Immune Network Vol. 1, No. 2, 2001

백작약 조다당분획에 의한 B 세포 증식의 특성

한국원자력연구소 방사선 식품생명공학기술개발과제팀[1], 순천대학교 생물학과[2], 충남대학교 생물학과[3]

박혜란[1] · 함연호[1] · 이성태[2] · 백상기[3] · 조성기[1]*

Characteristics of B cell proliferation by polysaccharide fraction of *Paeonia japonica* miyabe

Hae-Ran Park[1], Yeon-Ho Ham[1], Sung-Tae Yee[2], Sang-Gi Paik[3], Sung-Kee Jo[1]*

Radiation Food Technology and Bioscience Team, Korea Atomic Energy Research Institute[1]; Department of Biology, Sunchon National University[2]; Department of Biology, Chungnam National University[3]

Background : *Paeonia japonica* Miyabe is a medicinal plant which has been widely used as a component of blood-building decoctions (Chinese medicinal concept: Bu-Xie). The immunopharmacological characteristics of the extract of *Paeonia japonica* (PJ) were investigated. **Methods :** The effects of fractions of PJ extract on lymphocyte proliferation were measured by H^3-thymidine incorporation assay. The proliferated lymphocyte subsets were analyzed in flow cytometry. The subset cell populations of spleen cells were separated by magnetic cell separation system, and their proliferation by the extract were investigated. The effect of the extract on antibody production was determined in mice challenged with sheep red blood cells (SRBC) using hemolytic plaque forming cell assay. **Results :** Spleen cells were proliferated by water extract of PJ. Polysaccharide fraction (PJ-P) of the extract was most active in the proliferation. It was found in flow cytometry that the lymphocyte subset proliferated by PJ-P was B cell population. Among the separated subset cell populations, T cell-depleted cell population and macrophage-depleted cell population were most proliferated by PJ-P. However, positively selected populations of B cells and T cells were not proliferated by PJ-P. These results indicate that B cell proliferation by PJ-P may require the assistance of macrophages or T cells. These results suggest that firstly PJ-P may stimulate macrophages or T cells, and then B cells are activated. The number of antibody-secreting cells was increased by administration of PJ-P in mice immunized with SRBC as a T-dependent antigen. **Conclusion :** These results suggest that macrophages and accessory cells are directly activated by PJ-P and then helper T cells and B cells are indirectly activated. As the results, immune responses might be coordinately improved. In conclusion, PJ-P, a polysaccharide of *P. japonica*, may be a characteristic immunostimulator, which is analogous to polysaccharides such as lentinan, PSK and ginsan.

Key Words: *Paeonia japonica*, immunomodulator, splenocyte, FACS, MACS

Correspondence : Sung-Kee Jo, Ph.D., Radiation Food Technology and Bioscience Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusong, Daejon 305-353
Tel: 042-868-8063, Fax: 042-868-8043, E-mail: skjo@kaeri.re.kr

서 론

생체의 방어체계 중 면역계는 침입한 항원에 대하여

활성화되는 각종 면역세포들의 작용으로 숙주를 방어한다. 이 면역세포들의 증식, 분화 및 작용기전은 다양한 종류의 외부자극에 의해 조절·활성화된다. 이런 관점에서 보아 질병상태는 면역반응성이 저하된 상태라고 전제하고, 암 환자 또는 노약자 등에서 면역반응을 증진시킬 수 있는 물질을 추구하게 되었다. 즉, 면역증강제를 적용하여 면역반응성을 회복시키거나 증진시킴으로써 질병을 퇴치할 수 있다는 개념이 등장하였다(1-3). 현재까지 알려진 면역증강제는 세포분열을 포함한 일련의 세포생리를 변화시키는 외부자극물질 중의 일종이다. 그 중 비특이적 면역증강제란 면역반응을 향상시키기 위해 복잡한 면역조절계의 하나 또는 그 이상의 구성요소를 간접적인 방법을 통해 조절시키는 방법이라고 정의 할 수 있다(4).

면역증강제의 시초는 1970년대 초에 암치료를 위해 연구되어진 Bacillus Calmette-Guerin (BCG)으로 급성백혈병 환자에게 적용하면서 시작되었다(2). 그 후, 1980년대부터는 여러 cytokine, lymphokine, growth factor 등을 이용하여 생체의 상태를 호전시키려는 노력이 경주되어 왔다(1). 그러나 이들의 임상적 이용에는 많은 문제점들이 있는데, 대표적인 예로는 생체내에 대량의 cytokine을 투입하여도 혈중내 적절한 농도를 유지하기 어렵고 독성이 매우 심하며, 또한 cytokine은 단독이 아닌 여러 종류가 상호간의 작용을 상승 또는 억제하기 때문에 하나 또는 두 종류의 cytokine을 대량 투여하더라도 그 효과는 크게 기대할 수 없다. 이에 많은 연구자들은 독성이 약하고 생체내에서 여러 면역세포를 자극하여 cytokine을 유도하는 물질에 재 초점을 맞추고 있다(5-11). 이에 대표적인 예로 lentinan (12-14), schizofilan (15), polysaccharide K(PSK)(16,17) 그리고 ginsan (18-21)등을 들 수 있다. 이와 같이 비특이적 면역증강물질은 식물체의 고분자 물질 즉, polysaccharide에 의한다고 보고되고 있다.

