

Jurkat T 면역세포에서 Phosphoinositides의 가수분해를 증가시키는 약용식물 추출물의 검색

민도식 · 이영한 · 백석환 · 서판길 · 류성호*
포항공과대학교 생명과학과

Screening of the Extracts of Herbal Medicines which Stimulate the Hydrolysis of Phosphoinositides in Jurkat T-lymphocyte Cells

Do Sik MIN, Young Han LEE, Suk Hwan BAEK, Pann Ghil SUH and Sung Ho RYU*
Department of Life Science, Pohang University of Sciences and Technology, Hyoja-Dong, Pohang 790-784, Korea

(Received March 20, 1996; accepted June 9, 1996)

Abstract – Activation of the T lymphocytes results in a variety of early biochemical events ultimately leading to cell proliferation and lymphokine production. Stimulation of the signal transduction cascade in T cells through the T cell receptor coincides with activation of the phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC) pathway. Therefore, we have established a model system to screen immuno-simulator that can increase the hydrolysis of phosphoinositides in human T cell leukemia Jurkat cells. As a result of screening from herbal medicine extract, 4 extracts (Olibanum, Ephedrae Herba, Real Gar, Saussureae Radix) were found to increase the production of inositol phosphates. All the active fraction from the four kinds of extract were eluted in a different retention time on C-18 HPLC and these active fraction also showed difference in cell specificity. And all the active fractions increased DNA synthesis in T cell. Therefore, it is suggested that the active fraction among 4 extracts might contain a compound having different properties one another.

Keywords □ Jurkat T cells, immune stimulator, phospholipase C, herbal medicines

면역세포의 활성화로 인한 T 및 B 임파구 세포들의 증식과 분화는 생명체의 중요한 방어기능인 면역체계 초기조절에 핵심적인 단계이다. 이들 면역기능 조절에 대한 연구는 오래전 부터 많이 진행되어 왔으나 대개 조직 및 세포수준에서 이루어졌다. 그러나 최근에 와서야 세포내의 분자수준에서 밝히고자 하는 많은 시도가 이루어지고 있는 실정이다. 면역을 담당하고 있는 주된세포인 T 임파구의 세포막에 있는 세포 수용체는 항원 표현세포(antigen presenting cells)의 MHC(major histocompatibility complex)를 및 함께 노출된 항원과 결합하여 생성되는 신호를 T 세포내로 전달하는 역할을 함으로써 궁극적으로 T 세포를 활성화 시켜 증식과 분화를 촉진시킨다(Davis와 Bjorkman, 1988; Kourilsky와 Claverie, 1989; Watts, 1988; Bierer 등, 1989; Ledbetter 등, 1988).

최근에 phosphatidylinositol-specific phospholipase C

(PLC)에 의해 매개되는 신호전달이 면역세포들의 초기활성화에 중요한 것으로 밝혀졌다(June 등, 1990; Mustelin 등, 1990; Weiss 등, 1991). PLC는 세포막지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP₂)를 가수분해하여 이차전달물질인 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)를 생성시키는데 그중 IP₃는 세포내 Ca²⁺ 저장소로부터 Ca²⁺를 방출시키고 DAG는 protein kinase C (PKC)를 활성화시킴으로서 세포의 생리적 활성화를 유도한다(Nishizuka 1984; Berridge와 Irving, 1989). 면역세포의 활성화가 계속 진행되면 세포들의 증식과 분화과정에서 각종 cytokine들이 분비되어 지속적인 면역기능의 증폭과 조절을 하게된다. 이와같은 신호전달의 초기과정에 대한 분자단계의 연결과 조절현상들이 밝혀지면서, 천연 및 합성물질들을 대상으로 면역조절 물질을 탐색개발하려는 시도가 진행되고 있다. 특히 성장인자 수용체들의 tyrosine kinase 활성이나 PKC 활성을 대상으로 조절물질들이 탐색선택되었고 이와같은 물질들은 암치료제등으로 개발단계에 있다.

