

## 창출 성분의 장관면역 자극을 통한 골수세포 증식활성

유광원 · 신광순\*

고려대학교 생명공학원, \*경기대학교 식품생물공학과

### Bone Marrow Cell Proliferation Activity through Intestinal Immune System by the Components of *Atractylodes lancea* DC.

Kwang-Won Yu and Kwang-Soon Shin\*

Graduate school of Biotechnology, Korea University

\*Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University

Of hot-water extracts prepared from 10 herbal components of *Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang*, *Atractylodes lancea* DC. (ALR) and *Panax ginseng* C.A. Meyer (PG) showed the most potent bone marrow cell proliferation activity through intestinal immune system whereas other extracts did not have the activity except for *Astragalus membranaceus* Bunge (ASR) and *Angelica acutiloba* Kitagawa (AR) having low activity. Especially, ALR had the potent activity irrespective of classes of ALR, a place of production and the condition of breeding. In addition, we found that hot-water extract from *Atractylodes lancea* DC rhizomes (ALR-0) contributed mainly to Peyer's patch cells mediated-hematopoietic response of *Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang*. ALR-0 was further fractionated into MeOH-soluble fraction (ALR-1), MeOH-insoluble and EtOH-soluble fraction (ALR-2), and the crude polysaccharide fraction (ALR-3). Among these fractions, only ALR-3 showed potent stimulating activity for proliferation of bone marrow cells mediated by Peyer's patch cells, dose-dependently. In treatments of ALR-3 with NaIO<sub>4</sub>, NaClO<sub>2</sub>, and pronase, all significantly reduced the intestinal immune system modulating activity of ALR-3, and the activity of ALR-3 was much affected by NaIO<sub>4</sub> oxidation particularly. These results reveal that macromolecules, such as polysaccharide, rather than low-molecular-weight substances, are the potent intestinal immune system modulating compound of ALR.

**Key words :** *Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang*, *Atractylodes lancea* DC. intestinal immune system modulating activity, Peyer's patch cell, bone marrow cell

## 서 론

면역반응에 관여하는 세포들은 기능의 효과적인 수행을 위해 조직이나 기관을 구성하게 되는데, 이를 림프계(lymphoid system)라 한다. 림프계는 실질적으로 림프구를 생산하고 분화시키는 1차(혹은 중추) 림프 조직계(흉선, 골수)와, 림프구와 항원과의 접촉 또는 림프구간의 상호작용을 돕는 2차(혹은 말초) 림프 조직계(비장, 림프절 및 점막림프기관 등)로 분류된다<sup>(1)</sup>. 2차 림프 조직계 중 생체림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막림프기관은 수많은 필수 영양소들의 소화와 흡수의 중추적인 장소이면서 유해한 이물질들과 병원성 미생물들에 대한 물리적인 장벽 역할을 수행할 뿐만 아니라 면역 방

어계에서 중요한 면역학적 barrier 기능을 담당하고 있다<sup>(2)</sup>. 이러한 점막림프기관은 크게 기도에서의 폐조직과 폐포세포에 관련된 호흡 림프상 조직기관인 BALT(Bronchous Associated Lymphoid Tissue)<sup>(3)</sup>, 입천장과 코가 연결되는 부위의 비강관련 림프상 조직인 NALT(Nasal Associated Lymphoid Tissue)<sup>(4)</sup> 및 장관 림프상 조직으로서의 GALT(Gut Associated Lymphoid Tissue)로 구분할 수 있다<sup>(5)</sup>. 특히 GALT는 생체 내에서 가장 큰 림프상 조직으로 장관의 점막부위에 존재하며 장관면역계 내 IgA 면역반응을 비롯하여 생체방어에서 대단히 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>(6)</sup>. 한편, GALT에서의 여러 면역기관 중 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 inductive site로 알려져 있으며<sup>(7)</sup>, lumen dome은 항원의 흡수에 중요한 specialized M cell로 구성된 flattered epithelium으로 덮여있다<sup>(8)</sup>. 이와 같은 M cell은 lumen으로부터 가용성 항원, 세균과 바이러스 등을 pinocytosis나 phagocytosis에 의해 engulfment하여 림프세포에 이동시킴으로써 세포의 활성화에 기여한다<sup>(9)</sup>. 즉, 장관 내에 있는 Peyer's patch의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원

Corresponding author : Kwang-Soon Shin, Department of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Kyonggi-do 442-760, Korea  
Tel : 82-31-249-9655  
Fax : 82-31-253-1165  
E-mail : ksshin@kuic.kyonggi.ac.kr

**Table 1. Yields of hot-water extracts from component herbal medicines in Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang**

Scientific name	Korean name	Yields (%) <sup>1)</sup>
Roots of <i>Astragalus membranaceua</i> Bunge, ASR	황기	18.1
Barks of <i>Cinnamomum cassia</i> Blume, CC	계피	3.9
Roots of <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch var. <i>purpurea</i> Makino, RR	지황	20.0
Rhizomes of <i>Paeonia lactiflora</i> Pall, PR	작약	8.0
Rhizomes of <i>Cnidium officinale</i> Makino, CR	천궁	18.8
Rhizomes of <i>Atractylodes lancea</i> DC., ALR	창출	14.9
Roots of <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer, PG	인삼	13.7
Fungus of <i>Poria cocos</i> Wolf, PC	복령	0.7
Roots of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch et DC., GR	감초	17.1
Roots of <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa, AR	당귀	26.6

<sup>1)</sup>Yields of hot-water extracts against each herbal medicine (20 g). Each hot-water extract was prepared by decoction (3 time).