한편, Lee (22)는 면역증강제를 이용한 질병치료보다는 예방측면을 강조하였으며, 또한 현재까지 개발된 면역증강제를 혼합하여 더 좋은 효과를 얻는 것을 제안하였다. 이러한 맥락에서 현재 일본에서는 생약재료 뿐만 아니라 십전대보탕 및 보중익기탕 등의 탕제들의 면역증강효과에 대해 많은 연구를 하고 있다(23-26).

본 연구에서는 한방 보혈탕제의 구성 생약재로 사용빈도가 높은 백작약의 면역증진 효과를 관찰하고자 하였다. 백작약은 미나리아재비과 Ranunculaceae Paeonia 속에 속하며, 1960년대에 백작약의 주요성분인 paeoniflorin이 분리되었다(27). 그후 Egger 등(28)에 의해 paeoniflorin의 미약한 항염증 작용 및 스트레스성 궤양 예방효과가 보고되었다. 또한, 김(29)에 의한 백작약의 항스트레스효과에 대한 보고와 정(30)에 의한 백작약수침의 진통과 항경련효과에 대한 보고가 있다. 백작약은 수천 년부터 동양에서 보혈에 상등 약재로 사용되어왔다. 현재까지 많은 연구에도 불구하고 백작약의 면역증진작용에 관한 체계적인 연구보고는 국내·외에서 아직 나오지 않고 있다. 이에 본 연구에서 백작약으로부터 추출한 조다당분획의 면역증진 효과와 작용특성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 C57BL/6 mouse는 한국 대한실험동물센터에서 번식 사육한 특정병원체 부재(SPF) 생쥐를 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전까지는 사육실의 온도가 22±2℃, 습도가 55 60%로 유지되며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되는 환경에서 키우고, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2. 시료제조

백작약(Paeoniae Radix; root of *Paeonia japonica* Miyabe)은 전라남도 보성에서 구입하여 사용하였다. 백작약의 10배 부피의 증류수로 2회 열수 추출하고 여과한 후 감압농축하여 물추출물(PJ-T)로 사용하였다. 물추출물에 100% ethanol를 4배 가량 가해 4℃에서 24시간 방치하여 생긴 침전물을 수거하여 조다당분획(PJ-P)으로 사용하였고, 상층액은 ethanol 분획(PJ-E)으로 사용하였다. 각 시료를 사용하기 전에, limulus amebocyte lysate (E-TOXATE, sigma) test를 이용하여 시료내에 lipopolysaccharide (LPS)가 혼입되지 않았음을 확인하였다(31).

3. 일반성분분석

백작약의 열수추출물 및 조다당분획의 일반구성성분을 파악하기 위하여 단백질, 총당 및 요산의 함량을 측정하였다. 단백질의 정량은 Rowry 법에 따라 2N NaOH 용액으로 100℃에서 가수분해한 다음 lowry 시약을 처리하고 folin 시약을 가하여 발색되는 감청색을 UV-

spectrophotometer로 660nm에서 흡광도를 측정하였다(32). 총당의 정량은 phenol-H_2SO_4 법에 따라 시료에 페놀을 가한 후 농황산을 가하여 가수분해 후 발색되는 노란색을 UV-spectrophotometer로 480nm에서 흡광도를 측정하였다(33). 요산의 정량은 metahydroxydiphenyl 법을 이용하였으며 시료에 $Na_2B_4O_7/H_2SO_4$ 용액을 가하여 100℃에서 5분동안 가수분해한 후 m-hydroxydiphenyl 용액을 첨가하여 발색되는 자주색을 UV-spectrophotometer로 520nm에서 흡광도를 측정하였다(34).

4. 생쥐 비장림프구 분리 및 배양

생쥐를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% ethanol로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하여 멸균된 Hank's balanced salt solution (HBSS; GIBCO)이 담긴 petri-dish에서 세척후, 5% FBS-HBSS가 담긴 petri-dish로 옮겨, 멸균된 수술용 칼로 칼집을 낸 뒤 핀셋으로 지분거려 세포를 부유시킨 후 약 1분간 정치시켜 조직파편을 제거한 후 1500 rpm에서 10분간 원심침전시켰다. 혼입된 적혈구를 제거하기 위하여 cell pellet을 ACK buffer (Tris-NH_4Cl)에 현탁하여 1분간 정치한 뒤 FBS 10ml을 첨가하였다. 그리고 HBSS로 2회 세척하고 trypan blue 염색법으로 살아있는 세포수를 계수한 후 완전배지에 적정 농도로 조정하였다.

