

## Lupane계 Triterpenoid류가 임파구 분열에 미치는 효과

김영옥<sup>#</sup> · 조대현 · 정혜주 · 김진호 · 장승엽 · 육창수\* · 양기숙\*\* · 오오진\*\*

식품의약품안전청, \*경희대학교 약학대학, \*\*숙명여자대학교 약학대학

(Received January 15, 1999)

## Effects of Lupane-Triterpenoids on Mitogen-induced Proliferation of Lymphocytes

Young-Ok Kim<sup>#</sup>, Dae-Hyun Cho, Hye-Joo Chung, Jin-Ho Kim,  
Seung-Yeup Chang, Chang-Soo Yook\*,  
Ki-Sook Yang\*\* and O-Jin Oh\*\*

Korea Food & Drug Administration, Seoul, 122-704, Korea

\*College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul, 130-701, Korea

\*\*College of Pharmacy, Sookmyung Woman's University, Seoul, 140-742, Korea

**Abstract**—The effects of five lupane-triterpenoids from leaves of two *Acanthopanax* spp., chiisanogenin, chisanoside and 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin, acakoreoside A and acantrifoside A on the mitogen-induced proliferation were investigated *in vitro*. T cell proliferation (TCP) to concanavalin A (Con A) and the B cell proliferation (BCP) to lipopolysaccharide (LPS) were increased by chiisanogenin. TCP to Con A was significantly increased by chiisanoside and acankoreoside A, but not affected by chiisanogenin, 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin and acantrifoside A. BCP to LPS was significantly increased by acankoreoside A and acantrifoside A, and slightly increased by chiisanoside, chiisanogenin and 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin.

**Keywords** □ Mitogenic proliferation, lupane-triterpenoids, *Acanthopanax* spp., chiisanogenin, chiisanoside, 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin, acankoreoside A, acantrifoside A, concanavalin A, lipopolysaccharide.

한국에는 오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 여러 종의 식물이 비교적 많이 분포되어 있다. 최근 이들 식물로부터 유효성분의 분리 및 구조결정 등에 관한 연구가 수행되어, 육 및 장 등<sup>1-3)</sup>은 세잎오갈피나무 *Acanthopanax trifoliatum*의 잎과 섬오갈피나무 *A. koreanum*의 잎으로부터 수종의 새로운 lupane-triterpene glycosides를 분리 보고하였고, 오 등<sup>4)</sup>은 흰털오갈피나무 *A. divaricatum* var. *albeofructum*의 잎으로부터 3,3-seco-lupane계 triterpenoid류를 분리보고하였다. 한편 생리활성에 관한 연구로 한 등<sup>5)</sup>은 지리산 오갈피나무 *A. chiisanense*와 섬오갈피나무의 근피와

수피로부터 얻은 추출물의 생물학적 활성에 대하여 보고하였으며, Fujikawa 등<sup>6)</sup>은 가시오갈피나무 *A. sen-ticosum*의 수피추출물이 위암에 효과가 있음을 보고하였고, Sui 등<sup>7)</sup>은 이로부터 분리한 사포닌이 저혈당증에 효과가 있다고 보고하였다. 그 밖에도 Tong 등<sup>8)</sup>은 pachyman polysaccharides와 가시오갈피나무의 polysaccharides의 항암효과는 세포막의 변화뿐 아니라 면역능의 증가와도 관련이 있음을 보고하였다. 그러나 흰털오갈피나무와 섬오갈피나무의 추출물이 면역기능에 미치는 효과 및 이 식물들에서 분리된 새로운 lupane계 triterpenoid류의 약리작용에 대한 보고는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 흰털오갈피나무와 섬오갈피나무 잎에서 분리한 5종의 lupane계 triterpenoid류가 면역능에 미치는 영향을 알아보기

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-380-1797 (팩스) 02-380-1799

위하여 *in vitro* 임파구분열능에 관한 실험을 하였다.

간 06:00~18:00)을 유지하였다.

### 실험방법

#### 실험재료

시험물질인 chiisanogenin, chiisanoside, 22 $\alpha$ -hydroxy chiisanogenin, acankoreoside A 및 acantrifoside A는 육, 장 및 오 등<sup>2)</sup>이 분리한 화합물을 사용하였고, 이들 성분의 구조는 Fig. 1과 같다. Concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, USA), RPMI-1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco (Grand Island, NY, USA), [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium: MTS]는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약들은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하여 사용하였다.

