

## 섬오가피 추출물의 항암관련 사이토카인 분비활성

유수연 · 박원봉\*<sup>\*,#</sup>

대구한의대학교 한약재 약리학과, \*서울여자대학교 자연과학대학 화학과  
(Received February 16, 2010; Revised May 12, 2010; Accepted May 12, 2010)

### Effects of *Acanthopanax koreanum* Extracts on Anticancer Related Cytokine Secretions

Su-Yun Lyu and Won-Bong Park<sup>\*,#</sup>

Dept. of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Kyeongbuk 712-715, Korea  
\*Dept. of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

**Abstract** — Stems and roots of *Acanthopanax koreanum* Nakai were extracted with water and treated on immune cells in order to determine their immunomodulatory activities. Various Th-1 type cytokines were measured using ELISA including interleukin (IL)-2, IL-12, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) secreted by dendritic cells, T-cells, intestinal epithelial cells, natural killer cells, and macrophages. As a result, there was a significant increase in IL-12 and IFN- $\gamma$ , secretion, but there was no change in the secretion of TNF- $\alpha$ . Additionally T-cells slightly increased the secretion of IL-2, but there was a significant increase of IL-2 in intestinal epithelial cells. Therefore, our results suggest that *A. koreanum* Nakai may act as an immunomodulator by stimulating the cell-mediated immunity which can help the immune system defend against infections or cancer cells.

**Keywords** □ *Acanthopanax koreanum*, Cytokines, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$

인삼과 같은 과(오가피과, Araliaceae)에 속해있는 오가피는 잎사귀의 모양이 인삼과 매우 흡사할 뿐 아니라 효능 면에서도 인삼 못지않기 때문에 나무인삼, 또는 나무산삼이라고 부르기도 한다.<sup>1)</sup> 이 식물은 전통적으로 강정, 강장 및 진통목적으로 사용되고 있으며, 민간에서 신경통, 류마티스, 고혈압, 중풍, 당뇨, 습진, 거담 등에 사용되어 왔다.<sup>1,2)</sup> 오가피는 우리나라 전역과 중국 동북부 지방, 러시아의 시베리아, 일본의 북해도 등에 분포하며, 국내에는, 섬오가피(*Acanthopanax koreanum* Nakai), 흰털오가피(*A. divaricatus* var. *albeofructus*), 가시오가피(*A. senticosus*, Maxim) 등 10여종이 자생 또는 재배되고 있다.<sup>1)</sup> 가시오가피는 1960년대 러시아 과학자 Breckman에 의해서 범 적응적 효과가 보고된 이래 세계적으로 주목 받기 시작하였으나 우리나라에는 분포도가 그리 높지 않은 것으로 알려져 있다. 제주지역에 주로 자생하는 섬오가피의 성분으로는 acanthoside D, syringoside, ariansin, chiisanoside 등이 보고되어 있다.<sup>3-5)</sup>

암의 면역학적 치료는 인체 내의 면역세포들이 암세포 표면에

발현되는 정상세포와 다른 구조를 인식함으로써 항암 면역반응을 일으킨다는 데 기초를 두고 있다. 생체 내 정상적으로 존재하는 면역감시기구 중 종양세포를 인지하고 소멸시키는 것은 T세포나 자연살해세포(natural killer cell, NK cell) 등에 의한 세포성 면역기능의 활성화가 중요한 역할을 한다.<sup>6)</sup> T세포의 활성화 과정은 이를 조절하는 항원제시세포(antigen-presenting cell, APC)의 역할이 선행되어야만 하는데, 수지상 세포(dendritic cell)는 고도로 전문화된 항원제시세포로서 resting/naive T세포의 강력한 activator이며, 여러 가지 cytokine을 분비한다.<sup>7-10)</sup>

T세포는 크게 CD8<sup>+</sup>, cytotoxic T(Tc)세포와 CD4<sup>+</sup> helper T(Th)세포로 구분된다.<sup>6,11)</sup> 항암 면역반응은 주로 Tc세포가 암세포상의 MHC class I 항원과 결합된 종양 항원을 인식함으로써 이루어지며 이러한 Tc세포의 완전한 활성화를 위해 Th세포로부터 생성된 cytokine(interleukin-2)의 도움이 필요하다. Th세포는 분비되는 cytokine에 의해 다시 Th-1 type(IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등)과 Th-2 type(IL-4, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  등)로 나뉜다.<sup>12)</sup> Th-1/Th-2 세포는 공통의 naive T세포로부터 분화하며, naive T세포가 항원자극 후에 IL-12 존재 하에서 분화하면 Th-1 세포로, IL-4 존재 하에서 분화하면 Th-2 세포로, 분화한다.<sup>12)</sup>

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-970-5655 (팩스) 02-975-3159  
(E-mail) wbpark@swu.ac.kr

