

손바닥선인장(제주도 기념물 35호) 추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향

문창종¹ · 김승준¹ · 안미정¹ · 이선주^{2,3} · 정규식⁴ · 박상준⁴ · 윤도영⁴ · 최용경⁴ · 신태균^{1,2*}

¹제주대학교 농과대학 수의학과, ²생명과학연구소, ³자연과학대학 화학과,
⁴한국과학기술원 생명공학연구소

Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on immune cell activation

Changjong Moon¹, Seungjoon Kim¹, Meejung Ahn¹, Sunjoo Lee^{2,3}, Sangjoon Park⁴, Kyushik Jeong⁴,
Do-Young Yoon⁴, Young-Kyung Choe⁴, Taekyun Shin^{1,2*}

¹Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, ²Institute of Life Science

³Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea

⁴Korea Research Institute for Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Republic of Korea

Abstract

Opuntia ficus-indica (Op) extract has been claimed to have several therapeutic properties in oriental medicine including anti-inflammatory and anti-rheumatoid arthritis effects. Little is known of its effect on the activation of immune cells such as T cells and macrophages. To evaluate the functional effect of Op extract on immune cells, we examined whether Op extract stimulates the proliferation of T cells and the secretion of cytokines including IL-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha in THP-1 cell lines by RT-PCR. Op extract significantly enhanced the proliferation of T cell clone (D10S). Transcription of cytokines including IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha peaked 6 hrs after exposure to Op extract (100 g/ml) in the THP-1 cell line and declined thereafter. In an experiment to test the dose dependency of transcription of cytokines, transcription increased at a dose of 10 g/ml and the maximum expression was obtained at 100 g/ml, 6 hrs after exposure to Op extract. These findings suggest that Op extract is a potent stimulant of immune cells including T cells and macrophages, which acts by stimulating T cell proliferation and upregulating cytokines. These phenomena imply that some edible plants may be beneficial to living animals through the activation of immune functions.

Key words – *Opuntia ficus-indica*, Cactus, Lymphocytes, Macrophages, Cytokines

서 론

선인장은 소화기능의 향상, 창상치유 효과 및 류마치스 관절염의 증상완화 효능이 있는 것으로 알려져 있어 민간

요법에 일부 활용되어 오면서 관상용 뿐 만 아니라 기능성 식물로 재조명되고 있다(17). 최근 백 등(14)이 선인장열매 분말을 생쥐에 투여한 결과 항산화능을 확인하였을 뿐 만 아니라 선인장에 의한 항궤양 작용을 증명한 바 있다(9). 제주에서 특용작물로 재배되는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)은 다양한 형태의 기호식품으로 개발되어 시판되고 있으며 성분분석 결과 식이 섬유, 비타민 및 플라보노이드

*To whom all correspondence should be addressed
Tel · 064-754-3363, Fax : 064-756-3354,
E-mail: shmt@cheju.cheju.ac.kr

성분 등이 다량 함유되어있다고 한다(11). 일반적으로 식물체가 가지고 있는 플라보노이드 성분은 항염증작용 뿐 만 아니라 반응성 질소화합물을 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(5,6,15,19), 화살나무(7) 및 시호(2) 추출물 등과 같은 식물체 추출물은 면역계세포의 활성화에 직접 관여할 수 있다고 한다. 선인장의 경우 염증을 억제할 목적으로 사용되어 온 지는 오래 되었으나 이에 대한 연구는 많지 않다.

선인장을 민간요법에 활용한 류마치스관절염은 정확한 원인이 규명되어 있지는 않으나 자기면역성 질환의 일종으로 추정되고 있다(1,4). 병변이 나타나는 관절에는 자기면역성 림프구와 대식세포(macrophage)가 출현하며 동시에 이들 세포로부터 종양괴사인자를 비롯한 염증유도성 사이토카인이 증가된다(10,18). 특히, 종양괴사인자(TNF)는 정상적인 생체에서는 종양세포의 파괴 등 이로운 작용을 하지만 염증이 시작된 이후에는 정상조직도 손상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 자기면역성뇌척수염은 사람의 다발성 경화증의 동물모델(16)로 활용될 뿐 만 아니라 류마치스 등과 같은 자기면역성 질병에 대한 동물모델의 원형(prototype)으로 알려져 있다. 특히 류마치스관절염과 자기면역성뇌척수염 모델에서는 종양괴사인자가 염증의 시작에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

