

상기생의 트라이테르펜 및 페놀성 성분의 면역조절 작용

박대섭 · 최상진 · 김경란 · 이선미 · 이강노 · 표석능*
성균관대학교 약학대학

Immunodulatory Activity of Triterpenes and Phenolic Compounds from *Viscum Album L.*

Dae-Sup PARK, Sang Zin CHOI, Kyung Ran KIM, Sun Mee LEE, Kang Ro LEE and Suhkneung PYO*
College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-ku, Suwon City, Kyunggi-do 440-746

(Received Feb. 18, 2003 ; accepted Mar. 11, 2003)

Abstract – Plants are known as important source in the search for new drugs. The twelve compounds from *Viscum album* (Loranthaceae), lupeol (1), betulonic acid (2), betulonic acid (3), terminic acid (4), ursolic acid (5), β -sitosterol (6), α -spinasterol (7), oleanolic acid (8), 5-hydroxy-1-(4'-hydroxyphenyl)-7-(4''-hydroxyphenyl)-hepta-1-en-3-on (9), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-glucoside (10), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-[apiosyl(1 \rightarrow 2)]glucoside (11) and syringin (12) were evaluated for their immunomodulatory properties. Compounds 6 and 11 induced the macrophage tumoricidal activity and the lymphocyte blastogenesis. In addition, these compounds stimulated the macrophages to induce the production of TNF- α and NO. These findings suggest that compounds 6 and 11 are modulating various elements of the host immune response.

Keywords □ *Viscum album L.*, T and B lymphocyte, macrophage, TNF- α , NO

면역작용을 증강시키기 위해서 오래전부터 면역활성화 물질을 사용해 왔다. 면역작용의 조절은 자가 면역 질환, 조직이식 및 암치료 등 다양한 질병에 적용할 수 있다. 최근에 암치료에 대한 생물학적 물질과 면역 활성화 물질이 개발되고 발견되어 왔는데 천연물질로부터 새로운 면역조절제의 탐색에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 이중 천연에서 분리된 저분자물질들에 대해서도 면역조절 효과 연구가 다수 수행되었는데 Zexbrevin, helenalin, alantolacton과 diketocoriolin B 등이 면역반응을 조절한다고 알려져 있다(Wagner 등, 1985).

상기생 (*Viscum album L.*)은 겨우살이과(Loranthaceae)에 속하는 참나무, 팽나무, 물오리나무, 밤나무 및 자작나무에 기생하는 늘푸른떨기나무로서 우리나라 전역에 분포하고 산후요통, 동상, 진정, 통경 및 동맥경화 등의 치료약으로서 사용되어 왔으며 민간에서는 면역증강 및 항암보조 요법제로 널리 사용되어 왔다(Bae, 2000). 천연물 유래 항암 및 면역활성물질 연구에서 상기생이 민간에서 항암 및 면역증강제로 많이 사용됨을 알게 되었으며 1차적으로 상기생의 일반성분을 연구보고 한바 있다

(Choi 등, 2001). 그러나 이들 성분이 면역세포에 미치는 영향은 보고된바 없어 면역활성을 평가하기 위해 B cell과 T cell의 세포증식력의 변화를 통하여 항원특이성 면역반응을 담당하는 세포들을 검토하였고, macrophage의 세포독성능력을 측정하여 자연면역반응을 담당하는 세포에 미치는 영향을 알아보았다.

실험방법

실험동물 및 시료처리

실험 동물은 8주령의 자성 C57BL/6계 생쥐를 Charles River Lab. (Japan)으로부터 분양 받아 실험하였다. 상기생에서 분리한 화합물 (1-12)을 0.5% DMSO와 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) 용액에 완전히 녹여 0.22 μ m filter에 여과하여 100, 10, 1 μ g/mL 농도로 만들었다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma사 (St Louis, MO)에서 구입하였다.

시료의 분리 및 동정

실험에 사용된 상기생의 화합물 (1-12)의 분리 및 동정은 이미 보고한 방법으로 수행하였다(Choi 등, 2001). 즉, 화합물 1은 lupeol, 화합물 2는 betulonic acid, 화합물

*To whom correspondence should be addressed.