Proinflammatory cytokine을 생산하는 Th-1 세포는 세포매개성 면역반응(cell-mediated immune response)을 촉진한다.<sup>13)</sup> IL-2는 CD4<sup>+</sup> T-세포에 의해 생산되는 T-세포 성장인자로서, NK-세포 및 B-세포의 성장을 촉진하며, Th-2에서 Th-1으로 면역체계를 유도하고 NK-세포를 활성화하여 종양의 전이를 억제시킨다. 또한 활성화된 대식세포나 수지상 세포에 의하여 생산되는 IL-12는 NK-세포를 활성화하며, T-세포나 NK-세포에 의하여 IFN- $\gamma$ 를 생성하게 하는 강력한 유도체이다. IFN- $\gamma$ 는 대식세포를 활성화하며, IL-12의 양을 증가시키고, Th-1 type 반응을 촉진한다. 또한 IFN- $\gamma$ 는 B-세포에 작용하여 IgG급의 항체 생산을 촉진하며, cytotoxic T-세포의 생산을 도와준다. IL-12는 IFN- $\gamma$ 가 생성하는 Th-1 세포의 분화를 증가시켜 특이성 면역의 개발을 촉진한다.<sup>13)</sup> 따라서 IL-12 및 IFN- $\gamma$ 는 virus 등 세포 내 감염과 종양세포에 대한 숙주의 방어에 중요한 영향을 미친다.<sup>14)</sup> TNF- $\alpha$ 는 대식세포에 작용하여 염증반응을 촉진하고, T-세포와 B-세포의 활성화에 co-stimulator로 작용하며, 종양세포에 작용하여 세포자살(apoptosis)을 유도하기도 한다.<sup>15,16)</sup> 한편, Th-2 세포는 anti-inflammatory cytokine인 Th-2 type cytokine(IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 등)을 분비하여 T-세포의 활성을 억제하면서 Th-1 type cytokine의 생산을 억제시킨다.<sup>16,17)</sup> 따라서 Th-1 세포의 활성화 및 Th-2 세포의 억제는 항암면역 기능에 중요한 영향을 미칠 수 있다.

오가피의 면역조절에 관련된 연구로는 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)의 당단백 분획이 NK-세포 및 대식세포를 활성화시키며, IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$ 의 분비를 촉진시킨다는 보고가 있다.<sup>18,19)</sup> 또한 흰털오가피 열매 추출물이 Th-1 cytokine의 분비를 촉진시키며, Th-2 cytokine의 분비를 억제시켜 virus 등 세포 내 감염과 종양세포에 대한 숙주의 방어에 도움이 될 가능성이 있다고 보고된 바 있다.<sup>20)</sup> 또한, 섬오가피로부터 분리한 다당체(polysaccharide)가 B-세포를 활성화시키나 T-세포에는 영향이 없으며,<sup>21)</sup> 섬오가피로부터 분리한 acanthoic acid가 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제시키며,<sup>22,23)</sup> 장내피세포(human colon epithelial cells, IECs)에서 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)와 nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B) 경로를 통한 IL-8의 생산을 억제한다고 보고된 바 있다.<sup>24)</sup>

본 연구에서는 국내자생 섬오가피의 줄기 및 뿌리 추출물의 Th-1 type cytokine인 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비에 미치는 영향을 확인하고, 섬오가피의 암 예방 및 치료물질로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

### 실험방법

#### 시료

섬오가피 뿌리의 물 추출물(AKR) 및 줄기의 물 추출물(AKS)

은 대전생명공학연구소의 이정준 박사팀에서 준비한 시료를 사용하였다. 추출물은 증류수에, 50 mg/ml의 농도로 용해시킨 후, -20°C에 보관하고, 실험 시, 적정 농도로 세포 배양 배지로 희석하여 사용하였다.

#### 세포주 및 배양

Mouse dendritic 세포인 lymphoid 계열의 DC1 세포와 myeloid 계열의 DC2 세포를 서울대학교 의과대학 면역학교실의 강재승 교수로부터 분양 받았다. 그리고 rat 장 상내피세포인 IECs(intestinal epithelial cells)-6 세포, mouse 대식세포인 RAW 264.7 세포, 사람 T-세포인 Jurkat-T 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 또한 Human IL-2 cDNA를 transfection 시킨 사람 자연살해세포인 NK92MI 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다.

DC1, DC2 및 Jurkat-T 세포는 RPMI 1640(Gibco™ Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)에 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco™)과 1%(v/v) penicillin-streptomycin을 가해 37°C(5% CO<sub>2</sub>/air)에서 배양하였다. RAW 264.7 및 IEC-6 세포는 modified Eagle's medium(DMEM, Gibco™)에 10%(v/v) FBS와 1%(v/v) penicillin-streptomycin을 가해 37°C에서 배양하였다. NK92MI는 ribonucleosides와 deoxyribonucleosides를 포함하지 않은 Alpha minimum essential medium에 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l, sodium bicarbonate (Gibco™), 0.2 mM inositol(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.1 mM 2-mercaptoethanol(Sigma), 0.02 mM folic acid(Sigma), 12.5% horse serum (Gibco™) 12.5% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 가해 배양하였다.

#### MTT assay

배지로 희석시킨 시료를 세포에 농도 별로 처리하여, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml) assay로 측정하여 세포에 대한 시료의 독성을 확인하였다. 즉, 1×10<sup>4</sup> cells/well로 넣은 세포와 시료를 96 well plate에 분주한 다음 48시간 동안 배양하고, MTT 용액을 50 μl씩 첨가하여, 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양액을 제거한 후, DMSO(dimethylsulfoxide, Duksan)용액 200 μl씩 첨가하고 10분간 흔들어준 후, 595 nm에서 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Molecular Devices Co.)로 흡광도를 측정하였다.

#### ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Jurkat-T 세포는 50 ng/ml PMA와 1 μg/ml PHA로 그리고 이외의 세포는 1 μg/ml의 LPS로 자극 시킨 후, 배지로 희석시킨