생쥐 비장세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicilline-streptomycine이 함유된 RPMI 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

5. 시험관 내에서 면역세포 활성화(proliferation) 측정

백작약 물추출물과 각 분획물들의 비장림프구 활성화 정도를 ^{3}H-thymidine uptake 방법으로 측정하였다. 생쥐 비장세포를 96-well flat bottomed microplate (Corning)의 각 well에 2×10^5개씩 완전배지로 희석하여 분주하고, 백작약의 각 분획물들과 LPS 그리고 ConA를 각 농도별로 첨가한 후 2일, 3일, 4일, 5일 동안 배양하였다. 실험은 시료별로 3배수로 시행하였다. 배양 후 well 당 1.5 μCi의 ^{3}H-thymidine을 가한 후 4시간 더 배양하였고 cell harvester (Inotech)를 이용하여 glass fiber filter strip에 세포를 수거하였다. 건조된 filter paper를 떼어 sintillation vial에 옮긴 후 scintillation cocktail을 3 ㎖씩 넣고 β-scintillation counter로 ^{3}H-thymidine incorporation정도를 cpm으로 측정하였다.

6. 증식된 림프구의 subset 분석 (Fluorescence-activated cell sorter; FACS 분석)

생쥐 비장림프구를 2×10^5/well씩 분주하고, 백작약 조다당분획 PJ-P를 100 ㎍/㎖의 농도로 첨가하여 3일, 4일, 5일간 배양한 후 증식된 림프구의 subset를 FACS를 이용하여 분석하였다. FACS 분석은 다음과 같이 시행하였다. 배양세포를 수거하고 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포를 측정한 후, FACS medium으로 세척하여 각 tube에 10^6개씩 맞추어 분주하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 FcγRIII block으로 CD16/CD32 antibody (Parmingen)를 첨가하여 ice bath에서 5분간 처리하였다. 그 후에 각 tube에 표지하고자 하는 표식자에 대한 단일클론 항체를 각각 첨가하여 ice bath에서 40분간 배양하였다. 표지에 사용된 단일클론항체는 B 세포를 위해서는 anti-IgM antibody, 전체 T 세포를 위해서는 anti-Thy1.2 antibody, helper T 세포를 위해서는 anti-CD4 antibody, cytotoxic T 세포를 위해서는 anti-CD8 antibody를 사용하였는데, 모두 Pharmingen 제품으로서 FITC-conjugated antibody였다. 표지 후 FACS medium으로 2번 세척하여 FACStar (CULTER, USA)로 세포표면 표식자에 결합된 단일클론항체의 양을 세포당으로 분석하였다.

7. MACS로 분리한 림프구 subset별 PJ-P에 의한 증식 분석

조다당분획 PJ-P에 의해 증식되는 세포가 주로 어느 subset의 세포인지 또는 어느 subset 세포의 도움을 받는지 알아보기 위해 magnetic cell sorter (MACS: Miltenyi Biotec, Germany)를 이용하여 림프구를 subset별로 분리하였다. 대식세포를 제거하기 위해서 100mm dish에 비장세포를 2시간 배양하여 dish에 붙지 않은 세포만을 수거하여 사용하였다. T세포를 위해서는 CD90 microbeads, B세포를 위해서는 CD19 microbeads를 사용하였다. 비장세포를 위 두 종류의 microbeads와 함께 ice-bath에서 30분간 배양한 후 T세포 또는 B세포를 제거하기 위해서는 depletion column인 25AS column을 사용하였고, T세포 또는 B세포만을 얻기 위해서는 positive column인 25RS column을 사용하였다. 이렇게 분리된 세포들을 수거하고 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포들을 세었다. 각 분리된 세포들을 각 well에 2×10^5개씩 분주하고 PJ-P 100 ㎍/㎖를 첨가하여 2일, 3일, 4일, 5일 동안 배양한 후, 면역세포 활성화 측정방법과 동일하게

^{3}H-thymidine incorporation정도를 cpm으로 측정하였다.

8. Hemolytic plaque forming cell assay (35)

C57BL/6 생쥐에 sheep red blood cell(SRBC)을 1× 10^{9} cells/0.2 ㎖씩 꼬리정맥으로 주사하였다. 조다당분획 PJ-P 투여는 100 ㎎/㎏ B.W./0.2 ㎖씩 복강주사로 실시하였다. 대조군으로는 생리식염수를 0.2 ㎖씩 복강주사하였다. SRBC 주사 후 만 4일에 생쥐의 비장림프구를 분리하였다. 분리된 전체 림프구를 세고, 7× 10^{6}cells/㎖로 맞추어 ice-bath에 넣어놓고, SRBC는 생리식염수로 3번 세척 후 RPMI 1640에 20%가 되도록 현탁시켜 ice-bath에 넣어놓았다. 위의 두 세포를 고정하기 위해서는 0.5% agarose-RPMI 용액을 준비하였다. 이렇게 준비된 림프구와 SRBC, 0.5% agarose 용액을 100 ㎕, 100 ㎕, 1,600 ㎕씩 더하여 가볍게 혼합 후 준비한 petri- dish (Corning)에 전량을 부어 고루 퍼지도록 하여 잘 굳도록 방치하였다. 굳은 것을 확인한 후 37℃ 5% CO_2 incubator에 넣어 2시간 배양 후에 GPC (Guinea pig complement)를 1:70으로 희석하여 각 petri-dish에 600 ㎕씩 넣고 다시 2시간 더 배양하였다. 배양이 끝나면 plaque를 관찰하고 그 수를 세어 림프구의 희석배수를 고려하여 PFC/spleen으로 환산하였다.

