

더덕(*Codonopsis lanceolatae* Radix) 추출물이 면역세포에 미치는 영향

서 정 숙

기전여자전문대학 식품영양과

Effect of *Codonopsis lanceolatae* Radix Water Extract on Immunocytes

Jung-Sook Suh

Department of Food and Nutrition, Kijeon Woman's Junior College, Chonju 560-701, Korea

Abstract

The purpose of this research was to investigate the effect of *Codonopsis lanceolatae* Radix water extract(CLE) on immunocytes. The effect of CLE on the proliferation of thymocytes was estimated by MTT colorimetric assay, sub-population of thymocytes was estimated by laser flow cytometry, production of nitric oxide from macrophages was estimated by Griess method, and phagocytosis of human polymorphonuclear cells was estimated by lucigenin chemiluminescence. CLE increased the proliferation of thymocytes *in vivo*, but did not affect the proliferation of thymocytes *in vitro*. CLE accelerated the activation of heper T cells in thymocytes. CLE inhibited the production of nitric oxide from peritoneal macrophages, and increased the phagocytosis of human polymorphonuclear cells. These results suggest that CLE have immuno-regulatory action *in vivo*.

Key words : *Codonopsis lanceolatae*

서 론

더덕(*Codonopsis lanceolata* Benthams et Hooker)은 도라지과(*Campanulaceae*)에 속하는 다년생 만초로서, 뿌리를 양유(*Radix Codonopsis lanceolatae*)라 하며 모양은 비대하고 방추형이다¹⁾. 성분으로는 sterol, triterpenoid^{2,3)}, cycloartenol⁴⁾, N-formylharman, 1-carbomethoxy- β -carboline, perlolyrine, norharman⁵⁾ 및 휘발성 향기성분^{6,7)}들이 있고, 혈청지질의 감소⁸⁾ 및 항산화효과⁹⁾ 등의 약리작용이 있는 것으로 보고되었다.

더덕은 맛과 향이 독특하여 오래전부터 식용으로 사용되어 왔다. 한방에서는 병후회복, 산후회복, 유즙분비 촉진, 해소, 거담 및 항염작용 때문에 약으로도 사용하여 왔다¹⁾. 그러나 다양한 생리작용에도 불구하고 정확한 작용메카니즘은 아직 규명되지 않았다.

본 논문은 더덕이 생체의 면역세포에 미치는 영향을 검토한 결과로, *in vivo* 및 *in vitro*계에서 흉선세포(thymocytes)의 증식 및 흉선세포의 아군집(subpopulation)에 미치는 영향, 복강 매크로파지에서 NO의

생성에 미치는 영향 및 사람다형핵세포(human polymorphonuclear cells)의 lucigenin 화학발광(chemiluminescence)에 미치는 영향을 검토한 결과이다.

재료 및 방법

1. 재 료

더덕은 1996년 6월 전북 진안군에서 자생하고 있는 것을 채취하여 사용하였다. 실험동물로 BALB/c계 수컷 마우스(18±2g)를 대한실험동물에서 구입하여 일주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하고 사육중 물과 사료를 자유롭게 섭취하게 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), RPMI 1640(Gibco), fetal bovine serum(FBS, Gibco), trypsin(Gibco), penicillin-streptomycin(Sigma), Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A, Sigma), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumb-

romide(MTT, Sigma), concanavalin A(Con A, Wako), lipopolysaccharide(LPS, Sigma 026:B6), Ficoll-Hypaque(Sigma), thioglycollate(Difco), interferon γ (γ -IFN, Sigma Hu γ -IFN), sulfanilamide(Sigma), *N*-Naphthylethylenediamine 2HCl(Sigma), Ficoll-Hypaque(Sigma), zymosan(Sigma), lucigenin(Sigma), (PE) α -CD4 monoclonal antibody(Molecular probes), (FITC) α -CD8 monoclonal antibody(Molecular probes) 등이다. 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구인 culture flask(Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate reader(Dynattech MR5000), CO₂인큐베이터(Vision scientific Co.), luminometer(Berthold 96LP), flow cytometer(Coulter EPICS-XL), 원심분리기(VS-6000 CF), inverted microscope(Nikon Co.), 동결건조기(Labconco) 등을 사용하였다.

3. 더덕추출액 조제

더덕 90g을 씻어서 손으로 잘게 찢어, 증류수 1,000ml에 넣고 4℃에서 3일간 교반 추출한 다음, 여과지로 여과하고 여액을 회전진공증발기로 40℃에서 농축하였다. 농축액을 하루 냉동시킨 후 동결건조시켜 분말 6.2 g(이하 더덕추출물이라 함. 수득률 6.9 %)을 얻었다. 동물 실험에서는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포실험에는 3차 증류수에 용해시킨 뒤, 멤브레인 필터(0.45 μ m)로 여과 멸균하여 사용하였다.

