

귀전우 다당류 분획이 생쥐의 T 및 B 임파구와 대식세포의 활성화에 미치는 영향

강재우 · 신지섭 · 방준성 · 장성훈 · 이일화 · 전 훈 · 김대근 · 오찬호¹ · 조형권² · 은재순*

우석대학교 약학대학, 1: 우석대학교 과학기술대학, 2:(유)한풍제약

Effects of Polysaccharide Fraction from *Euonymus alatus* Sieb on T-, B-Lymphocytes and Macrophages in Mice

Jae Woo Kang, Ji Seop Shin, Jun Sung Bang, Sung Hoon Jang, Rihua Li, Jeon Hoon, Dae Geun Kim, Chan Ho Oh¹, Hyoung Kwon Cho², Jae Soon Eun*

College of Pharmacy, 1: College of Science Technology, Woosuk University, 2: Hanpoong Pharmaceutical Company

Effects of polysaccharide fraction from *Euonymus alatus* Sieb (EPF) on the immune response of T-, B-lymphocytes and macrophages were examined *in vitro* and *in vivo* system. EPF (500 mg/kg) were administered *p.o.* twice a day for 5 days to C57BL/6 mice, and then the cells were separated from mice. EPF decreased the viability of thymocytes, but increased the viability of splenocytes *in vitro* and *in vivo* system. Also, the administration of EPF enhanced the population of helper T cell and cytotoxic T cell in thymocytes and did not affect the population of splenocytes. Furthermore, EPF enhanced the phagocytic activity and the production of nitric oxide in peritoneal macrophages *in vivo* system. These results suggest that EPF regulates an immune response *via* the enhancement of mature T lymphocytes and B lymphocytes viability and phagocytic activity of macrophages.

Key words : *Euonymus alatus* Sieb (EPF), thymocytes, splenocytes, macrophages

서 론

귀전우는 낙엽관목인 화살나무(*Euonymus alatus* Sieb.)의 줄기 또는 가지의 날개를 함께 채취하여 건조한 것으로 우리나라 전지역에서 자생하며 맛은 약간 쓰다¹⁾. 귀전우의 성분으로는 evonine, alataimine²⁾, kaemperol, quercetin¹⁾, cardenolides³⁾, chlorogenic acid⁴⁾, 3,4-dihydroxycinnamic acid⁵⁾ 등이 알려져 있으며, 약리작용으로는 혈당강하작용⁶⁾, 지질저하작용⁷⁾, 항암작용^{5,8,9)} 및 면역조절작용¹⁰⁾ 등이 보고되었다. 대부분의 보고들은 귀전우를 ethanol, methanol 또는 petroleum ether 등의 유기용매로 추출하여 실험하였으나, 이등⁸⁾은 귀전우를 물로 추출하여 실험한 결과 면역세포의 활성화에 의해 항암작용이 나타난다고 보고하였으며, Chung 등¹⁰⁾은 귀전우를 물로 추출하여 실험한 결과 복강 대식세포를 활성화하는 작용이 있음을 보고하여 귀전우에

함유된 면역조절물질이 수용성 물질임을 강력히 제시하였으나, 아직까지 정확한 성분을 규명하지 못하고 있다. 따라서 본 실험에서는 귀전우에 함유된 수용성 물질 중 주로 다당류에 대한 면역조절작용을 관찰하고자, 다당류 분획을 분리하여 특이적 면역반응을 주도하는 T 및 B 임파구 및 비특이적 면역반응을 주도하는 대식세포에 대한 활성을 측정할 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 6 주령 C57BL/6계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고행사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

* 교신저자 : 은재순, 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2008/08/23 · 수정 : 2008/09/15 · 채택 : 2008/10/06

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), lipopolysaccharide (LPS), γ -interferon (γ -IFN), lucigenin, MTT, zymosan, N-naphthylethylenediamine · 2HCl은 Sigma Chemical Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4 antibody, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220 antibody, FITC-conjugated anti-Thy1 antibody는 Dainippon seiyaku Co., 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), multifunctional microplate reader (TECAN, infinite F200 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 귀전우는 전라북도 진안군에서 채집하여 우석대학교 천연물학 교실 김대근교수에게 확인받아 음건한 후 600 g을 증류수 2 L로 3회 추출하여 100 ml로 농축한 다음, 무수 ethyl alcohol 900 ml에 넣어 교반한 후 생성된 침전을 여과하고 동결건조하여 실험에 사용하였다 (수득률 2.1%, 이하 EPF라 칭함. WSP-2008-01).

