

## 자근에 함유된 복강 마크로파지의 탐식능 활성분획

은재순\*, 전 훈, 소준노<sup>1</sup>

우석대학교 약학대학, <sup>1</sup>자연과학대학

### An Active Fraction on Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophage in Lithospermi Radix

Jae-Soon Eun\*, Hoon Jeon and June-No So<sup>1</sup>

College of Pharmacy and <sup>1</sup>College of Natural Science, Woosuk University,  
Samrye 565-701, Korea

**Abstract** -The phagocytic activity of murine peritoneal macrophages was determined by lucigenin chemiluminescence with luminometer and engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles. 70% MeOH extract of Lithospermi Radix was fractionated successively with hexane, methylene chloride, *n*-BuOH and water. The water fraction (m.w. 500 to 1,000) enhanced the lucigenin chemiluminescence and the engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages. The water fraction suppressed the production of nitric oxide in the macrophages. These results suggest that an active fraction of phagocytosis in Lithospermi Radix is the water fraction and the molecular weight is 500 to 1,000.

**Key words** -Lithospermi Radix; phagocytosis; macrophage; lucigenin chemiluminescence; fluorescein-conjugated *E. coli*; nitric oxide.

자근(Lithospermi Radix)의 주성분은 naphthoquinone계의 색소인 shikonin 및 acetylshikonin의 동족체, lithospermi acid, 시안배당체인 lithospermoside, allantoin, polysaccharide, furylhydroquinone 등 다양한 성분이 밝혀졌으며,<sup>1)</sup> 약리작용으로는 항염작용,<sup>2)</sup> 항암작용,<sup>3)</sup> 항바이러스작용,<sup>4,5)</sup> 육아종형성 촉진작용,<sup>6)</sup> TNF- $\alpha$  생성 촉진작용<sup>7)</sup> 및 면역조절작용<sup>8)</sup> 등이 보고되었다.

본 연구자들은 macrophage의 탐식작용을 증강시키는 성분을 탐색하고자, macrophage의 탐식능을 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하는 방법으로, 수종 생약에 대해 검색하던 중 자근 불추출물이 macrophage의 탐식능을 증가시킬을 확인하

고, 자근에 함유된 macrophage의 탐식능 촉진 성분을 분리하고자, hexane, methylene chloride, *n*-BuOH 및 물로 계통분획하여 탐식능을 측정할 결과, 물 분획에서 macrophage의 탐식능이 현저히 증가됨을 발견하고, 물분획을 molecularporous membrane tubing(m.w. 1000 및 500)을 이용하여 분리하고 탐식능을 측정하였다.

#### 재료 및 방법

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

\*교신저자 : Fax 0652-290-1567

**시약 및 기구**-DME(without phenol red), RPMI 1640, lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* 026:B6),  $\gamma$ -interferon(Human  $\gamma$ -IFN), sulfanilamide, N-Naphthylethylenediamine 2HCl, zymosan, lucigenin는 Sigma Co., FBS, trypsin, thioglycollate는 Difco Co., FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles는 Molecular Probes Co. 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 96 well plate(white, Berthold), molecularporous membrane tubing(m.w. 500, 1000 Spectra/Por Co.), CO<sub>2</sub> incubator(Vision scientific Co.), luminometer(Berthold 96LP), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.)를 사용하였다.

**활성분획의 분리**-본 실험에 사용한 자근은 시중 건재상에서 구입하여 사용하였으며, 70% MeOH로 실온에서 3일간 추출한 다음 여과하고 여액을 감압 농축한 후, *n*-hexane, methylene chloride, *n*-BuOH 및 물로 계통분획한 다음 동결건조하였다. 활성을 나타낸 물 분획 1 g을 분자량 1,000 및 500인 molecularporous membrane tubing으로 3일간 투석하여 분자량 1,000 이상 100 mg, 1,000 이하 500 이상 400 mg 및 500 이하 200 mg을 얻어 동결건조하여 사용하였다.

**복강 macrophage의 분리**-멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고 3일 후 마우스를 경추탈골하여 도살한 다음 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 1640배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 다음, 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다.

