus



Control(Cytokine standard)

Fig. 1. Images of cytokine expression in 3T3-L1 of *Mori Fructus*.

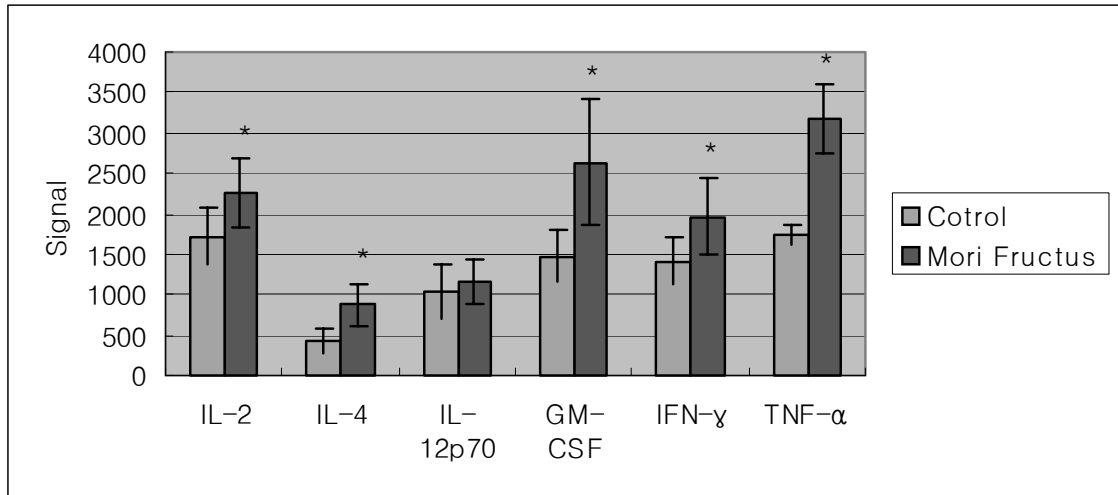


Fig. 2. Change of cytokines in 3T3-L1 of *Mori Fructus*. (P<0.05)

하여 항체를 만들고 개체의 항상성을 유지하는 현상으로 생체가 자기분비와 주변분비를 식별하는 기구이며 면역반응이란 주변분비를 항원으로 인식하고 특이하게 항체를 생산하여 이를 처리하는 연쇄적인 반응이며¹¹⁾ 이는 크게 암세포 등에 직접 작용하는 세포성면역반응과 부가적인 역할을 수행하는 체액성면역반응으로 나뉠 수 있다¹²⁾.

이처럼 건강과 면역력은 밀접한 관련이 있으므로 최근 임상가에서 건강 증진 및 비만치료에 응용하고 있는 桑椹子의 면역력에 대해서 알아보았다.

면역을 담당하는 세포 중 하나인 림프구에 있는 T세포는 세포막에 존재하는 단백질 종류에 의해 크게 CD4라는 단백질을 갖는 CD4+T세포와 CD8이라는 단백질을 갖는 CD8+T세포로 나뉘어 지는데, 그 중 CD4+T세포는 일명 helper T세포라고 불리며, Th1과 Th2 2가지로 나뉘어 지는데, Th1세포는 대식세포 활성화작용 및 killer T세포의 활성화작용을 하는 T세포이고, Th2세포는 항체생산작용을 하는 T세포이다. Th1과 Th2는 같은 CD4+T세포이지만 방출하는 cytokine이 다르다. Th1이 방출

하는 cytokine은 Interleukin-2(IL-2), Interferon-γ(IFN-γ) 등이고, Th2가 방출하는 cytokine은 Interleukin-4(IL-4), Interleukin-5(IL-5), Interleukin-6(IL-6)이다¹³⁾.

그 중 IL-2는 killer 세포의 활성화 및 B세포와 NK cell의 증식을 촉진시키며, IFN-γ는 대식세포와 NK cell을 활성화시키며, IL-4는 B세포를 형질세포로 분화시켜, 항체 생산을 촉진하는 작용을 하며 Interleukin-10(IL-10)은 Th1세포의 cytokine의 생성억제와 증식을 억제하는 작용을 한다¹³⁾.

IL-2는 자기성(autocrine)과 비자기성(paracrine) 성장인자로 작용하며 항원에 특이한 T 림프구 팽창에 관여한다. IL-2는 또한 T 림프구의 사이토카인 생성을 강화하고 그 반응을 증폭시킨다¹⁴⁾.

이상에서 볼 때 IL-2는 면역기능의 항진과 저하에 중요한 역할을 하는데, 桑椹子의 cytokine이 대조군에 비해 증가한 것으로 보아, 면역기능 조절에 효과 있을 것으로 사료된다.

