

The Protective Role of *Gleditsiae fructus* against *Streptococcus pneumoniae*

Jun-ki Lee¹, Se-Hui Lee¹, Dong Ju Seo¹, Kang-Hee Lee¹, Sojung Park¹, Sun Park¹, Taekyung Kim² and Jin-Young Yang^{1,3*}

¹Department of Integrated Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Department of Biology Education, Pusan National University, Busan 46241, Korea

³Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received October 26, 2022 / Revised November 10, 2022 / Accepted November 11, 2022

Natural products have been used to mitigate the effects of cancer and infectious diseases, as they feature diverse bioactivities, such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects. Here, we chose 10 natural products that are well-known as pulmonary enhancers and investigated their bactericidal effects on *Streptococcus pneumoniae*. In the disk diffusion assay, the growth of *S. pneumoniae* was significantly regulated by *G. fructus* treatment regardless of extraction method used. We first adopted spraying as a novel delivery method for *G. fructus*. Interestingly, mice exposed to *G. fructus* three times a day for 2 weeks were resistant to *S. pneumoniae* intranasal infection (shown both through body weight loss and survival rates compared to the control group). Moreover, we confirmed that exposure to *G. fructus* regulated the colonization of the bacteria despite the sustained inflammation in the lung after exposure to *S. pneumoniae*, indicating that migrated inflammatory immune cells may involve a host defense mechanism against pulmonary infectious diseases. While a similar number of granulocytes (CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺), neutrophils (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺), and monocytes (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁻) were found between groups, a significantly increased number of alveolar macrophages (CD11b⁺CD11c^{hi}F4/80⁺) was detected in BAL fluids of mice pre-exposed to *G. fructus* at 5 days after *S. pneumoniae* infection. Taken together, our data suggest that this usage of *G. fructus* can induce protective immunity against bacterial infection, indicating that facial spray may be helpful in enhancing the defense mechanism against pulmonary inflammation and in evaluating the efficacy of natural products as immune enhancers against respiratory diseases.

Key words : Alveolar macrophage, *Gleditsiae fructus*, immune enhancer, spray, *Streptococcus pneumoniae*

서 론

폐는 대부분의 조류, 포유류, 파충류의 호흡계에서 생명유지에 필수적인 기관이며 300 g의 사람 폐 조직당 존재하는 130 m²의 넓은 폐포 표면적의 도움으로 200 ml 혈액을 포함하는 모세혈관망에 의해 기체 교환을 실시한다. 사람의 기도 분지들은 평균 23 개의 분지로 구성되어 있으며 분지 말단에서 폐포와 미세혈관망이 속하는 기체 교환 단위를 가지는 8백만 개의 폐포낭이 존재한다. 기체 교환은 주로 호흡 세기관과 폐포관으로 이루어진 26,000에서 28,000 개의 폐포파리에서 주로 일어나며 순환계를

유지한다[18, 36, 45]. 폐는 이처럼 우리 몸에서 산소와 노폐물을 순환시키는데 효율적인 기관지 구조를 갖는다. 하지만 공기를 들이 마실 때 다른 해로운 입자들이 들어와서 폐 기능을 저해할 수 있다. 호흡계 구조 이외에도 폐는 하기도에 들어오는 병원체의 침입을 방지하는 기도 분기와 비인두강 구조를 포함한 해부학적 장벽을 가지고 있으며 유입된 항원들은 세기관지와 기관말단에서 상피세포의 섬모 운동을 통해 체내 밖으로 제거된다[38]. 폐포는 호흡 세기관과 폐포관의 벽에 존재하며 선택적 물질 교환과 폐의 이물질을 제거하는데 도움이 되는 계면 활성제를 분비하는 폐포 상피세포와 혈관 내피 세포로 구성되어 있다[12, 34]. 구조를 형성하는 상피, 내피세포뿐만 아니라 기도는 감염에 대한 폐 면역반응을 유지하는데 필요한 폐포대식세포, 호중구, 단핵구를 포함하는 다양한 세포 환경으로 구성되어 있다[35]. 폐는 즉각적으로 해로운 미생물의 위협을 감지하여 숙주를 보호하기 위해 기도 상피세포와 면역세포 간 상호작용으로 잘 조율된 폐 면역 체계를 가진다. 특히, 폐포대식세포는 유입된 항원을 마주

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2286, Fax : +82-51-581-296

E-mail : jyyang99@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하는 초기 면역 검문 지점 중 하나이며 면역 반응을 조절한다[16]. 폐포대식세포는 골수 전구체 세포로부터 유래한 대식세포 그룹 중 하나이며, 말초조직으로 이동하여 단핵탐식세포계를 구성하고 폐 조직과 공기 간격에 존재하는 병원체들에 대해 비특이적 장벽인 제1방어선을 유지한다[31, 50]. 기관지 나무의 보조병 역할을 하는 폐포대식세포는 정상 상태에서 주요 초기 면역세포를 구성하고 있으며 폐 항상성 유지를 위해 면역반응을 조정한다[2]. 염증이 생긴 폐에서, 폐포대식세포의 활성화와 염증이 진행되는 과정은 염증성 사이토카인의 일부인 TNF, IL-1 β , interferon- γ 과 억제성 사이토카인의 일부인 IL-10, TGF β 을 인식함으로써 유도되는 활성화 신호와 억제신호간의 정교한 균형을 수반한다[21]. 폐포대식세포가 염증과 식세포 과정에서 중요한 역할을 담당하므로 기관지 폐포세척액에서 폐포대식세포를 모으는 것은 폐의 병리학적 소견을 진단하는 일반적인 방법이다[44].

폐의 기도에서는 바이러스와 알레르기 유발 항원에 의해 발생하는 병원성 감염과 알레르기성 염증과 같은 자극들을 마주하며, 항원 자극에 노출된 사람의 기도에서 상주하는 면역세포들간 네트워크로부터 유래된 면역반응을 이해하는 연구에 많은 진전이 있어왔다[15]. 폐렴 구균은 기도에서 증식하는 주 병원체로 폐렴, 폐혈증, 뇌수막염을 포함한 심각한 질병을 유발하기에 1970년대 이후로 다루어져 왔다[9]. 폐렴 구균은 둥근 그람 양성 세균이며 통기성 혐기성으로 사슬로 이어진 모양으로 성장하여 빈번하게 일상 생활 중에 발생하는 지역사회획득 폐렴을 일으킨다[55]. 폐렴 구균은 기도 점막 표면에 안착하기 위해 발병성인자인 choP, cbpA와 같은 표면 물질과 피막을 가지며, 다른 숙주를 전염시키기 위한 증식을 시작한다[24, 51]. 폐렴 구균이 대량으로 서식하면 상피세포가 인식하여 균을 제거하는 초기 면역 반응과 염증반응을 촉진한다[54]. 폐렴 구균은 또 다른 중요한 발병성인자인 폐렴구균용혈소를 생산한다. 이는 숙주의 세포막에 결합하여 소중합체로 이루어진 천공을 형성하여 폐포 세포를 파괴하고 폐의 염증과 막 손상을 뒷받침하는 보체계의 활성을 일으킨다[13, 41]. 또한, 폐렴 구균은 IgA 단백질 분해효소를 생산하며 이는 침입한 병원체에 결합하는 IgA를 파괴한다. 표면을 Fab 조각으로 둘러싼 균은 면역 체계의 감지에서 벗어나 호중구에 의한 식세포 작용으로 잘 죽지 않는다[53]. 이러한 발병성인자들은 숙주 방어체계에 의해 인식되고 폐렴 구균으로부터 숙주가 폐를 보호하는 능력은 숙주의 면역 체계의 상태에 의존적이다. 병원체가 배상 세포가 분비한 점액에 갇히게 되면 섬모가 있는 상피세포들이 점액의 도움으로 체내에서 병원체를 제거하는데 기여한다[56]. 게다가 폐상피세포로부터 분비된 INF- γ , IL-6, TNF- α 과 같은 사이토카인에 의해 면역 세포들이 폐에 모일 수 있다[52]. 상피세포는 철 이온을 못쓰게 하고