4. 흉선세포, 비장세포 및 복강 대식세포의 분리

생쥐의 흉선세포 및 비장세포의 분리는 Wysocki¹¹⁾ 및 Mizel¹²⁾ 등의 방법을 이용하였다. 즉, 생쥐를 CO₂ 가스로 질식사킨 후, 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심 분리) 흉선세포 및 비장세포 부유액으로 하였다. 복강 대식세포의 분리는 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 4일째 CO₂ 가스로 질식사켜 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 세포를 모아 대식세포로 하였다. 세포배양시에는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml-100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. *In vivo* 실험에서는 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 EPF 500 mg/kg을 1일 2회씩 5 일간 경구투여한 다음 동일한 실험을 실시하였다.

5. 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann¹³⁾이 개발하여 Kotnik 등¹⁴⁾이 변형시킨 MTT법으로 측정하였다. 즉, 96-well plate의 각 well에 1×10^7 cells/ml 농도로 부유시켜, 세포를 분주한 다음 흉선세포에는 concanavalin A (Con A) 5 μ g/ml를, 비장세포에는 lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/ml를 첨가한 후, 37°C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS

100 μ l를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

6. 흉선세포 및 비장세포의 아집단 측정

T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다¹⁵⁾.

7. 대식세포의 탐식능 측정

분리한 대식세포를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin chemiluminescence 측정은 multifunctional microplate reader를 이용하여 37°C에서 측정하였다^{16,17)}. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 대식세포 부유액 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l 및 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 최종 volume이 200 μ l가 되도록 한 후, 37°C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence (LC) 양을 측정하였다.

8. 대식세포로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells을 분주한 후 대식세포로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법¹⁸⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 다음, 배양액 100 μ l와 Griess 시약 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylethylenediamine · 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37°C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO⁻의 농도를 환산하였다.

9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean \pm S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's *t*-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실 험

1. 세포생존율에 미치는 효과

대조군의 흉선세포에 mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF를 50, 10, 5 및 1 μ g/ml 각각 처리하였을 때 92.6 \pm 1.5, 98.8 \pm 1.6, 99.3 \pm 1.1 및 97.0 \pm 1.1%로 대조군에 비해 50 μ g/ml 농도에서

감소되었으며, Con A를 처리하였을 때 대조군의 세포생존율은 120.2 ± 2.2%로 Con A를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, EPF를 50, 10, 5 및 1 µg/ml 각각 처리하였을 때 112.5 ± 1.3, 118.7 ± 1.8, 119.4 ± 1.7 및 120.2 ± 1.8%로 대조군에 비해 50 µg/ml 농도에서 감소되었다. 대조군의 비장세포에 mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF를 50, 10, 5 및 1 µg/ml 각각 처리하였을 때 111.7 ± 2.2, 107.2 ± 1.6, 104.1 ± 1.8 및 101.0 ± 1.1%로 100 및 10 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 증가하였으며, LPS를 처리하였을 때는 대조군의 세포생존율은 140.9 ± 1.3%로 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, EPF를 50, 10, 5 및 1 µg/ml 각각 처리하였을 때 149.4 ± 1.2, 147.6 ± 1.4, 138.8 ± 1.9 및 139.7 ± 1.5%로 100 및 10 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 증가하였다(Table 1).