*To whom correspondence should be addressed.

개발된 대부분의 물질들은 모두 각 성장인자나 protein kinase C들의 활성을 억제하여 신호증폭을 막는 효과를 나타내고 있다. 이런 억제물질들중에는 면역세포의 증식을 감소시키는 것으로 보고되고 있는 것도 있다(Buttner 등, 1989).

면역세포 활성화 신호전달의 초기현상에 대한 규명은 극히 최근에 이루어진 연구들로서 아직 이를 대상으로 조절물질의 탐색이나 개발은 보고되지 않고 있다. 본 연구자들은 T 림파구 세포주인 Jurkat 세포를 식물의 lectin으로 자극시키면 PLC- γ 1의 tyrosine 잔기가 인산화되어 활성화됨을 밝힌 바 있으며(김희숙 등, 1993) 또한 이를 모델로 천연물질을 탐색하여 inositol phosphates의 생성을 증가시키는 생약추출물을 선정함으로써 면역활성 증강물질 개발체계의 가능성성을 제시하였다. 한편 오랜동안의 전통적인 연구방법으로 면역조절 효과를 가진 여러가지 천연 또는 합성 peptide들이 알려져 있으며 이들은 주로 박테리아 세포벽의 peptidoglycan, peptide hormone, 미생물의 대사산물 등의 다양한 근원에서 유래된 것이다. 이러한 peptide들은 phagocytosis, 항체생성, cytokine 생성등을 증가시켜 면역을 활성화시키는 것으로 조사되었다. 현재까지 알려진 면역활성 조절 peptide로는 muramyl peptide, lipopolypeptide, bestatin, thymic peptide, leukocyte dialysates, cyclosporin A 등이 주로 선도물질로 사용되어 면역조절 물질개발에 이용되고 있으며 이외에도 immunoglobulin, plasma protein, casein 등으로 부터 유래된 3-9 아미노산 잔기를 갖는 작은 peptide들이 면역조절 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Georgiev, 1990; Bessler 등, 1985; Berthou 등, 1987).

본 연구에서는 이와같은 면역세포 초기활성화 신호를 조절할 수 있는 새로운 물질의 탐색을 시도하였다. 즉 생체세포성 면역기능을 주로 담당하고 있는 T 세포의 활성화의 초기 신호전달이 PLC를 통하여 이루어지고 있음이 연구확립됨에 따라 이를 model system으로, 면역기능에 영향을 미치는 것으로 동의학에 널리 사용되고 있는 생약제를 대상으로 T 세포의 활성화에 대한 검색을 시도하여 PLC 활성을 증가시키는 4가지 약제 추출물을 선별하고 이들에는 4가지 서로 다른 성질의 물질이 존재함을 확인하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 [3 H]myo-inositol은 Amersham사에서, PDGF, phytohemagglutinin(PHA) 및 cell culture에 필요한 배지등은 Gibco-BRL에서, concanavalin A(Con A)는 Sigma사에서 AG 1X-8은 Bio-Rad에서 구입하였고 기타 시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다. 생약제들은 포항시 소재 한약방에서 구입하였다.

생약의 추출

생약 10 g을 증류수 50 ml과 함께 녹즙기로 완전히 갈고 10분간 끓인 후 13,000×g 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 whatman filter paper로 여과하여 생약 추출물로 사용하였다.

세포배양

Human leukemia T 세포인 Jurkat세포들은 10% fetal bovine serum(FBS), human leukemia B 세포인 Daudi 세포들은 20% fetal bovine serum(FBS)이 각각 함유된 RPMI 1640배양액을 사용하였고, mouse 섬유아세포인 NIH 3T3 세포들은 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM 배양액을 사용하였다. 배양액에는 50 U/ml penicilline 및 50 U/ml streptomycine을 첨가하였으며 95% 습도/5% CO₂에서 배양하였다. 세포농도는 5×10⁵ cells/ml로 건강하게 배양된 세포를 수확하여 실험에 사용하였다.