결 과

1. 백작약추출물의 화학적 조성

본 실험에 사용한 백작약 추출물 및 조다당분획물의 화학적 성질을 알아보기 위해 단백질함량, 총당함량 및 uronic acid 함량을 측정하였다. 그 결과 table Ⅰ에서 나타냈듯이 총당함량은 PJ-T가 46.3% 및 PJ-P가 70.6%였다. 단백질 함량은 각각의 분획에서 20.7% 및 19.8%였고 uronic acid 함량은 2.2% 및 15.1% 였다.

2. 백작약 분획물에 의한 림프구 증식 효과

Fig.1에서 보듯이 배양 3일째에 조다당분획 PJ-P는 100 ㎍/㎖에서 51,616 cpm으로 음성대조군에 비해 약 45배정도 높은 림프구 증식효과를 보였다. 열수 총추출물 PJ-T는 같은 농도에서 22,773 cpm으로 PJ-P보다는 약한 증식효과를 보였다. 에탄올 분획 PJ-E의 경우, 낮은 농도인 10 ㎍/㎖과 30 ㎍/㎖에서는 음성대조군에 비해 약 2 4배 정도 증식효과를 보였고, 100 ㎍/㎖에서는 음성대조군보다 낮은 cpm이 측정되어 세포독성을 보였다. 이들 결과로 보아 PJ-P는 PJ-T보다 약 2.3배 높은 증식효과를 보였다. 백작약 분획물에 의한 배양 시간별 림프구 증식효과는 Fig. 2에 나타내었다. PJ-T는 3일째에 최대 림프구 증식효과를 보였으나 PJ-P는 4일째 최대의 림프구 증식능을 보였다. PJ-P에 의한 림프구 증식 양상과는 대조적으로, 양성대조군으로 사용한 B세포 mitogen인 LPS는 배양 2일째에, T세포 mitogen인 ConA는 배양 2 3일에 최대의 증식효과를 보였다.

3. PJ-P에 의해 증식된 림프구의 subset 규명

PJ-P에 의하여 증식되는 림프구의 subset을 알아보기

Table Ⅰ. Chemical composition of the extract of *Paeonia japonica Miyabe*

Component	Content (%)	
	Water extract	Crude polysaccharide
Protein	20.7	19.8
Total sugar	46.3	70.6
Uronic acid	2.2	15.1

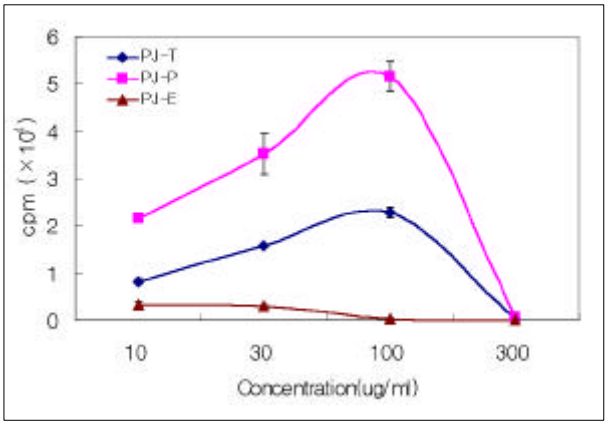

Fig. 1. Effects of fractions of *P. japonica* extract on proliferation of splenic lymphocytes *in vitro*. Spleen cells (2× 10^{5}/well) were cultured with fraction of the extract on 96-well flat bottomed plates for 3 days. After culture, the degree of lymphocyte proliferation was measured by the incorporation of ^{3}H-thymidine after a 4-hr pulsing with 1.5 ㎕Ci ^{3}H-TdR. The data present the mean values±standard deviation of three experiments. PJ-T, total water extract of *P. japonica*; PJ-P, polysaccharide fraction of the extract; PJ-E, ethanol fraction of the extract.