세포를 용해하는 apolactoferrin과 lysozyme을 포함하는 항균성 단백질을 생산하여 폐렴 구균을 제거한다[3]. 폐에서 필수적인 항균 방어 작용은 사이토카인 생산, 호중구를 포함한 면역세포 간 상호작용의 강화, 폐렴 구균 감염으로 인해 유발된 호중구 격리 현상 등에 의해 조절된다[11]. 대식 세포도 TLR2, TLR4와 같은 패턴인지 수용체를 통해 폐렴 구균을 인식함으로써 활성화되어 폐렴 구균을 사로잡는 포식 작용을 한다[7]. 체액성, 세포 매개 반응을 포함한 후천적 면역 반응은 감염되고 며칠 후에 체내에 형성된다. 체액성 면역에서 B 세포는 항원에 의해 활성화되고 IgA를 분비하여 폐렴 구균을 옵소닌화하고 포식 작용을 촉진시키며 세포 매개 면역에서는 T 세포 활성화와 동원을 통해 폐렴 구균을 죽인다[64]. CD4⁺ T 세포는 보조 자극 분자와 항원제시세포가 제시하는 항원 조각을 통해 활성화되고, 도움 T 세포가 IFN- γ 를 분비하여 세포 매개 면역 반응을 촉진시키는 Th1 세포와 체액성 면역 반응을 자극하는 사이토카인인 IL-4를 분비하는 Th2 세포로 분화한다[43]. 또한 Th17 세포는 폐렴 구균 감염 장소로 대식세포, 단핵구, 호중구가 이동하는데 필요한 염증성 사이토카인 일종인 IL-17을 분비하고, 세포독성 T 세포는 감염된 세포를 공격하고 자연살해세포는 폐렴 구균을 제거한다[17, 40]. 인플라마솜은 자극을 인지하는 단백질과 세포 사멸과 연관된 ASC 응집체 유사 단백질들로 구성된 복합체로 폐렴 구균 감염 시 병원성 물질과 DNA 분자를 인지한다. NLRP3 수용체는 숙주가 폐렴 구균 감염을 인지하는데 도움을 주고 대식 세포를 활성화하며, 인플라마솜은 NLRP3의 도움으로 IL-1 β 와 IL-18을 분비한다[6, 33, 58]. 폐렴 구균 감염에서 보체 단백질은 염증을 호전시키고 병원체를 죽이며 세포벽을 파괴하는 중요한 역할을 한다[23]. 보체 단백질 종류 중 하나인 C3가 결핍된 쥐를 폐렴 구균에 감염시켰을 때, C3를 가진 쥐에 비해 감염이 호전되지 않았고 생존 시간도 감소했다[25]. 폐 질환을 호전하는데 있어 폐렴 구균에 대한 숙주의 방어 기작과 연관된 후속 연구가 중요하다.

천연 추출물은 허용할 수 있는 유독성을 가지며 구강용도로서 제형화에 적절하고 약을 만드는데 대량생산 공정 과정이 편리하므로 오래 전부터 급성 호흡질환이나 바이러스 감염에 대한 약제로 많이 사용되어 왔다[19]. 더욱이 빈번한 항생제의 사용으로 인해 항균 저항성이 증가하여 전염성 질병을 치료하는 능력이 감소하였기에 넓은 화학적 구조적 다양성을 지닌 천연 추출물은 다른 합성 소재와 동등할 정도의 치료 가능성을 보여준다[42]. 조협은 *Gleditsia* 속의 주엽나무의 말린 열매로 이노제와 거담약으로 쓰이며 일본과 중국에서는 관절 결석증, 악성 단저, 변비, 설사, 이질, 혈변, 소화불량, 홍역, 수두, 백일해를 치료하는데 사용되었다[14, 27, 28]. *Gleditsia* 속의 형태는 가시가 많은 가지를 가진 낙엽수로 알려진다. 잎은 톱날

모양에 작고 꽃은 노백색이나 연한 초록색이며 3-5개의 다른 모양의 꽃잎으로 옆액에 모여있다[63]. 여러 연구에 따르면, 조합은 항바이러스와 항암효과를 보이며 기관지염과 편도염에 효과를 보여 화학 요법으로 쓸 수 있는 가능성을 갖고 있다[8, 22].

우리는 스프레이 분무 방법을 통해 쥐에게 조합을 처리한 마우스의 폐 조직 염증 증상의 완화와 유의적으로 줄어든 폐렴 구균의 수적 감소, 기관지 폐포 세척액에서 높은 수의 폐포 대식세포수를 관찰하였다. 이와 동시에 조합의 안전 분사 처리한 쥐들에서 몸무게 감소와 조직 염증 관점에서 유의적인 세포 독성을 보이지 않았음을 확인하였다. 종합해 보면, 스프레이가 비강내 또는 기관내 처리 방식보다 부작용 없이 폐 면역을 증강시키는데 더 나은 방식이 될 수 있음을 시사한다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육 조건

실험 동물은 생후 6 주령의 암컷 BALB/c마우스(Samta-ko)를 일주일간 동물실험실의 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 마우스는 온도 24-26°C와 습도 45-55%로 유지된 동물실험실에서 실험용 쥐사료 SAM#31(Samtako)와 1차증류수를 공급받았으며 외부로부터의 공기가 차단된 MSRSII cage (Orient bio)에서 사육되었다. 모든 실험동물은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 사전승인 하에 동물실험윤리 기준에 따라 취급하였다(PNU-2022-0123).

천연 추출물

폐 기능 향상에 효능이 있는 한약재 기반의 천연추출물 10종에 대해 생물 전환 및 에탄올 추출물 2 종류로 한의약진흥원(경산)에서 각각 5 g 분말 형태로 지원받았으며, 상온에서 보관하였다(Table 1). 각 실험에서 책정한 농도에 알맞게 분말을 DEPC treated water (Thermo scientific, Waltham, MA)에 녹여서 각 실험에 사용하였다.

Table 1. Natural products and its origin that have possibility to enhance lung immunity

Herbalmedicine	Origin
<i>Agrimonia pilosa</i> Ledebour	<i>Agrimonia eupatoria</i>
<i>Potentilla chinensis</i> Seringe	East Asian cinquefoil
<i>Rosa rugosa</i> Thunberg	Sweetbrier
<i>Orostachys japonicus</i> A. Berger	Houseleek/Sengreen
<i>Gleditsiae fructus</i>	Japanese honey locust
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Tangerine peel
<i>Thuja orientalis</i> L.	Oriental arbor vitae seeds
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo
<i>Diospyros kaki</i>	Persimmon tree leaves
<i>Rhynchosian ulubilid</i> Lour	Seomoktae

혐기성 박테리아의 배양

폐렴 구균은 5%의 양피(Thermo scientific, Waltham, MA)을 포함한 tryptic soy agar 배지 또는 0.5% 효모 추출물을 포함한 Todd-Hewitt broth 에서 배양되었다. 7.5 g의 agar (BD Biosciences, San Jose, CA)와 15 g의 tryptic soy broth (BD Biosciences, San Jose, CA)를 500 ml의 증류수에 혼합하고 25ml 양피를 첨가하여 7.3±0.2 pH 농도의 TSA 배지를 만들었다. 또한, 15g의 Todd-Hewitt broth (BD Biosciences, San Jose, CA)에 2.5 g의 효모 추출물(BD Biosciences, San Jose, CA)을 500 ml 증류수에 혼합하고 7.8±0.2 pH 농도의 THY 배지를 만들었다. 일정한 양의 폐렴 구균 스톱을 만들기 위해, 균의 흡광도가 1.0(~2×10⁸ CFUs/ml)에 도달할 때까지 THY 배지에서 균을 키웠다. 200 µl의 증식한 균을 50% 글리세롤(Sigma, St. Louis, MO) 400 µl에 분주하였고, 잘 섞인 600 µl의 혼합물은 -80°C에서 보관하였다. 쥐를 감염시킬 시, 각각 분주해 둔 분취량을 물 증탕 기기(Lap companion, Daejeon, Korea)에 녹여서 비강내 처리를 위해 4 배로 희석시킨다. 해동시킨 폐렴 구균은 4°C, 8,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리를 거쳤으며 5% 양피가 첨가된 TSA 배지에 10배 단계 희석법을 실시함으로 폐렴 구균의 절대량을 파악하였다. 모든 배양 조건은 혐기성 환경에서 이루어졌으며 GasPak EZ anaerobe container system sachets (BD Biosciences, San Jose, CA)와 BD GasPak EZ anaerobe pouch system (BD Biosciences, San Jose, CA)을 사용하여 이루어졌다. 혐기성 상태 조성 여부는 BBL GasPak anaerobic indicator strip (BD Biosciences, San Jose, CA)을 통해 확인하였다.