Table 1. Effect of polysaccharide fraction from *Euonymus alatus* Sieb. (EPF) on the cell viability of murine thymocytes and splenocytes *in vitro*

Cells	Mitogen	EPF Concentration(µg/ml)	Cell Viability(%)
Thymocytes	Con A(-)	-	100.0 ± 2.4
		50	92.6 ± 1.5*
		10	98.8 ± 1.6
		5	99.3 ± 1.1
		1	97.0 ± 1.1
	Con A(+)	-	120.2 ± 2.2###
		50	112.5 ± 1.3*
		10	118.7 ± 1.8
		5	119.4 ± 1.7
		1	120.2 ± 1.8
Splenocytes	LPS(-)	-	100.0 ± 1.7
		50	111.7 ± 2.2**
		10	107.2 ± 1.6*
		5	104.1 ± 1.8
		1	101.0 ± 1.1
	LPS(+)	-	140.9 ± 1.3###
		50	149.4 ± 1.2*
		10	147.6 ± 1.4*
		5	138.8 ± 1.9
		1	139.7 ± 1.5

Thymocytes (1 × 10⁶ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with concanavalin A and splenocytes (1 × 10⁶ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with lipopolysaccharide. The data represents the mean ± SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group (p < 0.05, **; p < 0.01, ***; p < 0.001). #: Significantly different from Con A or LPS non-treated group (###; p < 0.001). Con A(-); Concanavalin A non-treated group. Con A(+); Concanavalin A-treated group. LPS(-); Lipopolysaccharide non-treated group. LPS(+); Lipopolysaccharide treated group.

In vivo 실험에서 흉선세포에 mitogen인 Con A를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF 500 mg/kg을 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 89.5 ± 0.9%로 대조군에 비해 감소하였으며, Con A를 처리한 대조군은 121.5 ± 1.5%로 Con A를 처리하지 않았을 때에 비해 증가하였고, EPF 500 mg/kg을 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 109.4 ± 1.5%로 대조군에 비해 감소하였다. 비장세포에 mitogen인 LPS를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF 500 mg/kg을 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 119.1 ± 2.2%로 대조군에 비해

증가하였으며, LPS를 처리한 대조군은 160.7 ± 2.5%로 LPS를 처리하지 않았을 때에 비해 증가하였으며, EPF 500 mg/kg을 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 185.0 ± 2.9%로 대조군에 비해 증가하였다(Table 2).

Table 2. Effect of the administration of EPF (500 mg/kg) on the cell viability of murine thymocytes and splenocytes *in vivo*

Cells	Mitogen	Control	EPF
Thymocytes	Con A(-)	100.0 ± 1.8	89.5 ± 0.9***
	Con A(+)	121.5 ± 1.5###	109.4 ± 1.5**
Splenocytes	LPS(-)	100.0 ± 1.6	119.1 ± 2.2***
	LPS(+)	160.7 ± 2.5###	185.0 ± 2.9***

EPF (500 mg/kg) were administered *p.o.* twice a day for 5 days, and the thymocytes and splenocytes were separated. The data represents the mean ± SE of 5 mice. *: Significantly different from control group (**; p < 0.01, ***; p < 0.001). #: Significantly different from Con A or LPS non-treated group (###; p < 0.001).

2. 임파구 아집단에 미치는 효과

대조군의 흉선세포 중 CD4⁺CD8⁺ 세포군은 대조군에서 77.4 ± 0.6%, CD4⁺CD8⁻ 세포군은 10.9 ± 0.4%, CD4⁻CD8⁺ 세포군은 3.5 ± 0.2% 이었으며, EPF 투여군은 67.1 ± 0.5, 17.4 ± 0.6, 6.2 ± 0.6%로 대조군에 비해 CD4⁺CD8⁺ double positive 세포군은 감소하였으며, CD4⁺CD8⁻ single positive 세포군 및 CD4⁻CD8⁺ single positive 세포군은 증가하였다. 대조군의 비장세포 중 B220 positive 세포군 (B220⁺)은 37.5 ± 0.8% 이었으며, Thy1 positive 세포군 (Thy1⁺)은 16.6 ± 0.1% 이었고, EPF 투여군은 38.6 ± 1.0 및 16.3 ± 1.3%로 대조군과 별 차이가 없었다. 대조군의 비장세포 중 CD4⁺CD8⁻ single positive 세포군은 15.1 ± 0.3% 이었으며, CD4⁻CD8⁺ single positive 세포군은 7.7 ± 0.2% 이었고, EPF 투여군은 15.1 ± 0.1 및 8.7 ± 0.1%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Effect of the administration of EPF on the subpopulation of murine thymocytes and splenocytes *in vivo*