섬오가피 추출물을 농도 별로 세포에 처리하여 24시간 배양 후, 상등액 100  $\mu$ l를 취하여 cytokine 측정용 시료로 사용하였다. 96 well plate에 purified anti-mouse interleukin(IL)-12, anti-human IL-2, anti-mouse TNF- $\alpha$ , anti-human IFN- $\gamma$ , anti-rat IL-2 capture antibody(eBiosciences, San Diego, CA, USA), biotin-conjugated anti-mouse IL-12, anti-human IL-2, anti-mouse TNF- $\alpha$ , anti-human interferon- $\gamma$ , anti-rat IL-2 monoclonal antibody(eBiosciences, USA)를 사용하여 세포배양 상등액 중의 cytokine을 측정하였다. Anti-cytokine capture antibody를 binding buffer(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 9.0)에 2  $\mu$ g/ml 되도록 희석해서 96 well plate(NUNC Co., Rochester, NY, USA)에 50  $\mu$ l/well씩 넣은 후, 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating하였다. Tween 20(Sigma, Poole, UK)을 phosphate buffered saline(PBS)에 0.5%(v/v)가 되도록 가한 PBS/Tween 용액으로 plate를 3회 세척 후, blocking buffer인 1%(w/v) bovine serum albumin(BSA)(Sigma, Poole, UK)을 가하여 상온에서 2 시간 동안 방치하였다. PBS/Tween 용액으로 3회 세척 후, 세포 배양액 50  $\mu$ l를 가하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. PBS/Tween 으로 4회 세척 후, biotinylated antibody를 blocking buffer/PBS/Tween에 희석하여 100  $\mu$ l/well로 처리하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 다시 세척하고 1 : 1000으로 희석한 streptavidin-peroxidase(eBiosciences, USA)을 100  $\mu$ g/well로 blocking buffer/PBS/Tween에 희석하여 넣고 1시간 방치 후, PBS/Tween으로 세척하였다. 0.03% hydrogen peroxide를 함유한 0.05 M phosphate-citrate 완충용액(pH 5.0)에 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB, Sigma, Poole, UK)를 0.1 mg/ml가 되도록 제조한 기질용액을 100  $\mu$ g/well씩 넣었다. Stop reagent로 2.5 M sulfuric acid을 50  $\mu$ l/well로 넣어 15분간 방치하여 효소반응을 중지시킨 후 96-well plate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며 자료분석은 ANOVA test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 섬오가피 추출물의 세포독성

Cytokine 측정을 위한 전 단계로 시료의 세포에 대한 영향을 평가하기 위하여 사용된 6종류의 세포에 대한 시료의 독성여부를 MTT assay에 의하여 확인하였다.  $10^{-4}$  g/ml에서 시작하여 10 배수로 희석한 뿌리(AKR) 및 줄기(AKS) 물 추출물을 각 세포에 처리하여 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 사용된 모든 시료의 농도에서 사용된 세포들의 생존율이 90% 이상인 것으로

**Table I** – Cell viability (%) of stem extract of *Acanthopanax koreanum* (AKS) against cells. Cell viability was measured by MTT assay

Cells	Conc. (g/ml)					
	0	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
DC1	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 2
DC2	100 $\pm$ 0	103 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2
Jurkat	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 1	101 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 5	94 $\pm$ 4
NK92MI	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1
IEC-6	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 4	92 $\pm$ 2	90 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	91 $\pm$ 4
Raw264.7	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	95 $\pm$ 0

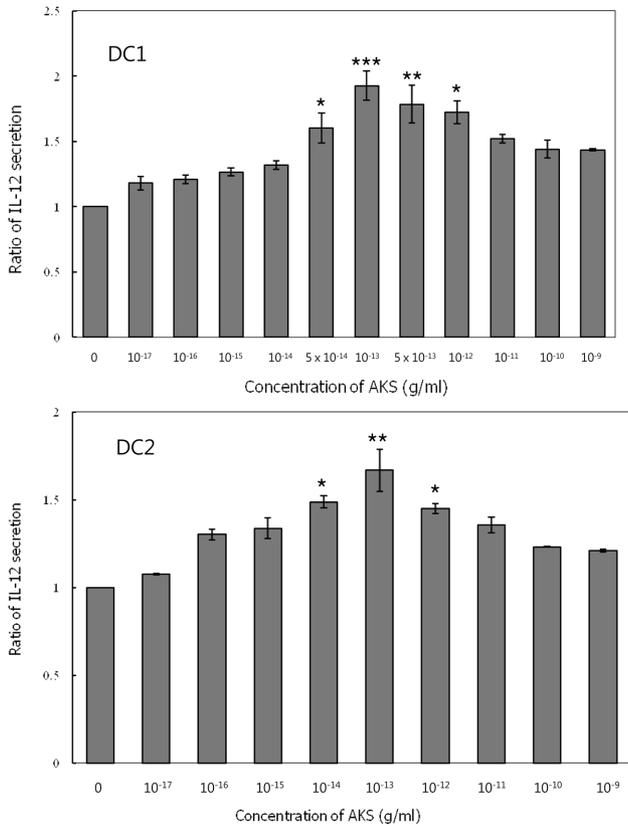
**Table II** – Cell viability (%) of root extract of *Acanthopanax koreanum* (AKR) against cells. Cell viability was measured by MTT assay

Cells	Conc. (g/ml)					
	0	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
DC1	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
DC2	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	98 $\pm$ 2
Jurkat	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 2	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3	99 $\pm$ 4	96 $\pm$ 2
NK92MI	100 $\pm$ 0	102 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1
IEC-6	100 $\pm$ 0	99 $\pm$ 1	106 $\pm$ 2	105 $\pm$ 1	97 $\pm$ 4	101 $\pm$ 3
Raw264.7	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 2	100 $\pm$ 3	99 $\pm$ 1	97 $\pm$ 2	97 $\pm$ 3

보아 세포의 생존에 큰 영향이 없는 것을 알 수 있었다(Table I, II). 따라서 이 결과를 토대로, 세포의 생존에 큰 영향이 없는  $10^{-6}$  g/ml 이하의 추출물을 세포에 처리하여 cytokine 분비실험을 수행하였다.

