

## 구기자 부위별 추출물이 흰쥐 비장세포의 증식에 미치는 영향

박종상\* · 박종대\*\*\* · 이봉춘\*\* · 최강주\*\*\* · 라상욱\*\* · 장기운\*\*\*\*

### Effects of Extracts from Various Parts of *Lycium chinense* Mill. on the Proliferation of Mouse Spleen Cells

Jong Sang Park\*, Jong Dae Park\*\*, Bong Chun Lee\*, Kang Ju Choi\*\*

Sang Wook Ra\* and Ki Woon Chang\*\*\*

**ABSTRACT** : To evaluate the biological effects of boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) extracts on the immune response systems, the mitogenic effects were tested by LPS (lipopolysaccharide) and Con A (concanavalin A) using water extracts from various parts of *Lycium chinense* Mill. The proliferation of B-lymphocytes which were activated by the mitogen, LPS, was markedly increased in the concentration of 0.1 mg/ml to 0.5 mg/ml, but inhibited in more than 0.5 mg/ml. It increased only proliferation of B-lymphocytes but not that of T-lymphocytes by Con A. There was no difference between boxthorn species in immune response. Water extracts of various parts in boxthorn enhanced the humoral immune response which was related to B-lymphocytes.

**Key words** : *Lycium chinense*, immune response, mitogenic effects, spleen cells.

## 서 언

구기자나무는 낙엽성 관목으로 우리나라를 비롯한 중국, 일본, 대만 등지에서 자생하거나 재배 (Lee & Sheo, 1986; Park, 1995) 되며, 국내에는 청양과 진도지방이 주산지이

다. 중국의 의약서인 「신농본초경」에는 3백 65종의 약초가 수록되어 있는데, 그 중에서 약의 효과와 작용별 3대 분류로 각각 분류되어있으며 구기자는 그중 생명을 보존하고 다량을 장기간 복용해도 해가 없는 상약(上藥)으로 분류되어있어, 「오래 복용하면 근골을 강하게 하고 몸을 가볍게 하며 늙지 않는다」

\* (주) 마이크로플랜츠 중앙연구소 (Microplants Co., Ltd. R&D Center, Jeonju 561-232, Korea) < 2000. 7. 14 접수 >

\*\* 충남농업기술원 청양구기자시험장 (Chungyang Boxthorn Experimental Station, Chungnam Agricultural Research and Extension, Chungyang 345-870, Korea)

\*\*\* 한국인삼연초연구원 (Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea)

\*\*\*\* 충남대학교 농화학과 (Dep't of Agricultural Chemistry, Chungnam Nat'l University, Taejon 305-764, Korea)

고 기재되어 있다. 구기자나무는 전부위가 약 용 및 식용으로 이용되고 있어 열매를 구기자, 잎을 구기엽, 뿌리 껍질을 지골피(地骨皮)라 하여 약효가 각각 다른 것으로 쓰여지고 있다(Kim & Kim, 1994). 구기자와 구기엽은 補肝腎, 益精血, 名目 등의 효능이 있어 補養藥으로 쓰이며, 지골피는 高血壓, 解熱, 消渴 등의 치료에 쓰인다.

Park et al. (1990)은 생약은 몸을 보호하고 건강을 유지하는 목적으로 오랫동안 복용하여 왔으며, 이는 과학적인 의미로 해석하면 체내의 저항성 증가작용인 면역계의 활성화로도 볼 수 있다고 하였으며, Na & Kim (1987)은 한방학적 개념의 면역은 질병의 발생 및 진전을 인체의 正氣와 질병인 邪氣의 항쟁 및 消長進退의 과정으로 본 正邪論에서 그 관련성을 찾아볼 수 있으며, 특히 正氣는 邪氣에 대응하는 항원능력 및 생리기능을 촉진하는 것으로 인체의 면역기능과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 면역계는 자기 다른 기능을 갖는 여러 종류의 세포들로 구성되어 있으며, 이들이 적절하게 협동함으로써 체내로 유입되는 이물질에 대하여 방어를 하고 있다. 따라서 면역기능 측정의 정확성을 기하기 위해서는 단일항목의 시험으로는 부적절하며 몇 가지 시험항목을 포함하여 측정하여야 하는데 이러한 면역활성 검정을 위한 실험으로는 면역세포의 증식효과를 기대할 수 있는 mitogen test, 이종세포항원간의 반응을 보이는 MLR(mixed lymphocytes reaction)과 lipopolysaccharide(B-cell mitogen) 및 concanavalin A(T-cell mitogen)와의 상호 작용을 보는 실험 등이 있다. 한편, 구기자나무에 대한 면역활성 연구는 구기자역기스를 *in vivo*에서 마우스에 투여하여 세포성 면역반응 증가를 확인한 보고(Na & Kim, 1987)가 있으나 구기엽과 지골피에 대한 보고는 없었다.

