

녹용 에탄올 분획이 생쥐의 T-Lymphocyte에 미치는 영향

전길자*, 서정숙, 오찬호¹, 염정열², 은재순²

이화여자대학교 화학과, ¹우석대학교 자연과학대학, ²약학대학

Effect of Ethyl Alcohol Fraction of *Cervus nippon* on Mouse T-Lymphocyte

Kil-Ja Jeon*, Jeong-Sook Suh, Chan-Ho Oh¹, Jung-Yul Yum² and Jae-Soon Eun²

Department of Chemistry, Ewha Woman's University, Seoul 120-750 and ¹Department of Biotechnology and ²College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

Abstract - In this study, the effect of 70% ethyl alcohol fraction of *Cervus nippon* (CN-E) on mouse T-lymphocyte was investigated *in vivo*. The administration of CN-E(100 mg/kg) enhanced the proliferation of thymocytes, the population of CD4⁺ CD8⁻ single-positive cells and the production of interferon- γ in thymocytes and splenocytes. The administration of CN-E did not induce DNA fragmentation and reduce mitochondrial transmembrane potential in thymocytes. These results indicate that the CN-E contains a stimulative component on the proliferation of thymocytes, the population of T_H cells and the production of interferon- γ in T-lymphocytes.

Key words - *Cervus nippon*; thymocyte; splenocyte; CD4; CD8; DNA fragmentation; mitochondrial transmembrane potential; IFN- γ ; IL-2.

녹용(*Cervus nippon*)은 한방에서 강정, 강장의 목적으로 사용되어 왔던 약재로서, 성장 촉진 작용,¹⁾ 콜레스테롤 저하작용²⁾ 및 조혈 작용^{3,4)} 등이 있음이 보고되었다. 특히 한방에서 보약의 대표적인 약재로 사용되고 있는 녹용의 주작용은 면역복합체 억제작용,⁵⁾ NK 세포의 활성 증강작용,⁶⁾ 세포성 및 체액성 면역 증강작용⁷⁾ 및 macrophage의 활성화 작용⁸⁾ 등 생체의 면역계를 증강시키는 작용임을 알 수 있다. 그러나 녹용에 함유된 면역증강 성분 및 작용기전에 대해서는 아직 명확히 규명되지 않고 있다. 최근 Kim^{9,10)} 등은 녹용을 hexane, chloroform 및 70% ethyl alcohol로 계통분획하여 실험한 결과 70% ethyl alcohol fraction에 조혈작용이 있음을 보고하였다. 본 연구자들도 녹용의 면역증강 성

분을 연구하는 과정에서 70% ethyl alcohol fraction에 면역 조절작용이 있음을 예비실험을 통하여 일부 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 녹용의 70% ethyl alcohol fraction이 생쥐의 T-lymphocyte에 미치는 영향을 관찰하고자, BALB/c계 생쥐에 녹용 70% ethyl alcohol fraction을 일주일간 경구투여하고 변화된 thymocyte와 splenocyte의 proliferation과 subpopulation, 생성되는 interferon- γ 및 interleukin-2의 양, thymocyte의 apoptosis에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 녹용은 매화록(*Cervus nippon*)을 경동시장 건재상에서 구입하여 녹용(175 g)을 실온에서 hexane, chloroform, 70%

*교신저자 : Fax 02-360-2384

ethyl alcohol로 계통분화하여 70% ethyl alcohol fraction(이하 CN-E라 함)을 감압농축한 후 동결 건조하여 분말(9.1 g)을 얻어 실험에 사용하였다.

실험동물 - 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 18 ± 2 g의 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, light/dark 12시간의 사육 조건에서 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 교형 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기구 - 실험에 사용한 시약은 penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS, 026:B6), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), concanavalin A(Con A)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co., (PE)-CD4 monoclonal antibody, (FITC) α -CD8 monoclonal antibody는 Molecular probes Co., mouse interferon- γ immunoassay kit, mouse interleukin-2 immunoassay kit는 R&D Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 세포 배양 용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용 기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96-well, 24-well, Costar), microplate reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision Scientific Co.), flow cytometer(Coulter EPICS-XL), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus(Labconco) 등을 사용하였다.

Thymocytes 및 splenocytes의 분리 - 1군을 5마리로 하여 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 CN-E 100 mg/kg를 생쥐에 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후, 8일째 생쥐의 흉선과 비장을 적출하여 thymocytes 및 splenocytes를 분리하였다. 세포 분리는 Wysocki¹¹⁾ 및 Mizel 등¹²⁾의 방법을 이용하였다. 즉 적출한 흉선 및 비장을 각각 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 분리한 thymocytes와 splenocytes의 생존율 및 총세포수를 trypan blue exclusion법으로 측정하였다.