### 섬오가피 추출물을 처리한 수지상 세포의 IL-12분비 경향

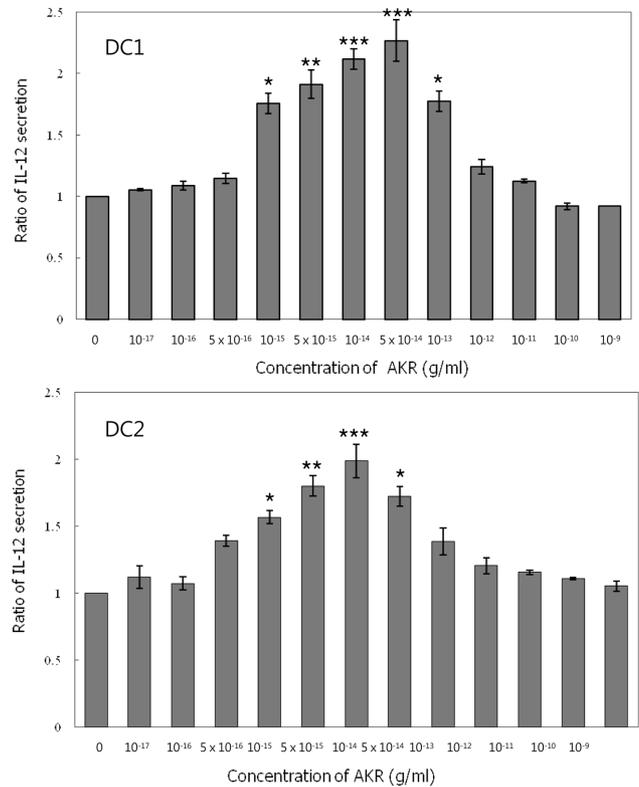
T세포의 활성화 과정은 항원제시세포의 역할이 선행되어야만 하는데, 수지상세포는 전문화된 항원제시 세포이다.<sup>7-10</sup> 또한 이 세포는, Tc-세포, Th-1 type-세포 및 NK-세포를 활성화 시키는 것으로 확인된 바 있다.<sup>25-27</sup> 본 연구에서는 수지상 세포의 IL-12 분비에 미치는 섬오가피 추출물의 영향을 알아보기 위하여 LPS를 처리하여 자극시킨 생쥐의 림프계(lymphoid) 수지상세포인 DC1과 골수계(myeloid) 수지상세포인 DC2에 추출물을 처리하여 배양시킨 후 배양액 중의 IL-12의 농도를 측정하였다. 그 결과, 매우 낮은 농도( $5 \times 10^{-17}$  g/ml)의 추출물을 처리한 DC1 및 DC2 세포에서 IL-12의 분비가 증가하기 시작하는 것으로 나타났다.  $10^{-13}$  g/ml 농도의 AKS를 처리한 경우 DC1 및 DC2 세포 모두에서 IL-12 분비가 가장 높았으며, 그 이상의 농도로 처리하면 IL-12의 분비가 다시 감소하는 bell-shape type의 peak 형태를 나타냈다(Fig. 1). 또한 AKR을 처리한 경우에도 유사한 분비 경향을 보였으며,  $5 \times 10^{-14}$  g/ml의 추출물을 처리한 DC1세포의 경우 IL-12의 분비가 2.3배 현저하게 증가하였으며, DC1 및 DC2 세포 모두 줄기 추출물을 처리한 경우보다 더욱 낮은 농도에서



**Fig. 1** – Secretion of IL-12 from DC1 and DC2 cells treated with stem extract of *Acanthopanax koreanum* (AKS). The extracts were diluted with complete cell culture medium (CTCM) and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with LPS were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of IL-12 in culture supernatants was measured by ELISA.

최대치를 보였으며, 분비 증가 정도가 더욱 큰 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

Steinman 등은 수지상 세포는 분화되기 전의 전구세포의 계통에 따라 형태학적으로 뚜렷이 구분되며, 이들을 각각 lymphoid DC와 myeloid DC로 구분할 수 있다고 보고하였다.<sup>28-30</sup> 그런데 수지상 세포의 기능은 동물과 사람에서 서로 상반되는 면역학적인 조절기능을 수행한다는 주장도 있다.<sup>31</sup> 즉, 생쥐에서는 림프구 계통에서 분화된 lymphoid DC는 주로 Th1-세포를 유도하고 골수계 계통에서 분화된 myeloid DC는 주로 Th2-세포를 유도하는데 비하여,<sup>31</sup> 사람의 면역체계에서는 lymphoid DC나 형질세포 계통에서 분화된 plasmacytoid DC는 Th2 반응을 초래하고 myeloid DC는 주로 Th1 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀져 있다.<sup>32</sup> 그러나 수지상 세포가 활성화된 후에 매우 짧은 기간 동안만 IL-12를 생산할 수 있으므로 naive T-세포를 Th1-세포로 유도할 수 있는 능력은 이때만 존재하며, 그 후에는 수지상 세포가 단지 Th2 반응만을 유도하거나 central memory T-세포를 생성하



**Fig. 2** – Secretion of IL-12 from DC1 and DC2 cells treated with root extract (AKR) of *Acanthopanax koreanum*. The extracts were diluted with CTCM and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with LPS were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of IL-12 in culture supernatants was measured by ELISA.

도록 할 수 있다고 주장도 있다.<sup>33</sup> 또한 이러한 면역반응의 유형을 결정할 수 있는 다른 요인들로서 항원의 투여량, 그리고 T-세포와 항원제시세포가 접촉하는 기간 등을 들 수 있다고 하였다.<sup>33</sup>

본 연구 결과에서는 Maldonado-Lopez 등<sup>31</sup>의 주장과는 달리 섬요가피 추출물을 전구세포가 다른 생쥐의 림프계 수지상세포(DC1)와 골수계 수지상세포(DC2)에 처리한 결과, 줄기 및 뿌리 추출물 모두 Th1 계열의 세포를 유도하는 IL-12의 분비를 촉진시키는 것으로 나타났다. 또한 뿌리 추출물이 줄기 추출물보다 IL-12의 분비에 미치는 영향이 더욱 컸으며, 10<sup>-14</sup>~10<sup>-13</sup> g/ml 농도의 추출물을 처리하였을 때 분비증가 정도가 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서 Sallusto 등<sup>33</sup>의 주장대로 면역반응의 유형은 수지상세포로 유도되는 전구세포의 기원이나 분화를 유도하는 자극의 특성 때문이 아니라 항원의 종류 및 양이나 수지상세포가 활성화되고 성숙되는 정도에 따라서 결정되는 것으로 추측된다.