과 반응하여 활성화된 후, 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하여 MLN (Mesenteric Lymph Node, 장관막 림프절)을 거쳐 체내를 순환하게 된다<sup>(10)</sup>. 결국 Peyer's patch를 포함한 장관면역계는 장관의 면역학적 방어계에 기여할 뿐만 아니라 systemic inflammation을 조절하여 결과적으로 알레르기 반응, 자가면역질환 등을 효과적으로 억제할 수 있는 것이다.

십전대보탕은 일반적으로 수술 후 회복 중이거나 만성질환으로부터 고통을 호소하는 환자들의 신체조절을 위하여 복용되는 전통 한약처방으로 10가지의 생약으로 구성되어 있다(Table 1). 십전대보탕은 지금까지 phagocytosis와 mitogenic activity 등의 여러 면역작용을 증진시키는 것으로 알려져 있으며<sup>(11-13)</sup>, 암환자의 방사선이나 화학요법 치료에 따른 면역세포의 감소나 골수세포의 증식억제 등의 부작용에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>(14)</sup>.

본 실험은 전통 한약재가 구강을 통해 복용되기 때문에 장관면역을 자극할 수 있다는 충분한 가능성 하에, 일반적으로 수술 후 회복 중이거나 만성질환으로 부터 고통을 호소하는 환자들의 신체조절을 위하여 복용되며 항암제 치료 중 야기되는 골수세포의 증식억제를 완화시키는 것으로 알려진 전통 한약처방인 십전대보탕의 구성 천연물을 대상으로 장관면역 활성을 검토하였다. 또한 Hong 등은<sup>(15)</sup> 최근 십전대보탕의 열수추출물이 Peyer's patch의 T세포를 활성화하며 T세포로부터 유래되는 hematopoietic growth factor의 분비를 촉진시킨다고 보고하였는데, 이러한 장관면역 활성을 갖은 십전대보탕의 어떤 천연물이 장관면역 활성화에 중요하게 관여하는지를 구성생약들의 열수추출물을 이용하여 측정하고, 최대 활성 천연물의 열수추출물을 분획함으로써, 향후 이를 기능성 식품소재로 사용하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

십전대보탕 구성 천연물의 열수추출물에 관한 장관면역 활성을 검색하기 위한 10종의 생약은 Tsumura Co. Ltd.(Tokyo, Japan)로부터 구입하였으며(Table 1), 이 검색과정에서 활성이 있었던 황기, 인삼 및 창출은 수확시기나 재배지가 다른 여러 종류의 천연물을 Tsumura, Uchida Co. Ltd.(Tokyo,

Japan) 및 Tochimoto-Tenkaido Co. Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였으며(Table 2), 시료로 사용한 모든 생약의 표본은 고려대 생명공학원 식품가공학연구실에 보관하였다. 한편, 활성측정에 사용된 RPMI-1640 medium과 Hank's balanced salt solution(HBSS)은 Gibco사(Grand Island, NY)로부터 구입하였고 fetal bovine serum(FBS)는 Cell Culture Lab.사(Cleveland, OH), penicillin, streptomycin과 amphotericin B는 Flow Lab.사(Irvine, Scotland)로부터 구입하여 사용하였다. 또한 골수세포 증식을 측정하는 형광시약인 Alamar Blue™은 Alamar Bio-Sciences Inc.사(Sacramento, CA)의 제품을 사용하였다.

### 장관면역 활성검색을 위한 각종 천연물의 열수추출물 조제

십전대보탕의 10종의 구성 천연물 20 g에 각각, 증류수 400

**Table 2. List of herbal medicines on the different Lot No. and company**

Herbal Medicine	Lot No.	Company
Roots of <i>Astragalus membranaceua</i> Bunge (ASR)	093423	Uchida Co.
	270296	Tochimoto-Tenkaido Co.
	14060961	Tsumura Co.
	131023020	Tsumura Co.
Rhizomes of <i>Atractylodes lancea</i> DC. (ALR)	US092327	Uchida Co.
	250496	Tochimoto-Tenkaido Co.
	1406259	Tsumura Co.
Roots of <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer (PG)	131005010	Tsumura Co.
	100010	Uchida Co.
	092401	Uchida Co.
	061095	Tochimoto-Tenkaido Co.
	412-K086A-70824	Tochimoto-Tenkaido Co.
	0780304-Z086	Tochimoto-Tenkaido Co.
	100596	Tochimoto-Tenkaido Co.
	010995	Tochimoto-Tenkaido Co.
	180595	Tochimoto-Tenkaido Co.
	CB-707-2	Tochimoto-Tenkaido Co.
511-C086	Tochimoto-Tenkaido Co.	
80305-Z086-1	Tochimoto-Tenkaido Co.	
14058551	Tsumura Co.	
131015030	Tsumura Co.	

mL을 첨가하고 증류수가 반으로 감소될 때까지 추출한 후 금속체(No. 50)를 이용하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고, 7,000 rpm에서 30분간의 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 각각 천연물의 열수 추출물로 하였다. 또한 10종의 천연물 열수추출물 중 활성이 높았던 창출(ALR), 인삼(PG)과 황귀(ASR)는 생약의 산지와 수확시기에 따라 활성의 차이가 있을 수 있기에 이를 검토하기 위해 재배조건에 따른 다양한 종류의 생약을 여러 회사로부터 구입하여 동일방법으로 열수추출물을 조제한 후 장관면역 활성을 비교 검토하였다.