디스크 확산법

실험하기 전, 냉동 보관한 폐렴 구균(2×10⁸ CFUs/ml) 스톱을 해동시키고 4°C, 8,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 씻어 주었다. 100µl PBS로 현탁한 폐렴 구균을 평판 도말법으로 TSA배지에 도말한 다음, 양성대조균으로 채택한 반코마이신(0.025 mg/ml)과, PBS, 조합의 에탄올 추출물(100 mg/ml), 조합의 생물 전환 추출물(100 mg/ml)에 각각 적신 8 mm 종이 디스크(Advantec, Tokyo, Japan)를 배지 표면에 잘 부착시켰다. 37°C에서 밤새 배양시킨 후, 8 mm 종이 디스크를 포함한 균 억제 환의 직경을 자를 사용하여 측정하였다.

조합의 처리 및 폐렴 구균의 감염

조합 수용액(4 mg/540 µl per mouse)은 하루에 3번 고르게 쥐에게 스프레이로 균일하게 분주하였고, 폐렴 구균은 마취 후 비강 경로로 쥐에게 처리하였다. 몸무게를 추적 관찰한 그룹에서는 감염시키기 전에 조합을 아침, 점심, 저녁으로 3 가지 시간대에 쥐에게 2 주 동안 스프레이로 처리 후에 폐렴 구균(1×10⁶ CFUs/20µl)을 비강내 방식으로

처리하였다. 조합(7.4mg/ml)은 DEPC treated water에 희석시켜서 사용했고, 쥐들은 마취상태에서 각각 20 μ l의 균 현탁액을 피펫을 사용하여 콧구멍에 천천히 분주하였다.

조직병리학적 조사

각 그룹별 적출한 폐 조직은 4%의 포르말린 용액으로 하루 고정한 후 자동조직처리기(Leica, TP 1020)를 이용해 탈수를 진행하였다. 이후 표본가공기(Leica, 149AUTO00C1)를 사용해 파라핀 블록을 제작한 후, 블록은 6 μ l 두께의 단면으로 잘라 박편을 만들었다. 이를 45°C 항온수조(Sunil science, SL-WBE-B)에 담근 후 슬라이드글라스에 옮기고, 50°C의 슬라이드위머(Ted pella Inc, XH-2001)에서 한시간 말려주었다. 건조된 슬라이드는 자일렌과 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 순서대로 담구어 수화시킨 다음, 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 염색된 박편에 permount 용액(Thermo scientific, Waltham, MA)을 처리하고, 커버글라스를 덮어 만들어진 슬라이드 표본은 EVOS 현미경 (Thermo scientific, Waltham, MA)을 사용하여 40배, 200 배 배율로 관찰하였다.

기관지 폐포 세척액 추출법

기관지 폐포 세척액을 얻기 위해 목 부분을 절개 후, 기도 내에 의료용 카테터 (Kovax-needle, Korea Vaccine, 서울)를 삽입하고 봉합사(B. Braun, Melsungen, Germany)를 사용해 카테터와 기관을 고정시켰다. 1 ml의 PBS를 카테터로 분주하고 3 번 왕복 운동하여 폐를 세척하고, 기관지 폐포 세척액을 추출했다. 각각의 기관지 폐포 세척액 샘플은 상온에서 8,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 따로 분리했다.

유세포 분석

기관지 폐포 세척액에서 획득한 세포는 4°C, 3,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 미리 준비한 50 μ l의 항체 cocktail과 반응시켰다. 항체 cocktail은 CD11c, CD11b, Ly6G, Ly6C, F4/80에 각각 FITC (BD bioscience, San Jose, CA), PE-Cy7 (BD bioscience), PE (BD bioscience), APC-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA), APC (eBioscience, Franklin Lake, NJ)가 부착된 항체를 RPMI에 FITC (1:100), Pe-Cy7 (1:400), PE (1:200), APC-Cy7 (1:400), 그리고 APC(1:200) 비율로 혼합하여 만들었다. 이를 차광한 상태로 4°C에서 20분간 항체와 반응시킨 다음, RPMI 1ml을 넣어 4°C, 3,000 rpm으로 4분간 원심분리하여 마지막으로 세포를 세척하였다. 상층액을 버린 후 펠렛을 200 μ l의 PBS로 현탁하여 유세포 분석을 위한 샘플을 준비하였다. 장비는 유세포 분석기(Beckman Coulter, Indianapolis, USA)를 사용하였으며, 데이터는 Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)를 통해 분석하

였다.

통계처리

본 실험의 모든 실험결과는 평균±표준 오차의 구조 방정식 모델링(SEM)으로 나타내었으며, GraphPad Prism version 7.00 program (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA)을 이용하여 *t*-test, Benjamini와 Krieger와 Yekutieli의 2단계 step-up method of multiple *t* test, 또는 Mantel-Cox의 log rank test를 통해 다른 그룹간의 유의적 차이를 검증하였다.

결 과

폐렴 구균에 대해 항균성 효과를 보이는 조합

폐 기능 향상에 효능이 있는 한약재 기반의 천연 소재 10 종을 선정하여 생물 전환과 에탄올 추출, 이렇게 2 가지 다른 방식으로 추출하였다. 주로 폐에 감염하는 폐렴 구균을 TSA배지에 평판도말하고, 디스크 확산법을 통해 각 천연추출물의 항균 효과를 조사해 보았다(Fig. 1A). 10 종의 천연추출물 후보군과 음성 및 양성 대조군으로 각각 사용한 증류수와 반코마이신의 폐렴 구균의 생장 억제 정도를 정량화 시켜본 결과, 9 종의 추출물에서는 박테리아의 유의미적인 생장 억제를 확인하지 못했다(Fig. 1B). 홍미톱게도, 생물 전환 추출법이나 에탄올 추출법에 상관 없이 조합의 균 억제환의 길이가 반코마이신의 균 억제환 직경 길이에 근접할 정도로 유의미한 억제능을 보였다(Fig. 2A - Fig. 2B). Fig. 2C의 흡광도 차이가 눈으로 보이는 그룹처럼 폐렴 구균에 대한 조합의 항균성을 재 측정하기 위해 5 가지 처리 그룹과 폐렴 구균을 0.5% 효모 추출물이 포함된 THY 배지에 함께 공배양시켜서 흡광도를 측정하였다. Fig. 2D의 600 nm에서 흡광도를 정량적으로 비교한 그래프에서 홍미톱게도, 조합의 흡광도가 반코마이신을 처리했을 때의 흡광도만큼 대조군에 비해 낮게 측정되었으며 이는 조합의 균의 생장 저해 효과가 반코마이신에 비교할 만큼 존재한다는 것을 의미한다. 이러한 데이터들은 조합이 생체 외에서 폐렴 구균에 대해 유의적인 항균 효과를 가진다는 것을 보여준다.

