

금잔화 추출물이 생쥐의 임파구 및 대식세포의 활성화에 미치는 영향

은재순*

우석대학교 약학대학

Effects of *Calendula Officinalis* L. Extract on the Activation of Murine Lymphocytes and Macrophages

Jae Soon Eun*

College of Pharmacy, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of *Calendula officinalis* extract (CE) on the activation of murine lymphocytes and macrophages. CE was administered *p.o.* once a day for 7 days at the concentration of 500 mg/kg. The administration of CE increased the viability of thymocytes, but decreased the viability of splenocytes. Also, CE increased the viability of thymocytes and splenocytes at the concentration of 5 µg/ml *in vitro*. The administration of CE did not affect the population of thymic CD4⁺/CD8⁺ cells and splenic CD4⁺/CD8⁺ cells. Furthermore, the administration of CE enhanced the phagocytic activity of peritoneal macrophages, but decreased the phagocytic activity *in vitro*. CE decreased the production of nitric oxide from peritoneal macrophages *in vivo* and *in vitro* system. These results suggest that CE enhance of cell viability by a direct influence on thymocytes and phagocytic activity by an indirect influence on peritoneal macrophages.

Key words : *calendula officinalis*, thymocytes, splenocytes, macrophages

서 론

금잔화 (*Calendula officinalis* L.)는 국화과 (Compositae)에 속하는 쌍떡잎식물로, 그 모양이 금잔 (金盞)과 비슷하여 생긴 이름으로 영어로는 마리골드 (marigold)라고 한다. 지중해 연안과 남유럽이 원산지이며, 크기는 10~30 cm 정도이고, 한해살이 또는 두해살이 풀로서 선모 같은 털이 있고 가지가 갈라지며, 꽃은 황색으로 7~8월경에 피고, 가지와 원줄기 끝에 두상화가 1개씩 달리며, 가장자리의 것은 설상화이다. 선모 같은 털로 인해 독특한 냄새가 나며, 이뇨, 발한, 완하 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾.

금잔화에 함유된 성분으로는 triterpene류, triterpene oligoglycoside류 및 flavonol glycoside류가 보고되었으며^{2,3)}, 약리작용으로는 항산화작용^{4,6)}, 간보호작용⁷⁾, 항염작용⁸⁾, 항균작용⁹⁾, 항곰팡이작용¹⁰⁾, 항바이러스작용^{11,12)} 및 항암작용^{13,14)} 등 다양한

활성이 있음이 보고되었으나, 금잔화의 면역조절작용에 대한 보고는 Zahra¹⁵⁾ 등이 금잔화 에탄올 추출물을 *in vitro*에서 처리시 phytohemagglutinin에 의해 유도된 임파구 증식을 촉진시킨다는 보고 외에 별로 없었다. 따라서 본 실험에서는 금잔화의 면역조절작용을 관찰하고자 금잔화 추출물을 생쥐에 경구투여한 후 임파구 및 대식세포의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 ICR계 수컷 20 ± 2 g을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20 ± 3°C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 실험재료 및 시약

실험에 사용한 금잔화 (*Calendula officinalis*) 추출물은 미국

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

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

· 접수 : 2009/05/26 · 수정 : 2009/06/15 · 채택 : 2009/07/20

HANSSON Corp.사에서 제조한 마리골드 에탄올 추출물 (Lot. No. MG/07-01-024)을 구입하여 사용하였으며 (이하 CE라 함.), 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), lucigenin, zymosan, MTT, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, sulfanilamide, concanavalin A (Con A), lipopolysaccharide (LPS), γ -interferon (γ -IFN)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co.에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 cell culture 용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), white multi-well plate (96-well, Nunc), microplate-reader (Molecular Devices, SoftMax Pro5), Infinite F200 (TECAN, Austria), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

3. 생쥐 흉선세포, 비장세포 및 대식세포의 분리

생쥐의 흉선세포 및 비장세포의 분리는 Wysocki¹⁶⁾ 및 Mizel¹⁷⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 CE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 생쥐를 CO₂ gas로 질식사시켜 사망시킨 후, 적출한 흉선 또는 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 원심분리), 흉선세포 및 비장세포 부유액으로 하였다. 대식세포의 분리는 CE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고, 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

4. 흉선세포 및 비장세포의 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann¹⁸⁾이 개발하여 Kotnik¹⁹⁾ 등이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 흉선세포 또는 비장세포를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 1.2×10^7 cells/ml로 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100 μ l씩을 분주하고 흉선세포에는 concanavalin A (Con A) 5 μ g/ml를 비장세포에는 lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37°C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT 용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고 차광하였다. 4시간 후에 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하고, 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate

reader로 570 nm에서 측정하였다. *In vitro* 실험에서는 분리한 흉선세포 및 비장세포에 CE 1, 5 및 10 μ g/ml를 48 시간 처리하고 동일한 실험을 실시하였다.