따라서 본 연구에서는 구기자나무의 부위별로 면역조절시험의 가장 기본적인 지표가 되는 LPS(lipopolysaccharide) 및 Con A(concanavalin A)에 의한 마우스의 비장세포 증식능에 대한 영향을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험의 공시품종은 청양구기자시험장 시험포장에서 재배한 재래종인 청양재래를 사용하였다. 면역활성검정용 시료는 건조한 과실(구기자), 잎(구기엽) 및 뿌리(지골피)에 10배수(w/v)의 증류수를 가해 80℃에서 2시간 동안 추출한 다음 여과지(No. 4)로 여과한 후 감압건조하여 처리별로 농도를 조절하여 사용하였다. 마우스의 비장세포로부터 B-임파구 증식능을 측정하기 위하여 LPS를 사용하였으며, T-임파구 증식능의 측정을 위하여 Con A를 사용하였다. 마우스를 치사시킨 다음 비장을 무균적으로 적출하여 단일 세포액으로 만들고 RPMI1640배지로 2회 세척한 다음 5% fetal bovin serum, 2mM L-glutamine, 100 unit penicillin, 100µg streptomycin 및  $5 \times 10^{-5}M$  2-mercaptoethanol을 함유하는 RPMI1640 complete 배지에 균질화하고 세포의 농도를  $2.5 \times 10^6$  cell/ml이 되도록 조정하였다. 80µl의 세포액을 96-well 배양접시(Costar)에 분주하고 시험목적에 맞도록 시험물질과 LPS(100µg/ml) 또는 Con A(1µg/ml)를 적절히 조제하여 well당 총용량이 100µl이 되도록 통일시켰다. 모든 처리가 끝나면 plate를 37℃의 CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양하여 유약화 반응을 유도하였다. 염료를 이용한 세포유약화 반응의 측정을 위해서는 방사능 물질의 처리 조작 및 세포의 회수단계를 생략하고, 배양시작 후 3일째에 Promega社의 Cell Titer 96® Aqueous Non-

radioactive Proliferation Kit를 사용하였다. 20 $\mu$ l의 염료를 각 well에 처리하고 37 $^{\circ}$ C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~4시간 동안 배양하여 발색을 유도한 다음 enzyme linked immunosorbant analyser (ELISA) reader를 이용하여 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 비장세포의 증식정도는 Abs<sub>490</sub>/well로 표현하였다.

## 결과 및 고찰

免疫이란 생체가 自己와 非自己를 識別하는 機構이며 외부로부터 침입하는 미생물 뿐만 아니라 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 非自己的인 抗原으로 인식하고, 특이하게 반응하여 항체를 생산하고 이를 제거함으로써 그 개체의 항상성을 유지하는 현상 (Na & Kim, 1987)이며 동물체내에 존재하는 자기 방어체계이다 (Kim et al., 1998). 자기방어를 위한 감시체계는 크게 두가지의 메카니즘으로 이루어지는데 하나는 체액성 면역 (humoral immune response) 과 세포성 면역 (cell-mediated immune response) 이다. 체액성 면역은 혈청내에 존재하는 항체가 외부물질과 결합함으로써 외부물질을 제거하여 면역성을 높이고, 세포성 면역은 임파계 (lymphoid system) 에 속하는 몇 종류에 의해 침입한 세포나 조직을 직접 파괴하는 기능을 갖고 있다.