Cells	Subtypes	Cell Subpopulation (%)	
		Control	EPF
Thymocytes	CD4 ⁺ CD8 ⁺	77.4 ± 0.6	67.1 ± 0.5**
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	10.9 ± 0.4	17.4 ± 0.6***
	CD4 ⁻ CD8 ⁺	3.5 ± 0.2	6.2 ± 0.6*
Splenocytes	B220 ⁺	37.5 ± 0.8	38.6 ± 1.0
	Thy1 ⁺	16.6 ± 0.1	16.3 ± 1.3
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	15.1 ± 0.3	15.1 ± 0.1
	CD4 ⁻ CD8 ⁺	7.7 ± 0.2	8.7 ± 0.1

EPF (500 mg/kg) was administered *p.o.* twice a day for 5 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody and splenocytes were PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. *: Significantly different from control group (p < 0.05, **; p < 0.01, ***; p < 0.001).

3. 복강 대식세포의 phagocytic activity에 미치는 효과

Lucigenin chemiluminescence (LC)은 대식세포에 의해 탐식이 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 생성된다¹⁹. 복강 대식세포로부터 생성되는 LC 양은 EPF 50, 10 및 1 µg/ml 처리하였을 때 농도의존적으로 대조군에 비해 LC양이 감소하였다(Fig. 1). *In vivo* 실험에서는 EPF 투여군에

서 분리한 복강 대식세포에서 분비되는 LC양이 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 2).

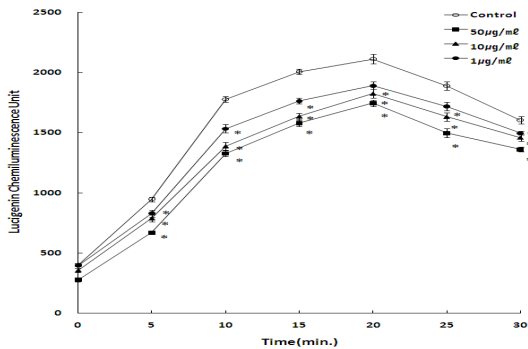


Fig. 1. Effect of EPF on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells (2×10^6 cells/ml) were treated with EPF (50, 10 and 1 µg/ml), respectively, and were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with a multifunctional microplate reader. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. \ddagger : Significantly different from control group ($p < 0.001$).

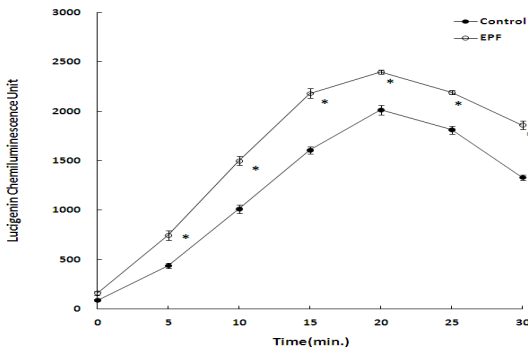


Fig. 2. Effect of the administration of EPF on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vivo*. EPF (500 mg/kg) were administered *p.o.* twice a day for 5 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was measured for 30 min with a multifunctional microplate reader. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. \ddagger : Significantly different from control group ($p < 0.001$).

Table 4. Effect of the administration of EPF on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages *in vivo*

Samples	Mitogen (LPS and γ -IFN)	Nitric oxide (μ M)	
		24hr	48hr
Control	-	1.5 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
	+	49.8 \pm 0.9 ^{###}	67.9 \pm 1.3 ^{###}
EPF	-	1.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
	+	67.9 \pm 0.9 ^{**}	87.3 \pm 3.4 ^{**}

EPF (500 mg/kg) were administered *p.o.* twice a day for 5 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 3rd day. The peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hr in the presence of mitogen (LPS and γ -IFN). The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. \ast : Significantly different from control group ($\ast\ast$: $p < 0.01$). $\#$: Significantly different from mitogen non-treated group ($p < 0.001$).

4. 복강 대식세포로부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 24 및 48시간 후 1.5 \pm 0.1 및 1.6 \pm

0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 49.8 \pm 0.9 및 67.9 \pm 1.3 μ M로 증가하였다. EPF 투여군은 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량이 67.9 \pm 0.9 및 87.3 \pm 3.4 μ M로 대조군에 비해 증가하였다(Table 4).