**복강 macrophage의 lucigenin chemiluminescence 측정**-분리한 복강 macrophage를 DME (without phenol red) 배지에 부유시켜 측정용 96 well microplate(white)의 각 well 당  $1 \times 10^6$  cells씩 분주하고, 각 분획  $5 \times 10^{-4}$  g/ml와 lucigenin 용액 50  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 15분간 전처리한 후 zymosan 용액 10  $\mu$ l를 첨가하여 5분 간격으로 60분 동안 lucigenin chemiluminescence(CL)를 luminometer로 37°C에서 측정하였다.<sup>9,10)</sup> *In*

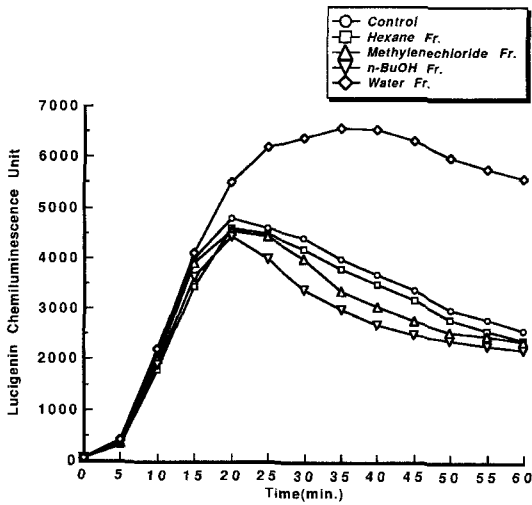
*vivo* 실험에서는 자초 물분획 100 mg/kg을 생쥐에 경구로 7일간 투여하고 macrophage를 분리하여 동일한 방법으로 실험하였다.

**복강 macrophage의 탐식작용에 의한 engulfment 측정**-FITC-conjugated *E. coli* particles을 HBSS에 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250  $\mu$ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI 1640배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 조정한 후, 100  $\mu$ l를 96 well에 분주하여 분자량 500~1,000인 분획을  $5 \times 10^{-4}$  g/ml 처리하고, 1시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양후 배지를 제거하고, *E. coli*를 HBSS로 1 mg/ml로 조제한 현탁액 25  $\mu$ l를 가하여 1시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100  $\mu$ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.<sup>11)</sup>

**복강 macrophage의 nitric oxide의 측정**-분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells로 분주한 후, 각 well에 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37°C CO<sub>2</sub>-incubator에서 24시간 배양한 다음 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess 시약으로 측정하였다.<sup>12)</sup> 즉 배지 100  $\mu$ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

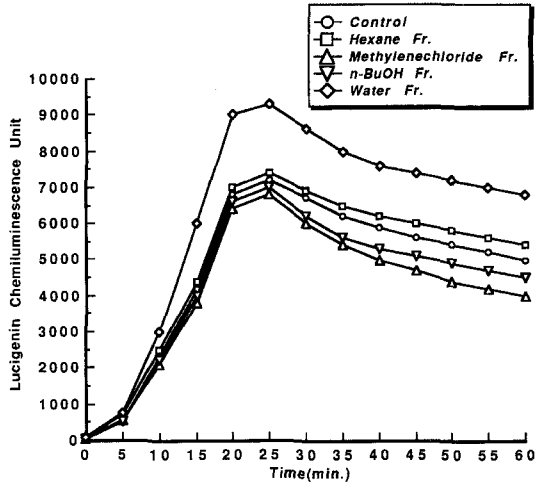
**Phagocytic activity 효과**-Lucigenin에 의해 증가되는 chemiluminescence(CL)은 myeloperoxidase의 활성과는 관련이 없고 phagocytosis를 하는 동안 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 자근 70% MeOH 엑스를 *n*-hexane, methylenechloride, *n*-BuOH 및 물로 분획하여 *in vitro*에서 macrophage에 처리하고 CL을 측정된 결과 물 분획에서 CL이 현저히 증가되었다(Fig. 1). *In vivo*에서도 동일한 결과를 나타내