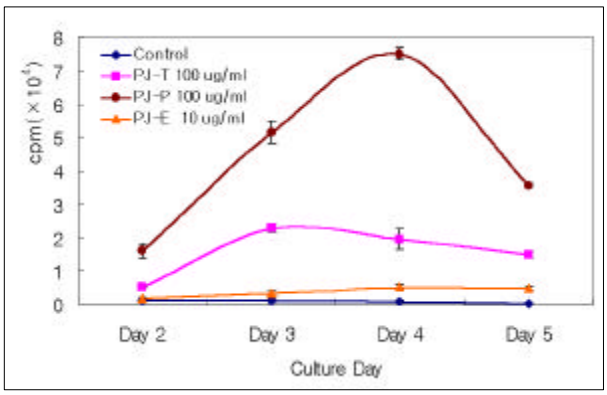

Fig. 2. Time course of the proliferation of splenic lymphocytes by the fractions of *P. japonica* extract. Spleen cells (2×10^5/well) were cultured with fraction of the extract at a optimal concentration. On day 2, 3 and 4 after culture, the degree of lymphocyte proliferation was measured by the incorporation of ^{3}H-thymidine after a 4-hr pulsing with 1.5 μCi ^{3}H-TdR. The data present the mean values±standard deviation of three experiments. The cpm of LPS was 139213, 48734, 18570 on day 2, 3, 4, respectively. The cpm of ConA was 149178, 121190, 16214 on day 2, 3, 4, respectively. PJ-T, total water extract of *P. japonica*; PJ-P, polysaccharide fraction of the extract; PJ-E, ethanol fraction of the extract.

위해 100μg/mℓ의 PJ-P를 첨가하여 3일, 4일, 5일 간 배양한 세포를 FACS로 분석하였다(Table Ⅱ). Table Ⅱ에 나타낸 바와 같이 배양 전에는 IgM 세포, Thy 1.2 세포가 약 60% 와 35%를 차지하였는데, 대조군의 경우 3일간 배양한 후에는 각각이 약 74%와 25%를 차지하였다. PJ-P를 첨가하여 비장림프구를 배양하였을 경우 배양 3일째에 IgM 세포가 82.6%, Thy 1.2 세포가 10.6%를 차지하였으며, 배양 4일째에는 86%, 13.8% 그리고, 배양 5일째는 90%와 9.2%를 각각 차지하였다. 따라서 PJ-P는 비장세포 중 주로 B세포를 증식시킨다는 것을 알 수 있었다. 한편, B 세포 mitogen인 LPS를 첨가하여 3일간 배양한 경우, IgM 세포가 약 88%이고 Thy 1.2 세포는 약 9%를 차지하였다. 그리고 T세포 mitogen인 ConA를 첨가하여 배양한 경우에 세포는 IgM 세포가 약 20%이고 Thy 1.2 세포가 약 84%를 차지하였다.

4. PJ-P에 의한 림프구 증식에 요구되는 subset 규명

PJ-P는 어느 subset 세포를 증식시킬 수 있는지 또는 어느 subset 세포가 그 증식에 꼭 필요한지를 알아보기 위해 MACS를 이용하여 세포를 subset별로 분리하여 증

Table Ⅱ. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets of splenocytes cultured with PJ-P

Culture day	Sample treatments	Conc. (μg/mℓ)	Percent of lymphocyte subsets			
			IgM	Thy 1.2	CD4	CD8
Day 0			60.4	35.2	20.8	14.4
Day 3	medium		74.2	25.2	12.6	10.8
	PJ-P	100	82.6	10.6	7.4	3.5
	LPS	60	87.7	8.5	NT	NT
	ConA	5	20.0	83.7	14.3	64.6
Day 4	PJ-P	100	86.0	13.8	7.2	3.6
Day 5	PJ-P	100	90.0	9.2	6.7	4.8

NT, not tested.

Table Ⅲ. Flow cytometric conformation of the cell populations separated from spleen cells by MACS

Separation of lymphocyte subsets from spleen cells	Percent of lymphocyte subsets	
	IgM	Thy 1.2(CD90)
Depletion of T cells	89.2	5.9
Depletion of B cells	3.8	91.2
Positive selection of T cells	1.7	NT
Positive selection of B cells	99.0	NT

NT, not tested.

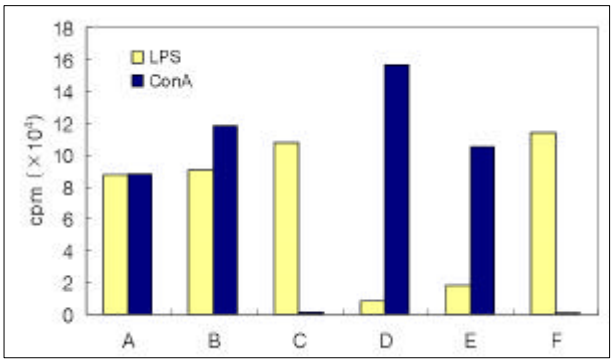

Fig. 3. Conformation of the proliferation of lymphocyte subsets by LPS and ConA. LPS and ConA was given to six kinds of cell preparations such as total cell population (A), macrophage-depleted cell population (B), T cell-depleted cell population (C), B cell-depleted cell population (D), positively selected T cell population (E), and positively selected B cell population (F) by MACS. After 2 days of culture, the degree of lymphocyte proliferation was measured by the incorporation of ^{3}H-TdR after a 4-hr pulsing with 2 μCi ^{3}H-TdR.