고 찰

흉선세포는 흉선의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T (Th) lymphocyte 및 cytotoxic T (Tc) lymphocyte로 분화되며, Th 세포로 분화된 세포들은 각종 cytokine을 분비하여 다른 T와 B 림파구 및 대식세포의 증식과 분화를 촉진하며, Tc cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 대식세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 흉선세포에는 미성숙 T 림파구와 성숙 T 림파구가 혼합되어 있으나, 비장세포에는 B 림파구, T 림파구 및 대식세포가 혼재되어 있으며, T 림파구는 성숙 T 림파구만이 존재하는 것으로 알려져 있다²⁰. 흉선세포에 T 림파구 mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF 50, 10, 5 및 1 µg/ml을 각각 처리하였을 경우 대조군에 비해 50 µg/ml의 농도에서 세포생존율이 감소하였으며, T 림파구 mitogen인 Con A와 EPF 50, 10, 5 및 1 µg/ml을 처리하였을 경우에도 대조군에 비해 50 µg/ml의 농도에서 세포생존율이 감소하였다. 비장세포에 B 림파구 mitogen인 lipopolysacchride (LPS)를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, EPF 50, 10, 5 및 1 µg/ml을 각각 처리하였을 경우 10 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, B 림파구 mitogen인 LPS와 EPF 50, 10, 5 및 1 µg/ml을 처리하였을 경우에도 10 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. 이 결과는 EPF가 B 림파구의 생존율을 증가시켜 면역능을 활성화할 수 있음을 시사하는 것이다.

한편, EPF를 5일간 1일 2회씩 경구투여하고 분리한 흉선세포의 세포생존율은 Con A를 처리하지 않은 경우나 처리한 경우 모두 대조군에 비해 감소하였으나, 비장세포의 세포생존율은 LPS를 처리하지 않은 경우나 처리한 경우 모두 대조군에 비해 증가하였다. 이는 EPF가 흉선세포에 직접작용하여 세포생존율을 감소시키고, 비장세포에 직접작용하여 세포생존율을 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 강력히 시사하는 것이다.

대조군의 흉선세포 중 CD4⁺CD8⁺ double positive 세포는 76.4%, Th (CD4 single positive cell) 세포는 10.9%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 3.5%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4⁺CD8⁻ 세포는 약 12%, CD4⁺CD8⁺ 세포는 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며²¹, EPF를 투여하였을 때 CD4⁺CD8⁺ double positive 세포는 대조군에 비해 감소하였으며, CD4⁺CD8⁻ 세포와 CD4⁺CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였다. 이는 EPF가 미성숙 T 세포를 활성화하여 성숙 T 세포인 helper T 세포와 cytotoxic T 세포로 분화를 증가시킴으로서 면역능을 증가시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 대조군의 비장세포 중 B220⁺ 세포는 37.5%, Thy1⁺ 세포는 16.6% 이었으나, EPF를 투여

하였을 때 B220⁺ 세포 및 Thy1⁺ 세포는 대조군과 별 차이가 없었다. 대조군의 비장세포 중 helper T 세포는 15.1%, cytotoxic T 세포는 7.7%로 나타났으며, EPF를 투여하였을 때 helper T 세포 및 cytotoxic T 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 EPF가 성숙한 T 세포에는 영향을 주지 않고, 미성숙 T 세포에 작용하여 성숙 T 세포로 분화를 촉진하여 면역능을 조절하고 있음을 시사하는 것이다.

외부로부터 이물질이 침입하면 대식세포가 활성화되어 탐식능이 증가하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 복강 대식세포로부터 생성되는 lucigenin chemiluminescence (LC)양을 측정할 결과 EPF를 *in vitro*에서 처리하였을 때 대조군에 비해 LC양이 농도의존적으로 감소하였으나, *in vivo* 실험에서는 EPF를 투여하였을 때 LC양이 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 EPF가 간접작용에 의해 탐식능을 증가시키고 있음을 시사하는 것이다.