**장관면역 활성 검색을 통해 선정된 천연물의 용매별 희분의 조제**

십전대보탕 구성 천연물의 다양한 종류로부터 장관면역 활성검색을 통해 최적의 시료로 선정된 Tochimoto-Tenkaido사의 *Atractylodes lancea* DC. rhizome(창출, ALR, Lot No. 250496) 500 g을 증류수 10 L로 3회에 걸쳐 열수추출하고 원심분리하여 상등액을 회수한 후 투석 및 동결건조를 거쳐 *A. lancea*의 열수추출물(ALR-0, 수율; 40.5%)로 조제하였다. ALR-0은 다시 5 L의 메탄올로 1시간씩 5회에 걸쳐 환류를 거친 후 원심분리하여 메탄올-가용성 희분(ALR-1, 수율; 1.5%)과 비가용성 희분으로 분리되었다. 메탄올-비가용성 희분은 증류수에 재용해시킨 후 4배의 에탄올을 첨가하고 12시간 교반, 원심분리하여 메탄올-불용성/에탄올-가용성 희분(ALR-2, 수율; 0.2%)을 분리하고 침전물은 증류수에 재용해시키고, 투석 후 원심분리, 농축, 동결건조를 거쳐 조다당 희분(ALR-3, 수율; 5.3%)으로 조제하였다.

**창출 부터 조제한 조다당 희분(ALR-3)의 효소·화학적 처리**

**NaIO<sub>4</sub> 산화:** Yamada 등의 방법<sup>(16)</sup>에 의거하여 측정하였는데, 즉 조다당 희분(ALR-3) 50 mg에 25 mM NaIO<sub>4</sub>가 함유된 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 40 mL을 첨가하고 암실, 4°C에서 96시간 교반하였다. 잔여 periodate를 제거하기 위해 ethylene glycol을 첨가하고 투석을 행하여 얻은 비투석액에 NaBH<sub>4</sub>를 첨가하여 환원시키고 초산으로 중화 후 투석, 동결건조하여 ALR-3의 NaIO<sub>4</sub> 산화물(periodate-oxidized ALR-3, 수율; 62.2%)을 조제하였다.

**NaClO<sub>2</sub> 처리:** Oka 등의 방법<sup>(17)</sup>으로 조다당 희분(ALR-3) 20 mg을 4% acetic acid 20 mL에 용해시킨 후 100 mg의 NaClO<sub>2</sub>을 첨가하였다. 이 혼합액을 70°C에서 색깔이 변할 때까지 반응시킨 후 3 M NaOH로 중화시키고 투석, 동결건조하여 ALR-3의 NaClO<sub>2</sub> 처리물(chlorite-treated ALR-3, 수율; 50.7%)로 조제하였다.

**Pronase 분해:** Yamada 등의 방법<sup>(16)</sup>, 즉 조다당 희분(ALR-3) 20 mg에 30 mg Actinase E(Kaken-Kagaku Co. Ltd., Japan)가 포함된 10 mg CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.9) 20 mL을 첨가하고 37°C에서 48시간 소화시켰다. 반응은 0.1 N HCl로 중지시키고 투석, 동결건조하여 ALR-3의 단백질 분해물(pronase-digested ALR-3, 수율; 79.3%)로 조제하였다.

**장관면역 활성 측정법**

**시료와 Peyer's patch 세포와의 반응:** 장관면역 활성은 Hong 등의 방법<sup>(15)</sup> 따라 측정하였다. 즉 C3H/HeJ 마우스(5-7주, 암컷)의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution(HBSS)이 담긴 petri dish에 옮기고 금속체(No. 100)를 patch 위에 올려놓은 다음, 주사기 고무마개로 눌러 조직을 파괴하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켰다. 세포현탁액을 금속체(No. 200)로 여과한 후 RPMI 1640-FBS(5% FBS 함유된 RPMI-1640)로 세척하고 2×10<sup>6</sup> cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정된 후 96-well plate에 180 µL씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 20 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용하였다.

**회수한 Peyer's patch 세포 배양액과 골수세포와의 반응:** 동일종 마우스의 대퇴부 뼈를 이용하여 골수세포를 회수하는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세척하여 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정하고 96-well plate에 100 µL씩 분주하였다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간 배양하였다.

**장관면역 활성도 측정:** 장관면역의 활성도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™의 형광시약이 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다<sup>(18)</sup>. 즉, 골수세포와 위의 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar Blue™ 20 µL를 첨가한 다음 형광도를 SPECTRAFluor Plus(TECAN Co. Ltd., Austria)을 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여, 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다.