Inositol phosphates의 측정

Inositol phosphate의 측정은 Downes 등 (1986)의 방법을 이용하였다. 원심분리에 의해 모은 Jurkat 세포들을 inositol-free RPMI 1640 배양액으로 씻은 후 0.5% dialyzed FBS가 함유된 동일 배양액으로 2.5×10⁶ cells/ml되게 다시 현탁시켜 [3 H]myo-inositol(2 mCi/ml)을 함유한 배양액으로 24시간동안 배양하여 세포막내의 phospholipid에 [3 H]myo-inositol을 표지시켰다. 24시간 배양후 무혈청 배양액으로 2회 세척하고 inositol phosphate phosphatase의 저해제인 LiCl을 함유한 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM LiCl, 1 mg/ml bovine serum albumin)으로 세포농도가 2.5×10⁶ cells/100 μ l되게 현탁하여 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 현탁한 세포를 microcentrifuge tube에 100 μ l씩 분주하여 mitogen 및 생약 추출물을 처리하였다. 30분 후에 cold perchloric acid를 최종 5% 되게끔 처리함으로써 세포로부터 inositol phosphates들을 1 시간 동안 추출시켰다. 산에 가용성인 분획들을 증류수로 희석하고 inositol phosphates들을 분리하기 위하여 Dowex AG 1X-8 음이온 교환수지 column에 통과시켰다. 60 mM ammonium formate/5 mM sodium tetraborate 2 ml을 4회 세척한 후 1 M ammonium formate/0.1 M formic acid 2 ml로 column에 결합되어 있는 총 [3 H] inositol phosphates(IPs)을 용출시켰고, 방사능 양은 liquid scintillation counter(Hewlett Packard)로 측정하였다.

C-18 reverse HPLC에 의한 활성분획 분리

생약추출물을 0.45 μ l membrane filter로 여과 후 Sep-pak C-18 cartridge로 통과시켜 methanol로 용출시키고 달린 후 증류수에 현탁시켰다. 이 시료를 0.05% trifluoro acetic acid가 함유된 증류수로 미리 평형화 시킨 preparative C-18 reverse phase HPLC column(Vydac, 21.5×250 mm)에 주입하여 2 ml/min으로 흘려보내고 용출은 0.05% trifluoro a-

cetic acid가 함유된 acetonitril gradient로 행해졌다. 0에서 15%까지는 5분동안, 15%에서 20%까지는 35분동안, 50%에서 100%까지는 10분동안 gradient를 행하였으며 각 peak fraction을 받고 모든 분획에 존재하는 용매를 말린 후 다시 증류수에 녹여서 시료로 사용하였다.

DNA합성의 측정

세포를 96 well plate에서 무혈청 배지로 12시간 키운 후 시료를 처리하고 계속해서 무혈청 배지에서 12시간 더 키운 후 0.4 μ Ci/ml의 [3 H]thymidine으로 8시간 pulse labelling을 하고 세포를 membrane filter가 부착된 96 well plate로 옮겨 세포를 lysis시킨다. DNA에 incorporation 되지 않은 [3 H]thymidine을 제거시키기 위하여 증류수로 5회 반복하여 씻은 후 DNA가 결합되어 있는 membrane filter를 punch out하여 [3 H]의 radioactivity를 측정함으로써 thymidine incorporation 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

T 세포에서 생약에 의한 PLC 활성화 검색

T 세포 활성화의 초기 신호전달이 PLC를 통하여 이루어지고 있다는 사실을 근거로 하여, 동의학에 널리 사용되어지고 있는 생약 45종을 대상으로, 물로 추출하여 Jurkat T 세포에 처리함으로써 PLC 활성을 검색하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 4종의 약제 추출물, 즉 유향(Olibanum), 마황(Ephedrae Herba), 옹황(Real Gar), 목향(Saussureae Radix)은 T 세포의 PLC 매개 신호 전달기작을 활성화하는 효과가 높게 관찰 되었으며, 일부 생약은(길경, Platycodi Radix; 시호, Bupleuri Radix; 하고초, Prumellae Spica) 세포 치사성 효과를 보여주었다.

