

벗나무의 면역억제 활성 연구

한 병 훈 · 한 용 남

서울대학교 생약연구소

Immunosuppressant Activity of Cherry Bark Extract

Byung Hoon HAN and Yong Nam HAN

Natural Products Research Institute, Seoul National University

The repeated administration of the cherry bark extract and its some fractions suppressed profoundly the antibody production in mice which were immunized with bacterial α -amylase.

서 론

벗나무의 줄기 및 껍질은 기침, 담마진, 우육체 등에 민간약으로 이용되고 있다¹⁾. 이들 질환들은 인체가 이물에 대하여 알러지성의 과민한 반응을 나타내는데 기인하고 있는 것으로 생각할 수 있다. 항체 생산계의 어느 단계에 영향을 줄 수 있는 유효성분이 벗나무 껍질중에 들어있을 것으로 생각되어 저자들은 혈중항체의 생산을 지표로 하여 벗나무 추출액에서 면역학적 활성이 있는 물질을 분리하고자 하였다.

면역억제 활성이 있는 것으로 알려진 식물로서는 감초(Glycyrrhiza)가 있으며 당단백질 분획에 속하는 물질이 유효한 것으로 보고되고 있다²⁾.

본 연구의 실험방법으로서는 결정성 α -amylase를 항원으로 complete Freund's adjuvant에 현탁시켜 마우스에 투여하고 벗나무 줄기의 껍질 추출물의 각종분획을 투여한후 α -amylase에 대한 anti-titer를 측정함으로써 면역억제활성을 측정하였다.

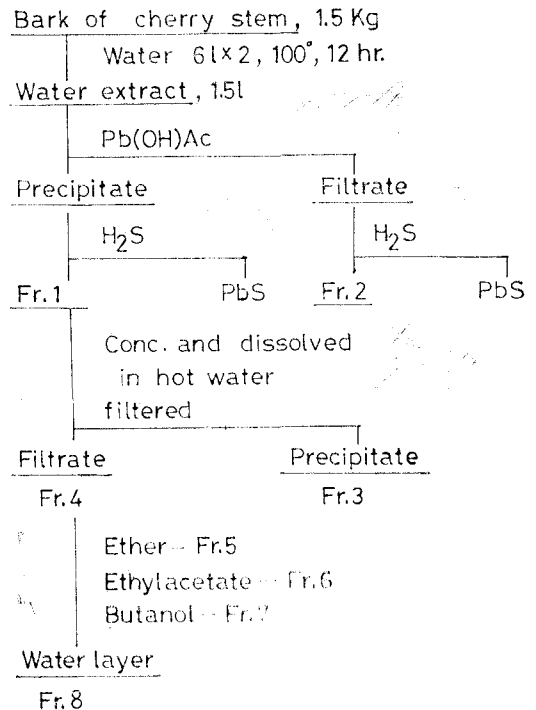
실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 벗나무 : 야산의 벗나무(*Prunus leveilleana*

KOEHNE)의 가지의 껍질을 벗겨서 사용하였다. (Scheme I).

2) 시약 : bacterial α -amylase (*B. subtilis*)는 Nagase Co. 제품을 사용하였다. complete Freund's adjuvant는 Difco Co. 제품을 사용하였다. 그의 유기용매는 일급품을 사용하였다.



Scheme I. Fraction of water extract of the bark of cherry stem. Each fraction was dissolved or suspended in 1.5 l of water.

2. 실험방법

1) 항원액 조제 : bacterial α -amylase의 5mg/ml saline 1 용량과 complete Freund's adjuvant 1 용량을 잘 혼합시켜 조제하였다.

2) 면역법 : 마우스 (우, ddD계 5주일생)에 α -amylase 항원액 0.2ml를 복강에 주사하였다. 3일후 부터 벗나무 껍질 추출액 또는 그 분획물을 0.2ml씩 15일간 매일 복강내 주사 하였다.

21일째 또는 28일째 되는날 mouse의 눈의 정맥총(ophthalmic venous plexus)에서 heparin 처리한 모세관으로 75 μ l의 혈액을 취하였다.