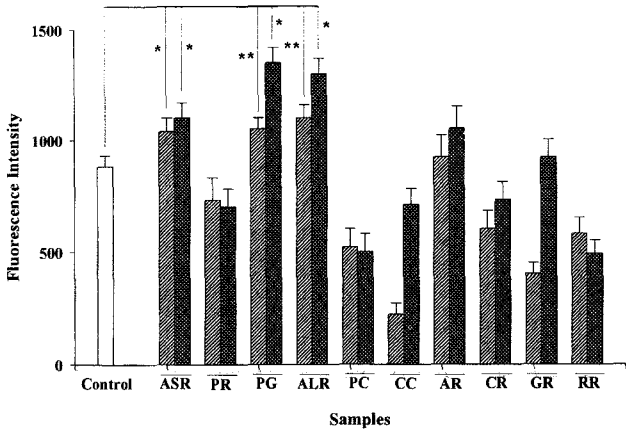
**통계처리**

실험결과들은 평균치±S.D.(standard deviation)로 나타내었고 student t-test를 이용, 통계처리하여 p<0.05 혹은 p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**10종 천연물의 열수추출물에 의한 장관면역 활성의 비교 검토**

십전대보탕은 황기(roots of *Astragalus membranacea* Bunge, ASR), 계피(barks of *Cinnamomum cassia* Blume, CC), 지황(roots of *Rehmannia glutinosa* Libosch var. *purpurea* Makino, RR), 작약(rhizomes of *Paeonia lactiflora* Pall, PR), 천궁(rhizomes of *Cnidium officinale* Makino, CR), 창출(rhizomes of *Atractylodes lancea* DC., ALR), 인삼(roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer, PG), 복령(fungus of *Poria cocos* Wolf, PC), 감초(roots of *Glycyrrhiza uralensis*

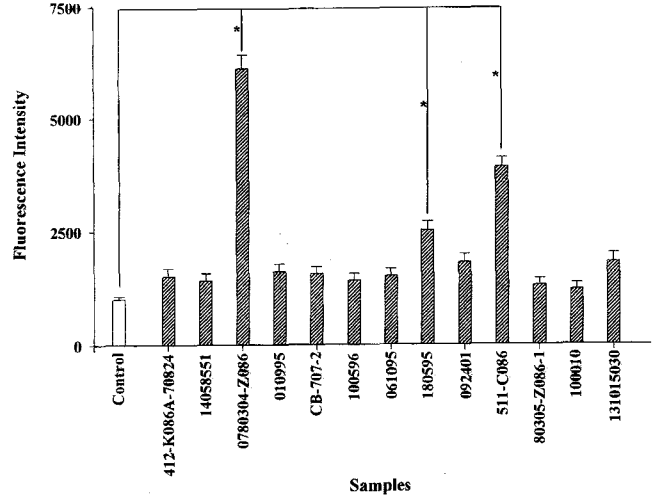


**Fig. 1. Intestinal immune system modulating activity of hot-water extracts obtained from 10 component herbal medicines**  
 □, Control (Saline); ▨, Sample (10 µg/mL); ▩, Sample (100 µg/mL). Values represent the means (n=4)±S.D. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01: Significance between the control and hot-water extract of each herbal medicine. ASR, roots of *Astragalus membranaceus* Bunge; PR, rhizomes of *Paeonia lactiflora* Pall; PG, roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer; ALR, rhizomes of *Atractylodes lancea* DC.; PC, fungus of *Poria cocos* Wolf; CC, barks of *Cinnamomum cassia* Blume; AR, roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa; CR, rhizomes of *Cnidium officinale* Makino; GR, roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et DC.; RR, roots of *Rehmannia glutinosa* Libosch var. *purpurea* Makino

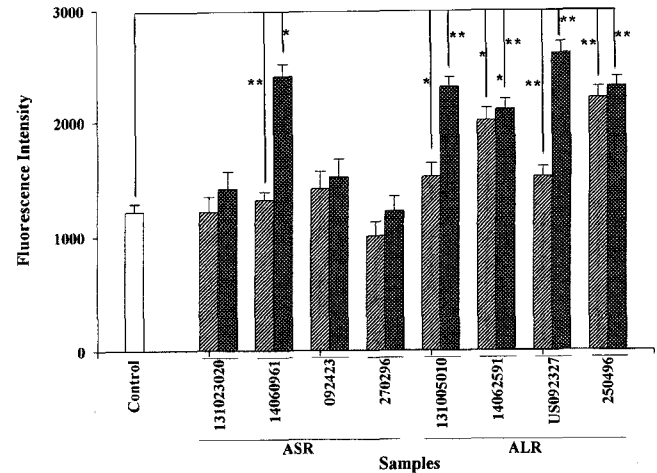
Fisch et DC., GR) 및 당귀(roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa, AR)의 10종의 천연물로부터 구성되고 있다(Table 1). 따라서 Hong 등<sup>(15)</sup>이 보고한 십전대보탕의 장관면역 활성이 주로 어느 천연물로부터 유래하고 있는가를 검토하기 위하여 10종의 구성 천연물의 열수추출물을 조제하고 그 추출물의 활성을 비교하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 낮은 수율을 보인 PR(8.0%), CC(3.9%) 및 PC(0.7%)를 제외하고는 대부분의 천연물이 10%이상의 수율을 보이고 있으며 특히 AR은 가장 높은 수율(26.6%)을 나타내었다. 한편, 열수추출물의 활성을 측정된 결과, ALR과 PG의 경우에 시료 농도 100 µg/mL에서 비교적 높은 활성이 나타날 뿐만 아니라 10 µg/mL의 낮은 농도에서도 대조군이나 다른 생약보다 높은 활성을 갖음을 알 수 있었으며, ASR과 AR에서도 약하지만 장관면역 활성이 대조군보다 높음을 보여주었다(Fig. 1). 그러나 그 외의 생약에서는 거의 활성을 보이지 않았으며 PC, CC와 RR 등에서는 오히려 대조군보다도 월등히 낮은 골수세포의 증식상태를 보여주고 있는데 이는 열수추출물에 세포독성을 갖는 물질이 함유되어 있는 것으로 추정된다(Fig. 1). 한편, 천연물의 경우에는 채취시기나 재배지에 따라 생리 활성에 큰 차이를 보일 수 있기 때문에 본 실험에서도 활성이 높은 ALR, PG 및 ASR에 관하여 그 수확시기나 산지가 다른 여러 종류의 생약에 관하여 육종조건에 따른 활성과의 관계를 비교 검토하였다.