**섬요가피 추출물을 처리한 T-세포 및 장상피세포의 IL-2 분비 영향**

IL-2는 T-세포에 의해 생산되는 T-세포 성장인자로서, NK-세포 및 B-세포의 성장을 촉진하며, Th-2에서 Th-1으로 면역체계

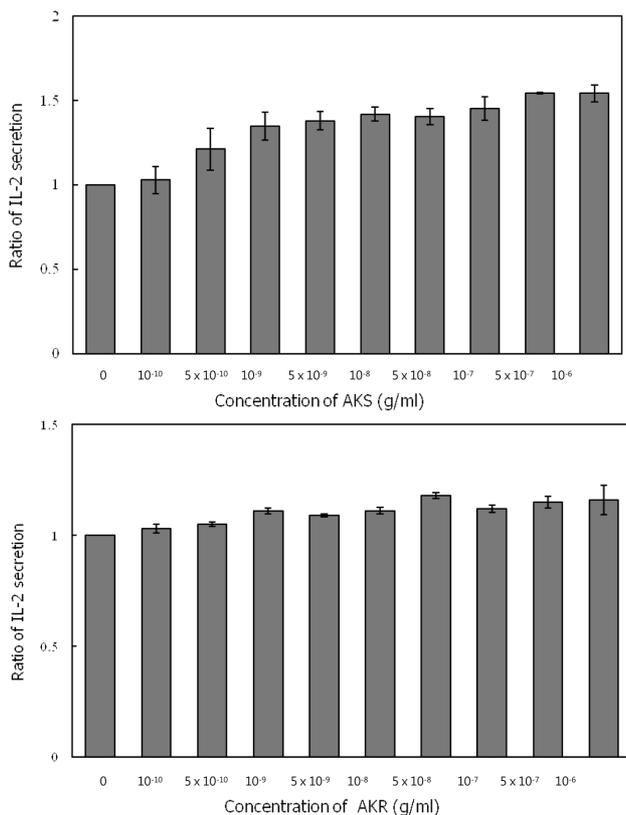
를 유도하고 NK-세포를 활성화하여 종양의 전이를 억제시킨다. 또한, 항암 면역반응은 cytotoxic T-세포가 종양 항원을 인식함으로써 이루어지며 이러한 Tc-세포의 완전한 활성화를 위해 IL-2의 도움이 필요하다.<sup>6,11)</sup> 본 연구에서는 사람 T-세포인 Jurkat-T 세포와 쥐의 장상피세포인 IEC-6 세포에 섬오가피 추출물을 처리하여 배양한 배양액 중의 IL-2의 농도를 측정하였다. 그 결과, AKS는 Jurkat-T-세포의 IL-2 분비를 약간 증가시키는 것으로 나타났다. 추출물의 농도를  $5 \times 10^{-7}$  g/ml까지 증가시킬 경우 IL-2 분비가 1.5배 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 IL-2 분비가 더 이상 증가하지 않았다. 그러나 AKR은 Jurkat-T 세포의 IL-2 분비에 거의 영향이 없는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 본 연구에서 사용한 물추출물은 다량의 다당체를 함유할 것으로 미루어 볼 때, 섬오가피로부터 분리한 다당체(polysaccharide)가 B-세포를 활성화시키나 T-세포에는 영향이 없다는 보고<sup>21)</sup>와는 다소 차이가 있는 것을 알 수 있었다.

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine 또는 항원과의 직접적인 반응에 의해서 활성화되는 장상피세포는 IL-8을 생산하여 염증반응

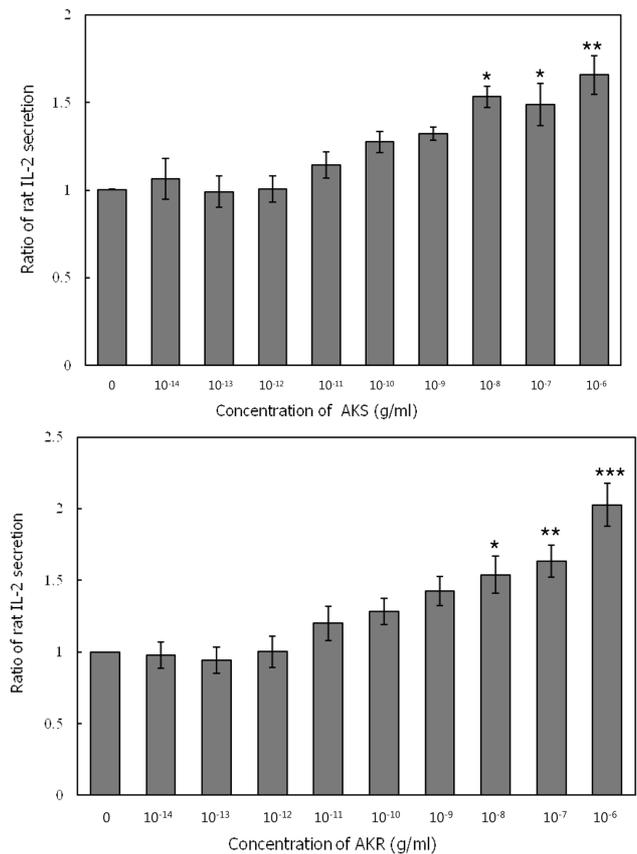
을 촉진시키는데, 섬오가피 추출물은 장상피세포에서 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로를 통하여 IL-8의 생산을 억제한다고 보고된 바 있다.<sup>24)</sup> 본 연구에서는 IEC-6 세포에 섬오가피 추출물을 처리하여 IL-2의 분비여부를 확인한 결과, 농도의존적으로 IL-2의 분비가 증가하는 것을 알 수 있었다.  $10^{-11}$  g/ml 농도의 AKS 및 AKR 추출물을 처리한 결과, IL-2의 분비가 증가하기 시작하였으며, 특히  $10^{-6}$  g/ml의 AKR을 처리한 경우 IL-2의 분비가 2.03배 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 현재, 대부분의 오가피를 경구로 복용하고 있는 점을 고려하면, 복용 후 흡수단계에서 1차적으로 만나는 장상피세포에서의 IL-2의 분비측진은 매우 의미 있는 결과라고 볼 수 있다.