이 연구에서는 제주도에서 재배되는 손바닥선인장(제주도 기념물 35호)의 유효성분 탐색을 위한 기초연구로서 먼저 선인장추출물이 림프구의 증식능에 어떤 영향을 미치는지를 조사하고, 동시에 사람의 대식세포 세포주에서 종양괴사인자를 비롯한 사이토카인의 유도능을 평가하고자 하였다. 아울러 자기면역성뇌척수염 동물에 선인장 추출물을 투여한 후 척수조직의 변화를 나각적으로 분석하여 선인장 추출물이 질병모델 동물의 생체에 어떤 영향을 미칠 수 있는지를 평가하고자 한다.

재료 및 방법

선인장열매 추출

손바닥선인장 열매를 으갠 다음 동결건조 후 분말을 만들어 냉동 보관하였다. 알코올 추출물을 만들기 위해서는 선인장 열매를 70% 알코올에 2일간 침적하고 상층액을 회수하여 회전식 진공증발기로 추출하였다. 그 후 선인장 추

출물의 건조용량을 기준으로 100 mg/ml 되게 생리식염수로 희석한 후 원액으로 사용하였다.

T 세포 증식능 검사

이용한 세포는 IL-1에만 특이적인 T helper-cell line (D10S)으로 IL-1의 자극이 있을 때 분화 증식하는 특성을 가지고 있다(13). 세포증식능의 평가는 Orencole와 Dinarello (13)의 방법에 따라 MTT법을 활용하였으며 Table 2에 나타난 바와 같은 약물의 농도에 따라 투여하고, 3시간 후 증식능을 검사하였고, 이 후 2회 반복(총 3회) 실험 후 유의성을 검증하였다.

대식세포의 배양

THP 세포주는 배양상태에서 다양한 사이토카인을 생산할 수 있는 사람유래 대식세포이다(12). THP-1 세포(human monocytic leukemia line, American Type Culture Collection TIB 202)는 10% FCS을 첨가한 RPMI-1640 (Sigma Chemical Co.)을 이용하여 37°C CO₂ 항온기에서 배양하였다.

자극시험

선인장 추출물이 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 THP-1 세포주에서 사이토카인을 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 관찰하였다. 먼저 경시적인 변화를 확인하기 위하여 추출물을 배양액에 첨가한 후 30분, 1시간, 6시간, 12시간 및 24시간이 경과한 세포를 회수하였다. 그리고 자극물질의 농도에 따른 사이토카인의 변화를 확인하기 위하여 vehicle 및 다양한 농도(10 ug/ml - 2000 ug/ml)를 배양세포에 적용한 후 6시간제 세포를 회수하여 RT-PCR을 실시하였다.

RNA의 분리, cDNA합성 및 PCR

RNA분리를 위하여 total RNA isolation system (Promega)을 사용하였으며 RNA의 양은 260nm의 흡광도를 측정하여 정량 하였다. cDNA 합성은 Advantage RT-for PCR kit (Clontech)을 사용하여 합성하였다. cDNA합성이 끝난 후 GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer)을 이용하여 통상적인 방법에 따라 PCR을 수행하였으며 반응산물은 전기영동한 후 UV lamp 하에서 사진 촬영하였고, 그 결과를 densitometer (M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad Labora-

tories, Hercules, CA)로 측정하여 Fig. 1에서 사이토카인의 변화를 그래프로 나타내었다. 사용한 사이토카인 primer는 Table 1과 같다(12).

자기면역성뇌척수염 모델에 선인장 추출물의 투여시험 선인장 추출물이 자기면역성 질병 모델에 미치는 영향을 확인하기 위하여 자기면역성뇌척수염을 이용하였다(16). 뇌