폐렴 구균과 조합의 최적의 처리 조건에 따른 생체 내에서 조합의 보호 효과

생체 내에서 조합의 항균효과를 고려하여 생체 외에서 조합이 나타낼 수 있는 세포독성을 최소화하는 최적의 조합 분주 및 폐렴 구균 감염 실험 계획을 고안하였다(Fig. 3A). 홍미톱게도 기존의 비강내 처리 방식이 아닌, 쥐에게 가는 부담을 덜어주도록 스프레이 분사 형식으로 조합을 처리하였다. Fig. 3B의 몸무게 및 생존율 변화 그래프에서 보이는 것처럼 2×10^6 CFUs/head의 폐렴 구균을 쥐에 접종

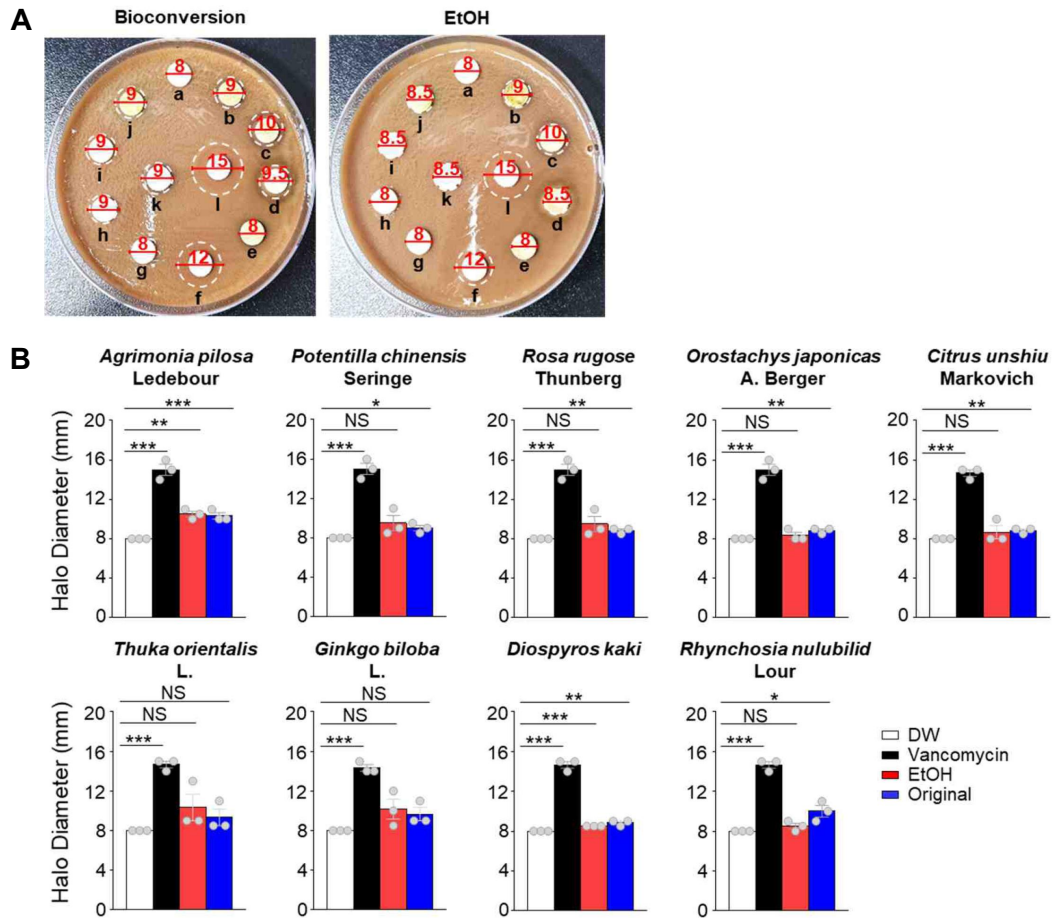


Fig. 1. Screening of an antimicrobial activity of natural products by disk diffusion assay. (A) Each disk containing vancomycin (0.025 $\mu\text{g/ml}$) and natural product (100 mg/ml) were plated on TSA plates (a: DEPC water, b: *Agrimonia pilosa* Ledebour, c: *Potentilla chinensis* Seringe, d: *Rosa rugosa* Thunberg, e: *Orostachys japonicus* A. Berger, f: *Gleditsiae fructus*, g: *Citrus unshiu* Markovich, h: *Thuja orientalis* L., i: *Ginkgo biloba* L., j: *Diospyros kaki*, k: *Rhynchosia nulubilid* Lour and l: vancomycin). White dashed lines with round corner are the diameter of the clear zone (disk diameter: 8 mm). (B) Quantification of diameters of clear zone: distilled water (white); vancomycin (black); Natural products extracted with 70% EtOH (red) or bioconversion (blue). Statistical analyses were performed with *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; NS: not significant).

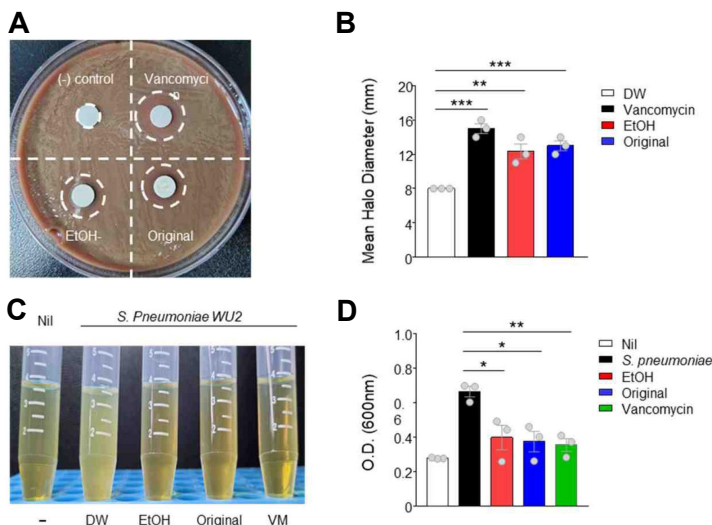


Fig. 2. An antibacterial effect of *G. fructus* to *S. pneumoniae*. (A) Representative image of disk diffusion assay is clearly shown the inhibition area of *S. pneumoniae* growth with white dashed lines. Each disks were dipped into distilled water, the vancomycin (5 μg) and 2 kinds of *G. fructus* (100 mg/ml) and placed on the TSA plate. Disk diameter: 8 mm. (B) Quantification of diameters of clear zone. Growth ratio of *S. pneumoniae* were investigated by liquid culture with *G. fructus* (C) and its quantification graph on optical density (D). Statistical analyses were performed with *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

하면 대조군과 실험군의 모든 쥐들이 점진적으로 몸무게가 감소하면서 죽었고, 그보다 적은 폐렴 구균(5×10^5 CFUs/head)을 쥐에 접종하면 조협이 전처리와 상관없이 쥐들이 모두 생존하였다(Fig. 3C). 반면에, 폐렴 구균을 앞선 두 농도 사이(1×10^6 CFUs/head)로 쥐에게 처리하였더니 비록 유의성은 띄지 않았지만, 조협을 처리한 그룹에서 대조군에 비해 근소하게 몸무게 감소가 완화되었으며 생존율이 50% 증가하였다(Fig. 3D). 한편, 일반적으로 폐 조직에서 폐렴 구균의 증식은 숙주의 염증 반응을 동반하기에 조협의 항염증 효과를 조직학적 분석을 통해 추가적으로 살펴 보았다. Fig. 3E의 H&E염색 결과에서 볼 수 있듯이, 스프레이로 조협을 전처리한 그룹은 폐렴 구균의 비강내 감염에 대해서 세기관지 주변이 깨끗하고 폐포 구조가 잘 보존되어 있었으나, 대조군에서는 염증으로 인해 면역 세포들이 비어있는 폐 공간 내부로 많이 몰려온 것을 쉽게 확인할 수 있었다. 이러한 데이터들을 바탕으로 종합해 보면, 새로 도입한 스프레이 안면 분사법을 통해서 숙주로 전달된 조협이 폐렴 구균에 대해 충분한 방어 효과를 나타내었고, 이 때 조협의 항균 효과가 가장 잘 드러날 수 있는 최적의 폐렴 구균의 감염 농도(1×10^6 CFUs/head)를 결정함으로써 추후 생체 실험에서 진행할 전반적인 조건들을 성립하였다.