생약을 이용한 면역활성에 대한 연구 (Park et al., 1990; Moon et al., 1990; Yang et al., 1983) 는 주로 인삼, 백하수호, 황기, 당귀 등이 그 대상이었고 이들은 대체로 생쥐의 세포성 면역 및 체액성면역 반응을 증가시킨다고 보고되었다. 또한 Moon et al. (1991) 은 면역 결핍증, 암 및 만성간염 등의 질병에 비특이적 면역 반응의 증가나 체액성 항체생성의 증가 및 세포성 면역을 증가시킴으로서

이들 질환이 치료될 수 있다고 주장하였으며, Ha et al. (1985) 는 면역과 스트레스의 관계도 의학적인 많은 관심의 대상이 되고있으며, 면역계는 다른 중요한 homeostatic system의 경우처럼 외적 및 내적 환경에 대단히 예민하다고 하였다.

본 연구에서는 청양재래종의 과실, 잎 및 뿌리의 물추출물을 *in vitro*에서 면역세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스의 mitogenic assay를 수행하여 어느 정도 기초적인 면역조절기능을 예측하고자 하였다. 분리한 임파구를 그대로 배양하면 거의 분열하지 않지만 적당한 분열촉진 인자 (mitogen) 의 존재상태에서 배양하면 DNA 합성과 세포증식을 일으킨다. 그림 1에 나타난 바와 같이 열매인 구기자의 경우 mitogen을 처리하지 않은 상태 (No Mit)에서는 품종간 차이가 없이 저농도 (0.01~0.05mg/ml) 에서는 비장세포의 분열증식을 촉진하지 않다가 0.1~0.5mg/ml의 농도에서는 증식을 촉진하였고 1mg/ml의 농도에서는 증식을 억제하였다. 체액성 면역과 관련이 있는 B임파구를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 비장세포의 분열증식능을 측정하였을 경우 품종간 차이 없이 저농도에서 (0.01~0.1mg/ml) 비장세포의 분열증식을 촉진하였으나 그 이상의 농도에서는 증식을 억제하였다. 한편 세포성면역과 관련이 있는 T임파구를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A를 1 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 비장세포의 분열증식능을 측정한 결과 0.5mg/ml까지 완만하게 증식을 촉진하다가 1mg/ml이상에서는 분열증식을 억제하였다. 이 결과로부터 알 수 있는 것은 열매는 체액성 면역이 관여하여 항체생성을 촉진함으로써 면역증강효과에 작용할 수 있다고 판단된다.

Chungyangjaerae

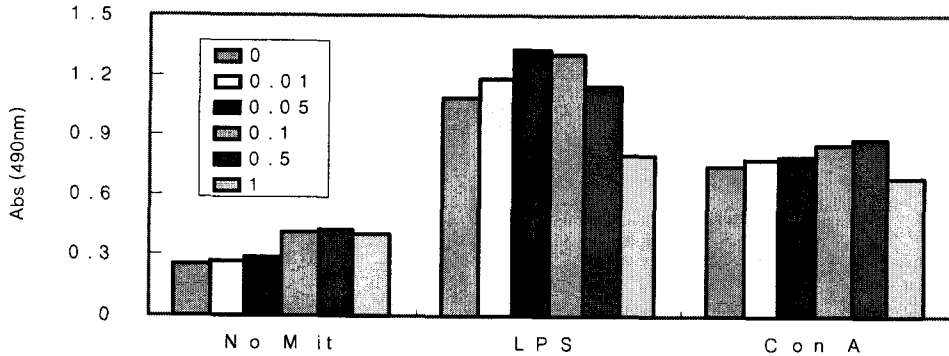


Fig. 1. Effect of water soluble extract obtained from *Lycii fructus* in Chungyangjaerae on splenic lymphocyte proliferation in mice.

Samples were initially included in the splenic lymphocyte with no mitogen, LPS (100 $\mu$ g/ml) or Con A(1 $\mu$ g/ml). Spleen cells(1 $\times$ 10<sup>5</sup>/well) from mice were mixed with various concentrations of samples and cultured for 72hr in 5% CO<sub>2</sub> incubator.