HPLC에 의한 생약종의 PLC 활성 물질분획

검색 후 선별된 4종의 생약 추출물에 함유된 PLC 활성 물질을 분리하기 위해, 생약 추출물을 C-18 HPLC를 이용하여 분획하였다. Fig.1은 210 nm 에서 흡광하는 profile을 나타내고 있으며 모든 분획을 말려 소량의 증류수에 현탁시켜 [3 H]myo-inositol로 표지한 Jurkat T면역 세포에 처리한 결과 흡광 peak과 PLC 활성의 지표인 총 inositol phosphates의 생성양과 일치되는 활성분획(↓)을 얻을 수 있었다. a는 유향으로부터, b는 마황으로부터, c는 목향으로부터, d는 옹황으로부터 얻어진 활성분획을 각각 보여주고 있다. 이중 a와 b는 같은 용출시간에서 c와 d는 각각 다른 용출시간에서 용출되었다. 따라서 적어도 c와 d는 a 및 b와는 다른 물질이라고 판단되었다. HPLC에 injection한 시료가 나타내는 PLC 활성의 1/10에 해당하는 활성물질들을 건조 후 소량의 증류수에 녹여 다음 실험에 사용하였다.

PLC 활성물질의 세포특이성

HPLC에 의해 분리된 PLC 활성분획의 세포특이성을 조

Table 1. Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by hot water extract of Korean traditional medicines in Jurkat T lymphocyte cell

Samples	PLC stimulation activity	Cytolytic activity
Platycodi Radix	-	+
Aloe	-	-
Hoelen	-	-
Bupleuri Radix	-	+
Dioscoreae Rhizoma	-	-
Moutan Cortex Radicis	-	-
Alkebiae Caulis	-	-
Crataegi Fructus	-	-
Zizyphi Spinosi Semen	-	-
Menthae herba	-	-
Aurantii Nobilis Pericarpium	-	-
Real Gar	+	-
Paeoniae Radix	-	-
Sanguisorbae Radix	-	-
Gastrodiae Rhizoma	-	-
Acori Graminei Rhizoma	-	-
Cimicifugae Rhizoma	-	-
Schizonepetae Herba	-	-
Prunellae Spica	-	+
Anemarrhenae Rhizoma	-	-
Saussureae Radix	+	-
Olibanum	+	-
Astragali Radix	-	-
Phellodendri Cortex	-	-
Picrasmae Lignum	-	-
Ephedrae Herba	+	-
Theae Folium	-	-
Aconiti Tuber	-	-
Chelidoni Herba	-	-
Angelicae Gigantis Radix	-	-
Atractylodes Rhizoma	-	-
Zedoary	-	-
Croci Stigma	-	-
Nupharis Rhizoma	-	-
Euonymi Lignum Suberatum	-	-
Perisicae Semen	-	-
Mori Cortex Radicis	-	-
Evodiae Fructus	-	-
Lycii Fructus	-	-
Rehmanniae Radix	-	-
Notoginseng Radix	-	-
Ginseng Radix Alba	-	-
Curcumae Rhizoma	-	-
Schizandrae Fructus	-	-
Plantaginis Semen	-	-

사하기 위하여 [3 H] myo-inositol로 표지한 Jurkat T 세포와 Daudi B세포 그리고 NIH 3T3 섬유아 세포에 활성분획을 처리하여 생성된 inositol phosphates를 정량하였다(Fig. 2). Jurkat T 세포에 4종류의 PLC 활성분획(a, b, c, d)을 처리