기관지 폐포 세척액에서의 폐포 대식세포 비율을 증가시키는 조협

호흡기의 숙주의 방어 기작에 포함되는 면역 세포 (폐포 대식세포, 과립구, 호중구, 단핵구)들이 조협 처리에 영향을 받을 수 있다고 생각하여, 유세포 분석을 통해 기관지 폐포 세척액 내의 세포를 분석해 보았다. 조협을 2주간 스프레이 분사로 전처리한 마우스 그룹에 1×10^6 CFUs의 폐렴 구균을 비강 경로로 감염시키고 5일 후 기관지 폐포 세척액 세포 군집에서 폐포 대식세포(CD11b⁺CD11c^{hi}F4/80⁺)의 비율이 대조군에 비해 높게 관찰되었다(Fig. 4A). 비록 폐포 대식세포 수의 상대량 비교에서 그룹간의 유의적 차이는 없었지만(Fig. 4B), 절대적량 비교에서 조협을 전처리한 그룹에서 대조군에 비해 유의적으로 더 높은 폐포 대식 세포가 존재하였다(Fig. 4C). 그러나, 두 그룹간의 호중구(CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺)와 과립구(CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺), 단핵구(CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁻)의 상대적 비율과 절대적 세포 수는 비슷하였다(Fig. 4D - Fig. 4F). 종합해 보면, 이러한 결과들은 스프레이로 조협을 전처리한 마우스 그룹에서 유의적으로 늘어난 폐포 대식세포가 폐렴 구균에 의한 치사율 감소 및 염증 억제에 밀접하게 연관되어 있다는 점을 시사한다.

고 찰

조협을 스프레이 방식으로 쥐에게 분주함에 따라, 저자

는 폐렴 구균 감염으로 유발된 폐렴과 같은 폐 질환에서 조협의 보호 효과를 입증하였다. 비록 조협에 노출된 후 폐렴 구균을 비강내 처리한 쥐에서 폐 염증과 연관된 조직학적 특징을 정량적으로 평가하지는 못하였지만, 폐에서 폐렴 구균의 증식 저해와 기관지 폐포 세척액에서 높은 비율의 폐포 대식세포를 발견하였다. 결과적으로 조협은 쥐에게 분주 방식으로 처리될 때 폐렴 구균의 비강내 처리에 대해 저항성을 보이며 보호 효과를 보였다.

한약재로서 *Gleditsia*속의 추출물은 항암, 항염증, 항알러지, 항균, 항진균, 항산화 효과 등의 치료 활성을 가지는 것으로 입증 받았으며 넓은 의학 분야에서 사용된다[63]. 이러한 다양한 약재 활성은 생체 외 실험에서 주로 적용되었고 실험 동물을 사용한 생체 내 실험은 비교적 덜 수행되었다[8, 14, 22, 27, 28, 42]. 독성이나 부작용을 중심으로 다룬 논문은 적었기에 저자는 생체 내에서 해가 될 수 있는 경우를 고려하여 조협의 세포 독성을 확인하였다. 그래서, 저자는 부작용과 독성을 최소화하는 안전하고 편리한 방법으로 스프레이 방식을 선택하였다. 비록 저자는 이번 연구에서 조협의 보호 효과를 증점적으로 다뤘다면 다른 천연 추출물도 다양한 생물 작용 효과를 가진 것으로 잘 알려져 있다. 용아초는 항바이러스 효과를[4], 위릉채는 항균 효과를[37], 해당화, 서목태는 항산화 효과를[5, 62], 와송은 항암효과를[26], 진피, 백자인, 백과, 시엽은 항염증 효과를 가진다[10, 39, 47, 49]. 저자는 면역 향상을 위한 치료상의 선구자로서 천연 추출물에 대한 많은 관심들이 재활성화되길 희망한다. *Gleditsia*속의 적용에 대해 아직 알려지지 않은 방어 기작을 이해하는데 더 상세한 연구가 필요하다.

폐 면역계는 감염 시에 병원체 연관 분자 패턴의 인식과 면역세포를 자극하고 끌어들이는 사이토카인에 의한 조직 상주 세포와 면역 세포간의 상호작용으로 이루어진다[29]. 그람 양성 세균의 세포벽의 구성 물질인 리포테이코산과 폐렴 구균의 독성물질은 폐 상피세포와 폐포 대식세포에 발현되는 Toll-유사 수용체 2와 4같은 패턴 인식 수용체들에 의해 각각 인식된다[1, 30]. 보통, 면역 반응은 염증 반응과 식세포 작용을 유발하는 면역 연관 세포와 수용체-분자 패턴 간 상호작용에 의해 활성화된다[20, 46]. 이전 연구에서는 쥐에서의 폐렴 구균 증식 과정은 폐렴 구균을 포함한 병원체에 대한 TNF- α , IL-6, IL-1 염증성 사이토카인과 CXCL8 케모카인에 연관된 세포 매개 반응과 후천적 면역 반응을 유도하는데 포식 작용을 증진하기 위해 감염 부위로 몰려드는 Th17, Treg 림프구, 과립구와 단핵구의 증가가 수반된다[48, 57, 59, 61]. 폐포 대식세포의 경우 넓은 범위의 후천적 면역 반응을 조절하는 면역 조절 사이토카인인 GM-SCF을 사용한 제2형 폐포 세포(AEC II_s) 간의 상호작용에 의해 독감, 수두 바이러스 등의 바이러스성 감염을 조절하는 중요한 역할을 수행한