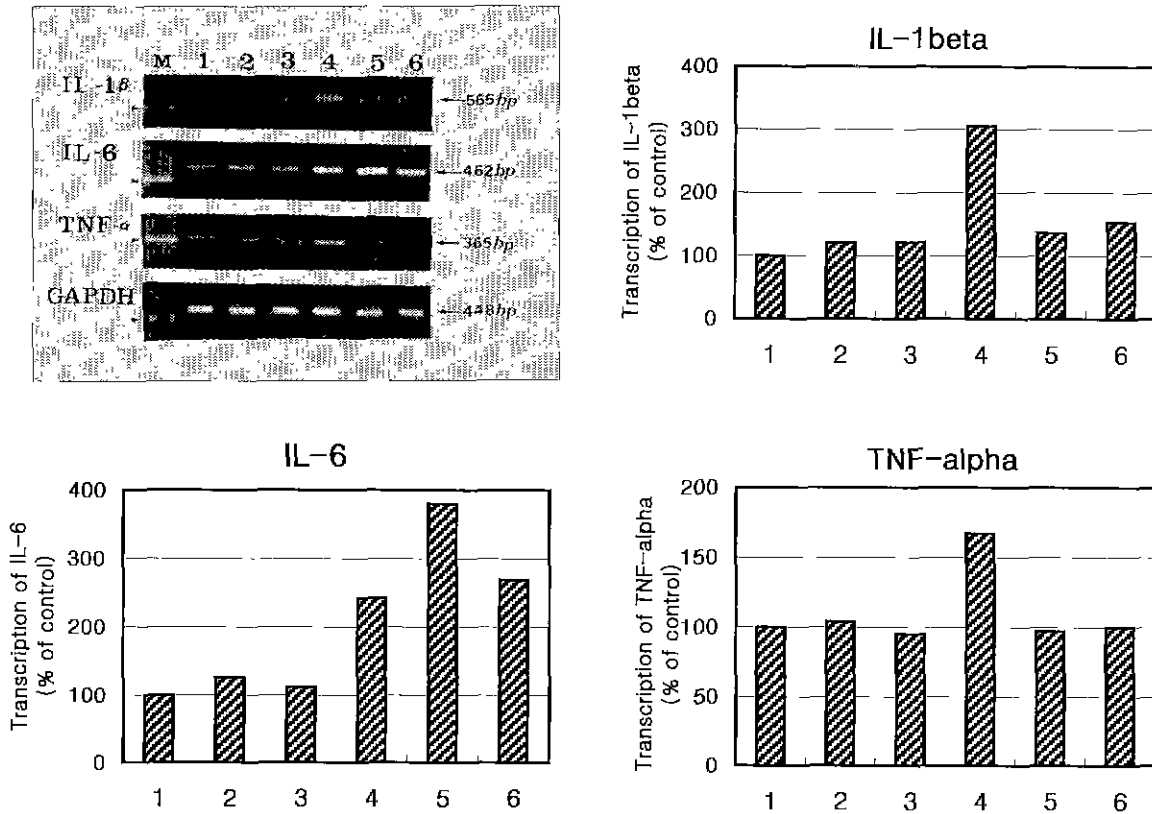


Fig. 1. Time dependent regulation of transcription of IL-1 beta (565 bp), IL-6 (462 bp), tumor necrosis factor-alpha (365 bp) and GAPDH (448 bp) in THP-1 cell line treated with *Opuntia ficus* extracts (100 ug/ml). M, molecular marker; lane 1, control; lane 2, 30minutes; lane 3, 1 hr; lane 4, 6 hrs; lane 5, 12 hrs; lane 6, 24 hrs. Arrowheads indicate 350 bp of molecular marker. Graphs, Semiquantitative analyses at time dependent transcription after treatment of *Opuntia ficus* extracts represent changes of IL-1 beta, IL-6 and TGF-alpha.

Table 1. Primers of cytokines used in this study

cytokine	sequence	molecular weight
Interleukin-1 beta	sense : 5'-GACACATGGATAACGAGGCT-3'	565 bp
	antisense : 5'-TTAGGAAGACACAAATTGCAT-3'	
Interleukin-6	sense : 5'-ATCCTCGACGGCATCTCAGCC-3'	462 bp
	antisense : 5'-CTACATTGCCGAAGAGCCCT-3'	
TNF-alpha	sense : 5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'	365 bp
	antisense : 5'-TTATCTCTCAGCTCCACGCCA-3'	
rat GAPDH	sense : 5'-ATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCT-3'	448 bp
	antisense : 5'-CACAGTCTTCTGAGTGGCAGT-3'	