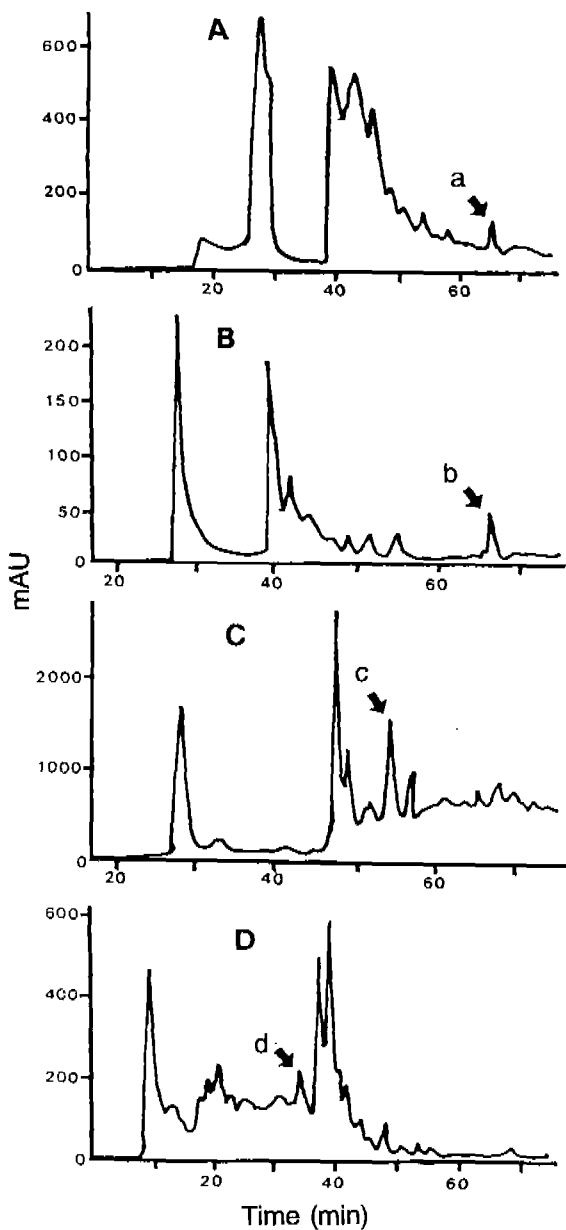


Fig. 1. C-18 reverse phase HPLC of the extracts from Olibanum (A), Ephedrae Herba (B), Real Gar (C), Saussureae Radix (D). Distilled water fraction derived from four herbal medicines was separated by a HPLC on a C18 column. All fractions which were dried and dissolved in distilled water, were exposed to Jurkat T cells and then activities (→) that stimulated hydrolysis of PI were measured. A small capital represents active peak fraction from each extract.

시, 모두 inositol phosphates의 양을 증가시켰다. Daudi B 세포에 처리했을 때에는 a만이 inositol phosphates의 양을 증가시켰으며 그 외 다른 활성분획은 아무런 영향을 미치지 않았다. 또한 4종류의 활성분획을 NIH 3T3 세포에 처리시, 어떤 분획도 inositol phosphates형성에 영향을 주지 않았다. 각 세포들에 각각의 mitogen으로 알려진 물질들, 즉