5. 흉선세포 및 비장세포의 아군집 측정

분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척한 후, 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 다음 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다²⁰⁾.

6. 복강 대식세포로부터 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 대식세포를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 Infinite F200를 이용하여 37°C에서 측정하였다^{21,22)}. 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 양을 측정하였다. *In vitro* 실험에서는 CE 1, 5 및 10 μ g/ml를 처리하고 30분 후에 동일한 실험을 실시하였다.

7. 복강 대식세포로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells을 분주한 후 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법²³⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100 μ l와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고, 37°C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

8. 통계처리

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

결 과

1. 흉선세포 및 비장세포의 세포생존율에 미치는 효과

약물을 투여하고 분리한 흉선세포에 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 $125.7 \pm 2.8\%$ 로 증가

하였으며, CE를 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 149.6 ± 6.2%로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 169.4 ± 7.8%로 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 분리한 비장세포에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 167.8 ± 7.5%로 증가하였으며, CE를 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 81.5 ± 5.8%로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 145.5 ± 4.8%로 대조군에 비해 감소하였다(Table 1). *In vitro* 실험에서 흉선세포에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 148.0 ± 0.9%로 증가하였으며, CE 1, 5 및 10 µg/ml를 각각 처리하였을 때 5 µg/ml 이상의 농도에서 세포생존율이 대조군에 비해 증가하였다. 비장세포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 139.6 ± 2.1%로 증가하였으며, CE 1, 5 및 10 µg/ml를 각각 처리하였을 때 5 µg/ml 이상의 농도에서 세포생존율이 대조군에 비해 증가하였다(Table 2).

Table 1. Effects of the administration of *Calendula officinalis* L. extract (CE) on the cell viability of mitogen treated-thymocytes and splenocytes in mice.

Samples	Cell Viability (%)			
	Thymocytes		Splenocytes	
	Con A(-)	Con A(+)	LPS(-)	LPS(+)
Control	100.0 ± 9.2	125.7 ± 2.8	100.0 ± 6.8	167.8 ± 7.5
CE	149.6 ± 6.2***	169.4 ± 7.8***	81.5 ± 5.8*	145.5 ± 4.8***

CE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes and splenocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A (Con A) on thymocytes or lipopolysaccharide (LPS) on splenocytes. The data represents the mean ± SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (; p<0.05, **; 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

Table 2. Effects of CE on the cell viability of thymocytes and splenocytes *in vitro*.

Samples	Dose (µg/ml)	Cell viability (%)			
		Thymocytes		Splenocytes	
		Con A(-)	Con A(+)	LPS(-)	LPS(+)
Control	-	100.0 ± 1.8	148.0 ± 0.9	100.0 ± 1.7	139.6 ± 2.1
CE	1	103.3 ± 1.4	149.4 ± 1.6	101.6 ± 1.9	139.3 ± 1.4
	5	109.1 ± 1.7**	160.9 ± 1.1***	113.4 ± 1.2***	149.2 ± 1.1*
	10	121.9 ± 1.5***	174.6 ± 1.5***	123.5 ± 2.1***	154.7 ± 2.1***

The various concentration of CE (1, 5, 10 and 10 µg/ml) were added into mouse thymocytes or splenocytes, and then the cells were cultured for 48 hrs. The data represents the mean ± SE from 3 experiments. *; Significantly different from control group (; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001).