식정도를 시험하였다. 먼저 MACS에 의한 세포 분리가 잘 되었는지를 확인하기 위하여 FACS로 분석한 결과, depletion의 경우 약 90%, positive selection의 경우 약 99%까지의 순도를 보였다(Table Ⅲ). 또한, 분리한 세포를 B 세포 mitogen인 LPS와 T 세포 mitogen인 ConA와 함께 배양하여 2일째에 증식정도를 비교한 결과(Fig. 3), 순도가 높게 분리되었음을 확인하였다. 다만, positive selection 된 T 세포의 경우 LPS에 의한 미약한 증식은 LPS가 T 세포와 대식세포를 자극할 수 있다는 보고(5)를 전제로 한다면 B 세포의 혼입 가능성을 배제할 수 있다. PJ-P를 첨가하여 각 분획세포군을 배양한 결과(Fig. 4), 총비장세포군, 대식세포를 제거한 나머지 세포군 및 T 세포를 제거한 세포군은 배양 2일째부터 5일째까지 계속 증식되었다. 이 3가지 세포군의 증식정도를 비교하면 T 세포군 제거군 〉 대식세포 제거군 〉 비장 총세포군의 순으로 증식효과가 높았다. B 세포제거군은 배양 3

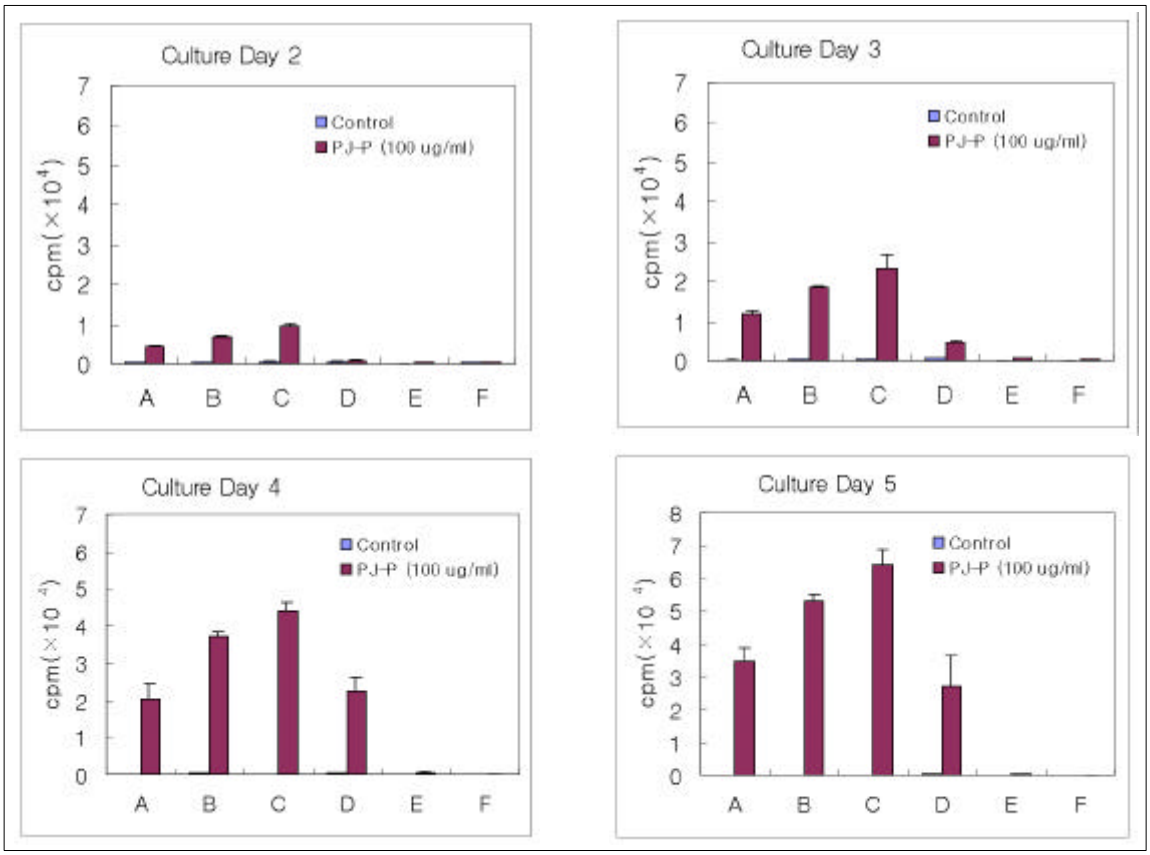

Fig. 4. The proliferation pattern of lymphocyte subsets by PJ-P. PJ-P(100 μg/mℓ) was given to six kinds of cell preparations such as total cell population(A), macrophage-depleted cell population(B), T cell-depleted cell population(C), B cell-depleted cell population(D), positively selected T cell population(E), and positively selected B cell population(F). On day 2, 3, 4 and 5 after incubation, the degree of the lymphocyte proliferation was measured by the incorporation of ^{3}H-thymidine into the cells.