Significantly different from control in LPS and No mitogen treated group (p < 0.01)

앞의 경우 No Mit 처리구에서는 저농도인 0.01~0.05mg/ml까지는 분열증식을 보여주지 않았으며, 0.1mg/ml 이상의 농도에서는 약

간 촉진시킬 뿐이었다. LPS 처리구에서는 0.1 mg/ml까지 비장세포의 분열증식을 촉진시켰으나 그 이상의 농도에서는 억제하여 농도별

Chungyangjaerae

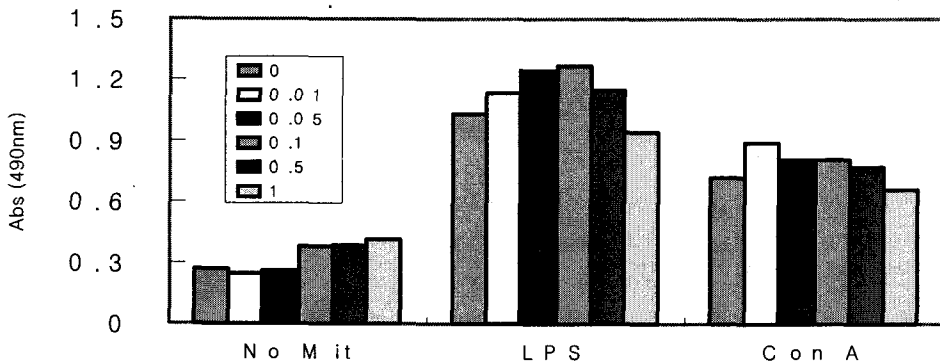


Fig. 2. Effect of water soluble extract obtained from *Lycii folium* in Chungyangjaerae on splenic lymphocyte proliferation in mice.

Samples were initially included in the splenic lymphocyte with no mitogen, LPS (100 $\mu$ g/ml) or Con A(1 $\mu$ g/ml). Spleen cells(1 $\times$ 10<sup>5</sup>/well) from mice were mixed with various concentrations of samples and cultured for 72hr in 5% CO<sub>2</sub> incubator.

Significantly different from control in LPS and No mitogen treated group (p < 0.01)

로 면역조절능이 있음을 확인할 수 있었다. 앞의 비장세포 분열증식 효과는 그림 2에 나타내었다.

뿌리의 비장세포 증식효과를 그림 3에 나타내었다. 뿌리의 경우 품종간 차이는 없었으며, No Mit 처리구에서는 농도의존적으로 비장세포의 분열 증식을 촉진하였다. LPS 처리구에서는 0.1mg/ml까지 비장세포의 분열증식을 농도의존적으로 촉진시켰고 그 이상의 농도에서는 억제시켰다. Con A 처리구에서는 비장세포의 분열증식효과 및 억제효과도 없었다. 뿌리의 경우에는 세포성 면역에는 거의 효과를 보여주지 않지만 체액성 조절기능에 관여하는 것으로 생각되어, 적절한 농도에서 재검토해야 할 필요가 있다고 판단된다. 고농도 처리시 비장세포의 분열증식이 억제되는 것은 면역조절능을 발휘하는 농도가 있음을 의미하며, 이는 농도에 따른 면역 활성이 상이함을 의미한다. 구기자의 부위별 물추출물

에 대한 면역조절활성을 비교검토하기 위해서는 in vivo에서 용량별 및 투여기간별로綿羊적혈구에 의한 마우스의 항체생성능을 측정하는 연구가 수행되어야 한다고 생각한다.

## 적 요

구기자나무의 부위별 물추출물이 LPS (lipopolysaccharide) 및 Con A (concanavalin A)에 의한 마우스의 비장세포 증식능에 미치는 영향을 시험한 결과 부위별 면역 활성중 과실에서의 No mit 처리구에서는 0.1mg/ml~0.5mg/ml 농도에서, LPS 처리구에서는 0.01mg/ml~0.1mg/ml의 농도에서 B-cell (체액성 면역)의 분열증식을 촉진시켰다. 잎과 뿌리는 LPS 처리구에서 0.1mg/ml 까지 비장세포의 분열증식을 촉진시켰으며 Con A 처리구에서는 T-cell (세포성 면역)의 증식효과가 없었다.