4. 더덕추출물이 마우스의 흉선세포의 증식에 미치는 영향

마우스의 흉선세포는 Wysocki¹⁰⁾ 및 Mizel 등¹¹⁾의 방법으로 분리하였다. 마우스를 경추탈골하여 도살한 후 적출한 흉선을 DPBS-A를 넣은 페트리 접시에서 잘게 분쇄하고 스테인레스스틸 체로 여과하여 2회 세척한 다음, 10ml 주사기로 세포부유액을 취하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전으로 얻은 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 흉선세포를 분리하였다. 분리한 흉선세포의 생존율 및 총세포수는 hemocytometer로 측정하였다.

In vitro 실험에는 분리한 흉선세포 부유액에 더덕추출물 용액 1 및 10 μ g/ml를 각각 가하고 세포증식율을 MTT법(참고문헌 12)으로 측정하였다.

In vivo 실험에는 더덕추출물 500mg/kg을 1회 씩 3일 및 6일간 씩 경구투여하고 약물투여 다음날, 마우스를 경추탈골하여 도살한 후 흉선을 적출하여 약물

을 투여하지 않은 마우스를 대조군으로 세포증식율을 MTT법으로 측정하였다.

MTT법은 Mosmann¹²⁾방법의 Kotnik 등¹³⁾ 방법으로, 흉선세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1.2 \times 10⁶cells/ml 농도로 접종하여 흉선세포에는 Con A 5 μ g/ml 및 더덕추출물을 첨가한 후 37℃의 CO₂ 항온기에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 웰의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 세포생존율을 계산하였다.

5. 더덕추출물이 흉선세포의 아군집에 미치는 영향

더덕추출물 500mg/kg을 1일 1회씩 3일간 BALB/c 마우스에 경구투여하고 약물투여 다음날, 마우스를 경추탈골하여 도살한 후 흉선을 적출하여 4의 방법과 동일한 방법으로 흉선세포를 분리하였다. 분리한 흉선세포(1 \times 10⁶ cells/tube)에 형광시약인 phycoerythrin(PE) 및 fluorescein isothiocyanate(FITC)로 conjugate 시킨 (PE) α -CD4, (FITC) α -CD8 단클로날항체로 이중염색(1 : 160 dilution)하여 flow cytometer(excitation 488 nm, emission FITC 525 nm, PE 575 nm)로 아군집을 측정하였다.

6. 더덕추출물이 마우스 복강 매크로파지의 NO 생성에 미치는 영향

더덕추출물 500mg/kg을 1일 1회씩 6일간 경구투여하고 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하였다. 3일후에 마우스를 경추탈골하여 도살한 후, 복강에 찬 PBS 10ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4℃에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 배지로 2회 세척한 다음, 직경 120mm 페트리접시에 분주하여 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착한 매크로파지를 cell scraper로 모아 웰당 10⁶ 셀을 24 웰판에 분주하였다. 각 웰에 LPS 10 μ g/ml와 γ -IFN 25units/ml를 첨가하고 24시간 후에 생성된 NO양을 Griess법¹⁴⁾으로 측정하였다. 배지 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% *N*-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 웰판에 넣고 570nm에서 매크로파지 reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 따라 NO 양을 측정하였다.

7. 더덕추출물이 사람다형핵세포의 lucigenin 화학발광에 미치는 영향

헤파린 처리한 주사기로 건강한 성인으로부터 채취한 혈액을 밀도 1.119와 1.077의 Ficoll-Hypaque 이중층 위에 올려서 700×g로 30분간 원심분리한 후 서로 다른 밀도의 매질층 사이 밴드를 취하여 DPBS-A로 3회 씻고(200×g로 10분간 원심분리), 최종 세포농도가 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME(without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 사용하였다.

Zymosan 용액은 zymosan 67 mg을 10 ml의 DPBS-A에 넣어 37℃에서 30분간 방치한 후, 동일 양의 DPBS-A로 2회 세척하고 혈액제공자의 자가혈청이 10% 첨가된 10ml의 DME에 부유시켜 37℃에서 30분간 처리하고, 처리된 zymosan을 신선한 DME로 씻어준 후, 10ml의 DME에 재부유시켜 조제하였다.

Lucigenin 용액은 10ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin 용액은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다.