#### 섬오가피 추출물을 처리한 NK-세포의 IFN- $\gamma$ 분비 경향

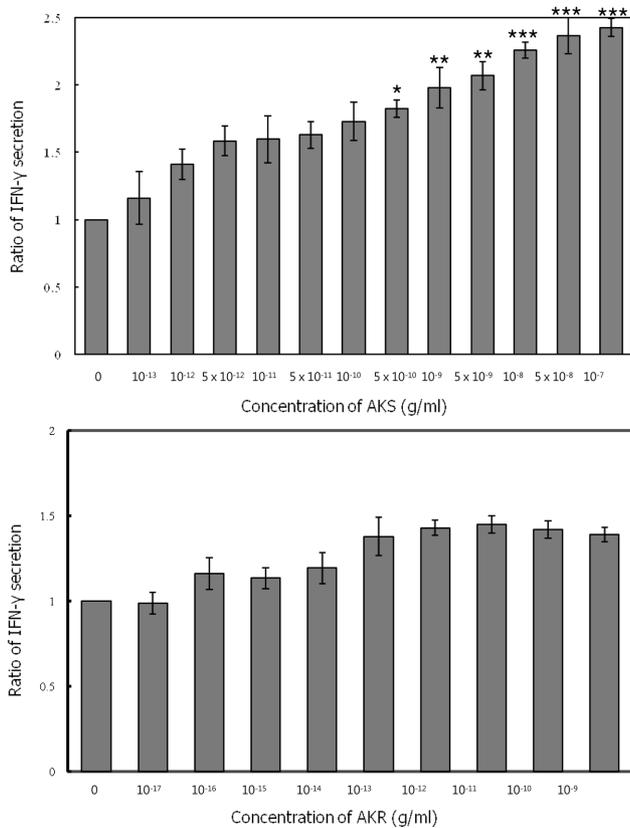
Th1-세포 혹은 NK-세포에 의해서 생산되는 IFN- $\gamma$ 는 대식세포를 활성화하며, IL-12의 양을 증가시키고, Th-1 type 반응을 촉진한다. 또한 IFN- $\gamma$ 는 B-세포에 작용하여 IgG급의 항체 생산을



**Fig. 3** – Secretion of IL-2 from Jurkat-T cells treated with stem (AKS) and root (AKR) extract of *Acanthopanax koreanum*. The extracts were diluted with CTCM and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with 50 ng/ml PMA and 1  $\mu$ g/ml PHA were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of IL-2 in culture supernatants was measured by ELISA.



**Fig. 4** – Secretion of IL-2 from IEC-6 cells treated with stem (AKS) and root (AKR) extract of *Acanthopanax koreanum*. The extracts were diluted with CTCM and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with LPS were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of IL-2 in culture supernatants was measured by ELISA.

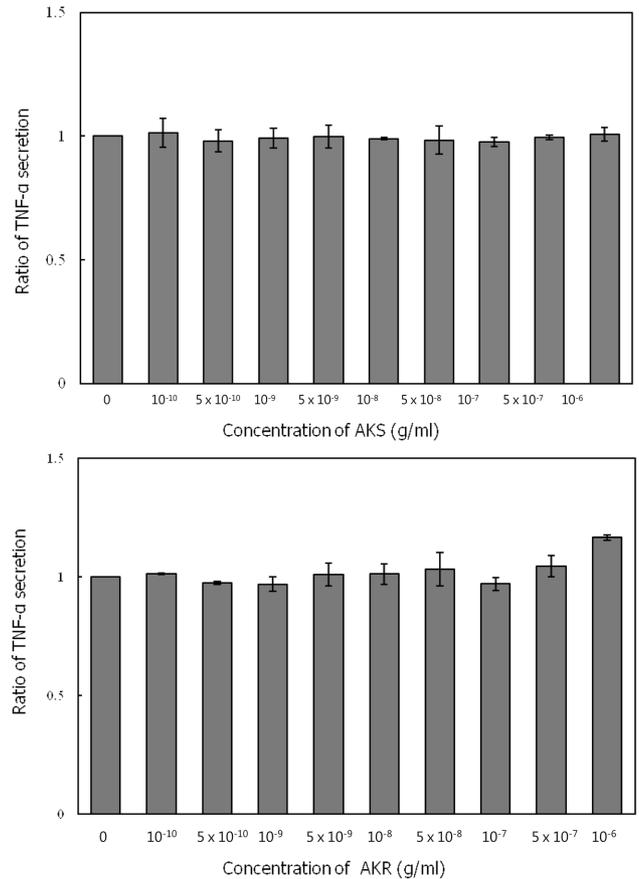


**Fig. 5** – Secretion of IFN- $\gamma$  from NK92MI cells treated with stem (AKS) and root (AKR) extract of *Acanthopanax koreanum*. The extracts were diluted with CTCM and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with LPS were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of IFN- $\gamma$  in culture supernatants was measured by ELISA.