일째부터 증식되기 시작하여 5일째까지 계속 증식되었다. 한편, T 세포 또는 B 세포만을 positive selection하여 PJ-P를 첨가하여 배양했을 때에는 배양 5일까지도 증식되지 않았다.

5. PJ-P에 의한 항체 생성 증강 효과

시험관내에서 백작약의 조다당분획 PJ-P에 의한 B 세포 증식에는 대식세포 또는 T 세포의 도움이 필요하다는 것을 알았다. 이에 PJ-P에 의한 B 세포 증식효과가 생체내에서도 나타나는지를 확인하기 위하여 T 세포 의존성 항원인 SRBC에 대한 항체 생성에 미치는 효과를 관찰하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이, SRBC를 정맥내로 주사한 생쥐에서 생리식염수 주사 군에 비해 PJ-P (100 mg/kg B.W.) 주사 군에서 항원 SRBC에 대한 항체를 생산하는 세포가 약 2.7배로 높게 생성되었다. 이 결과로 보아 PJ-P는 T 세포 의존성 항체생산을 증진시킨다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

백작약추출물이 림프구의 증식에 미치는 영향을 분획별로 관찰한 결과 비장세포의 증식반응은 조다당분획인 PJ-P에 의함을 알 수 있었다. 이것은 현재까지 연구되어 온 식물추출물의 면역증강효과가 다당분획에 의한다는 것과 일치하였다. PJ-P에 의하여 증식된 비장세포는 대부분이 B 세포였으며, 이 결과로 보아 PJ-P는 세포성 면역계보다는 체액성 면역계에 더 관여할 것으로 사료된다. 이러한 결과는 이미 연구되어온 인삼추출물(18-21)이나 lentinan (12-14)이 세포성 면역계를 증진시킨다는 연구결과와는 다른 기전으로 면역반응을 증진시키는 것으로 생각되어진다.

PJ-P가 B 세포를 증식시키는데 있어서 어느 subset 세포가 그 증식에 꼭 필요한지를 알아보기 위해 MACS를 이용하여 세포를 subset별로 분리하여 증식정도를 시험하였다. PJ-P는 B 세포를 증진시키는데 있어서 직접적으로 B 세포를 증진시키기보다는 대식세포나 T세포의 필수적인 도움하에서 B 세포를 증식시킴을 알 수 있었으며, B 세포가 배제된 상태에서는 T 세포도 대식세포의 도움이 있을 경우 배양 4일부터는 증식될 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 PJ-P가 대식세포와 T세포를 자극하여 cytokines를 분비하게 함으로서 B 세포가 증식됨을 강하게 암시하였다. 이 결과는 당귀의 다당분획이 B 세포만 존재 시에 림프구의 최대 증식효과를 나타낸 보고(10)와 잘 알려진 B 세포 mitogen인 LPS 또한 B 세포만 존재 시에 최대 증진효과를 나타낸 결과(Fig. 3)와 비교할 때, PJ-P는 B 세포를 증식시킴에 있어서 당귀 다당체와 그리고 LPS와는 다른 작용기전으로 림프구를 활성화시키는 것으로 사료된다.

이 결과는 lentinan (12-14), schizofilan (15), PSK (16, 17), ginsan (18-21) 등의 비특이적 면역증강제(3)의 작용기전과 비교해 볼 때, PJ-P에 의해 궁극적으로 활성화되는 세포아군이 B세포인 점이 서로 다른 특징이다. 결과적으로 PJ-P는 먼저 대식세포 혹은 T 세포에 영향을 주어 cytokine을 유도하고 이 들은 다시 대식세포와 B 세포를 활성화시키는 것으로 가정해 볼 수 있으며, 이에 대하여 유전자 발현 및 cytokine 생성에 관한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

또한, PJ-P가 생체내에서 T-dependent antigen에 대한 항체 생성 세포수를 증가시킨 결과로 보아, PJ-P는 T 세포의 도움으로 B 세포의 증식과 더불어 항체 생성 기능을 갖도록 분화 유도하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 백작약 조다당분획인 PJ-P는 다른 식물체로부터 추출된 다당체와 상호보완적인 면역조절물질로 활용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Oldham RK : Biological response modifier. JNCI 70; 789-796, 1983
2. Wimer BM : The ideal biological response modifier. Mol Biother 1;311-317, 1989
3. Galbraith GM : Therapeutic Immunomodulation. Dermatol Clin 6;561-568, 1988
4. Gatenby PA : Immunopotentiation. In: Roitt IM, Delves PJ eds. : Encyclopedia of immunology, p847-852, Academic Press, 1992
5. Hadden JW : Immunostimulants. Immunology today 14;275-280, 1993
6. Chang J : Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements?. Biochemical Pharmacology 59;211-219, 2000
7. Audibert FM, Lise LD : Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunology Today 14;281-284 1993
8. Liu J : FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. Immunolgy