화학발광은 luminometer로 37℃에서 측정하였다¹⁵. 측정용 마이크로 플레이트(white)의 각 웰에 준비된 PMN 세포부유액 50μl와 lucigenin 용액 50μl를 넣고 37℃에서 15분간 전처리한 후, 더덕추출물 10μg/ml 및 zymosan 용액 30μl를 첨가하여 최종량이 200μl가 되도록한 후, 5분 간격으로 90분 동안 화학발광을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 더덕추출물이 흉선세포의 증식에 미치는 효과

In vitro 실험에서 흉선세포에 Con A를 처리한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않은 결과는 $72.3 \pm 1.9\%$ 로, 대조군보다 세포생존율이 현저히 감소하였다. 더덕추출물 1 및 10μg/ml를 처리한 경우는 세포생존율이 각각 $103.6 \pm 2.4\%$ 및 $104.4 \pm 2.9\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다(Fig. 1).

In vivo 실험에서 약물을 투여하지 않은 마우스의 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않은 결과는 $75.9 \pm 1.5\%$ 로 대조군보다 세포생존율이 현저히 감소하였으며, 마우스에 더덕 추출물 500 mg/kg을 3일 및 6일간 투여하면 각각 $134.0 \pm 1.8\%$ 및 $138.4 \pm 2.1\%$ 로 대조군보다 증가하였다(Fig. 2).

이는 더덕추출물이 *in vitro*에서는 흉선세포의 증식에

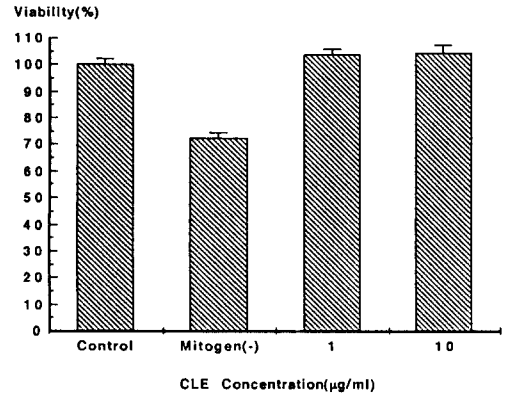


Fig. 1. Effect of *Codonopsis lanceolata* Radix water extract(CLE) on the proliferation of mouse thymocytes *in vitro*. Thymocytes obtained from BALB/c mice were cultured in RPMI1640 containing 10% FBS, Concanavalin A(5 μg/ml) and CLE were added at the beginning of the culture. The cells were incubated for 48 hrs. In CO₂-incubator at 37℃, followed by the addition of 20 μl MTT and further incubation for 4 hours. At the termination of the culture, add 100 μl of 10% SDS and then the cells were incubated for 18 hours. The OD of each well was measured with Microplate Reader at 570 nm. Each bar represents the mean ± SE from 4 experiments. *: Significantly different from control group(P<0.001). Control; Concanavalin A treated group Mitogen(-); Concanavalin A non-treated group.

는 별 영향을 주지 못하나, *In vivo*에서는 흉선세포의 증식을 촉진할 수 있는 것을 의미한다.

2. 더덕추출물이 흉선세포의 아군집에 미치는 영향

생체에서 면역작용을 가지는 다양한 면역세포는 그중에서 T림프구는 가장 중심적인 역할을 한다. T 세포는 골수에서 생성되어 흉선을 거치는 동안 분화를 거듭하면서 T_H 및 T_C/T_S 등의 각 형태로 나누어진다. 그중 T_H 세포는 생체면역기능을 관장하는 중심세포로 각종 cytokine(IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5 및 IL-6 등)을 생성하고, 매크로파지의 활성화, 식세포의 탐식기능증진 및 B 세포로부터의 항체생성을 촉진시키는 역할을 한다. 대조군의 흉선세포중 CD4 양성세포인 helper T 세포(T_H)는 $8.4 \pm 0.2\%$, CD8 양성세포인 cytotoxic T 세포(TC)는 $5.4 \pm 0.5\%$ 이었으나, 더덕추출물을 경구 투여한 마우스의 흉선세포중 T_H는 $12.3 \pm 1.2\%$, T_S는 $5.6 \pm 1.2\%$ 로 T_H 세포가 활성화되었다(Fig. 3).

이는 더덕추출물이 흉선세포중 주로 helper T 세포를 활성화시켜 면역증강작용을 하는 것을 의미한다.