#### 실험동물

국립독성연구소(서울)에서 공급받은 건강상태가 양호한 6~7 주령의 특정균부재(specific pathogen free) 암컷 Balb/c계 생쥐를 사용하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰다. 동물의 사육 조건은 온도 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 상대습도 55 $\pm$ 5%, 명암교대 12 시간(조명시

#### Lymphocyte 분리

Mishell 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 실험하였다. 마우스를 경추달골하여 희생시킨 후 비장을 적출하고 차가운 phosphate-buffered saline(PBS)에서 slide glass로 압착하여 비장세포를 얻었으며 RBC lysing buffer(0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM KHCO<sub>3</sub> 및 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.2)를 이용하여 적혈구를 제거하였다. Incomplete RPMI-1640 (100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 IU/mL penicillin 및 2 mM L-glutamine) 배지로 1회 세척하고 complete RPMI-1640(100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, 2 mM L-glutamine 및 10% heat-inactivated fetal bovine serum)로 2회 세척한 후 complete RPMI-1640에 부유시킨 비장세포를 계수 하였다.

#### Mitogen 농도 결정

마우스 비장세포의 임파구 분열능 시험에 사용하기 위한 mitogen의 적정농도를 결정하기 위하여 비장세포를 96 well flat-bottomed microtiter plate의 각 well에 최종 농도가 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL가 되도록 조정하여 50  $\mu$ l씩 분주하였다. Mitogen은 complete RPMI-1640 배지에 희석하여 50  $\mu$ l씩 plate의 각 well에 추가하였으며 T-cell mitogen인 Con A는 0.5, 1, 2, 5 및

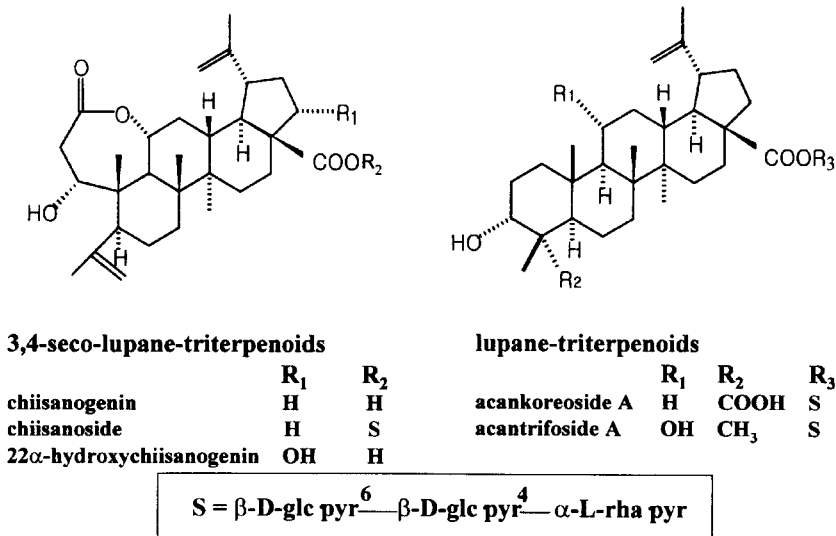


Fig. 1 — Structures of lupane-triterpenoids.

10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , B-cell mitogen인 LPS는 10, 20, 50 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 최종농도가 되도록 조정된 후 Buttke 등<sup>10)</sup>에 따라 MTS 방법으로 세포분열능을 평가하였다. 모든 임파구 분열능 시험은 triplicate로 수행하였다. Mitogen을 처리한 plate는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 후에 MTS 20  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 추가하고 4시간 배양한 후 ELISA reader(Molecular Devices Co, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Lupane계 triterpenoid류의 T세포에 대한 임파구 분열능 시험

흰털오갈피나무잎의 성분인 chiisanogenin, chiisanoside, 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin 및 섬오갈피나무잎의 성분인 acankoreoside A, acantrifoside A가 T 세포분열능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 각 well에 비장 세포( $2 \times 10^6$  cells/mL)와 Con A(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 사용하여 임파구 분열능을 측정하였다. 시험물질은 먼저 에탄올에 녹인 다음 phosphate buffer saline(PBS)를 넣어 희석하였다. 이 때 최종 에탄올의 양은 0.1%이하가 되도록 하였다. 이 시험액을 complete RPMI-1640 배지로 희석하여 각 well에 최종 농도가 lupane계 triterpenoid류는 2.5, 5, 10, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  또한 3,4-seco-lupane계 triterpenoid류는 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 하여 37°C에서 72시간 배양한 다음 MTS assay를 실시 하였다.