2. 흉선세포 및 비장세포의 아군집에 미치는 효과

흉선세포 중 대조군의 CD4⁺CD8⁻ 세포는 12.6 ± 0.4% 이었으며, CD4⁺CD8⁺ 세포는 2.5 ± 0.1% 이었다. CE를 투여하고 분리한 thymic T-lymphocytes 중 CD4⁺CD8⁻ 세포는 12.4 ± 0.8%로, CD4⁺CD8⁺ 세포는 3.1 ± 0.6%로 대조군과 별 차이가 없었다. 비장세포 중 대조군의 B220⁺ 세포는 31.4 ± 0.5% 이었으며, Thy1⁺는 14.8 ± 0.3% 이었다. CE를 투여하고 분리한 비장세포 중 B220⁺ 세포는 29.9 ± 3.5%로, Thy1⁺ 세포는 14.6 ± 0.3%로 대조군과 별 차이가 없었다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의

CD4⁺CD8⁻ 세포는 13.9 ± 0.5% 이었고, CD4⁺CD8⁺ 세포는 6.6 ± 0.3% 이었으며, CE를 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4⁺CD8⁻ 세포는 13.0 ± 0.3%로, CD4⁺CD8⁺ 세포는 6.8 ± 0.1%로 대조군과 별 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Effects of CE on the subpopulation of thymocytes and splenocytes in mice.

Samples	Subpopulation (%)					
	Thymocytes			Splenocytes		
	CD4 ⁺	CD8 ⁻	B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁻
Control	12.6 ± 0.4	2.5 ± 0.1	31.4 ± 0.5	14.8 ± 0.3	13.9 ± 0.5	6.6 ± 0.3
CE	12.4 ± 0.8	3.1 ± 0.6	29.9 ± 3.5	14.6 ± 0.3	13.0 ± 0.3	6.8 ± 0.1

CE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes and splenocytes were stained with 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.

3. 복강 대식세포의 탐식능에 미치는 효과

Chemiluminescence은 탐식이 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가된다²⁴⁾. CE를 투여하고 분리한 대식세포에서 생성되는 lucigenin chemiluminescence 양은 대조군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 1). *In vitro* 실험에서 CE 1, 5 및 10 µg/ml를 각각 처리하였을 때 5 µg/ml 이상의 농도에서 농도의존적으로 대조군에 비해 lucigenin chemiluminescence 양이 감소하였다(Fig. 2).

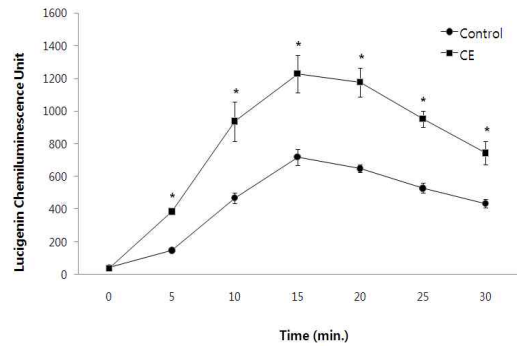


Fig. 1. Effect of the administration of CE on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. CE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean ± SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (p<0.001).

4. 복강 대식세포로부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 대식세포에 LPS와 γ-IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 2.5 ± 0.3 µM 이었으며, CE를 투여하고 분리한 대식세포에서 NO 생성량은 2.3 ± 0.2 µM로 대조군과 별 차이가 없었으나, LPS와 γ-IFN을 처리하였을 때 대조군의 NO 생성량은 11.5 ± 0.4 µM 이었으며, CE를 투여한 군은 9.6 ± 0.3 µM로 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 3). *In vitro* 실험에서 대조군의 대식세포에 LPS와 γ-IFN을 처리하였을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 13.7 ± 0.4 µM 이었으며, CE 1, 5 및 10 µg/ml를 각각 처리하였을 때 13.2 ± 0.8,

11.9 ± 0.7 및 8.9 ± 0.5 μM로 10 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 4).

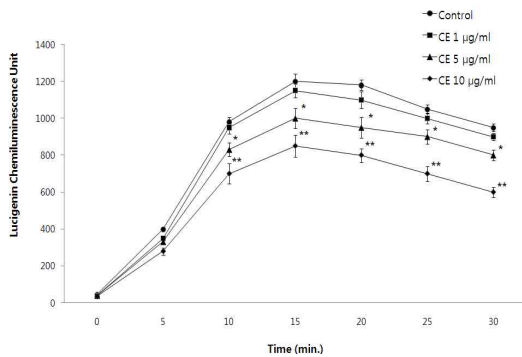


Fig. 2. Effect of CE on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with CE (1, 5 and 10 μg/ml). The chemiluminescence was measured for 30 min with a luminometer. Each bar represents the mean ± SE of 3 experiments. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