IL-4(B세포 활성화물 혹은 분화인자-1으로 알려짐)는 B세포가 IgG1과 IgE를 생성하도록 활성화와

분화를 유발하기도 하고 성장인자와 활성인자로서 T세포에 작용한다. 또 대식세포에서는 MHC 클래스 II의 발현을 유발하는 반면 사이토카인의 생성을 억제한다. IL-4가 과량 생산되면 IgE의 생성이 증가하여 알레르기를 일으킨다¹⁵⁾.

桑椹子는 IL-4에서도 대조군에 비해 2배가량 증가를 나타내는 효과를 보였다.

IL-12p70은 대식세포와 NK cell의 활동촉진과 IFN- γ 생성을 유발하는 작용을 하며¹⁶⁾, 桑椹子는 IL-12p70에 경미한 증가를 나타낸 것으로 큰 역할을 하지 않는 것으로 보인다.

granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF, 과립구 대식세포 집락 자극인자), M-CSF(대식세포 집락 자극인자), G-CSF(과립구 집락 자극인자)는 활성화된 T 림프구, 대식세포, 내피세포, 그리고 기질 섬유아세포에 의해 합성되며, 골수에 작용하여 염증성 백혈구의 생산을 증가시키는 작용을 하는 cytokine이다. 또한, G-CSF는 내분비 호르몬으로서의 작용을 하는데, 염증부위에서 생성되어 염증반응으로 인해 소모된 호중구를 대체하기 위해 골수로부터 호중구를 이동시킨다. GM-CSF도 대식세포 활성화 인자로서 랑게르한스 세포로부터 수지상세포로의 분화를 촉진한다.

IFN- γ 는 cytokine 분비를 촉진하는데¹⁵⁾, 桑椹子는 대조군에 비하여 증가하는 것으로 보아 이에 관여하는 것으로 보인다.

tumour necrosis factor(TNF, 종양괴사인자)는 그람-음성 세균에 대한 반응의 주된 매개자이며, 그리고 또한 다른 감염성 미생물에 대한 자가면역반응에 있다. T림프구에 의해 생성되는 IFN- γ 는 LPS에 의해 자극된 단핵식세포로부터의 TNF 합성을 증가시킨다. 이와 같이 TNF는 자연 및 특이면역의 매개자이며 특이면역반응과 급성 염증반응의 중요한 연결자이다¹⁴⁾.

이상의 실험결과를 통해 桑椹子는 신체의 전반

적인 면역기능을 증강시키는 효과가 있을 것으로 생각이 되며 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

桑椹子 추출물을 전처리한 3T3-L1 전지방세포를 Protein chip으로 cytokine에 미치는 영향을 분석한 결과 발현되는 cytokine들은 모두 대조군에 비하여 증가하였으며, IL-2, IL-4, GM-CSF, IFN- γ , TNF에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

이상으로 보아 桑椹子 추출물은 면역력 증강에 효과가 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. 차운엽, 김성수. 대개의 HepG2 cell 산화억제 효과 및 유전자 발현 profile 분석에 대한 연구. 한방재활의학과학회지. 2003;13(4):147-71.
2. 대학병리학회. 병리학. 서울:高文社. 2005:436-7.
3. 광영, 신길조, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 桑枝, 桑葉, 桑白皮 및 桑椹子の 抗脂血 효과에 관한 연구. 경희의학. 1992;8(1):44.
4. 박용기, 강병수. 桑椹子の 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1999;14(2):43-50.
5. 박병철, 차운엽. 桑椹子の 항산화효과 및 3T3-L1 세포주의 유전자 발현에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2007;17(3):19-33.
6. Green H, Kehinde O., An established preadipose cell line and its differentiation in culture. Cell. 3, 1974:127-133
7. 金先熙 외 10인. 본초학. 서울. 영림사. 1991:598-9.

8. 謝明寸. 中醫藥材學. 臺北. 正中書局. 1990: 622-3.
9. 陸昌洙 外. 한약의 약리성분 임상응용. 서울. 쏘 丑文化社. 1982:748.
10. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典(上). 서울. 成輔社. 1980:1967-8.
11. 菊地浩吉 外(李淵台 譯). 최신 면역학. 서울. 集文堂. 1989:33, 335.
12. 서울대학교 의과대학. 중양학. 서울대학교 출판부. 1992:1-3, 137-43, 151, 225-34.
13. 新谷太. Pathophysiology로 이해하는 내과학 권7. 면역, 알레르기 질환. 정담. 2002:5-11.
14. 김광혁 외. 세포 분자 면역학. 정문각. 1998: 307-8, 320, 329, 341-2, 467.
15. 하대유. 그림으로 본 면역학. 서울:고문사. 1994: 102-3.
16. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David male. Immunology. Mosby. 1996:8, 11.