### Lupane계 triterpenoid류의 B세포에 대한 임파구 분열능 시험

Lupane계 triterpenoid류 및 3,4-seco-lupane계 triterpenoid류가 B세포분열능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 각 well에 비장 세포( $2 \times 10^6$  cells/mL)와 LPS(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 사용하여 임파구 분열능을 측정하였다. 이후 시험방법은 T세포에 대한 임파구분열능 시험과 동일하게 실시하였다.

### 통계학적 처리

모든 실험 결과는 student's t-test(paired)<sup>11)</sup>를 이용하여 대조군과 비교 분석하였다.

### 결과 및 고찰

*Acanthopanax*속 식물들의 성분이 많이 밝혀짐에 따라 이에 대한 약효들이 입증되고 있다.<sup>12-17)</sup> 특히 *A. obtusum*뿌리의 항암효과 등에 관한 보고에서 그 항암효과는 면역기능의 향진에 의한 것임을 밝혔으며,<sup>14)</sup> 그 외에도 *Acanthopanax*속 식물들의 polysaccharides 등의 면역능에 대한 보고가 있다.<sup>12,15,16)</sup>

이에 본 연구에서는 흰털오갈피나무잎 및 섬오갈피나무잎에서 새로이 분리한 3,4-seco-lupane계 triterpenoid류 3종과 lupane계 triterpenoid류 2종의 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 임파구 분열능에 대한 실험을 수행하였다. 즉, T 세포 및 B 세포를 자극하여 blastogenesis를 야기시키는 Con A와

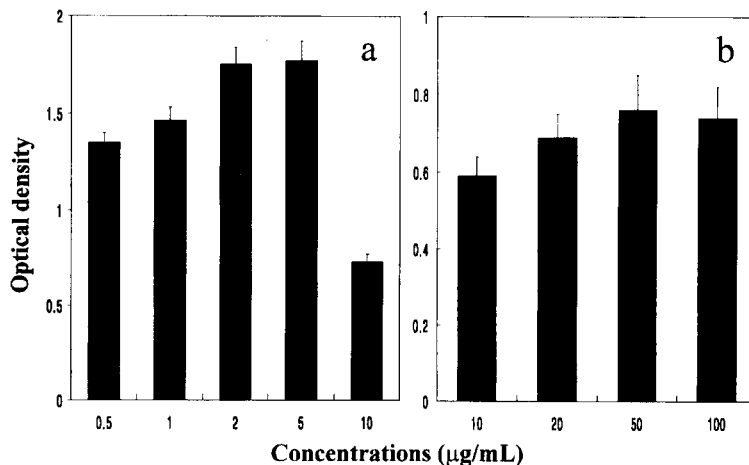


Fig. 2 — Lymphocyte proliferation of splenocytes in different concentrations of mitogen, as assayed by MTS. a: concanavalin A, b: lipopolysaccharide.

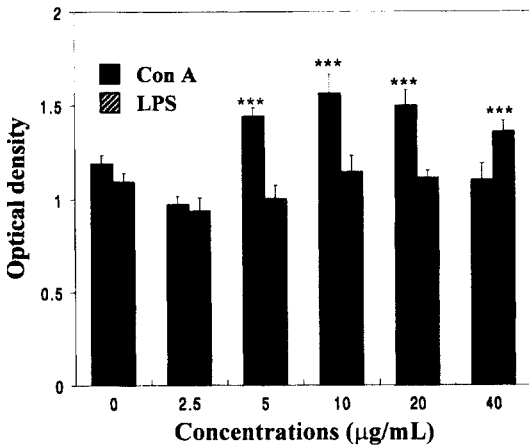


Fig. 3—Effects of chiisanoside on the lymphocyte proliferation of splenocytes induced by mitogen, as assayed by MTS (\*\*\* $p < 0.001$ ).