3) 항체 역가 측정 : 혈액 검체를 saline용액 3ml에 희석하여 원심분리한 후 상층액을 취하여 Okada²⁾의 방법에 따라 α -amylase에 대한 항체 역가를 측정하였다. 즉 희석된 혈청 0.5ml를 취하여 60°C에서 50분간 가열하여 혈장 중에 존재하는 α -amylase를 불활성화 시켰다. 이 용액에 α -amylase 0.5 μ g/0.5ml를 가하고 37°C에서 50분간 가온하였다.

남아있는 amylase활성을 측정하기 위하여 0.4 M-acetate buffer (pH 5.9) 1ml를 가하고 1% 가용성 전분용액 2ml를 가하여 37°C에서 15분간 가온하였다. 그후 N-HCl 5ml를 가하여 반

응을 중단시키고 이 반응 혼합용액 중 1ml를 취하여 0.01% J₂용액 20ml를 가한후 660nm에서 흡광도를 측정하였다.⁴⁾

$$\alpha\text{-amylase의 역가(단위)} = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 40$$

D₀: 대조액의 흡광도

D: 15분동안 효소반응후의 흡광도

항체 역가는 α -amylase활성 10단위를 중화할 수 있는 항혈청의 희석배수로 하였다.

4) 벗나무껍질 추출물의 분획화 : 벗나무껍질 (6월에 채집) 1.5kg을 6 litre의 물과 함께 수욕 상에서 12시간 추출하였다. 1회 더 반복하여 추출액을 합하여 총 1.5 l가 되도록 조절하였다(벗나무껍질 1g/ml 수용액). 이 수용액을 출발점으로 하여 Scheme I에서와 같이 항체역가를 측정하여 가면서 분획하여 총 8개 분획을 얻었다. 각 분획의 농축물을 증류수 1.5 l에 용해 또는 혼합시켜 조제한 후 0.2ml씩 마우스에 복강투여 하였다.

실험 결과

1. 벗나무껍질 분획물의 면역억제활성 :

벗나무껍질 물추출물 0.2ml는 Table I에서와

Table I. Immunosuppressive Activities of Cherry Bark Extract and its Some Fractions (n=number of mice).

Exp. No.	Samples	Dosage	Anti-titer	
			21day	28day
1	Control (Saline)	0.2ml	43.5±14.6 (n=6)	
	Dexamethazone	1.6 μ g	5.4± 3.6 (n=5)	
	Fr. 1	0.2ml	6.9± 6.7 (n=4)	
	Fr. 2	0.2ml	45.0±17.5 (n=5)	
2	Control (Saline)	0.2ml	52.3± 7.9 (n=6)	84.7± 7.9 (n=6)
	Fr. 3	0.2ml	46.9± 9.9 (n=6)	72.2±15.8 (n=5)
	Fr. 4	0.2ml × $\frac{1}{5}$	13.2± 4.7 (n=6)	22.4±11.6 (n=6)
	Fr. 4	0.2ml × $\frac{1}{50}$	33.9±11.9 (n=6)	66.9±18.9 (n=6)
3	Control (Saline)	0.2ml	38.0± 4.0 (n=5)	
	Fr. 5 (ether)	0.2ml	20.9± 6.7 (n=5)	
	Fr. 6 (EtOAc)	0.2ml	3.7± 3.2 (n=5)	
	Fr. 7 (BuOH)	0.2ml	29.7±17.9 (n=6)	
	Fr. 8 (water)	0.2ml	46.1± 6.7 (n=5)	

같이 dexamethazone 1.6 μ g과 거의 같은 정도의 면역억제활성을 나타내었다. 이 물 추출물을 염기성 초산남으로 침전되는 분획(Fr. 1)과 비침전 분획(Fr. 2)으로 나누었을 때 면역억제 활성은 Fr. 1에만 나타났다 (Table I). Fr. 1을 끓는 물에 가용성인 분획(Fr. 4)과 비가용성 분획(Fr. 3)로 나누었을 때 대부분의 면역억제 활성은 끓는 물에 가용성인 분획(Fr. 4)으로 이행되었다 (Table I).