### Chungyangjaerae

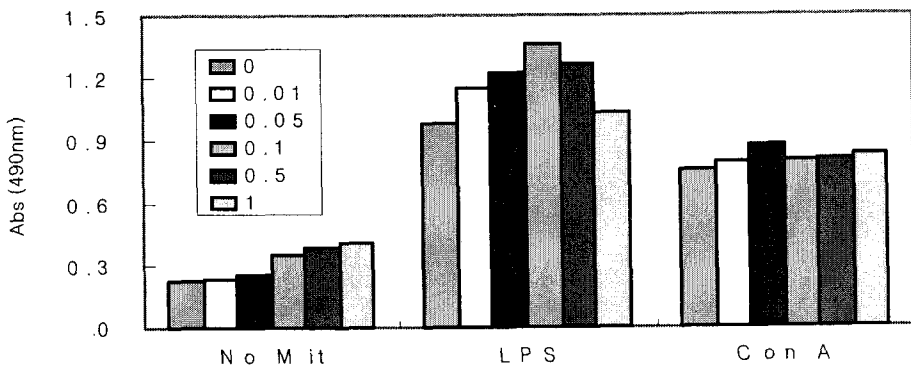


Fig. 3. Effect of water soluble extract obtained from *Lycii cortex* in Chungyangjaerae on splenic lymphocyte proliferation in mice.

Samples were initially included in the splenic lymphocyte with no mitogen, LPS (100µg/ml) or Con A(1µg/ml). Spleen cells(1×10<sup>5</sup>/well) from mice were mixed with various concentrations of samples and cultured for 72hr in 5% CO<sub>2</sub> incubator.

Significantly different from control in LPS and No mitogen treated group (p < 0.01)

## LITERATURE CITED

- Kim S. J. and L. H. Kim. 1994. The Comparative Studies On Antidiabetic Activities of Lycium Drugs - The Effect of *Lycium* Drug Extracts on Streptozotocin Induced Hyperglycemia in Rats. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* 8 : 5-15.
- Ha T. Y., Y. K. Kim and K. N. Han. 1985. Effect of Auditory Stress on Immune Response in Mice. *Korean J. Immunology* 7(1) : 11-25.
- Lee M. Y. and H. J. Sheo. 1986. Quantitative Analysis of Total Amino Acids and Free Sugars in *Lycii fructus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 15(3) : 249-252.
- Na Y. G. and K. H. Kim. 1987. Effect of *Atractylis Rhizoma* and *Lycii Fructus* on cell-mediated and humoral immune response in Mice. *K. H. Univ. O. Med. J.* 10 : 579-587.
- Moon H. S., Y. H. Ham, I. S. Chung, S. K. Jo, S. I. Hong, E. K. Park and Y. S. Yun. 1990. Influence of *Angelicae gigantis* Radix on the Immune System I. T-independent B-Cell Proliferation. *Korean J. Immunology* 12(1) : 113-118.
- Moon E. Y., S. Y. Park, E. K. Park, S. K. Jo and Y. S. Yun. 1991. Influence of *Angelicae gigantis* Radix on the Immune System (II) - Stimulation of Hemolytic Plaque Forming Cells by *in vivo* Treatment. *Korean J. Immunology* 13(1) : 71-77.
- Park S. Y., E. Y. Moon, O. P. Zee and E. K. Park. 1990. Immunomodulating Activity of Water Extract from Herbal Drug (I)-Immuno Suppressing Activity of Water Extract from *Xanthil Strumarium*. *Korean J. Immunology* 12(1) : 119-130.
- Park W. J. 1995. Studies on Chemical Compositions and Biological Activities of *Lycium chinense* Mill. Ph.D. Thesis. Kunkuk Univ. Press. Korea. 5P.
- Yang Y. T., C. C. Soon, S. I. Chung and H. S. Lee. 1983. Immuno-Adjaent Effect of *Panax ginseng* Extracts Against Sarcoma 180 Ascites Tumor Cells. *Korean J. Immunology* 5(1) : 15-28.