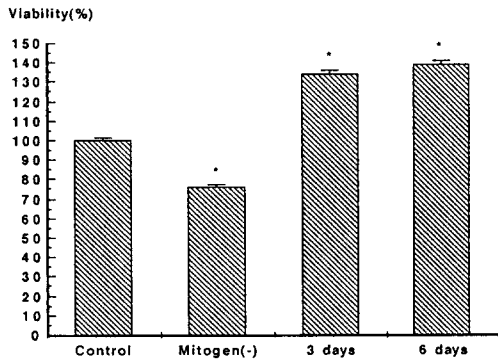


Fig. 2. Effect of concanavalin A on the proliferation of thymocytes obtained from CLE-treated mice. CLE(500 mg /kg) was administered orally for 3 or 8 days. Thymocytes obtained from CLE-treated BALB/C mice were cultured in RPM1640 media containing 10% FBS. Con A (5 μ g /ml) was added at the beginning of the culture. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments. *: Significantly different from control group ($P < 0.001$). Control: Concanavalin A treated group Mitogen (-); Concanavalin A non-treated group.

3. 더덕추출물이 마우스 복강 매크로파지의 NO 생성에 미치는 효과

정상 마우스의 복강 매크로파지에 LPS와 γ -IFN을 첨가하지 않았을 때의 NO 양은 $8.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$, LPS와 γ -IFN을 첨가하였을 때는 $26.2 \pm 2.4 \mu\text{M}$ 로 NO 생성이 현저히 증가하였다. 더덕추출물을 투여한 마우스의 복강 매크로파지에 LPS와 γ -IFN을 첨가하지 않았을 때의 NO 양은 $4.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$, LPS와 γ -IFN을 첨가하였을 때는 $10.5 \pm 2.4 \mu\text{M}$ 로 현저히 감소하였다(Fig. 4).

이는 더덕추출물이 매크로파지에서 NO 생성을 억제하고 있는 것을 의미한다.

4. 더덕추출물이 사람다형핵세포의 lucigenin 화학발광에 미치는 효과

Human PMN 세포에 더덕추출물을 처리하였을 때 lucigenin 화학발광은 10분 후부터 대조군보다 현저히 증가하였으며, zymosan을 병용처리한 것도 zymosan만 처리한 것에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 5).

이는 더덕추출물이 PMN 세포의 phagocytosis를 증가시키는 것을 의미한다. 상기 2의 결과와 같이 CLE

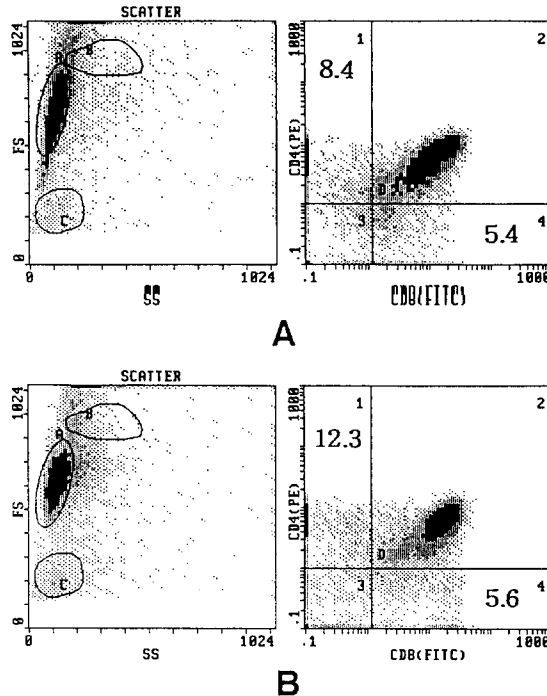


Fig. 3. Effect of CLE on sub-population of thymocytes from LCE-treated mice. CLE(500 mg /kg) was administered orally for 3 days. Two-color analysis were carried out on CLE-treated BALB /c mice thymocytes by flow cytometer(ERxitation: 488 nm, Emission: FITC 525 nm, PE 575 nm) after staining the cells with a mixture of α CD8-FITC and α CD4-PE mAbs. Non-treated(A) control mice and CLE-treated(B) mice thymocytes were labelled with FITC-conjugated α -mouse CD8 and PE-conjugated α -mouse CD4 mAbs. The data represents the mean from 3 experiments.

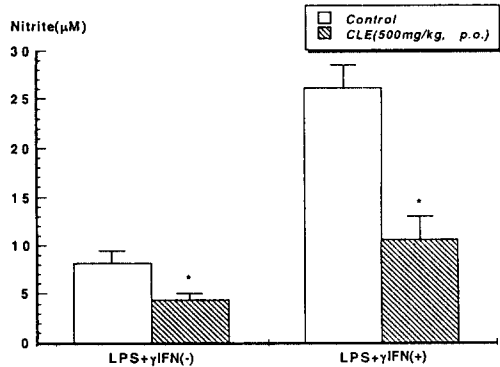


Fig. 4. Effect of CLE on nitric oxide production from peritoneal macrophages of CLE-treated mice. CLE(500 mg/kg) was administered orally for 6 days, and 3% thioglycollate was injected i.p. for 3 days. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPM1640 medium alone(control) or with LPS(1 µg/mg) and γ-IFN(25 units/ml). Each bar represents the mean ± SE from 3 experiments. *: Significantly different from control group(P<0.01). LPS+γIFN(-); Lipopolysaccharide and γ-interferone non-treated group. LPS+γIFN(+); Lipopolysaccharide and γ-interferone treated group.