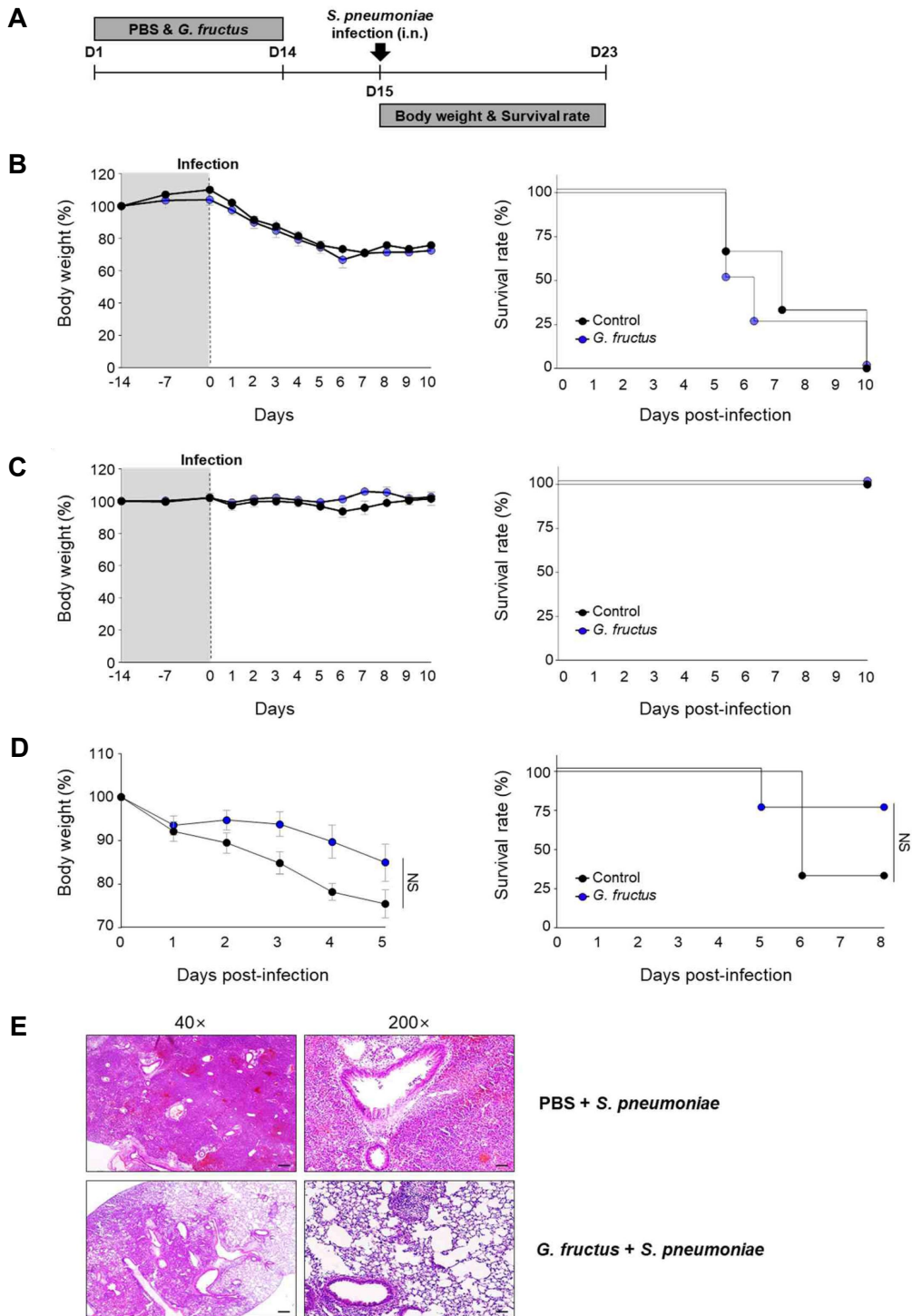


Fig. 3. Determination of optimal challenge dose in *S. pneumoniae* infection. To find proper challenge dose in murine model after intranasal infection to mice with *S. pneumoniae*. (A) Experimental scheme: *G. fructus* was treated using spray three times in a day for 7 or 14 days. (B-D) body weight and survival rate were monitored before and after *S. pneumoniae* infection. (B: 2 × 10⁶ CFUs/20 μl, C: 5 × 10⁵ CFUs/20 μl, and D: 1 × 10⁶ CFUs/20 μl, respectively). (E) Lung tissues were harvested at 5 days after infection. Representative photos of lung tissue performed by H&E staining were investigated with different magnification (40× and 200×). The scale bar means 250 μm and 50 μm, representatively. Body weight data are mean ± SEM (n=8) and survival rates (n=3, 4 per group) are measured. Statistical analyses were performed by multiple *t* test of two-stage step-up method of Benjamini, Krieger, and Yekutieli for body weight loss and log-rank (Mantel-Cox) test for survival rate (NS: not significant).

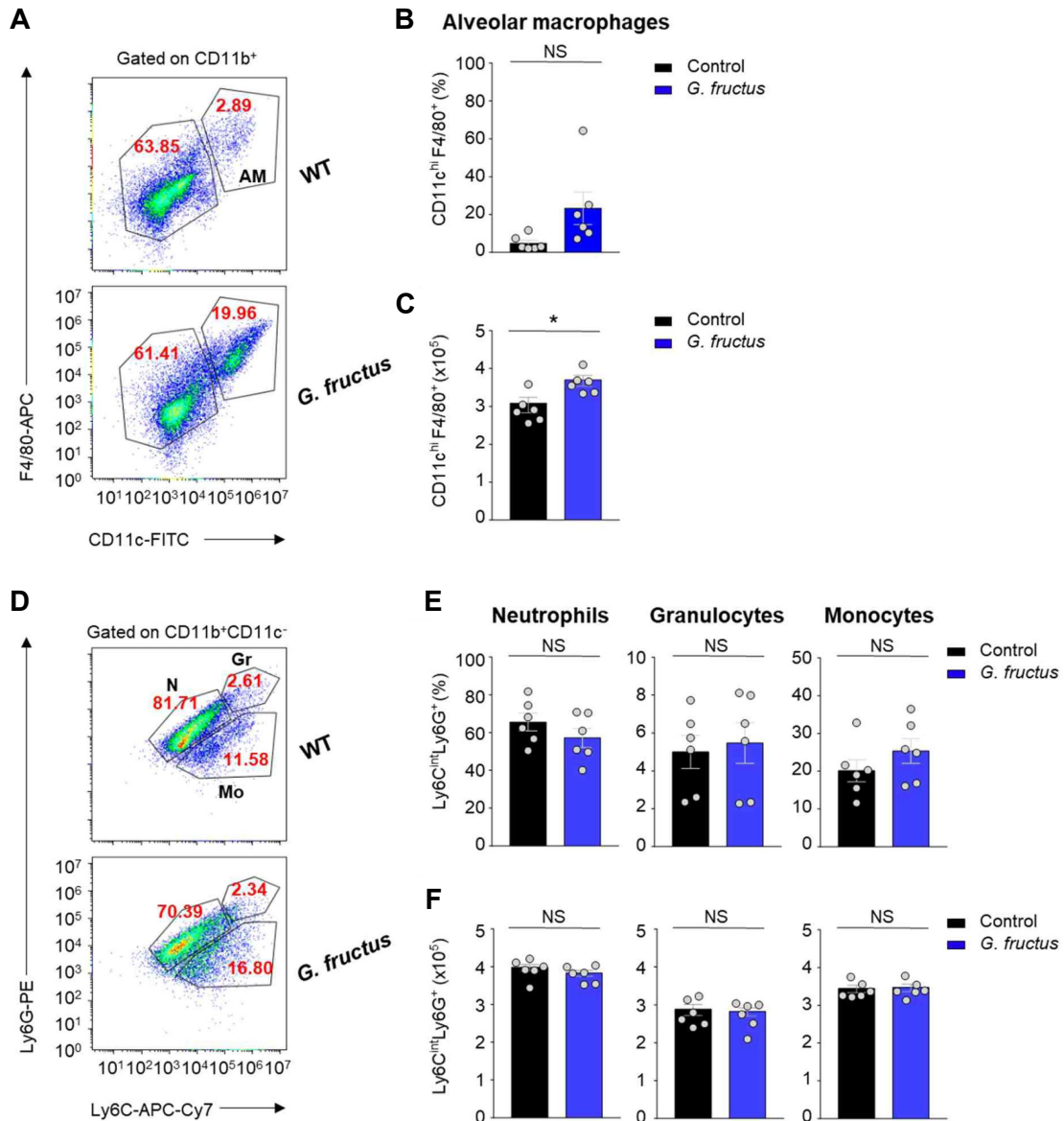


Fig. 4. Alveolar macrophage significantly increasing in BAL fluid of *G. fructus* treated group following *S. pneumoniae* infection. (A, D) Representative FACS images of diverse immune cells which were obtained from BAL fluid of control and *G. fructus*-treated group at 5 days post 1×10^6 CFUs of *S. pneumoniae* infection intranasally and analyzed by flow cytometry. AM: alveolar macrophages, N: neutrophils, Gr: granulocytes, Mo: monocytes. Quantification data of comparative cell percentages (B, E) and absolute numbers (C, F) of each cells were investigated in the BAL fluid of mice. Data are mean \pm SEM and results are representative of three independent experiments (n=6 per group). Statistical analyses were performed with *t*-test (* $p < 0.05$; NS: Not significant).

다[32, 60]. 조합에 노출된 쥐의 기관지 폐포 세척액에서 호중구, 단핵구, 과립구 간의 수의 유의적 차이가 보이지는 않지만, 폐포 대식세포 수가 증가하였으므로 조합의 보호 효과가 숙주 방어 기작과 관련될 수 있는 가능성을 시사한다.