Thymocytes 및 splenocytes의 cell viability

측정 - 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 48시간 배양하고 세포생존율을 MTT법^{13,14)}으로 측정하였다. 세포부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.2×10^6 cells/ml 농도로 접종하여 thymocytes는 concanavalin A(Con A) 1 $\mu\text{g/ml}$ 를, splenocytes는 lipopolysaccharide(LPS) 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37°C 의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한다. 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료시 0.01 N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl 를 각 well에 첨가하고 차광 상태에서 18시간 방치한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

Thymocytes 및 splenocytes의 아군집 측정 - 분리한 thymocytes 및 splenocytes 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1×10^6 cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes는 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로, splenocytes는 PE-anti B220/FITC-anti Thy1 monoclonal antibody로 이중염색하여 4°C 에서 반응시킨 다음, flow cytometer(excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 아군집을 측정하였다.¹⁵⁾

Interferon- γ 및 Interleukin-2의 측정 - 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 2×10^6 cells/ml 농도로 조제하여 96 well plate에 200 μl 씩 분주한 후 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500 rpm, 5분, 4°C)한 다음 상등액 50 μl 를 취하여 mouse interferon- γ (mIFN- γ)immunoassay kit 및 mouse interleukin-2(mIL-2) immunoassay kit를 이용하여 450 nm에서 microplate reader로 측정하였다.

Thymocytes의 apoptosis 측정 - 분리한 thymocytes에 PI buffer(0.1% Na-Citrate+0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 $\mu\text{g/ml}$) 20 μl 를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 관찰하였다.¹⁶⁾

Thymocytes의 mitochondrial transmembrane potential 측정 - 분리한 thymocytes를 1×10^6

cells/well이 되도록 세포수를 조정 한 후 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC₆)를 최종농도가 40 nM이 되도록 PBS에 희석해서 염색하고 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm, emission: 525 nm)로 mitochondrial transmembrane potential을 측정하였으며, 이때 negative control로는 uncoupling agent로서 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone(mCICCP, 50 µM)를 가하여 측정하였다.¹⁷⁾

통계처리-모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계 처리는 student's t-test를 실시하여 P<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

Thymocytes 및 splenocytes의 cell viability에 미치는 효과-Thymocytes에서 con A를 처리한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, con A를 처리하지 아니한 대조군의 세포생존율은 72.9±1.5%로 감소하였으나, CN-E 투여군은 con A를 처리하거나, 처리하지 않았을 때 대조군에 비해 세포생존율은 모두 유의성있게 증가하였다. Splenocytes에서 LPS를 처리한 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하지 아니한 대조군의 세포생존율은 92.3±1.6%로 감소하였으며, CN-E 투여군은 LPS를 처리하거나 처리하지 않았을 때 대조군에 비해 세포생존율이 감소하였다(Table I). 이는 CN-E가 흉선세포의 증식을 촉진하는 작용이 있음을 의미하는 것이다.

Thymocytes 및 splenocytes의 아군집에 미치는 효과-생체에 있어서 면역작용을 가지는 면역세포들은 종류가 다양하지만, 그 중에서 가장 중심적인 역할을 하는 세포는 T 임파구로 알려져 있다. T 세포는 골수에서 생성되어 흉선을 거치는 동안 분화를 거듭하면서 T_H 및 T_C/T_S등의 각 subtype으로 나누어지는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 그 중에서도 T_H 세포는 생체 면역 기능을 관장하는 중심 세포로서 각종 cytokine을 생성하고, 특히 macrophage의 활성화, 식세포의 탐식 기능 증진 및 B 세포로부터의 항체 생성을 촉진시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ Thymocytes의 subpopulation은 대조군에서 CD4⁺CD8⁻(helper T) 세포는 11.7±0.5%, CD4⁻CD8⁺(cytotoxic T) 세포는 3.3±0.2%이었으며, CN-E 투여시 thymocytes의 CD4⁺CD8⁻ 세포는 대조군에 비해 증가하였으나 CD4⁻CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 차이가 없었다.

Splenocytes의 subpopulation은 대조군에서 B220⁺ 세포는 23.6±1.5%, Thy-1⁺ 세포는 9.3±1.6%이었으며, CN-E 투여시 B220⁺ 세포는 대조군과 차이가 없었으나, Thy-1⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였다. 또한 대조군의 splenic T-lymphocyte의 CD4⁺CD8⁻ 세포는 12.0±0.3%, CD4⁻CD8⁺ 세포는 3.1±0.1%이었다. CN-E 투여시 CD4⁺CD8⁻ 세포는 증가하였으나, CD4⁻CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다(Table II). 이는 CN-E가 thymocytes의 helper T 세포의 population을 증가시키고, splenocytes의 T lymphocytes 중 helper T 세포의 population을 증가시켜 면역조절작용을 가지고 있음을 의미하는 것

Table I. The proliferation of thymocytes and splenocytes in 70% EtOH fraction of *Cervus nippon*(CN-E) administered mice

Samples	Cell viability(%)			
	Thymocytes		Splenocytes	
	Treatment of Con A	Non-treatment of Con A	Treatment of LPS	Non-treatment of LPS
Control	100.0±1.5	72.9±1.5	100.0±1.7	92.3±1.6
CN-E	134.2±2.4**	102.8±2.1**	91.5±2.0*	83.6±1.5*

CN-E (100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days in BALB/c mice. The cells(1×10⁶ cells/well) were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader.