척수염의 유도는 Shin 등(15)의 방법에 따라 뇌조직유제(1 mg/ml in PBS)를 *Macobacterium tuberculosis* H37Ra을 5 mg/ml되게 첨가한 complete Freund's adjuvant와 동량 혼합하여 랫트 뒷발바닥에 100 ul씩 피하주사하였다. 실험 동물은 면역 후 7 일간 매일 선인장 열매 추출물(100 mg/ea)을 경구 투여하고, 면역 후 21 일째 부검하였다. 척수조직 내 염증 반응을 평가하기 위하여 실험군별로 3-5 마리의 척수조직 표본을 만든 후 헤마톡실린-에오진 염색을 실시하였으며 염증정도의 평가를 위하여 혈관주위염증 세포침윤(perivascular cuffing)의 수를 산정한 후 대조군과 비교하였다(Student t-test). 동시에 척수조직에 침윤하는 염증세포와 신경아교세포와의 상관관계를 확인하기 위하여 일부 조직편은 2.5% glutaraldehyde 고정액 및 2% osmic acid에 고정한 후 전자현미경 표본을 만들어 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

선인장추출물이 T 세포 증식능에 미치는 영향

선인장 추출물은 vehicle 처리군에 비해 현저히 세포증식능이 있으며 IL-1과 동시 투여한 경우에도 IL-1단독 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 2). 선인장 추출물내 IL-1과 같은 물질의 존재여부를 확인하기 위하여 western blot를 실시하였으나 이와 같은 물질은 확인되지 않았다.

Table 2. Effect of *Opuntia ficus* (*Op*) extract (10 ug/ml - 50 ug/ml) on the proliferation of IL-1 sensitive T-cell line (D10S). *Op* extract significantly enhanced the proliferation of T cell clone (D10S) ($P < 0.05$).

Treatment	Mean ± S.E.
Control	0 ± 0.05
mIL-1 beta (1 ng/ml)	0.506 ± 0.15 ~
<i>Op</i> extract (10 ug/ml)	0.413 ± 0.13 *
<i>Op</i> extract (50 ug/ml)	0.381 ± 0.09 *
mIL-1 beta (1 ng/ml) + <i>Op</i> (10 ug/ml)	0.717 ± 0.17 *
mIL-1 beta (1 ng/ml) + <i>Op</i> (10 ug/ml)	0.823 ± 0.12 *

The data was expressed as mean ± S.E. of three experiments. Significant value by Student's paired T-test: *, $P < 0.05$.

선인장 추출물이 대식세포의 사이토카인 transcription에 미치는 영향

추출물의 농도별 평가로 확인하여 가장 효과적으로 사이토카인을 유도할 수 있는 선인장 추출물 농도(100 ug/ml)에서 IL-1 beta(약 3배), IL-6(약 2배) 및 TNF-alpha(약 1.5 배)의 발현을 선인장 추출물 투여 후 시간 경과에 따른 cytokine transcription 의 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 IL-1 beta(약 1.2 - 3.0배), IL-6(약 1.1 - 3.8배)는 대조군(Fig. 1, lane 1)에 비해 현저한 증가를 나타내었으며, IL-1beta는 투여 후 6시간 켜(Fig. 1, lane 4) 최고치(3.05배)를 나타내었고, IL-6는 투여 후 12시간 켜(Fig. 1, lane 5) 최고치(3.8배)를 나타내었으며 이 후 떨어지는 경향을 나타내었다. TNF-alpha는 대조군(Fig. 1, lane 1)에 비해 6시간 켜(Fig. 1, lane 4)로 최고치(1.67배)를 나타내었으며 이 후 떨어지는 경향을 나타내었다.

고 찰

선인장은 전통적으로 창상의 치유제, 항염증제로 민간에서 이용되어 왔으나 이에 대한 면역학적 효과는 규명된 바 많지 않다. 이 연구에서는 제주산 손바닥선인장 추출물이 면역계세포에 미치는 영향을 T 세포 증식능과 사람유래 대식세포주(THP-1 cell line) 에서 관찰하였다. 그 결과 손바닥선인장 추출물은 T-helper cell clone에서 IL-1과 같은 세포증식능이 있음을 확인하였고, 동시에 배양된 대식세포에서 종양괴사인자(TNF) 뿐만 아니라 IL-1, IL-6 등의 사이토카인을 유도할 수 있음을 확인하였으나, 각 사이토카인의 최고치인 6시간(IL-1 beta, TNF-alpha)과 12시간(IL-6)이후에의 감소는 autocrine에 의한 feedback 효과인지, 다른 조건에 따른 것인지는 알 수 없었다. 이 실험에서 mRNA의 증가를 직접 확인하기 위한 Northern blot을 행하지는 않았으나 이 실험에서 이용한 RT-PCR 방법은 loading 한 량이 일정하고 같은 조건에서 PCR을 시행하였으므로 그 결과도 유의성이 있었다.