LPS를 이용하여 세포매개성 및 체액성 면역능을 측정하였는데, mitogen의 최적 농도를 결정하기 위하여 실험한 결과 Con A와 LPS는 각각 5 µg/mL과 50 µg/mL에서 최고의 임파구 분열능을 나타내었다(Fig. 2). Mitogen의 임파구 분열능은 최고 농도 이상에서는 저해될 수 있기 때문에 본 연구에서는 Con A와 LPS를 2 µg/mL 및 20 µg/mL 농도로 각각 사용하였다. 본 연구 결과 chiisanoside는 T 세포 분화를 촉진하는 것으로 추측된다(Fig. 3). 즉 시험물질을 투여하지 않은 대조군에 비하여 5 µg/mL 투여군부터 분화능이 현저하게 증가하였으며, 20 µg/mL 투여군까지는 용량의존적으로 유의성있게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 40 µg/mL 투여군에서는 분화능이 저하되는 것으로 관찰되었다. 또한 chiisanoside는 B세포의 분화를 촉진하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 대조군에 비하여 20 µg/mL 투여군까지는 큰 증가 없었으나 40 µg/mL 투여군에서 현저하게 분화능이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 chiisanoside는 Mitogen(Con A 및 LPS)를 이용한 임파구분화능 시험에서 T 및 B임파구의 분화를 촉진하는 것으로 추측되며, 면역기능에 대한 시험물질의 효과를 입증하기 위하여 더 많은 시험이 필요할 것으로 사료된다. 이 결과는 가시오갈피나무 *A. senticosus*의 polysaccharides가 Con A 및 LPS에 대한 임파구분열, IgG, PFC IgM 및 DTH 반응을 증가시킨다는 Xie<sup>13)</sup> 및 Shen 등<sup>16)</sup>의 보고와 체액성면역은 억제하고 세포성면역은 증가시킨다는 Li 등<sup>17)</sup>의 보

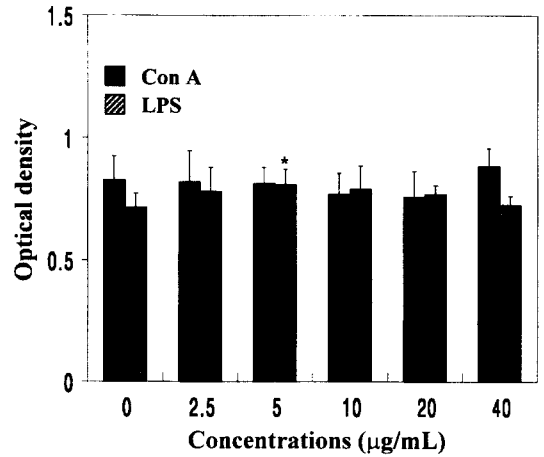


Fig. 4—Effects of chiisanogenin on the lymphocyte proliferation of splenocytes induced by mitogen, as assayed by MTS (\* $p < 0.05$ ).

고와 일치한다. 한편 chiisanogenin은 분화에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었으며, T 임파구의 분화에 약간의 항진 효과가 있는 것으로 사료되나 유의성은 없었다(Fig. 4). 또한 2.5 µg/mL~20 µg/mL 투여군에서 시험물질이 B 임파구의 분화를 약간 촉진시키는 것으로 관찰되었으나 40 µg/mL 투여군에서는 억제하였다. 따라서 chiisanogenin은 임파구의 분화에 영향을 미치지 못하는 것으로 추정된다. 22α-hydroxychiisanogenin은 T임파구 분열에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 B 임파구분열을 약간 증가시켰다(Fig. 5). 특히 5 µg/mL 투여군에서 유의

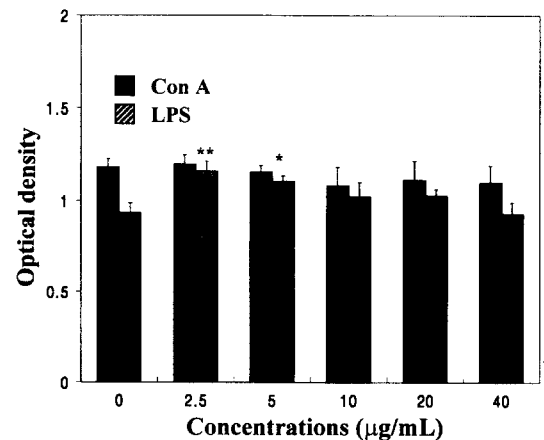


Fig. 5—Effects of 22α-hydroxychiisanogenin on the lymphocyte proliferation of splenocytes induced by mitogen, as assayed by MTS (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