**수확시기와 산지에 따른 PG, ALR 및 ASR의 장관면역 활성의 검토**

Table 2에 나타난 것처럼 여러 회사로부터 구입되어 수확 시기나 산지의 차이에 따라 다양한 Lot No.를 갖은 창출

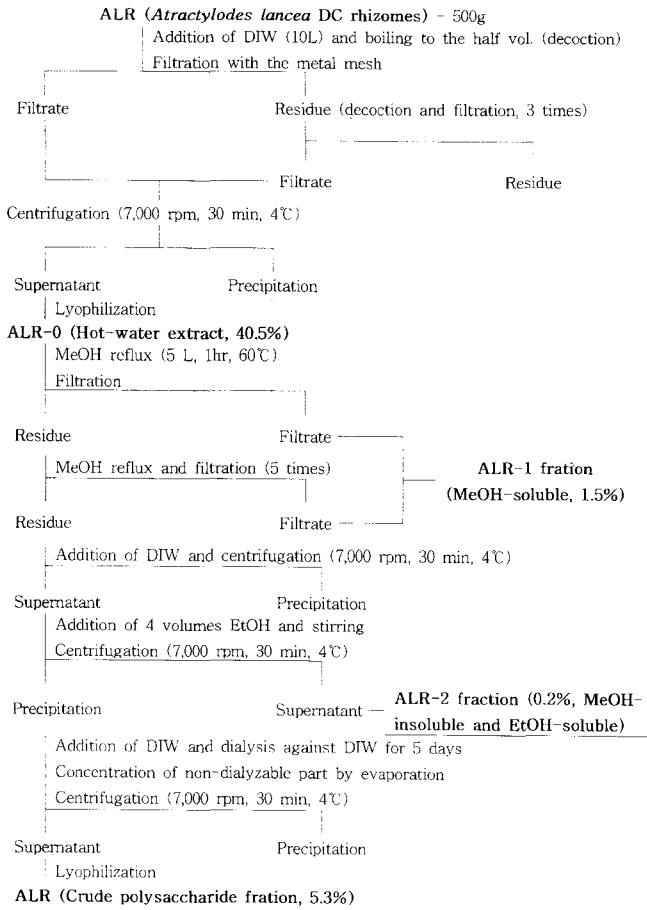


**Fig. 2. Intestinal immune system modulating activity of hot-water extracts obtained from various *Panax ginseng* C.A. Meyer**  
 □, Control (Saline); ▨, Sample (100 µg/mL). Values represent the means (n=4)±S.D. \*, p<0.05; Significance between the control and hot-water extract of each herbal medicine.



**Fig. 3. Intestinal immune system modulating activity of hot-water extracts obtained from various *Astragalus membranaceus* Bunge and *Atractylodes lancea* DC**  
 □, Control (Saline); ▨, Sample (50 µg/mL); ▩, Sample (100 µg/mL). Values represent the means (n=4)±S.D. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01: Significance between the control and hot-water extract of each herbal medicine. ASR, roots of *Astragalus membranaceus* Bunge; ALR, rhizomes of *Atractylodes lancea* DC.

(ALR), 인삼(PG), 황기(ASR)의 열수추출물에 대하여 활성을 검토한 결과, 큰 활성의 차이를 보이고 있어 수확시기나 산지에 따라 활성물질의 함유량에 변화가 있음을 시사하였다. PG에 있어서는 Tochimoto-Tenkaido사의 Lot No. 0780304-Z086 및 511-C086의 인삼은 높은 활성을 보였으나 다른 종류의 PG에서는 미약한 활성을 보였다(Fig. 2). 또한 ASR에 있어서도 Tsumura사의 Lot No. 14060961의 황기가 높은 활성을 갖는 것에 비해 그 외 생약에는 거의 활성이 없었다(Fig. 3). 그러나 ASR과 PG가 이런 경향을 보이는 것과는 달리 ALR은 시료에 관계없이 높은 활성을 보여주었으며(Fig. 3), 특히 Tochimoto-Tenkaido사의 Lot No. 250496의 창출은