끝으로 조합은 폐에서 폐렴 구균의 증식을 억제하고 기관지 폐포 세척액에서 폐포 대식세포를 증가시켰다. 실제로 조합의 일반적인 비강내 처리 방식으로는 자체 독성

으로 인해 쥐에게서 낮은 생존율을 보였으나(data not shown), 안면 분주하는 방식을 채택했을 시 이러한 부작용이 보이지 않았으며 조합의 보호 효과도 확인할 수 있었던 새로운 방식을 찾을 수 있었다. 저자는 위와 같은 결과들이 폐 염증에 대한 방어 기작을 이해하는 것과 면역 증진제로서의 천연 추출물의 효능을 평가하는 과정 간의 유익한 연결 관계를 찾는 데 기여할 것이라고 믿는다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업 ‘(2021370A00-2123-BD02)’과 2020학년도 부산대학교 신임교수연구정착금 지원으로 이루어졌음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Allard, B., Panariti, A. and Martin, J. G. 2018. Alveolar macrophages in the resolution of inflammation, tissue repair, and tolerance to infection. *Front. Immunol.* **9**, 1777.
- Andre, G. O., Politano, W. R., Mirza, S., Converso, T. R., Ferraz, L. F., Leite, L. C. and Darrieux, M. 2015. Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. *Microb. Pathog.* **89**, 7-17.
- Attallah, N. G. M., El-Kadem, A. H., Negm, W. A., Elekhaway, E., El-Masry, T. A., Elmongy, E. I., Altwaijry, N., Alanazi, A. S., Al-Hamoud, G. A. and Ragab, A. E. 2021. Promising antiviral activity of *Agrimonia pilosa* phytochemicals against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 supported with *in vivo* mice study. *Pharmaceuticals (Basel)* **14**, 1313.
- Bae, G. J. and Ha, B. J. 2015. Antioxidative effect of fermented rhynchosia nulubilis in obese rats. *J. Food Hyg. Saf.* **30**, 383-389.
- Baroja-Mazo, A., Martin-Sanchez, F., Gomez, A. I., Martinez, C. M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barbera-Cremades, M., Yague, J., Ruiz-Ortiz, E., Anton, J., Bujan, S., Couillin, I., Brough, D., Arostegui, J. I. and Pelegrin, P. 2014. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* **15**, 738-748.
- Brooks, L. R. K. and Mias, G. I. 2018. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Front. Immunol.* **9**, 1366.
- Cha, M. R., Kim, J. Y., Hwang, J. H. and Park, H. R. 2007. Induction of cytotoxicity and apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells by a *Gleditsia* Semen extract. *Food Scie. Biotechnol.* **16**, 260-264.
- Chiavolini, D., Pozzi, G. and Ricci, S. 2008. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 666-685.
- Choi, J., Kim, M. J., Komakech, R., Jung, H. and Kang, Y. 2019. Anti-inflammatory activities of astringent persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) stalks of various cultivar types based on the stages of maturity in the Gyeongnam province. *Bmc Complement. Altern. Med.* **19**, 262.
- Craig, A., Mai, J., Cai, S. and Jeyaseelan, S. 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**, 568-575.
- De Groot, M., Lagasse, A. and Sebruyens, M. 1958. Fine structure of the alveolar wall of the lung. *Nature* **181**, 1066-1067.
- Gilbert, R. J., Jimenez, J. L., Chen, S., Tickle, I. J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P. W. and Saibil, H. R. 1999. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* **97**, 647-655.
- Harauchi, Y., Kajimoto, T., Ohta, E., Kawachi, H., Imamura-Jinda, A. and Ohta, S. 2017. Prenylated purine alkaloids from seeds of *Gleditsia japonica*. *Phytochemistry* **143**, 145-150.
- Harker, J. A. and Lloyd, C. M. 2021. Overlapping and distinct features of viral and allergen immunity in the human lung. *Immunity* **54**, 617-631.
- Hartl, D., Tirouvanziam, R., Laval, J., Greene, C. M., Habel, D., Sharma, L., Yildirim, A. O., Dela Cruz, C. S. and Hogaboam, C. M. 2018. Innate immunity of the lung: from basic mechanisms to translational medicine. *J. Innate. Immun.* **10**, 487-501.
- Hoe, E., Anderson, J., Nathanielsz, J., Toh, Z. Q., Marimla, R., Balloch, A. and Licciardi, P. V. 2017. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiol. Immunol.* **61**, 49-56.
- Hsia, C. C., Hyde, D. M. and Weibel, E. R. 2016. Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange. *Compr. Physiol.* **6**, 827-895.
- Huang, J., Tao, G., Liu, J., Cai, J., Huang, Z. and Chen, J. X. 2020. Current prevention of COVID-19: natural products and herbal medicine. *Front. Pharmacol.* **11**, 588508.
- Huang, Y. F., Wang, Z. M., Jin, C. F., Wang, L., Zhang, X. M., Xu, W. C., Xiang, Y., Wang, W., He, X. J., Yin, Y. B. and He, Y. J. 2016. TLR2 promotes macrophage recruitment and *Streptococcus pneumoniae* clearance during mouse otitis media. *Pediatr. Res.* **80**, 886-893.
- Hussell, T. and Bell, T. J. 2014. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 81-93.
- Hwang, Y. J., Lee, S. H., Ryu, S. Y., Ahn, J. W., Kim, E. J., Ro, J. S. and Lee, K. S. 1994. Chemical study on the phenolic compounds from *Gleditsia japonica*. *Kor. J. Pharmacognosy* **25**, 11-19.
- Kadioglu, A. and Andrew, P. W. 2004. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* **25**, 143-149.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. and Andrew, P. W. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 288-301.
- Kerr, A. R., Paterson, G. K., Riboldi-Tunnicliffe, A. and Mitchell, T. J. 2005. Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect. Immun.* **73**, 4245-4252.

26. Kim, J. W., Kim, S. H., Mariappan, R., Moon, D., Kim, J. and Yoon, S. P. 2021. Anti-cancer effects of the aqueous extract of *Orostachys japonica* A. Berger on 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer via MAPK signalling pathways *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* **280**, 114412.
27. Konoshima, T., Fukushima, H., Inui, H., Sato, K. and Sawada, T. 1981. The structure of prosapogenin obtained from the saponin of *gleditsia-japonica*. *Phytochemistry* **20**, 139-142.
28. Konoshima, T., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Cosentino, L. M. and Lee, K. H. 1995. Anti-AIDS agents, 21. triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *gleditsia japonica* and *gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation. *J. Nat. Prod.* **58**, 1372-1377.
29. Lloyd, C. M. and Marsland, B. J. 2017. Lung homeostasis: influence of age, microbes, and the immune system. *Immunity* **46**, 549-561.
30. Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R. and Golenbock, D. T. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 1966-1971.
31. Marten, K. and Hansell, D. M. 2005. Imaging of macrophage-related lung diseases. *Eur. Radiol.* **15**, 727-741.
32. McCormick, T. S., Hejal, R. B., Leal, L. O. and Ghannoum, M. A. 2021. GM-CSF: orchestrating the pulmonary response to infection. *Front. Pharmacol.* **12**, 735443.
33. McNeela, E. A., Burke, A., Neill, D. R., Baxter, C., Fernandes, V. E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R. M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K. A., Tschoop, J., Petrilli, V., Andrew, P. W., Kadioglu, A. and Lavelle, E. C. 2010. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* **6**, e1001191.
34. Mendenhall, R. and Sun, C. 1964. Surface lining of lung alveoli as a structure. *Nature* **201**, 713-714.
35. Mettelman, R. C., Allen, E. K. and Thomas, P. G. 2022. Mucosal immune responses to infection and vaccination in the respiratory tract. *Immunity* **55**, 749-780.
36. Muhlfield, C. and Ochs, M. 2017. Development, remodeling and regeneration of the lung: coping with the structural and functional challenges of breathing. *Cell Tissue Res.* **367**, 407-411.
37. Naveen, K. V., Kim, H. Y., Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A. and Wang, M. H. 2021. Phyto-fabrication of biocompatible silver nanoparticles using *Potentilla chinensis* Ser leaves: characterization and evaluation of its antibacterial activity. *J. Nanostructure Chem.* **12**, 655-667.
38. Nicod, L. 2005. Lung defences: an overview. *Eur. Respir. Rev.* **14**, 45-50.
39. Oh, Y. C., Cho, W. K., Jeong, Y. H., Im, G. Y., Yang, M. C., Hwang, Y. H. and Ma, J. Y. 2012. Anti-inflammatory effect of citrus unshiu peel in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Am. J. Chin. Med.* **40**, 611-629.
40. Paterson, G. K. and Mitchell, T. J. 2006. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology (Reading)* **152**, 285-293.
41. Paton, J. C. 1996. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol.* **4**, 103-106.
42. Porras, G., Chassagne, F., Lyles, J. T., Marquez, L., Dettweiler, M., Salam, A. M., Samarakoon, T., Shabih, S., Farrokhi, D. R. and Quave, C. L. 2021. Ethnobotany and the role of plant natural products in antibiotic drug discovery. *Chem. Rev.* **121**, 3495-3560.
43. Romagnani, S. 1999. Th1/th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **5**, 285-294.
44. Rossi, G., Cavazza, A., Spagnolo, P., Bellafiore, S., Kuhn, E., Carassai, P., Caramanico, L., Montanari, G., Cappiello, G., Andreani, A., Bono, F. and Nannini, N. 2017. The role of macrophages in interstitial lung diseases: Number 3 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *Eur. Respir. Rev.* **26**, 170009.
45. Schittny, J. C. 2017. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* **367**, 427-444.
46. Schroder, N. W. J., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U. B., Weber, J. R. and Schumann, R. R. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* **278**, 15587-15594.
47. Shin, I. S., Shin, N. R., Jeon, C. M., Kwon, O. K., Hong, J. M., Kim, H. S., Oh, S. R. and Ahn, K. S. 2015. *Thuja orientalis* reduces airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *Mol. Med. Rep.* **12**, 4640-4646.
48. Szylar, G., Wysoczanski, R., Marshall, H., Marks, D. J. B., Jose, R., Ehrenstein, M. R. and Brown, J. S. 2022. A novel *Streptococcus pneumoniae* human challenge model demonstrates Treg lymphocyte recruitment to the infection site. *Sci. Rep.* **12**, 3990.
49. Tao, Z., Jin, W. W., Ao, M. Z., Zhai, S. B., Xu, H. and Yu, L. J. 2019. Evaluation of the anti-inflammatory properties of the active constituents in *Ginkgo biloba* for the treatment of pulmonary diseases. *Food Funct.* **10**, 2209-2220.
50. Tate, M. D., Pickett, D. L., van Rooijen, N., Brooks, A. G. and Reading, P. C. 2010. Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice. *J. Virol.* **84**, 7569-7580.
51. van Bueren, A. L., Higgins, M., Wang, D., Burke, R. D. and Boraston, A. B. 2007. Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 76-84.
52. van der Poll, T. and Opal, S. M. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**, 1543-1556.
53. Wang, Z., Rahkola, J., Redzic, J. S., Chi, Y. C., Tran, N., Holyoak, T., Zheng, H., Janoff, E. and Eisenmesser, E.