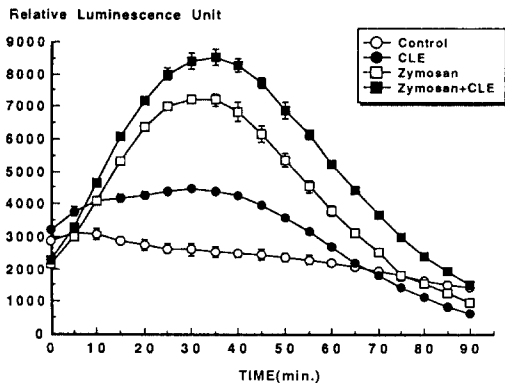


Fig. 5. Effect of CLE on lucigenin chemiluminescence from human polymorphonuclear cells. PMN cells were incubated in DME media containing 10 µg/ml of CLE in the presence and absence of opsonized zymosan (1 mg/ml). The chemiluminescence was measured at 5 min intervals for 90 min. Other procedures were described as detailed in the materials and methods section. Each ber represents the mean ± SE from 3 experiments.

가 T_H 세포를 활성화시켜 γ-IFN 등의 생성이 촉진되어 식세포의 탐식작용을 증강시키는 것으로 추정되나 자

한 메카니즘은 앞으로 더 연구되어야 한다.

요 약

더덕 물추출물이 면역세포에 미치는 영향에 대해 연구한 결과, 더덕 물추출물을 경구투여한 경우 흉선세포의 증식을 촉진하였으나, 흉선세포에 직접 처리한 경우는 그다지 영향을 주지 않았다. 경구투여시 T_H 세포를 활성화하였다. 더덕물추출물은 경구투여시 복강 매크로파지의 NO 생성을 억제하였고, 사람 PMN 세포의 phagocytosis를 증가시켰다. 이 결과는 더덕이 생체내에서 면역작용을 증강시킬 수 있는 것을 시사한다.

참고문헌

1. 辛民教: 原色臨床本草學, 南山堂, 서울, 230(1986).
2. Yang, H. S., Choi, S. S., Han, B. H., Kang, S. S. and Woo, W. S.: Sterols and tripenoids from *Codonopsis lanceolata*. *J. Pharm. Soc. Korea*, 19(3), 209 (1975).
3. Han, B. H., Kang, S. S. and Woo, W. S.: Triterpenoid from *Codonopsis lanceolata*. *J. Pharm. Soc. Korea*, 20(3), 145(1976).
4. Chung, B. S. and Im, D. S.: On the composition of *Codonopsis lanceolata* Benth et Hook, Program the 25th annual convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 26(1976).
5. Chang, Y. K., Kim, S. Y. and Han, B. H.: Chemical studies on the alkaloidal constituents of *Codonopsis lanceolata*. *Yakhak Hoeji*, 30(1), 1(1986).
6. Park, J. Y., Kim, Y. H., Kim, K. S. and Kwag, J.: Volatile flavor components of *Codonopsis lanceolata* Traut.(Benth. et Hook). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32(4), 338(1989).
7. Kim, J. H., Kim, Y. R., Kim, J. J. and Oh, C. H.: Comparative sampling procedures for the volatile flavor components of *Codonopsis lanceolata*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 24(2), 171(1992).
8. Lee, Y. S. and Kim, C. M.: Effect of dietary *Codonopsis lanceolata* on lipid composition in rat serum, 韓國飲食文化研究論叢, 245(1993).
9. Maeng, Y. S. and Park, H. K.: Antioxidant activity of ethanol extract from Dodok(*Codonopsis lanceolata*). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23(3), 311(1991).
10. Wysocki, L. J. and Sato, V. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2844(1978).
11. Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L.: *J. Immunol.*, 120, 1497(1979).
12. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65, 55-63 (1983).
13. Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 129, 23(1990).

14. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A.: Killing of *Plasmodium falciparum* *in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, **59** (9), 3280~3283(1991).
 15. 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).
 16. 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).
-

(1996년 11월 5일 접수)