3은 betulinic acid, 화합물 4는 terminic acid, 화합물 5는 ursolic acid, 화합물 6은 β -sitosterol, 화합물 7은 α -spinasterol, 화합물 8은 oleanolic acid, 화합물 9는 5-hydroxy-1-(4'-hydroxyphenyl)-7-(4''-hydroxyphenyl)-hepta-1-en-3-one, 화합물 10 및 11은 각각 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-glucoside 및 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-[apiosyl(1 \rightarrow 2)] glucoside, 화합물 12는 syringin으로 각각 동정하였다(Choi 등, 2001). 모든 세포배양 시약, thioglycollate broth와 시험물질은 Limulus lysate test (E-toxate, Sigma)를 이용하여 endo-toxin 오염에 대하여 실험한 결과 10 pg/mL 보다 적은 것으로 판명되었다.

Splenocyte preparation

생쥐를 ether로 치사시킨 후 무균상태에서 spleen을 꺼내어 3 mL RPMI 1640 (Gibco) 배지가 있는 60 mm petri dish에 넣었다. 5 mL용 주사기를 이용하여 splenocyte를 부유시킨 후 잘 현탁하여 원심분리관에 옮겨서 100 g에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 버린 후 37°C의 0.83% Tris-NH₄Cl 용액에 부유시켜 10분간 방치하여 red cell을 용해시켰다. 다시 원심분리하여 0.83% Tris-NH₄Cl 용액을 완전히 세척하고 난 후 splenocyte를 원하는 농도로 희석시켰다.

Splenocyte blastogenesis

Splenocyte를 96 well plate에 5 \times 10⁵/well이 되도록 하였다. 상기생 성분을 농도별로 처리하고, 10 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS)와 2.5 μ g/mL concanavalin A (ConA)를 각각의 상기생 성분 농도에 첨가하여 B cell과 T cell의 세포증식력을 측정하였다. 전체 배양부피를 200 μ L로 하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후에 25 μ L의 MTT (2 mg/mL)를 가하였다. 4시간 더 배양한 후 형성된 formazan을 150 μ L의 DMSO를 가하여 용해하고 10 분간 진탕한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Carmichael 등, 1987).

Peritoneal macrophage preparation

Peritoneal macrophage는 thioglycollate (Difco Lab. Detroit, MI)를 이용하여 외부자극에 대한 항암작용을 쉽게 알아볼 수 있도록 inflammatory macrophage 상태로 만들어 실험하였다. 생쥐에 4.05% thioglycollate를 1 mL 복강주사하고 3일 후에 RPMI1640 배양액으로 복강을 세척하여 복강세포를 취하였다. 복강세포로부터의 macrophage 분리는 Klimetzek와 Remold (1980)가 서술한 방법대로 시행하였다. 간단히 설명하면, 복강세포를 teflon-coated petri dish (100 \times 15 mm)에 5-6 \times 10⁵ cells/cm²으로 분주하여 macrophage가 바닥에 부착하도록 하였다. Petri

dish에 부착하지 않은 세포를 제거한 후 1.5% FBS를 포함한 D-PBS 용액 15 mL 을 가한 후 0.3 mL 의 0.1 M EDTA (pH 7.0)를 첨가하여 15분동안 상온에 방치하였다. 주사기를 이용하여 바닥으로부터 macrophage를 떼어 내어 원심분리한 후 세척하여 macrophage를 원하는 농도로 희석하였다.

Macrophage tumoricidal activity

B16 흑색종암세포 (ATCC, Rockville, MD)에 대한 macrophage의 항암효과를 측정하기 위해 96 well에 대식세포를 1 \times 10⁵ cells/well의 농도로 넣고 표적세포인 B16 흑색종 암세포를 1 \times 10⁴ cells/well이 되도록 가하고 18시간동안 배양하였다(Kim 등, 2002). MTT (2 μ g/mL) 25 μ L 를 가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 Molecular Device microplate reader (Menlo, CA)로 540 nm에서 측정하여 암세포 사멸능을 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 - \left[\frac{\text{OD}(\text{macrophage} + \text{tumor target}) - \text{OD}(\text{macrophage})}{\text{OD}(\text{tumor target})} \right] \times 100$$

Macrophage nitric oxide production

Macrophage의 활성화 정도를 측정하기 위하여 macrophage가 분비하는 nitric oxide의 생성량을 측정하였다(Ding 등, 1988). Macrophage를 96 well plate에 1 \times 10⁵/well이 되도록 분주하고 상기생 성분을 농도별로 20 시간 처리하였다. 새 배양액으로 바꾸어 20시간 더 배양한 후, 상층액 100 μ L만을 취하여 새 plate에 옮긴 후 100 μ L Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치하였다. ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로부터 macrophage가 분비하는 nitric oxide를 정량하였다.

Macrophage TNF- α production

TNF- α 측정은 상기생 성분을 처리한 macrophage의 상층액을 앞에서 서술한 방법(macrophage nitric oxide production)으로 준비한 후 제조사의 방법에 따라 ELISA kit (Endogen, Woburn, MA)를 이용하여 실시하였다.