선인장내 어떤 물질이 이와 같은 사이토카인 유도에 관여하는 지는 분명하지는 않으나 많은 식물 플라보노이드는 종양괴사인자를 유도할 수 있다고 한 것(8)으로 보아 선인장에서도 이와 유사한 물질이 있는 것으로 생각된다(11). 종양괴사인자는 암세포의 파괴에 결정적으로 작용하는 중

요한 인자이며 병원체의 사멸에도 깊이 관여한다. 따라서 선인장추출물은 적용되는 조건에 따라 다양한 기능을 할 수 있을 것으로 생각된다. 즉 피부와 같은 조직에서는 소량의 사이토카인 분비를 자극하여 창상 치유 등에 관여할 수 있을 것으로 생각되며, 면역계세포에 직접 자극되는 경우 사이토카인의 강력한 유도물질을 함유한 것으로 추정된다. 이와 같은 자극 물질은 여러 식물에서 함유되어 있을 수 있으며 선인장의 경우도 플라보노이드 성분은 주요 구성성분 중의 하나라고 한다(11). 플라보노이드는 다양한 유도체를 가지며 특히 정제된 플라보노이드가 염증의 초기 진행에 중요한 접착분자를 발현을 억제한다고 한다(3). 따라서 플라보노이드는 종류에 따라 주로 사이토카인에 의해 유도되는 접착분자의 발현을 억제할 수 있는 물질도 분비시킬 수 있는 것으로 생각된다. 본 실험의 경우 선인장 추출물은 이미 염증이 진행중인 경우 오히려 비특이적으로 T 세포의 증식과 대식세포로부터 염증성 싸이토카인의 분비를 촉진시켜 염증을 악화시킬 수 있음을 시사하고 있다.

선인장 추출물이 자기면역성 질병에 미치는 영향을 평가한 연구는 많지 않은 가운데 선인장이 일부 염증성 질병에 기호식품으로 이용되기도 한다. 이러한 선인장 추출물을 자기면역성뇌척수염에서 자기면역과 동시에 1주간 투여한 실험군에서는 마비증세의 첫 발현 일자 및 뒷다리의 마비 정도가 대조군에 비해 현저히 심하게 나타났으며, 이와 같은 소견은 선인장추출물이 면역계세포의 초기활성화를 통해 자기면역성뇌척수염을 촉진시킬 수 있는 것으로 생각된다. 이 실험에서는 마비정도를 명확히 구분하기 위하여 척수 조직 내 병변을 정량적으로 분석한 바 혈관주위염증세포침윤의 수가 선인장 추출물 투여군(4.2 ± 0.8)이 대조군(1.2 ± 0.4)에 비해 유의성($P < 0.05$)있게 관찰되었다. 이와 같은 소견은 전자현미경 검사에서도 확인되었으며 특히 선인장 투여군에서는 척수조직의 회백질의 등쪽뿌리부위에서 염증부위가 다소 심하게 나타났다. 이상의 소견으로 보아 선인장추출물은 면역계세포의 활성화를 통해 질병이 진행중인 자기면역성 질병의 경우 질병을 더욱 심화시킬 수 있는 것으로 나타났다.

요 약

손바닥 선인장은 항염증제로 민간에서 널리 이용되어

왔으나 염증세포에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바 많지 않다. 이 실험에서는 손바닥 선인장이 면역계세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 배양 T 세포에서 세포증식을 조사하고 배양된 대식세포에서는 여러 생리활성물질의 변화를 조사하였다. 그 결과 손바닥선인장 추출물은 배양 림프구의 증식을 촉진시킬 수 있음을 확인하였고 동시에 손바닥선인장 추출물은 대식세포를 자극하여 여러 종류의 생리활성물질(IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha)의 분비를 촉진시킬 수 있음을 증명하였다. 그러나 염증이 진행되고 있는 자기면역성질환모델동물에서는 염증을 심화시키는 것으로 나타났다. 이 실험결과 손바닥선인장 추출물은 정상적인 개체에서는 면역계세포의 활성화를 통해 생체 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 선인장추출물은 탐식세포주에서 IL-1 beta, IL-6 및 증양괴사인자(TNF)를 유도할 수 있어 건강한 생체에서는 항염증 작용을 가질 수 있을 것으로 생각되며 림프구의 증식을 통해 면역계의 활성화에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 이미 염증이 진행된 경우에는 염증을 촉진시킬 가능성이 높은 기호식품으로써 복용에 주의가 요망된다