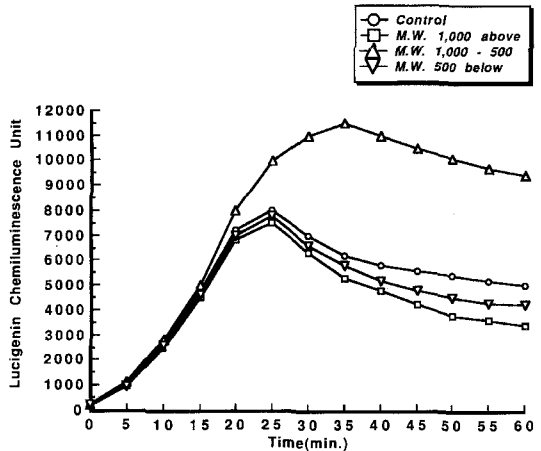
**Fig. 1.** Effect of solvent fractions of *Lithospermi Radix* on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The peritoneal macrophages were separated from BALB/c mice injected with 3% thioglycollate for 3 days. The macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in DME media (without phenol red) treated with the fractions ( $5 \times 10^{-4}$  g/ml) and opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was measured for 60 min with 5-min intervals by using luminometer. Each point represents the mean of 5 experiments.

는지를 확인하기 위하여 자초 각 용매 분획 100 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophage의 CL을 측정 한 결과 *in vitro* 실험의 결과와 동일하게 물 분획 투여군에서 CL이 증가하였다(Fig. 2). 물분획을 molecularporous membrane tubing을 이용하여 분자량 1,000 이상, 1,000~500 및 500 이하로 분획하여 CL을 측정 한 결과 분자량 1,000~500에서 CL이 증가하였다(Fig. 3). 또한, 분자량 1,000~500 분획은 FITC-conjugated *E. coli* particles의 탐식도 현저히 증가시켰다(Fig. 4). 이는 자근에 함유된 macrophage의 탐식능 활성성분이 물분획에 함유된 분자량 1,000~500인 물질임을 의미한다.

**Nitric oxide 생성 효과**-Nitric oxide는 human neutrophils의 F-actin양을 감소시키고 phagosome에서 oxygen metabolites의 생성을 억제하여,<sup>14)</sup> murine macrophages의 pseudopodia formation과 탐식능을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 본 실험에서 hexane, methylene chloride 및 n-BuOH 분획을 처리시 nitric

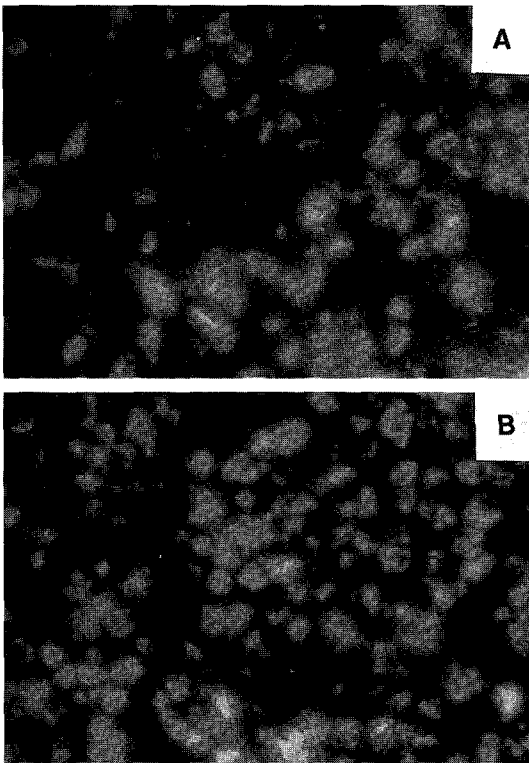


**Fig. 2.** Lucigenin chemiluminescence of peritoneal macrophages in the fractions of *Lithospermi Radix* administered mice. The fractions (100 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Each point represents the mean of 5 experiments.



**Fig. 3.** Effect of *Lithospermi Radix* water fraction (m.w. 1,000 and 500) on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. The macrophages were cultured in DME media (without phenol red) treated with the fractions ( $5 \times 10^{-4}$  g/ml). Each point represents the mean of 5 experiments.

oxide 생성은 대조군과 별 차이가 없었으나, 물 분획을 처리시에는 nitric oxide 생성이 억제되었다(Fig. 5). 본 실험의 결과만으로 물 분획에 의한 macrophage의 탐식능 촉진이 nitric oxide의 생성이 억제된 결과라고 단정할 수는 없지만, nitric



**Fig. 4.** Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages treated with Lithospermi Radix water fraction (m.w. 1,000~500,  $5 \times 10^{-4}$  g/ml). Photographs (taken at 400X magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and the macrophages treated with the fraction (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