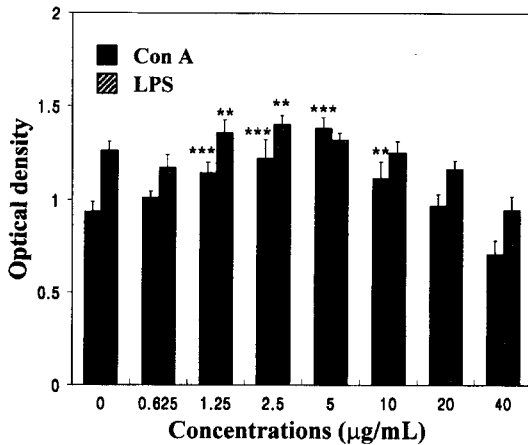


Fig. 6—Effects of acankoreoside A on the lymphocyte proliferation of splenocytes in Balb/c mice induced by mitogen, as assayed by MTS (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

성있게 증가되었다. Acankoreoside A는 T 및 B 임파구분열을 크게 증가시켰다(Fig. 6). 특히 B 임파구분열을 5 µg/mL 투여군까지 용량의존적으로 증가시켰으며, 10 µg/mL 부터 억제하기 시작하여 40 µg/mL 투여군에서는 대조군에 비하여 크게 억제하는 등 저농도에서는 항진, 고농도에서는 억제하는 양상을 나타내었다. 또한 T 임파구의 분열을 2.5 µg/mL 용량까지는 증가시켰으나 5 µg/mL 용량에서 억제하기 시작하여 40 µg/mL 용량에서는 역시 대조군에 비하여 크게 억제시킴을 알 수 있었다. 따라서 acankoreoside A는 저농도에서 T 및 B 임파구의 분열을 촉진시키지만 고농도에서는 억제하는 것으로 추정된다. Acantrifoside A는 acankoreoside A와 유사하게 저농도(0.625~2.5 µg/mL)에서는 촉진시켰으나 고농도(5~40 µg/mL)에서는 용량의존적으로 억제시켰으며, B 임파구의 분열에는 거의 영향을 미치지 않았다(Fig. 7). 이상의 실험결과를 종합하면 흰털오갈피나무잎의 성분보다는 섬오갈피나무잎의 성분이 비장세포의 분열을 증가시켰으며, 섬오갈피나무잎의 성분인 acankoreoside A와 Acantrifoside A는 lupane계 triterpenoid류의 배당체이다. 즉 배당체는 임파구분열을 증가시키는 것으로 보인다. 따라서 5종의 시험물질인 lupane계 triterpenoid류는 *in vitro* 실험에서 임파구분열에 영향을 미치며, 저농도에서는 촉진, 고농도에서는 억제하는 양면적 효과를 갖는 것으로 추정된다. 고농도에서 나타난 억제효과는 세포독성 등을 포함한 원인을

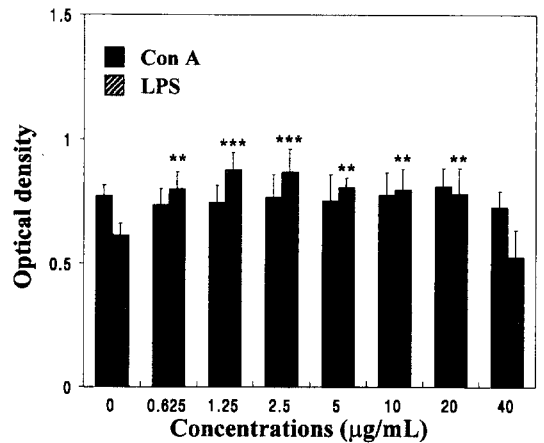


Fig. 7—Effects of acantrifoside A on the lymphocyte proliferation of splenocytes induced by mitogen, as assayed by MTS (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

밝히기 위해서 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 결론

흰털오갈피나무잎의 성분인 3, 4-seco-lupane계 triterpenoid류 3종(chiisanogenin, chiisanoside, 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin)과 섬오갈피나무잎의 성분인 lupane계 triterpenoid류 2종(acankoreoside A 및 acantrifoside A)의 임파구분열에 대한 *in vitro* 실험결과는 다음과 같다.