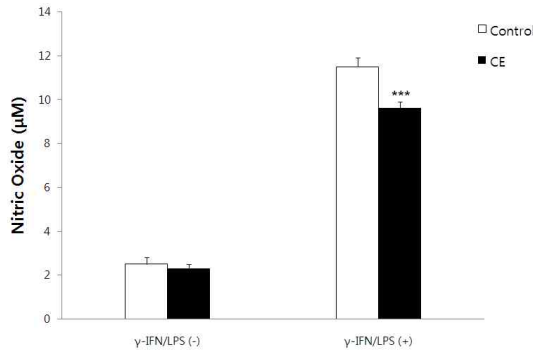


Fig. 3. Effect of the administration of CE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages. CE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hrs. in the presence or in the absence of γ-IFN and LPS. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean ± SE of 5 mice. γ-IFN/LPS (-); γ-interferon and lipopolysaccharide non-treated group, γ-IFN/LPS (+); γ-interferon and lipopolysaccharide treated group. *; Significantly different from control group (**; $p < 0.001$).

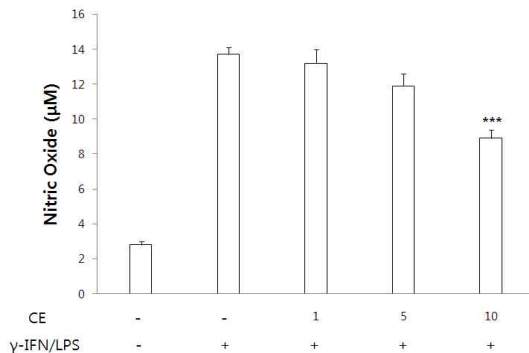


Fig. 4. Effect of CE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages *in vitro*. Peritoneal macrophages were cultured with CE (1, 5 and 10 μg/ml) for 48 hrs. in the presence of γ-IFN and LPS. *; Significantly different from γ-interferon and lipopolysaccharide treated control group (**; $p < 0.001$).

고찰

생체는 외부로부터 항원이 들어오면 입과구가 감작하여 두 가지 형태의 면역반응을 일으킨다. 첫째는 항원의 공격을 숙주의 조직에는 손상을 일으키지 않고 제거하거나 국소염증반응만을 일으키는 정상적인 면역반응이고, 둘째는 면역반응이 원하지 않는 방향으로 진행되어 인체에 병적인 상태를 유발하는 allergy 또는 hypersensitivity이다. 따라서 면역반응은 생체방어의 강도에 따라 생체에 있어서 의미가 전혀 다르게 나타난다²⁵⁾.

흉선세포는 흉선의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (CD4⁺) 및 cytotoxic T lymphocyte (CD8⁺)로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는 γ-IFN 및 IL-2, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 T, B 입과구 및 대식세포의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, B 입과구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

CE를 투여하였을 때 흉선세포의 생존율은 증가하였으나, 비장세포의 생존율은 감소하였다. 이러한 결과가 CE의 직접작용에 의한 것인지를 관찰하기 위해 CE를 *in vitro*에서 처리한 결과 흉선세포 및 비장세포의 생존율이 모두 증가하였다. 이 결과는 CE를 경구투여하였을 때 흉선세포에는 직접적으로 작용하여 세포 생존율을 증가시키며, 비장세포에는 간접적으로 작용하여 세포 생존율을 감소시키고 있음을 시사하는 것이다.

CE를 투여하였을 때 흉선세포의 thymic CD4⁺ 세포 및 thymic CD8⁺ 세포 아군집의 비율은 대조군과 별 차이가 없었으며, 비장세포의 B220⁺ 세포 및 Thy1⁺ 세포의 아군집의 비율과 splenic CD4⁺ 세포 및 splenic CD8⁺ 세포 아군집의 비율도 대조군과 별 차이가 없었다. 이는 CE가 흉선세포 및 비장세포의 아군집의 비율에는 영향을 주지 않음을 의미하는 것이다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 입과구에서 cytokines들을 분비하여 대식세포의 탐식능 등을 증가시키는 것으로 알려져 있어²⁴⁾, 복강 대식세포의 탐식능을 측정하여 보았다. 본 실험에서는 대식세포의 탐식능을 측정하는데 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 대식세포가 particle을 탐식하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써, 탐식능이 진행되는 것을 경시적으로 확인하는 방법이다²³⁾. 대식세포로부터 생성되는 lucigenin chemiluminescence 양을 측정된 결과, CE를 투여하였을 때는 대조군에 비해 현저히 증가하였으나, *in vitro*에서 처리하였을 때는 5 μg/ml 이상의 농도에서 농도의존적으로 감소하였다. 이 결과는 CE가 대식세포에 간접적으로 작용하여 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 있으며²⁷⁾, 특히 T 입과구의 생명을 조절하는 등 생체의 면역반응에 중요한 역할을