The data represents the mean±SE of 5 mice.

*, ** Significantly different from control group(*p<0.01, **p<0.001).

Table II. The subpopulation of thymocytes and splenocytes in CN-E administered mice

Samples	Thymocytes(%)			Splenocytes(%)		
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	B220 ⁺	Thy-1 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺
Control	11.7±0.5	3.3±0.2	23.6±1.5	9.3±1.6	12.0±0.3	3.1±0.1
CN-E	15.4±0.7*	3.5±0.3	23.2±1.1	14.1±0.7*	16.2±0.6*	4.1±0.3

CN-E (100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days in BALB/c mice, and then thymocytes and splenocytes were separated. The subpopulation of thymocytes and splenocytes were measured with a flow cytometer after staining with CD4/PE, CD8/FITC, B220/PE and Thy-1/FITC mAbs. Other procedures were described in detail in the Materials and Method section.

The data represents the mean±SE of 5 mice.

* Significantly different from control group(p<0.001).

Table III. Interferon- γ and interleukin-2 in thymocytes and splenocytes of CN-E administered mice

Samples	mIFN- γ (pg/mL)		mIL-2(pg/mL)	
	Thymocytes	Splenocytes	Thymocytes	Splenocytes
Control	39.7±3.3	64.6±4.5	51.8±4.5	46.7±2.8
CN-E	76.5±4.4*	117.7±5.3*	49.7±3.0	42.3±3.2

CN-E(100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then mice thymocytes and splenocytes were separated. The cells(4×10^5 cells/well) were cultured for 48 h, in CO₂ incubator. mIFN- γ and mIL-2 were determined with ELISA kit.

The data represents the mean±SE of 5 mice.

* Significantly different from control group(p<0.01).

이다.

Interferon- γ 및 Interleukin-2 양에 미치는 효과-T_H 임파구는 T_{H1}과 T_{H2}의 2개의 아군으로 구분되며, T_{H1} 임파구는 IL-2 및 IFN- γ 를 분비하며, T_{H2} 임파구에서는 IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13 등을 분비한다. 분비된 cytokines의 주된 작용을 살펴 보면 IL-2는 NK cell을 활성화하며, IFN- γ 는 macrophage의 phagocytes를 촉진한다. 또한 IL-4는 IgE antibody의 생성을, IL-5는 eosinophils를 활성화한다. CN-E 투여시 macrophage의 phagocytic activity가 증가되었다는 본 연구자들의 연구 결과를 토대로,²⁰⁾ 본 실험에서는 CN-E를 투여하고 T_{H1} 세포에서 분비되는 IFN- γ 와 IL-2를 측정 한 결과, CN-E 투여시 IFN- γ 는 thymocytes와 splenocytes에서 모두 증가하였으나, IL-2는 대조군과 별 차이가 없었다(Table III). 이는 CN-E 투여에 의해 T_H 임파구 중 T_{H1} 아군이 증가하고, 여기에서 분비되는 IFN- γ 에 의해 macrophage의 phagocytic activity가 증가된 것을 확인하여 주는 결과라 할 수 있으나, T_{H2} 아군에 대해서는 추후 연구 할 예정이다.

Thymocytes의 apoptosis에 미치는 효과-흉선은

미성숙한 T 임파구의 증식과 분화를 담당하고 있는 중요한 면역장기의 하나로 골수에서 생성된 hematopoietic stem cell이 유입되어 하루에 5,000만개 이상의 세포가 생성되며, 이 중에서 95% 이상의 세포는 apoptosis에 의해 제거되고 단지 1~2%의 세포만이 더 분열해서 성숙한 T 세포(CD4⁺CD8⁻ 또는 CD4⁻CD8⁺ single positive cell)가 되어 흉선으로부터 방출된다. 한편, 미성숙 T 세포(CD4⁻CD8⁻ or CD4⁺CD8⁺)는 apoptosis에 의해 배제되며, 이때 Fas 유전자의 발현이 중요하다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 약물을 투여하지 않은 대조군의 thymocytes의 DNA fragmentation은 8.8±0.3%이었으며, CN-E 투여시 thymocytes의 DNA fragmentation은 8.3±0.1로 대조군과 비교하여 별 차이가 없었다(Table IV). 이는 CN-E가 T_H 세포의 population을 증가시켰다는 앞의 결과와 비교할 때, CN-E가 미성숙 T 세포의 apoptosis 보다는 T 세포의 활성화에 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