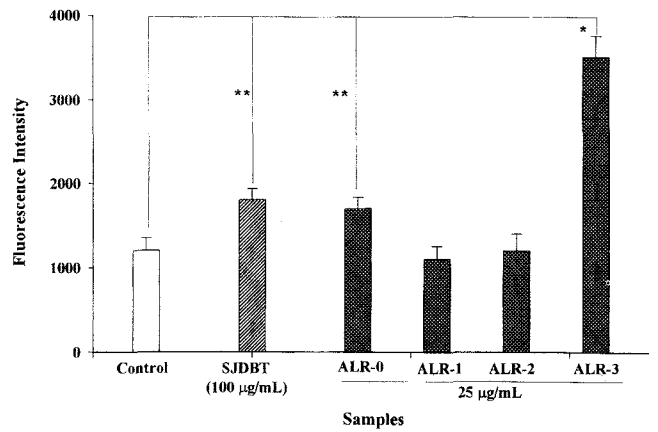


**Scheme 1. Preparation of the crude polysaccharide fraction of *Atractylodes lancea* DC. rhizomes**

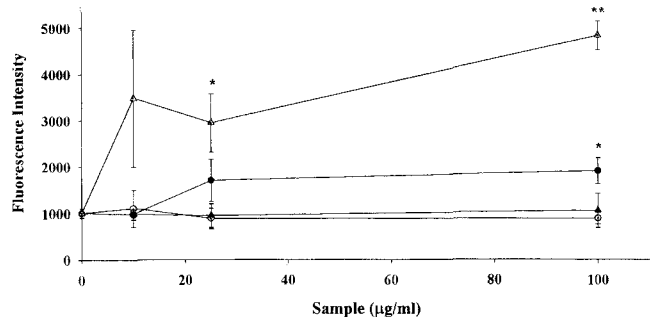
시료농도 100 µg/mL에서 뿐만 아니라 50 µg/mL의 농도에서도 높은 활성을 갖음을 알 수 있었다. 한편, 십전대보탕의 구성생약 중 장관면역 활성이 가장 우수한 것으로 선정된 이와 같은 창출은 digestive medicine이나 tonic으로 사용되고 있는 한약의 구성생약으로, 한방에서는 건조한 성질을 가지고 있어서 위장을 보호하는 역할을 하고 설사를 멎게하며 바람과 습기로 온몸이 저리고 배가 더부룩해지는 것을 치료하는 것으로 알려진 생약이다. 일반적으로 백출(*Atractylodes macrocephale* Koidz.)과 혼동하기 쉬우나 본초강목이 작성된 이후로는 백출은 습한 성질을 가지고 있어 비장을 보호하는 성질이 있기 때문에 창출과 구분하여 한방에서 사용되고 있다.

**활성 검색 후 선정된 창출의 분획과 활성검토**

검색을 통해 높은 활성을 갖고면서도 산지나 수확시기에 따라 활성에 큰 차이를 보이지 않은 창출 중에서도 저농도에서도 높은 활성을 갖는 Tochimoto-Tenkaido사의 Lot No. 250496의 열수추출물(ALR-0)을 Scheme 1과 같이 용매별 분획을 실시하여 장관면역 활성획분을 조제하였다. 즉, ALR-0 획분을 용매별로 분획하여 메탄올-가용성 획분(ALR-1), 메탄올-불용성이며 에탄올-가용성 획분(ALR-2) 및 조다당획분(ALR-3)을 얻었다. 이러한 획분들에 대하여 장관면역 활성을 측정된 결과(Fig. 4), 25 µg/mL의 낮은 농도에서 ALR-3의 획분만이 십전대보탕의 열수추출물이나 ALR-0 획분 보다 높

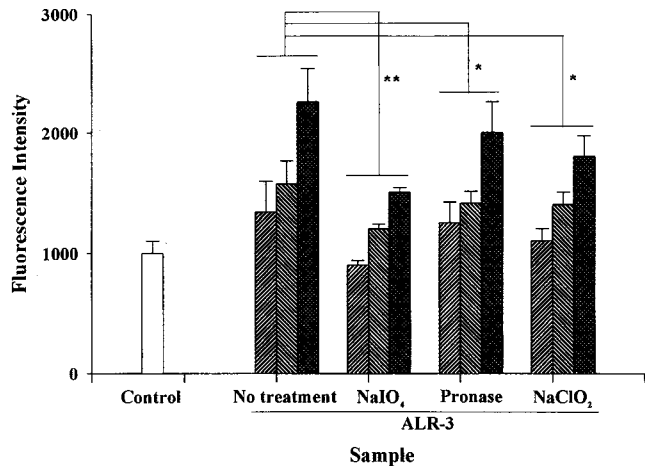


**Fig. 4. Intestinal immune system modulating activity of fractions obtained from hot-water extracts of *Atractylodes lancea* DC** □, Control (Saline); ▨, SJD BT (100 µg/mL); ▩, Sample (25 µg/mL). Values represent the means (n=4)±S.D. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01: Significance between the control and fractions obtained from *Atractylodes lancea* DC. rhizomes. SJD BT, hot-water extract of Sip-Jeon-Dae-Bo-Tang; ALR-0, hot-water extract of *A. lancea* DC. rhizomes; ALR-1, methanol-soluble fraction of ALR-0; ALR-2, methanol-insoluble and ethanol-soluble fraction of ALR-0; ALR-3, the crude polysaccharide fraction.



**Fig. 5. Dose-dependent curve of intestinal immune system modulating activity of fractions obtained from hot-water extracts of *Atractylodes lancea* DC** Values represent the means (n=4)±S.D. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01: Significance between the control and fractions obtained from *Atractylodes lancea* DC. rhizomes. ●, ALR-0; hot-water extract of *A. lancea* DC. rhizomes; ○, ALR-1; methanol-soluble fraction of ALR-0; ▲, ALR-2; methanol-insoluble and ethanol-soluble fraction of ALR-0; △, ALR-3; the crude polysaccharide fraction.