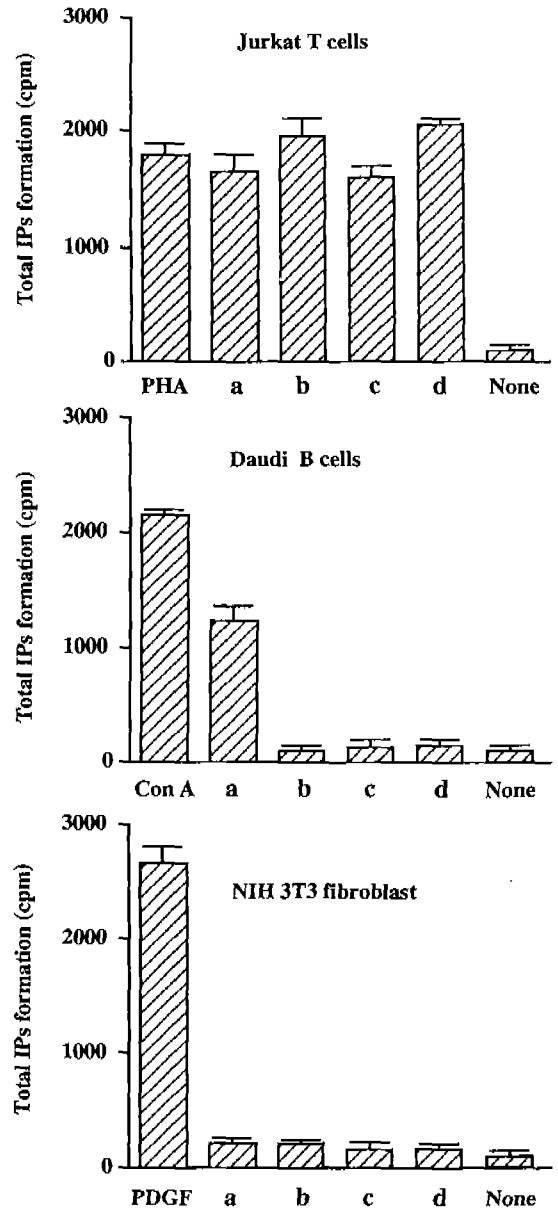


Fig. 2. Cell specificity of active components from herbal medicines. The active fractions separated by a HPLC were treated in Jurkat T cells, Daudi B cells, and NIH 3T3 fibroblasts. Then, total inositol phosphates (IPs) formation was measured. a, Olibanum; b, Ephedrae Herba; c, Real Gar; d, Saussureae Radix; None, not treated; PHA (10 µg/ml), Con A (10 µg/ml), PDGF (50 ng/ml).

phytohemagglutinin A, Con A 그리고 PDGF을 처리하였을 때 보고된 바와 같은 정도의 inositol phosphate 형성이 관찰되었다. 이상의 결과로부터, 4가지 생약 추출물로부터 분리한 PLC활성분획은 면역세포가 아닌 섬유아세포에서는 아무런 영향을 미치지 않았고, a는 T 세포와 B 세포에 모두 작용하였고, b, c, 및 d는 T 세포에서만 특이적으로 작용하여 inositol phosphates형성을 증가시키는 물질을 함유하

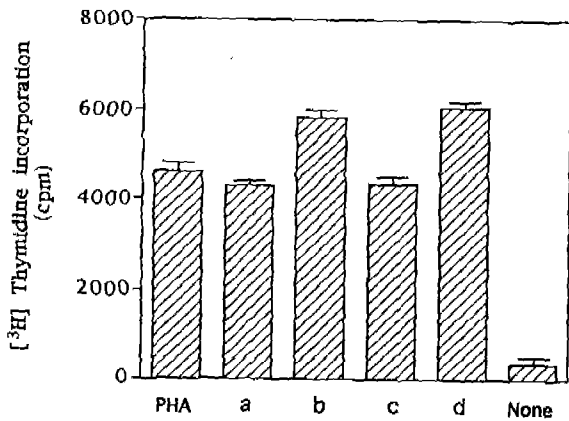


Fig. 3. Stimulation by herbal medicines of [³H]thymidine incorporation into Jurkat T cells. Jurkat cells were subjected to the active fractions and PHA (10 µg/ml). Then, cells were puls-labelled with 0.4 Ci/ml of [³H]thymidine for 8 h and after lysis of cells, radioactivity were measured in a liquid scintillation. a, Olibanum; b, Ephedrae Herba; c, Real Gar; d, Saussureae Radix; None, not treated.

고 있는 것으로 여겨진다. 따라서 HPLC에서의 용출시간과 세포에 따른 작용효과를 고려할때, a, b, c, d는 서로 다른 활성 물질로 추측되어진다. 그렇지만 각 물질의 정체를 정확히 알기 위해서는 순수 분리와 구조 동정이 필요하다.