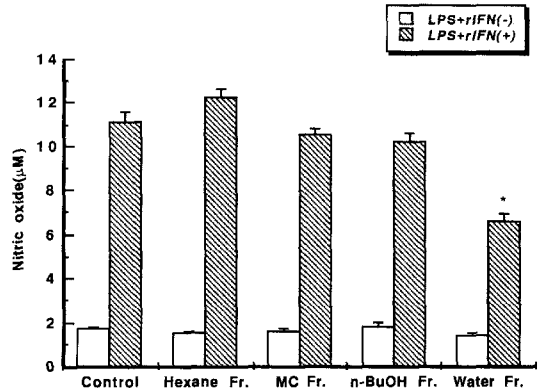
oxide가 일부 관여하고 있을 가능성이 있다고 추정된다.

**결 론**

자근에 함유된 murine peritoneal macrophage의 탐식능을 증가시키는 분획은 물분획에 함유된 분자량 500 이상 1,000 이하인 물질이었으며, 추후 정확한 구조를 확인할 예정이다.

**사 사**

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.



**Fig. 5.** Effect of solvent fractions of Lithospermi Radix on nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. Thioglycollate was injected *i.p.* for 3 days and the macrophages obtained after 2 h. adherence period were cultured in RPMI 1640 media treated with the fractions. LPS+γIFN(-): LPS and γIFN non-treated group, LPS+γIFN(+): LPS and γIFN treated group. Each bar represents the mean±SE from 5 experiments. \*: Significantly different from control group (p<0.01).

**인용문헌**

1. 韓大錫 (1993) 生藥學, 226. 東明社.
2. Cyong, J. and Otsuka, Y (1982) A pharmacological study of the anti-inflammatory activity of Chinese herbs. A review. *Acupuncture & Electro-Therapeutics Res. Int. J.* 7: 173-202.
3. Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Iitaka, Y., Hoshi, A. and Kuretani, K. (1981) Antitumor activity of shikonin, alkannin and their derivatives. II. X-ray analysis of cyclo-alkannin leucoacetate, tautomerism of alkannin and cyclo-alkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (11): 3069-3071.
4. Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H. and Tanabe, M. (1989) Anti-tumor promoting activities and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of Shi-Un-Kou and its constituents. *Yakugaku Zasshi* 109(11): 843-846.
5. Ueba, N., Otake, T., Yamazaki, K., Mori, H. and Morimoto, M. (1993) Anti-HIV activities of crude drugs, Shikon(Lithospermic Radix), in vivo. *Nippon Rinsho(Japan)* 51(1): 207-212.
6. Ozaki, Y., Suga, C., Yoshioka, T., Morimoto, T. and Harada, M. (1990) Evaluation on equiv-

- alence of pharmacological properties between natural crude drugs and their cultured cells based on their components. *Yakugaku Zasshi* 110(4): 268-272
7. Jin, R., Wan, L. L., Mitsuishi, T., Sato, S., Akuzawa, Y., Kodama, K. and Kurashige, S. (1994) Effect of Shi-Ka-Ron and Chinese herbs on cytokine production of macrophage in immunocompromised mice. *Am. J. Chinese Medicine* 22(3-4): 255-266.
  8. Jin, R., Wan, L. L., Mitsuishi, T., Sato, S., Akuzawa, Y., Kodama, K. and Kurashige, S. (1994) Immunomodulative effects of Chinese herbs in mice treated with anti-tumor agent cyclophosphamide. *Yakugaku Zasshi* 114(7): 533-538.
  9. Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. (1988) Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods* 112: 163-168.
  10. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. (1994) Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* 174: 259-268.
  11. Chok, P. W., Choon, S. P. and Benjamin, H. S. (1993) A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immuno. Methods* 162: 1-5.
  12. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity* 59(9): 3280-3283.
  13. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr., R. B. (1987) Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leukocyte Biol.* 41: 450-455.
  14. Forslund, T. and Sundqvist, T. (1997) Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. and Biophysical Research Communications* 233: 492-498.
  15. Jun, C. D., Park, S. K., Kim, J. M., Kim, J. D. and Chung, H. T. (1996) Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Korean. J. Immunol.* 18: 625-634.

(1998년 10월 17일 접수)