감사의 글

본 연구의 일부는 한국학술진흥재단의 학술연구조성비(지역개발연구과제, 1997)의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. Cunnane, G., K. M. Hummel, U. Muller-Ladner, R. E. Gay and S. Gay. 1998. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.(Warsz)* 46, 1-7.
2. 조정곤, 김중면. 1994. 시호추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향. *대한수의학회지* 34, 769-780.
3. Gerritsen, M. E., W. W. Carley, G. E. Ranges, C. P. Shen, S. A. Phan, G. F. Ligon and C. A. Perry. 1995. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* 147, 278-292.
4. Gay, S., R. E. Gay and W. J. Koopman. 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: Two cellular mechanisms explain joint destruction. *Ann. Rheum. Dis.* 52, 39-47.
5. Haenen, G. R., J. B. Paqueay, R. E. Korthouwer and A.

- Bast. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **236**, 591-593.
6. Hollman, P. C., J. M. van Trijp, M. N. Buysman, M. S. van der Gaag, M. J. Mengelers, J. H. de Vries and M. B. Katan. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* **418**, 152-156.
7. 김종면, 최민순, 조정곤, 정영미, 박태욱. 1994. 화살나무 및 느릅나무 추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향. *대한수의학회지* **34**, 307-314.
8. Kunizane, H., H. Ueda and M. Yamazaki. 1995. Screening of phagocyte activators in plants; enhancement of TNF production by flavonoids. *Yakugaku Zasshi* **115**, 749-755.
9. Lee, H. J., Y. W. Lee and J. H. Kim. 1998. A study on antiulcer effects of *Opuntia dillenii* haw on stomach ulcer induced by water-immersion stress in rats. *J. food Hyg. Safety* **13**, 53-61.
10. Leistad, L. and M. Ostensen. 1998. Detection of cytokine mRNA in human, articular cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Scand. J. Rheumatol.* **27**, 61-67.
11. 이영철, 김홍만, 김영언, 황금희, 안채경. 1997. 선인장의 성분분석 및 가공식품의 품질개선 시험. 한국식품개발연구원 보고서.
12. Lim, J. S., S. H. Lee, E. Lee, Y. Kang, J. W. Kim, J. K. Kim, H. H. Kim, C. Lee, S. J. Kim, G. H. Bai, H. G. Lee, K. D. Kim, T. W. Chung and Y. K. Choe. 1997. Differential expression of ferritin heavy chain in THP-1 cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 981-988.
13. Orencole, S. F. and C. A. Dinarello. 1989. Characterization of a subclone (D10S) of the D10.G4.1 helper T-cell line which proliferate to attomolar concentrations of interleukin-1 in the absence of mitogens. *Cytokine* **1**, 14-22.
14. Paik, S. K., H. Y. Kim, S. D. Yang, C. W. Song, T. Shin and S. S. Han. 1999. The effects of *Opuntia ficus-indica* fruit powder on antioxidant parameters in senescence-accelerated mouse (SAM). *Kor. J. Gerontol.* **9**, 70-77.
15. Panes, J., M. E. Gerritsen, D. C. Anderson, M. Miyasaka and D. N. Granger. 1996. Apigerun inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation* **3**, 279-286.
16. Shin, T., T. Kojima, Y. Ishihara and Y. Matsumoto. 1995. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **56**, 171-178.
17. 송주택, 정현철, 김병무, 태희성. 1989. *한국식물대보감*. pp. 684-685, 한국자원식물연구원, 제일출판사.
18. Tanuma, N., T. Kojima, T. Shin, Y. Aikawa, T. Kohji, Y. Ishihara and Y. Matsumoto. 1997. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **73**, 197-206.
19. Wolle, J., R. R. Hill, E. Ferguson, L. J. Devall, B. K. Trivedi, R. S. Newton and U. Saxena. 1996. Selective inhibition of tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcription factor NF-kappa B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1501-1508.