Fr. 4를 계속하여 ether 추출(Fr. 5)한 다음 그 수층을 ethyl-acetate 추출(Fr. 6)하고 다시 그 수층을 *n*-butanol 추출(Fr. 7)을 행하고 최후의 수층(Fr. 8)에 대하여 면역억제 활성을 측정 한 결과 ethyl-acetate에 이행되는 분획인 Fr. 6가 가장 높은 면역억제 활성을 나타내었다 (Table I).

2. 용량-면역억제 활성관계: 면역억제 활성이 강한 Fr. 4에 대하여 용량작용 관계를 측정하였다 (Fig. 1). 즉 Fr. 4를 증류수로 희석하여 그 농도가 $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{64}$ 가 되게한 다음에 0.2ml씩 마우스에 투여하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 투여량과 면역억제활성 간에는 대략 직선 관

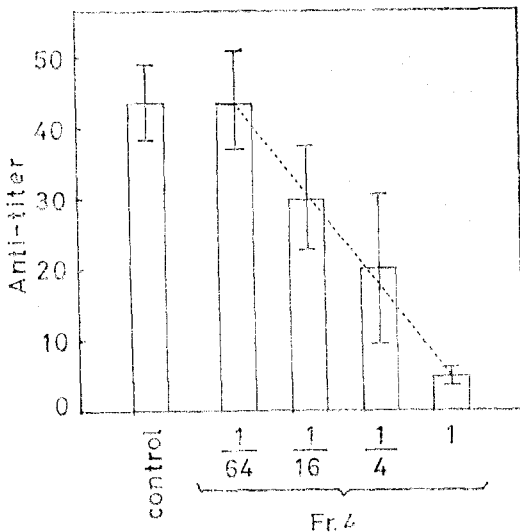


Fig. 1. Dose dependency relations of immunosuppressive activities of the Fr. 4 of cherry bark-extract. Mice were immunized with bacterial α -amylase and received intraperitoneally 0.2ml fraction 4 for 21 days. The antibody titers are expressed by the dilution index of serum which can neutralize ten units of α -amylase activity.

계가 나타났다.

고 찰

옛날부터 사용되고 있는 민간 생약중에는 알러지성 질환이나 염증성 질환등에 유효한 것들이 있는 것으로 알려지고 있다. 이들중에 한방 약으로 널리 사용되는 감초가 면역억제 활성이 있는 것으로 알려지고 있다.

본 연구에서는 민간약으로 담마진, 기침, 우속체등에 사용되고 있는 벗나무의 껍질이 강력 한 면역억제 활성이 있음을 밝혔다. bacterial α -amylase를 항원으로 하여 마우스에 주사한 다음 극히 초기(28일이내)에 면역억제 활성이 나타남을 관찰하였으므로 각종 immunoglobulin 중 특히 IgM, IgG의 생산억제⁵⁾를 지표로 실험이 진행되었다. 그러나 벗나무의 면역억제 활성성분이 IgE, 및 T cell⁶⁾에 대하여 어떤 활성이 있는지 앞으로 계속 연구되어야 할 것이다.

벗나무의 면역억제활성 분획은 염기성 초산남으로 침전되며 끓는물에 녹는 분획중에서도 ethyl-acetate에 잘 녹는 분획임이 밝혀졌다. 이 활성분획중에서 유효성분의 분리를 진행하고 있으며 flavonoid로 추정하고 있다. 벗나무에서 수층의 flavonoid가 Hasegawa⁷⁾ 등에 의하여 분리되어 그 구조가 밝혀져 있으나 그 박층크로마토그래피의 소견으로 보아서 면역억제활성성분과는 일치되지 않는 것으로 생각되고 있다.

(1978. 10. 1 接受)

문 헌

1. 이신주 : 한국민속약(서문당), 116 (1976).
2. Oura, H., Nakashima, S., Kumagai, A. and Takata M.: *Taisha*, 10, 651 (1973).
3. Okada, Y., Onoue, K., Nakashima, S. and Yamamura, Y.: *J. Biochem.*, 54, 477 (1963).
4. Fuwa, H.: *J. Biochem.*, 41, 583 (1954).
5. Kishimoto, T. and Ishizaka, K.: *J. Immunol.*, 109, 612 (1972).
6. Nakashima, S. and Ono, S.: *Gann*, 63, 111 (1972)
7. Hasegawa, M. and Shirato, T.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5559 (1954).