세균, 기생충 및 암 등이 생체에 들어오면 대식세포에서는 NO synthase (NOS)에 의해 nitric oxide (NO)가 생성되어 다양한 생체 방어반응을 나타내는 것으로 알려져 있으며²³⁾, 특히 T 임파구의 생명을 조절하는 등 생체의 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 실험에서 LPS와 γ -interferone을 처리하지 않은 대조군에서 분비되는 NO 양은 24 시간 및 48 시간 후 각각 1.5 및 1.6 μ M 이었으나, LPS와 γ -interferone을 처리하였을 때는 49.8 및 67.9 μ M로 증가하였으며, EPF를 투여하고 분리한 복강 대식세포에서 분비되는 NO양은 LPS와 γ -interferone을 처리하였을 때에 비해 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 EPF 물추출물이 *in vitro*계에서 NO 생성을 촉진한다는 Chung 등의 보고¹⁰⁾와 비교하였을 때 EPF를 투여하면 직접작용에 의해 대식세포로부터 NO 생성을 촉진함으로써 비특이적 면역반응을 증가시킬 수 있으며, 이의 주성분이 다당류일 가능성을 강력히 시사하는 것이다.

결 론

귀전우 다당류 분획 (EPF)은 미성숙 T 임파구의 성숙을 촉진하고, B임파구를 활성화하며, 대식세포의 탐식능을 증가시켜 면역능을 증가시킨다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구임 (지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단)

참고문헌

1. 생약학교재편찬위원회. 생약학, 동명사, p 224, 2005.
2. Huang, K.C. The pharmacology of Chinese herbs. Boca Raton: CRC Press, pp 93-94, 1993.
3. Kitanaka, S., Takido, M., Mizoue, K. and Nakaike, S. Cytotoxic cardenolides from woods of *Euonymus alata*,

- Chemical and Pharmaceutical Bulletin 44: 615-617, 1996.
4. Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G., Moon, S.K., Kim, C.H. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* 77(22):2760-2769, 2005.
5. Park, W.H., Kim, S.H., Kim, C.H. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination. *Toxicology*, 207(3):383-390, 2005.
6. Fang, X.K., Gao, Y., Yang, H.Y., Lang, S.M., Wang, Q.J., Yu, B.Y., Zhu, D.N. Alleviating effects of active fraction of *Euonymus alatus* abundant in flavonoids on diabetic mice. *Am. J. Chin. Med.* 36(1):125-140, 2008.
7. Park, S.H., Ko, S.K., Chung, S.H. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol.* 102(3):326-335, 2005.
8. Eun, J.S., Park, S.H., Kweon, J., Kim, Y.A., Kang, S.Y., Oh, C.H. and Jeon, H. Cytotoxicity of petroleum ether extract of *Euonymus alatus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(3):253-258, 1995.
9. Lee, J.H., Kim, H.K. and Ha, T.Y. Antitumor effect of winged *Euonymus* against chemically induced and malignant cell implanted-tumors in mice. *Kor. J. Immunol.* 15(2):243-247, 1993.
10. Chung, H.S., Jeong, H.J., Kim, J.S., Jeong, S.I., Kim, K.S., Kim, K.S., Kang, B.K., Ahn, J.W., Baek, S.H., Kim, H.M. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Euonymus alatus* in mouse peritoneal macrophages. *Clin. Chim. Acta.* 318(1-2):113-120, 2002.
11. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2844-2848, 1978.
12. Mizel, S.B., Openheim, J.J., Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 120: 1497-1503, 1979.
13. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65: 55-63, 1983.
14. Kotnic, V., Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 129: 23-30, 1990.
15. Suda, T., Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879, 1994.

16. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C., Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174: 259-268, 1994.
17. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S., Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 112: 163-168, 1988.
18. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B., Clark, I.A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9):3280-3283, 1991.
19. Channon, J.Y., Leslie, C.C., Johnston, Jr.R.B. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.* 41: 450-455, 1987.
20. Miceli, M.C., Parnes, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53: 59-63, 1993.
21. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). pp 177-178, 1994.
22. Breiheim, G., Stendahl, O., Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 45: 1-8, 1984.
23. Nathan, C.F., Hibbs, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65-70, 1991.
24. Kilbourn, R.G., Griffith, O.W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Instit.* 84(11):828-831, 1992.