은 활성을 보였고 그 외 획분들에서는 활성이 거의 없었다. 또한 시료농도를 0부터 100 µg/mL까지 변화시키면서 각 획분들의 활성을 검토한 결과(Fig. 5)에서도 ALR-3 획분만이 첨가되는 시료농도의 증가에 따라 활성이 증가되었으며 다른 획분에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 ALR-0 획분의 장관면역 활성은 저분자 물질들이 주로 추출되는 메탄올이나 에탄올의 획분보다는 에탄올 첨가에 의해 고분자류가 대부분 침전되는 조다당 획분인 ALR-3 중의 물질에 장관면역 활성이 기인하고 있는 것으로 생각된다. 또한 지금까지 창출로부터는 sesquiterpenoids, triterpenoids와 acetylene 유도체 같은 저분자 물질들이 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase의 저해 활성, anti-gastric ulcer 활성 및 neuromuscle connection의 저해활성을 갖는 것으로 보고되어<sup>(19-21)</sup> 있는 반면에, 생리활성



**Fig. 6. Effect of chemical and enzymatic treatments of ALR-3 on intestinal immune system modulating activity**

□, Control (Saline); ▨, Sample (10 µg/mL); ▩, Sample (25 µg/mL); ■, Sample (100 µg/mL). Values represent the means (n=4) ±S.D. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; Significance between no treatment and chemical/enzymatic treatments of ALR-3. No treatment, the crude polysaccharide fraction of ALR-3; NaIO<sub>4</sub>, periodate-oxidized ALR-3; Pronase, pronase-digested ALR-3; NaClO<sub>2</sub>, chlorite-treated ALR-3

을 갖는 고분자 물질은 Tominaga 등의<sup>(22)</sup> 창출 고분자획분이 MMC-induced myelosuppression에 대하여 예방적인 효과가 있다는 보고 이외에는 거의 없는 실정으로 고분자 물질의 생리활성을 밝힌다는 점에서 본 실험의 또 다른 의의가 있다고 하겠다.

#### 창출의 조다당획분의 효소 및 화학적 처리에 의한 장관면역 활성의 변화

창출의 열수추출물로부터 에탄올 침전에 의해 조제된 조다당 획분(ALR-3)의 활성물질을 검토하기 위하여 ALR-3을 NaIO<sub>4</sub> 산화, NaClO<sub>2</sub> 처리 및 단백질 분해효소인 pronase에 의해 소화시킨 후 그 반응산물들에 대하여 활성을 비교 검토하였다. Fig. 6에서 보이는 것처럼 모든 처리군에서 ALR-3의 활성이 감소하였는데 특히 periodate 산화가 가장 많은 감소를 보였다. Periodate는 당의 구조에서 인접한 hydroxyl기를 갖는 탄소와 탄소사이를 산화시키는 특성을 갖고 있으므로<sup>(23)</sup> 활성에 중요하게 관여하는 물질이 당류일 가능성을 높게 해주고 있으며, 결과적으로 다당류의 당 구조가 파괴되어 활성이 감소한 것으로 생각된다. 또한 lignin의 분자 구조를 파괴하는 것으로 알려진<sup>(17)</sup> chlorite의 처리에 의해서도 활성이 약간 감소하였는데, 대부분 식물유래의 추출물질에는 많은 양의 lignin(당과 polyphenol과의 화합물)이 포함되어 있으므로 이러한 lignin류가 활성에 중요하게 관여하는 다당류와 함께 약하지만 활성에 관여하는 것으로 생각된다. 한편 pronase 처리에 의해서는 활성의 변화가 거의 일어나지 않았다. 이러한 결과로 미루어 ALR-3에 포함된 여러 물질 중 창출의 열수추출물의 장관면역 활성에 중요하게 관여하는 고분자 획분의 활성물질은 단백질보다는 다당일 것으로 추정되며 이러한 활성물질을 밝히기 위하여 향후 조다당 획분의 분획에 따른 정제와 구조분석이 필요하다고 생각된다.

## 요 약

십전대보탕의 10가지 구성 천연물을 열수추출하여 장관면역 활성을 비교 검토한 결과, 창출(*Atractylodes lancea* DC., ALR)과 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, PG)에서는 높은 활성을 나타내었으나 약한 활성을 갖는 황기(*Astragalus membranaceus*, ASR)와 당귀(*Angelica acutiloba* Kitagawa, AR)를 제외하고는 어떤 생약에서도 거의 활성을 갖지 않았다. 한편 이러한 활성을 가진 생약(ALR, PG와 ASR) 중에서도 특히 ALR만이 종류, 생산지 및 육종조건에 관계없이 항상 일정하게 높은 활성을 보여주어 창출의 열수추출물 획분(ALR-0)이 십전대보탕의 장관면역 활성에 중요하게 관여하는 시료로 선정되었다. ALR-0 획분은 다시 용매별로 분획되어 메탄올-가용성 획분(ALR-1), 메탄올-불용성/에탄올-가용성 획분(ALR-2) 및 조다당 획분(ALR-3)으로 조제되었으며 이들의 활성을 측정된 결과, 단지 ALR-3 획분만이 Peyer's patch를 통한 골수세포의 증식을 활성화시키는 장관면역 활성을 시료농도에 의존적으로 나타내었으며 그 외의 획분에는 활성이 거의 없었다. 한편 ALR-3 획분을 NaIO<sub>4</sub>, NaClO<sub>2</sub> 및 pronase로 처리한 후 활성을 측정된 결과, 모든 처리군에서 활성이 감소되었으며 특히 periodate 산화에 의해 심한 활성감소를 보였다. 이러한 결과를 토대로 십전대보탕의 장관면역 활성은 10종의 생약 중에서도 특히 창출이 중요하게 활성에 관여하는 것으로 보이며 다양한 용매별 분획을 통해 저분자보다는 에탄올에 침전된 고분자가 주요 함유물질인 조다당 획분이 장관면역 활성에 관여하는 것으로 추정되었다. 또한 periodate 산화에 의해 활성이 크게 감소되는 것으로 보아 주로 다당류가 창출의 장관면역에 중요한 활성물질인 것으로 생각된다.