촉진하며, cytotoxic T-세포의 생산을 도와 준다.<sup>14)</sup> 가시오가피의 당단백 분획이 NK-세포를 활성화하여 IFN- $\gamma$ 의 분비를 촉진시킨다는 보고<sup>18,19)</sup>가 있으나 섬오가피에 관련된 자료는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 LPS로 자극시킨 NK(NK92MI)-세포에 섬오가피 추출물을 처리하여 배양액 중의 IFN- $\gamma$ 의 농도를 측정하였다. 그 결과, AKS를 처리한 경우 IFN- $\gamma$ 의 분비가 농도의존적으로 크게 증가하였으며, 10<sup>-7</sup> g/ml 농도의 추출물을 처리하였을 때 IFN- $\gamma$ 의 분비가 2.4배 현저히 증가하는 것으로 나타났다. AKR을 처리한 경우에도 IFN- $\gamma$ 의 분비가 약간 증가하였으나, AKS보다 증가 정도가 다소 낮았다. 또한 10<sup>-12</sup> g/ml 농도 이상에서는 IFN- $\gamma$ 의 분비가 더 이상 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

**섬오가피 추출물을 처리한 대식세포의 TNF- $\alpha$  분비 경향**

Th-1 type의 cytokine 중의 하나인 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에 작용하여 염증반응을 촉진하고, T-세포와 B-세포의 활성화에 co-stimulator로 작용하며, 중앙세포에 작용하여 세포자살(apoptosis)



**Fig. 6** – Secretion of TNF- $\alpha$  from RAW263.7 cells treated with stem (AKS) and root (AKR) extract of *Acanthopanax koreanum*. The extracts were diluted with CTCM and then tested in triplicate wells. The cells stimulated with LPS were incubated for 24 hr at 37°C and the concentration of TNF- $\alpha$  in culture supernatants was measured by ELISA.

을 유도하기도 한다.<sup>15,16)</sup> 섬오가피로부터 분리한 acanthoic acid가 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제시킨다는 보고<sup>22,23)</sup>가 있으나 그 이상은 보고된 바 없다. 본 연구에서는 대식세포의 TNF- $\alpha$  분비에 미치는 섬오가피 추출물의 영향을 알아보기 위하여 LPS로 자극시킨 RAW263.7 세포에 추출물을 처리 후 배양액의 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하였다. 그 결과, 줄기 및 뿌리 추출물 모두 대식세포의 TNF- $\alpha$ 의 분비에 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었고, 섬오가피의 정제된 성분인 acanthoic acid를 처리한 Kang 등<sup>22)</sup>의 결과와는 차이가 있었다.

**결 론**

암의 면역학적 치료는 인체 내의 면역세포들이 암세포 표면에 발현되는 정상세포와 다른 구조를 인식함으로써 항암 면역반응을 일으킨다는 데 기초를 두고 있다. 여러 가지 중요한 면역반응들을 조절하는 생리활성 cytokine은 암의 면역학적 치료에 상당

한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 세포매개성 면역반응을 촉진하는 Th-1 세포는 proinflammatory cytokine인 Th-1 type (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등)를 생산하며, 체액성 면역을 촉진하는 Th-2 세포는 anti-inflammatory cytokine인 Th-2 type cytokine(IL-4, IL-6, IL-8, IL-10)을 생산한다. 따라서 Th-1 세포의 활성화 및 Th-2 세포의 억제에는 항암면역기능에 중요한 기능을 미칠 수 있다.<sup>13)</sup> 본 연구에서는 섬오가피의 줄기 및 뿌리 추출물의 Th-1 type cytokine인 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비에 미치는 영향을 확인하고, 섬오가피의 암 예방 및 치료물질로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

섬오가피 추출물을 전구세포가 다른 수지상세포에 처리한 결과, 줄기 및 뿌리 추출물 모두 동일하게 Th1 계열의 세포를 유도하는 IL-12의 분비를 촉진시키는 것으로 나타났다. 따라서 Sallusto 등<sup>33)</sup>의 주장대로 면역반응의 유형은 수지상세포로 유도되는 전구세포의 기원이나 분화를 유도하는 자극의 특성 때문이 아니라 항원의 종류 및 양이나 수지상세포가 활성화되고 성숙되는 정도에 따라서 결정되는 것으로 추측된다. 또한, 섬오가피 추출물은 T-세포의 IL-2 분비에는 거의 영향이 없으나, IEC-6 세포의 IL-2의 분비를 농도의존적으로 현저히 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 대부분의 오가피를 경구로 복용하고 있는 점을 고려하면, 복용 후 흡수단계에서 1차적으로 만나는 장상피세포에서의 IL-2의 분비촉진은 매우 의미 있는 결과라고 볼 수 있다. 또한, 섬오가피 줄기추출물은 NK-세포로부터 IFN- $\gamma$ 의 분비를 크게 증가시켰으며, 뿌리 추출물은 IFN- $\gamma$ 의 분비증가 정도가 낮았다. 그러나 섬오가피 추출물은 대식세포의 TNF- $\alpha$ 의 분비에 거의 영향을 주지 않았다.

결론적으로 섬오가피 추출물은 Th-1 type cytokine 중 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 의 분비를 증가시키나 TNF- $\alpha$ 의 분비에는 영향을 주지 않았다. 또한 T-세포에 의한 IL-2 분비에는 큰 영향이 없었으나 장상피세포 IEC-6 세포에 의한 IL-2의 분비에는 크게 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 따라서 섬오가피 추출물은 Th-1 type cytokine의 분비를 증가시켜 세포매개성 면역반응을 촉진시켜 세포 내 감염과 종양세포에 대한 숙주의 방어에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2010년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1) Yook, C. S., Lee, D. H. and Seo, Y. K. : A new form of *Acanthopanax* species (I). *Kor J. Pharmacogn.* **7**, 179 (1978).