2020. Mechanism and inhibition of Streptococcus pneumoniae IgA1 protease. *Nat. Commun.* **11**, 6063.
54. Weight, C. M., Venturini, C., Pojar, S., Jochems, S. P., Reine, J., Nikolaou, E., Solorzano, C., Noursadeghi, M., Brown, J. S., Ferreira, D. M. and Heyderman, R. S. 2019. Microinvasion by Streptococcus pneumoniae induces epithelial innate immunity during colonisation at the human mucosal surface. *Nat. Commun.* **10**, 3060.
55. Weiser, J. N., Ferreira, D. M. and Paton, J. C. 2018. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 355-367.
56. Whitsett, J. A. and Alenghat, T. 2015. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* **16**, 27-35.
57. Wilson, R., Cohen, J. M., Jose, R. J., de Vogel, C., Baxendale, H. and Brown, J. S. 2015. Protection against Streptococcus pneumoniae lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol.* **8**, 627-639.
58. Witznath, M., Pache, F., Lorenz, D., Koppe, U., Gutbier, B., Tabeling, C., Reppe, K., Meixenberger, K., Dorhoi, A., Ma, J. T., Holmes, A., Trendelenburg, G., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., van der Linden, M., Tschopp, J., Mitchell, T. J., Suttrop, N. and Opitz, B. 2011. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* **187**, 434-440.
59. Yang, H., Ko, H. J., Yang, J. Y., Kim, J. J., Seo, S. U., Park, S. G., Choi, S. S., Seong, J. K. and Kweon, M. N. 2013. Interleukin-1 promotes coagulation, which is necessary for protective immunity in the lung against Streptococcus pneumoniae infection. *J. Infect. Dis.* **207**, 50-60.
60. Yang, N., Luna, J. M., Dai, P., Wang, Y., Rice, C. M. and Deng, L. 2022. Lung type II alveolar epithelial cells collaborate with CCR2(+) inflammatory monocytes in host defense against poxvirus infection. *Nat. Commun.* **13**, 1671.
61. Yipp, B. G., Kim, J. H., Lima, R., Zbytniuk, L. D., Petri, B., Swanlund, N., Ho, M., Szeto, V. G., Tak, T., Koenderman, L., Pickkers, P., Tool, A. T. J., Kuijpers, T. W., van den Berg, T. K., Looney, M. R., Krummel, M. F. and Kubes, P. 2017. The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. *Sci. Immunol.* **2**, eaam8929.
62. Zhang, C. L., Zhao, F. S., Li, R. H., Wu, Y. Y., Liu, S. and Liang, Q. C. 2019. Purification, characterization, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from Rosa rugosa petals. *Int. J. Biol. Macromol.* **124**, 938-945.
63. Zhang, J. P., Tian, X. H., Yang, Y. X., Liu, Q. X., Wang, Q., Chen, L. P., Li, H. L. and Zhang, W. D. 2016. Gleditsia species: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* **178**, 155-171.
64. Zhang, L., Li, Z., Wan, Z., Kilby, A., Kilby, J. M. and Jiang, W. 2015. Humoral immune responses to Streptococcus pneumoniae in the setting of HIV-1 infection. *Vaccine* **33**, 4430-4436.

초록 : 폐렴 구균에 대한 조협의 보호 역할 연구

이준기¹ · 이세희¹ · 서동주¹ · 이강희¹ · 박소정¹ · 박선¹ · 김태경² · 양진영^{1,3*}

(¹부산대학교 생명시스템학과, ²부산대학교 생물교육과, ³부산대학교 생명과학과)

천연 추출물은 항산화, 항균, 항염 및 면역조절 효과 등의 다양한 생리활성을 가지며 암과 전염병을 치료하는데 사용되어왔다. 우리는 본 연구에서 폐 증강제로 잘 알려진 10 가지의 천연 추출물을 선정하였고 폐렴구균[*Streptococcus (S.) pneumoniae*]에 대한 항균성을 조사하였다. 디스크 확산 분석에서 우리는 다른 천연 추출물과 비교 시, 조협을 처리했을 때 폐렴 구균의 생장이 유의적으로 조절되었음을 확인하였다. 비강 경로를 통한 조협 처리가 생체 내 독성을 유발하여 우리는 조협을 처리하는 새로운 방법으로 스프레이를 채택했다. 흥미롭게도 2 주 동안 하루에 3 번 조협을 처리한 쥐들은 몸무게 감소와 생존율에서 폐렴 구균의 비강내 감염에 대해 저항력을 보였다. 더욱이 저자는 스프레이를 통해 조협에 주기적으로 노출될 시 폐렴 구균을 투여한 폐에서 지속되는 염증이 다소 완화되는 것으로 미루어보면, 이는 이동해온 염증 세포가 폐 감염 질환에 대한 숙주 방어기작과 관련될 수 있다는 점을 시사하고 있다. 이를 통해 조협 선처리 후 폐렴 구균을 감염시킨 후 5 일이 지난 쥐의 기관지 폐포 세척액에서 면역세포를 분석해 본 결과, 과립구(CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺), 호중구(CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁺), 그리고 단핵구(CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G⁻) 세포는 대조군과 비슷한 수치였으나, 유의적으로 증가한 수준의 폐포 대식세포(CD11b⁺CD11c^{hi}F4/80⁺)가 확인되었다. 이들의 결과를 종합하면, 저자의 자료는 이 같은 편리한 조협 적용이 균 감염에 대한 방어 면역을 유도할 수 있다는 점을 암시하며 안전 스프레이 방법이 폐 염증의 방어 기작을 이해하고, 폐 질환에서 면역 증강제로서의 천연 추출물의 효능을 평가하는데 도움이 될 것임을 나타낸다.