Today 14;290-295, 1993

9. Bergelson LD : Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. Immunology Today 16;483-486, 1995
10. Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, Kim HM : Characteristic immunostimulation by angelan isolated from Angelica gigas Nakai. Immunopharmacology 40;39-48, 1998
11. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH : Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. J of Ethnopharmacology 72;167-172, 2000
12. Maeda YY, Watanabe ST, Chihara G, Rokutanda M : T-cell mediated vascular dilatation and hemorrhage induced by antitumor polysaccharide. Intl J Immunopharmacol 6;493-501, 1984
13. Hamuro J, Takatsuki F, suga T, Kikuchi T, Suzuki M : Synergistic antimetastatic effects of lentinan and interleukin 2 with pre- and post-operative treatments. Jpn J Cancer Res 85;1288-1297, 1994
14. Chihara G, Suga T, Hamuro J, Takasuka N, Maeda YY, Sasaki T, Shiio T : Antitumor and metastasis- inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator. Cancer Detection and Prevention supplement 1;423-443, 1987
15. Sugawara I, Lee KC, Wong M : Schzsphyllum (SPG)-treated macrophages and antitumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. Cancer Immunol Immunother 16;137-144, 1984
16. Akiyama J, Kawamura T, Gotohda E, Yamada Y, Hosokawa M, Kodama T, Kobayashi H : Immunotherapy of transplated KMT-17 tumor in rats by combination of cyclo-phosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. Cancer Res 37;3042, 1977
17. Tsuru S, Nomoto K : Effects of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. J Clin Lab Immunol 4;215-219, 1983
18. Yun YS, Lee YS, Jo SK, Jung IS : Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from Panax ginseng as an immunomodulator. Planta Medica 59;485-578, 1993
19. Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS : Acidic polysaccaride from Panax ginseng, Ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. Planta Medica 64;110-115, 1998
20. Kim YS, Kang KS, Kim SI : Study on antitumor and immunomodulating ativities of polysaccharide fractions from Panax ginseng: Comparison of effets of neutral and acidic polysaccharide fraction. Arch. Pharm Res 13;330-337, 1990
21. Attele AS, Wu JA, Yuan CS : Ginseng Pharmacology. Biochemical Pharmacology 58;1685-1693, 1999
22. Lee YS : Isolation of antineoplastic immunomodulator from the roots of Panax ginseng C.A. Meyer, Thesis of doctor degree, College of pharmacy, Ewha Woman's University 1994
23. Matsumoto T, Sakurai MH, Kiyohara H, Yamada H : Orally administered decoction of Kampo(Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To" modulates cytokine secretion and induces NKT cells in mouse liver. Immunopharmacology 46;149-161, 2000
24. Li T, Tamada K, Abe K, Tada H, Onoe Y, Tatsugami K, Harada M, Kubo C, Nomoto K : The restoration of the antitumor T cell response from stress-induced suppression using a traditional chinese herbal medicine Hochu-ekki-to(TJ-41: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang). Immunopharmacology 43;11-21, 1999
25. Ohtake N, Suzuki R, Daihuhara H, Nakai Y, Yamamoto M, Amagaya S, Ishige A, Sasaki H, Komatsu Y, Fukuda K, Hayashi S : Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saiko-to. International J of Immunopharmacology 22;419-430, 2000
26. Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H : Lignin-carbohydrate complexes: Intestinal immune system modulating ingredients in Kampo(Japanese Herbal) medicine, Ju-zen-Taiho-To. Planta Medica 66;20-24, 2000
27. Aimi N, Inaba M, Watanabe M, Shibata S : Chemical studies on the oriental plant drugs. XXIII. Paeoniflorin, a glucoside of Chinese paeony root. Tetrahedron 25;1825-1838, 1969
28. Egger K, Keil M : Flavone glycosides in the flowers of *Paeonia arborea, P. suffruicosa*. Planta 88;154- 156, 1969
29. **김도순 : 시호·백작약의 항스트레스효과에 관한 실험적 연구. 석사학위논문, 원광대학교** 1990

30. **정동주 : 백작약수침이 생쥐의 진통 및 항경련효과에 미치는 영향. 석사학위논문, 대구한의과대학** 1986
31. Yin, E.T., Galanos C., Kinsky S. : Picogram-sensitivity assay for enodotixin: Gelation of Limulus polyphemus blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from gram-negative bacteria. Biochem Biophys Acta 261;284-289, 1972
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr ALm Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193;265-275, 1951
33. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28;350-356, 1956
34. Lelly Blumenkrantz, Gustav Asboe-Hansen : New method for quantitative determination of Uronic Acids. Analytical Biochemistry 54;484-489, 1973
35. Jerne NK, Nordin AA : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140;450, 1963

각 주

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.