## 문 헌

1. Playfair, J.H.L. In *Immunology at a Glance*, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, London, England (1987)
2. Bienenstock, J. and Befus, A.D. Review of mucosal immunology. *Immunol.* 41: 249-270 (1980)
3. Bienenstock, J. and Clancy, R. Bronchial mucosal lymphoid tissue. In *Handbook of Mucosal Immunology*, Orga, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, J. (ed.), pp. 529-538, Academic Press, San Diego, USA (1994)
4. Krahenbuhl, J-P. and Neutra, M.R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72: 853-879 (1992)
5. Kato, T. and Owen, R.L. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In *Handbook of Mucosal Immunology*, Orga, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J.R. and Bienenstock, J. (ed.), pp. 11-26, Academic Press, San Diego, USA (1994)
6. Mowat, A.M. and Viney, J.L. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol. rev.* 156: 145-166 (1997)
7. Sminia, T., Wilders, M.M., Janse, E.M. and Hoefsmit, E.C. Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat. *Immunobiology* 164: 136-143 (1983)
8. Trier, J. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20: 531-547 (1991)
9. Bockman, D.E. and Cooper, M.D. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of labricus, appendix and Peyer's patches: An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 136: 455-478 (1973)
10. James, S.P. and Zeitz, M. Human gastrointestinal mucosal T cells.

- In Handbook of Mucosal Immunology, Pearay, L.O., Jiri, M., Michael, E.L., Warren, S., Jerry, R.M. and John, B. (ed.), pp. 275-285, Academic Press, London, England (1994)
11. Komatsu, Y., Takemoto, N., Maruyama, H., Tsuchiya, H., Aburada, M., Hosoya, E., Shinohara, S. and Hamada, H. Effect of Juzentaihoto on the anti-SRBC response in mice. *Jap. J. Inflammat.* 6: 405-408 (1986)
  12. Maruyama, H., Kawamura, H., Takemoto, N., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E. Effect of Juzentaihoto on phagocytes. *Jap. J. Inflammat.* 8: 461-465 (1988)
  13. Takemoto, N., Murayama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E. Mitogenic activity of Juzentaihoto on murine lymphoid cells. *Jap. J. Inflammat.* 9: 137-140 (1989)
  14. Kawamura, H., Maruyama, H., Takemoto, N., Komatsu, Y., Aburada, M., Ikehara, S. and Hosoya, E. Accelerating effects of Japanese Kampo medicine on recovery of murine haematopoietic stem cells after administration of Mitomycin C. *Int. J. Immunotherapy* 5: 35-42 (1989)
  15. Hong, T., Matsumoto, T., Kiyohara, H. and Yamada, H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360 (1998)
  16. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.-C., Takemoto, N., Komatsu, Y., Kawamura, H., Aburada, M. and Hosoya, E. Fractionation and characterization of mitogenic and anti-complementary active fraction from Kampo (Japanese herbal) medicine 'Juzen-Taiho-To'. *Planta Med.* 56: 386-391 (1990)
  17. Oka, H., Ohno, N., Iwanaga, S., Izumi, S., Kawakita, T., Nomoto, K. and Yadomae, T. Characterization of mitogenic substances in the hot-water extracts of *Bupeuri Radix*. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 757-765 (1995)
  18. Page, B., Page, M. and Noel, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3: 473-476 (1993)
  19. Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K., Kano, I. Specific inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by atractylon, a major component of *Byaku-jutsu*, by interaction with enzyme in the E2 state. *Biochem. Pharmacol.* 51: 339-343 (1996)
  20. Hwang, J.-M., Tseng, T.-H., Hsieh, Y.-S., Chou, F.-P., Wang, C.-J. and Chu, C.-Y. Inhibitory effect of atractylon on tert-butylhydroperoxide induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 70: 640-644 (1996)
  21. Kimura, M., Diwan, P.V., Yanagi, S., Kon-no, Y., Nojima, H. and Kimura, I. Potentiating effects of  $\beta$ -eudesmol-related cyclohexylidene derivatives on succinylcholine-induced neuromuscular block in isolated phrenic nerve-diaphragm muscles of normal and alloxan-diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 407-410 (1995)
  22. Tominaga, Y., Sugiyama, K. Effect of Kampo medicines on MMC-induced myelosuppression in mice. II. Effect of ingredients of *Shi-Kunshi-To*. *J. Trad. Med.* 11: 332-323 (1994)
  23. Hay, G.W., Lewis, B.A. and Smith, F. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R.L. (ed), 5: p. 347, Academic Press Inc., New York and London, USA and England (1973)

(2000년 10월 24일 접수)