Thymocytes의 mitochondrial transmembrane potential에 미치는 효과-DNA fragmentation에 의한 apoptotic cell death가 유도될 때는 선행 단계로 mitochondrial transmembrane poten-

Table IV. The DNA fragmentation and mitochondrial transmembrane potential(MTP) in thymocytes of CN-E administered mice

Samples	DNA fragmentation(%)	MTP(%)
Control	8.8±0.3	86.1±0.5
CN-E	8.3±0.1	84.7±1.0

CN-E(100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then mice thymocytes were separated. DNA fragmentation was analyzed by flow cytometry staining with propidium iodide, and mitochondrial transmembrane potential was analyzed by flow cytometry staining with DiOC₆. Other procedures were described as detailed in the Materials and Methods section. The data represents the mean±SE of 5 mice.

tial이 감소되는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ CN-E 투여 시 thymocytes의 mitochondrial transmembrane potential은 대조군과 별 차이가 없었다 (Table IV). 이는 CN-E가 thymocytes 분화 단계의 초기에도 apoptosis를 유도하지 않고 있음을 의미하는 것이다.

결 론

녹용 70% ethyl alcohol 분획(CN-E)에는 thymocytes의 세포생존율, thymocytes와 splenocytes 중 helper T 세포의 population 및 IFN- γ 의 생성을 증가시키는 성분이 함유되어 있으며, 현재 CN-E에 함유된 T-lymphocyte 활성 성분을 분리 정제하고 있는 중이다.

사 사

본 연구는 1997년도 한국학술진흥재단 대학부설 연구소과제 연구비의 일부에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. Wang, B. X., Zhao, X. H., Qi, S. B., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. (1988) Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem. Pharm. Bull.* 36(7): 2587-2592.
2. Fennessy, P. F. (1991) Velvet antler: the production and pharmacology. *Proc. of a Deer Course for Veterinarians* 8: 169-180.
3. Kim, G. H. and Park, S. W. (1982) The effect of deer horn on the hematopoietic action. *Kor. Biochem. J.* 15(2): 152-157.
4. Chen, J. Y. P. (1973) Chinese health food and herbtonics. *Am. J. Chin. Med.* 1: 225-247.
5. Ko, B. H. and Song, I. B. (1986) An experimental study on the effects of deer horn, *Rehmannia glutiosa*, *Panax ginseng* and *Acanthopanax sessiliflorum* on immune response & NK cell activity in mice. *J. K.O.M.S.* 7(2): 157-173.
6. 趙全成, 孫曉波, 永井隆之, 松本司, 清原寬章, 丁宗鐵, 山田陽城 (1990) 鹿茸의 免疫複合體除去能促進活性と作用物質. *和漢醫藥學會誌* 7(3): 544-545.
7. Liu, X. L. (1984) Twelve cases of aplastic anemia treated mainly by ready made chinese. *Chung I Tsa Chin.* 25(10): 759-760.
8. Du, Y. T. (1981) Effects of injection of gelatin from the horn of cervus nippon Temminck on the phagocytosis of macrophages in patients with breast cancer. *Chung I Tsa Chin.* 22(3): 36-37.
9. Kim, S. H. and Kim, M. J. (1993) Biological effects of Deer Antler extracts on hematopoietic system. *Korean J. BRM.* 3(1): 23-30.
10. Kim, M. J., Yeum, N. M., Choi, M. K. and Kim, S. H. (1994) The effects of GM-CSF, SCF and Deer Antler extracts on the mouse hematopoietic cells. *Korean J. BRM.* 4(1): 47-53.
11. Wysocki, L. J. and Sato, V. L. (1978) Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2844.
12. Mizel, S. B., Openheim J. J. and Rosensteich D. L. (1979): Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 120: 1497.
13. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
14. Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. (1990) A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. Methods* 129: 23-28.
15. Suda, T. and Nagata, S. (1994) Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879.

16. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, G. and Riccardi, C. A. (1991) Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.
17. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X. and Kroemer, G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181: 1661-1672.
18. Miceli, M. C. and Parnes, J. R. (1993) The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology* 53: 59-122.
19. Abbas, A. K, Lichtman, A. H. and Poper, J. S. (1994) Cellular and molecular immunology. 2nd edition, 208, 241. W. B. Saunders Co., U.S.A.
20. Eun, J. S., Oh, C. H., Suh, J. S. and Jeon, K. J. (1998) Phagocytic activity of ethyl alcohol fraction of Deer Antler in murine peritoneal macrophage. 265. The 47th annual convention of the Pharmaceutical Society of Korea.

(1998년 8월 18일 접수)