1. chiisanoside은 T임파구 분열을 유의성 있게 증가시켰고 B임파구의 분열을 약간 증가시켰다.

2. chiisanogenin 및 22 $\alpha$ -hydroxychiisanogenin는 T임파구 분열에는 거의 영향을 미치지 않았으나, B임파구 분열은 약간 증가시켰다.

3. acankoreoside A는 T 및 B 임파구 분열을 용량의존적으로 크게 증가시켰으며, acantrifoside A는 T 임파구 분열에는 거의 영향을 미치지 않았으나, B 임파구 분열을 크게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 lupane계 triterpenoid류는 *in vitro* 실험에서 생쥐 비장세포의 임파구분열을 증가시키는 것으로 생각된다.

## 문헌

- 1) Yook, C. S., Kim, I. H., Hahn, D. R., Nohara, T. and Chang, S. Y. : A lupane-triterpene glyco-

- side from leaves of two *Acanthopanax*. *Phytochemistry* **49**(3), 839 (1998).
- 2) Chang, S. Y., Yook, C. S., Nohara, T. : Two new lupane-triterpene glycosides from leaves of *Acanthopanax koreanum*. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(1), 163 (1998).
  - 3) Chang S. Y., Yook, C. S. and Nohara, T. : Lupane-triterpene glycosides from Leaves of *Acanthopanax koreanum*. *Phytochemistry*, in print.
  - 4) 吳杓眞, 金泰姬, 梁基淑, 陸昌洙, 張承燁, 野原埜弘 : 白毛五加トリテルペン 成分, 日本生藥學會第45回年會(仙台), p. 165 (1998).
  - 5) Hahn, D. R., Kasai, R., Kim, J. H., Taniyasu, S., Tanaka, O., Kim, C. J. and Park, M. J. : The glycosides of araliaceaus drugs and their biological activities. *Kor. J. Pharmacogn.* **17**(1), 78 (1986).
  - 6) Fugikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S. : Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulser in restrained cold water stressed rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(9), 1227 (1996).
  - 7) Sui, D. Y., Lu, Z. Z., Li, S. H. and Cai, Y. : Hypoglycemic effect of saponin isolated from leaves of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxin) Harms. *Chung Kuo Chung Yao Chih.* **19**(11), 683-5, 703 (1994).
  - 8) Tong, L., Hyang, T. Y. and Li, J. L. : Effect of plant polysaccharides on cell proliferation and cell membrane contents of sialic acid, phospholipid and cholesterol in S 180 and K 562 cells. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tas Chih.* **14**(8), 482 (1994).
  - 9) Mishell, B. B., Shiigi, S. M., Henry, C. : Preparation of mouse cell suspensions. In Mishell, B. B. and Shiigi, S. M.(Eds.), *Selected methods in cellular immunology*, Freeman, San-Francisco, p. 27 (1980).
  - 10) Buttke, T. M., McCubrey, J. A. and Owen, T. C. : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine dependent cell lines. *J. Immunol. Methods* **157**, 233 (1993).
  - 11) Diem, K. and Lentner, C. : *Documants geigy scientific tables*. Geigy, NY, p. 158 (1975).
  - 12) Wang, J. Z., Mao, X. J., Ito, H. and Shimura, K. : Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta. Med.* **57**(4), 335 (1991).
  - 13) Xie, S. S. : Immunoregulatory effect of polysaccharide of *Acanthopanax senticosus*. I. Immunological mechanism of PAS against cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* **11**(5), 338 (1989).
  - 14) Wang, J. Z., Tsumura, H., Ma, N., Ito, H. and Shimura, K. : Biochemical and morphological alterations of macrophages and spleen cells produced by antitumor polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta. Med.* **57**(1), 54 (1993).
  - 15) Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollma, A. Odenthal, S., Stuppner, H. Jurcic, K., Le Turdu M. and Fang, J. N. : Immunostimulating action of polysaccharides(heteroglycans) from higher plants. *Arzneimittelforschung* **35**(7), 1069 (1985).
  - 16) Shen, M. L., Zhai, S. K., Chen, H. L., Luo, Y. D., Tu, G. R. and Ou, D. W. : Immunomopharmacological effects of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on expermental animals. *Int. Immunopharmacol.* **13**(5), 549 (1991).
  - 17) Li, X. Y. : Immunomodulating Chinese herbal medicines. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **2**, 159 (1991).