하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 본 실험에서 CE를 투여하고 분리한 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 대조군에 비해 NO 생성이 감소하였으며, *in vitro*에서 CE 10 μ g/ml 농도를 처리하였을 때 대조군에 비해 감소하였다. 이는 CE가 대식세포에 직접 작용하여 NO 생성을 억제하고 있음을 의미하는 것이다. NO는 활성화된 대식세포의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에²⁹⁾, CE가 NO 생성을 억제하여 탐식능을 증가시킨 것이 아닌가 추정되나, 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 과제이다.

결 론

금잔화 추출물은 흉선세포에 직접작용하여 세포생존율을 증가시키며, 대식세포에는 간접적으로 작용하여 탐식능을 증가시켜 면역능을 조절하고 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부(지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단) 및 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 완역 중약대사전, 도서출판 정담, p 773, 1997.
2. Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T., Matsuda, H. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chem. Pharm. Bull. 49: 863-870, 2001.
3. Neukirch, H., D'Ambrosio, M., Dall-Via, J., Guerriero, A. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. Phytochem. Anal. 15: 30-35, 2004.
4. Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Falchi, M., Bertelli, A., Morelli, R., Lo Scalzo, R. Antioxidant Activity of *Calendula officinalis* Extract: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. Pharmacology, 83(6):348-355, 2009.
5. Preethi, K. Chandran and Ramadasan Kuttan. Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns. J. Clin. Biochem. Nutr., 43(2):58-64, 2008.
6. Preethi, K.C., Kuttan, G. and Kuttan, R. Antioxidant potential of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. Pharmaceutical. Biol., 44(9):691-697, 2006.
7. Preethi, K.C., Kuttan, R. Hepato and reno protective action of *Calendula officinalis* L. flower extract. Indian J. Exp. Biol. 47(3):163-168, 2009.
8. Della Logia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S. and Issac, O. The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula* flowers. Planta. Med. 60: 516-520, 1994.
9. Dumenil, G., Chemli, R. and Balasard, G. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*. Ann. Pharma. Fran. 38: 493-499, 1980.
10. Kasiram, K., Sakharkar, P.R. and Patil, A.T. Antifungal activity of *Calendula officinalis*. Indian. J. Pharm. Sci. 6: 464-466, 2000.
11. Barbour, E.K., Sagherian, V., Talhouk, S., Talhouk, R., Farran, M.T., Sleiman, F.T. and Harakeh, S. Evaluation of homeopathy in broiler chickens exposed to live viral vaccines and administered *Calendula officinalis* extract. Med. Sci. Monit. 10(8):281-285, 2004.
12. Kalvatchev, Z., Walder, R., Garzaro, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed. Pharmacother. 51(4):176-180, 1997.
13. Barajas-Farias, L.M., Pérez-Carreón, J.I., Arce-Popoca, E., Fattel-Fazenda, S., Alemán-Lazarini, L., Hernández-García, S., Salcido-Neyoy, M., Cruz-Jiménez, F.G., Camacho, J., Villa-Treviño, S. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. Planta Med. 72(3):217-221, 2006.
14. Eva, J.M., Angel, G.L., Laura, P., Ignacio, A., Antonia, C. and Federico, G. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer, 6: 119, 2006.
15. Zahra, A., Mohammed, A. and Mohammed, H.K. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. Journal of Ethnopharmacology, 72: 167-172, 2000.
16. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2844, 1978.
17. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol. 120: 1497, 1979.

18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.* 65: 55, 1983.
19. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.* 129: 23, 1990.
20. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879, 1994.
21. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods,* 174: 259, 1994.
22. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods,* 112: 163, 1988.
23. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of *Plasmodium faciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity,* 59(9):3280, 1991.
24. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 45: 1, 1984.
25. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. Saunders Company (2ed), U.S.A. pp 279-282, 1994.
26. 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.
27. Nathan, C.F., Hibbs, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65-70, 1991.
28. 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.
29. 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.