T 세포에서 PLC 활성물질의 DNA 합성에 미치는 영향

T세포의 mitogen으로 알려진 PHA와 C-18 HPLC에 의해 분리된 4종류의 PLC 활성분획을 Jurkat T 세포에 처리하여 DNA 합성에 미치는 영향을 조사한 결과, 이들 모두 DNA 합성을 증가시켰다(Fig. 3). 한편 Daudi B 세포에 처리하였을 때에는 a만이 DNA 합성을 증가시켰으며 다른 생약제의 활성분획은 아무런 영향을 미치지 않았다(data not shown). 이는 Jurkat 세포와 Daudi 세포에서 inositol phosphates의 생성을 증가시키는 양상과 일치하는 것으로 나타났다.

결론

PLC 활성화를 모델로 하여 T 세포 활성화 물질검색을 위해 한방이나 민간요법에서 널리 사용되고 있는 45종의 약재추출물에 대하여 PLC활성을 검색한 결과 4가지 생약(유향, 마황, 목향, 옹황)이 가장 효과가 있었으며, 이들의 유효성분을 HPLC로 분리한 활성분획은 용출시간과 세포 특이성을 고려해 볼때 서로 다른 물질인 것으로 사료되었으며 이들은 모두 Jurkat, T 세포에서 DNA 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 세포 특이성 있는 PLC 활성과 DNA 합성을 증가시키는 물질들의 선별로, 이들 물질의 구조규명과 함께 면역 조절 선도물질의 제공이 가능해졌다.

감사의 말씀

본 연구는 부분적으로 과기처 특정연구개발사업(G7)과 포항공대 기초과학연구소의 지원으로 이루어졌으며 이에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- 김희숙, 문경호, 이영한, 윤두희, 류성호, 서판길. (1993). T 세포에서 lectin에 의한 phospholipase C-γ1 tyrosine 잔기 인산화를 통한 phospholipase C의 활성화. *Korean Biochem. J.* **26**, 704-711
- Berridge, M. J. and Irving, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205
- Berthou, J., Lifchitz, A., Delettre, J. and Jolles, D. (1987). Immunostimulating properties and three dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett.* **218**, 55-60
- Bessler, W. G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmuller, K-H. and Jung, G. (1985). Synthetic lipopeptide analogues of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.* **135**, 1900-1906
- Buttner, N., Siegelbaum, S. A. and Volterra, A. (1989). Direct modulation of Aplysia S-K⁺ channels by a 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid. *Nature* **342**, 553-558
- Bierer, B. E., Sleckman, B. P., Ratnofsky, S. E. and Burakoff, S. J. (1988). The biological role of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 579-588
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-399
- Downes, C. P., Hawkin, P. T., Irvine, R. F. (1986) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-trisphosphate in agonist-stimulated parotid gland. *Biochem. J.* **238**, 501-506
- Georgiev, V. S. (1990). Immunomodulatory activity of small peptides. *Trend. Pharmacol. Sci.* **11**, 373-379
- June, C. H., Fletcher, M. C. Ledbetter, J. A. and Samelson, L. E. (1990). Increase in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* **144**, 1591-1599.
- Kourilsky, P. and Claverie, J. M. (1988). MHC-antigen interaction : what does the T cell receptor see?. *Adv. Immunol.* **45**, 107-114
- Ledbetter, J. A., Tonks, N. K., Fishcer, E. H. and Clard, E. A. (1988). CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8628-8635
- Margolis, B., Zilberstein, A., Franks, C., Felder, S., Kremer, S., Ullrich, A., Rhee, S. G., Skorecki, K. and Schlessinger, J. (1990). Effect of phospholipase C γ overexpression on PDGF-induced second messengers and mitogenesis. *Science* **248**, 607-610
- Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N., and Altman, A. (1990). T cell antigen receptor-mediated activation of phos-

- pholipase C requires Tyrosine phosphorylation. *Science* **247**, 1584-1589
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**, 693-699
- Watts, T. H. (1988). T cell activation by performed, long-lived Ia-peptide complexes. Quantitative aspects. *J. Immunol.* **141**, 3708-3714
- Weiss, A., Koretxky, G., Schatzman, R. C., and Kadlecek. T. (1991). Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**. 5484-5494