- 2) Lee, Y. S., Lee, E. B. and Kim, Y. H. : Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from *Acanthopanax koreanum* root bark. *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 176 (2001).
- 3) Kim, Y. H., Chung, B. S. and Kim, H. J. : Studies on the chemical constituents of *Acanthopanax koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **16**, 151 (1985).
- 4) Kim, Y. H., Chung, B. S. and Kim, H. J. : Studies on the constituents of *Acanthopanax koreanum*. *Arch. Pharm. Res.* **11**, 159 (1988).
- 5) Kang, J. S., Linh, P. T., Cai, X. F., Lee, J. J. and Kim, Y. H. : Determination of chiisanoside in *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Nat. Product Sci.* **9**, 45 (2003).
- 6) Oppenheim, J. J. : Cytokines: past, present and future. *Int. J. Hematol.* **74**, 3 (2001).
- 7) Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. : Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142 (1973).
- 8) Shurin, M., R. : Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **43**, 158 (1996).
- 9) Banchereau, J. and Steinman, R. M. : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245 (1998).
- 10) Palucka, K. and Banchereau, J. : Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J. Clin. Immunol.* **19**, 12 (1999).
- 11) Beutler, B., Biron, C., Carroll, M., Cyster, J., Gerard, C., Gordon, S., Lanier, L., Lehrer, R., McGhee, J., Medzhitov, R., Springer, T. and Yokoyama, W. : Innate immunity. In: Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J. (eds.), *Immunobiology*, 6th ed. Garland Science Publishing, New York, NY, p. 76 (2005).
- 12) Lucey, D. R., Clerici, M. and Shearer, G. M. : Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 532 (1996).
- 13) Mossman, T. R. and Sad, S. : The expanding universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* **17**, 138 (1996).
- 14) Podhajcer, O. L., Lopez, M. V. and Mazzolini, G. : Cytokine gene transfer for cancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **18**, 183 (2007).
- 15) Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Ikemizu, S., Yamamoto, Y., Shibata, H., Nishibata, T., Mukai, Y., Okamoto, T., Taniai, M., Kawamura, M., Abe, Y., Nakagawa, S., Nagata, S., Yamagata, Y. and Mayumi, T. : Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF- $\alpha$  improves its antitumor potency. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **315**, 808 (2004).
- 16) Trinchieri, G. : Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cell type 1 and cytokine lymphocytes. *Blood* **84**, 4008 (1995).
- 17) Nishimura, T., Nakui, M., Sato, M., Iwakabe, K., Kitamura, H.,

- Sekimoto, M., Ohta, A., Koda, T. and Nishimura, S. : The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, S52 (2000).
- 18) Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Lee, S. W., Shin, K. S., Choi, W. H., Hwang, S. H., Ha, E. S., Jo, S. K., Kim, S. H. and Park, W. M. : Anti-metastatic activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *J. of Ethnopharmacol.* **93**, 247 (2004).
- 19) Ha, E. S., Hwang, S. H., Shin, K. S., Yu, K. W., Lee, K. H., Choi, J. S., Park, W. M. and Yoon, T. J. : Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 217 (2004).
- 20) Lyu, S., Noh, B. and Park, W. B. : Modulation of Th1/Th2 cytokine secretion in human peripheral blood mononuclear cells by water extract of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus* fruits. *Yahak Hoeji* **52**, 27 (2008).
- 21) Han, S. B., Park, S. K., Ahn, H. J., Yoon, Y. D., Kim, Y. H., Lee, J. J., Lee, K. H., Moon, J. S., Kim, H. C. and M., K. H. : Characterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of *Acanthopanax koreanum*. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 683 (2003).
- 22) Kang, H. S., Kim, Y. H., Lee, C. S., Lee, J. J., Choi, I. and Pyun, K. H. : Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11),15-dien-19-oic acid and its antifibrotic effects *in vivo*. *Cellular Immunol.* **170**, 212 (1996).
- 23) Kang, H. S., Song, H. K., Lee, J. J., Pyun, K. H. and Choi, I. : Effects of acanthoic acid on TNF- $\alpha$  gene expression and haptoglobin synthesis. *Mediators Inflamm.* **7**, 257 (1998).
- 24) Kim, J. A., Kim, D. K., Tae, J., Kang, O. H., Choi, Y. A., Choi, S. C., Kim, T. H., Nah, Y. H., Choi, S. J., Kim, Y. H., Bae, K. H. and Lee, Y. M. : Acanthoic acid inhibits IL-8 production via MAPKs and NF- $\kappa$ B in a TNF- $\alpha$ -stimulated human intestinal epithelial cell line. *Clinica. Chimica. Acta* **342**, 193 (2004).
- 25) Inaba, K., Young, J. W. and Steinman, R. M. : Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **166**, 182 (1987).
- 26) Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T. and Steinman, R. M. : Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *J. Exp. Med.* **172**, 631 (1990).
- 27) Fernandez, N. C., Flament, C., Crpineau, F., Angevin, E., Vivier, E. and Zitvogel, L. : Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur. Cytokine Netw.* **13**, 17 (2002).
- 28) Steinman, R. M. and Banchereau, J. : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245 (1998).
- 29) Steinman, R. M. : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271 (1991).
- 30) Reid, C. D. : Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br. J. Haematol.* **112**, 874 (2001).
- 31) Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Mechel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J. and Moser, M. : CD8  $\alpha$ + and CD8  $\alpha$ - subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* **189**, 587 (1999).
- 32) Viera, P. L., de Jong, E. C., Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. and Kalinski, P. : Development of the Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* **164**, 4507 (2000).
- 33) Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. : The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* **4**, Suppl 3, S127 (2002).