통계처리

대조군과 실험군의 실험결과에 대한 통계학적 분석은 student-t test를 이용하여 *p*값이 0.05 이하인 것을 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

결과 및 고찰

상기생에서 분리한 화합물에서 면역증강효과를 기대하

는데에는 이유가 있다. 지금 까지 알려진 상기생의 성분 중 lectin, polysaccharide가 면역증강효과를 가지고 있다는 것은 일반적인 사실이다. 이러한 생각을 바탕으로 상기생으로부터 분리 동정한 다양한 성분을 가지고 항원특이성 면역반응에 관여하는 lymphocyte와 자연면역반응에 관여하는 macrophage 에 미치는 영향을 알아보았다.

Lymphocyte의 *in vitro* mitogen-stimulated proliferation assay는 면역조절제에 의해서 특이적으로 감작된 lymphocyte의 활성화 증식 능력평가와 관련이 있기때문에 상기생으로부터 분리한 화합물을 처리한 lymphocyte가 mitogen에 의하여 어떻게 변화되어 반응하는지 알아보기 위하여 다양한 농도(1-100 µg/mL)의 화합물과 함께 B cell mitogen LPS와 T cell mitogen ConA를 처리하였다. 대부분의 화합물은 100 µg/mL보다 높은 농도에서 세포 독성을 나타내었다(Choi 등, 2001). Fig. 1에서 보는 바와 같이 실험결과 화합물 6과 11은 splenocyte

blastogenesis에서 세포 증식력의 증가를 일으켰다. 그러나, 그 이외의 화합물들은 항원특이성 세포에 영향을 주지 못하였다 (data not shown). 따라서 ConA 처리군과 LPS 처리군 모두에서 유의성 있는 증가가 나타난 점으로 보아 화합물 6과 11은 T cell뿐만 아니라 B cell에도 세포증식력에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

자연면역반응에 관여하는 중요한 면역세포는 macrophage다. Macrophage는 항바이러스효과 뿐만 아니라 항암작용도 가지고 있다. 이러한 항암작용은 macrophage가 활성화 단계를 거쳐 여러 가지 기능이 변화되면서 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 상태로 전환되어서 나타난다(Adams와 Hamilton, 1984). 따라서 대식세포를 직접 활성화시켜 항암효과를 발휘하는지를 알아보기 위하여 분리동정한 화합물들을 처리한 macro-

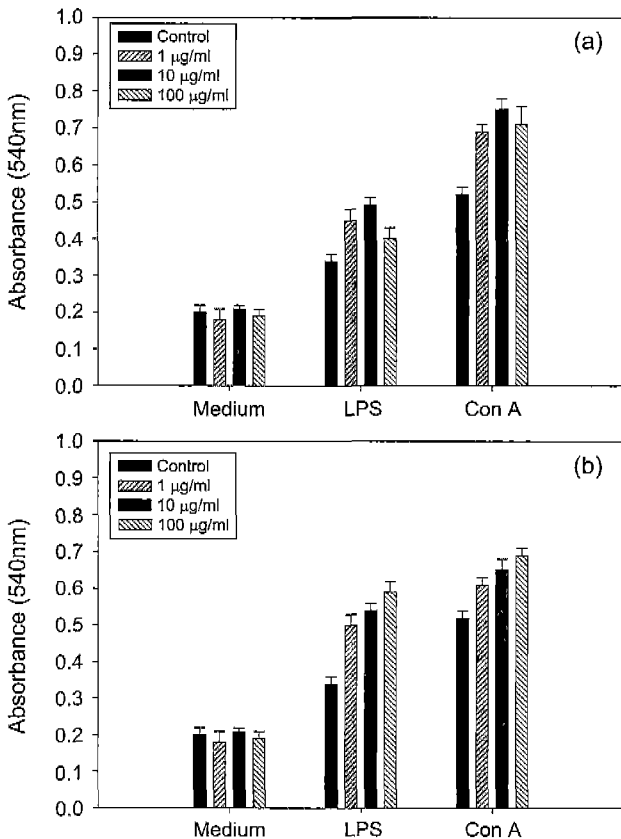


Fig. 1. The effect of compound 6 (a) and 11 (b) on splenocyte blastogenesis. Cells (5×10^5 cells/well) were treated with Con A(4 µg/mL) or LPS(10 µg/mL) for 48 hrs in the presence of various concentrations of compounds. The proliferation of splenocytes was assessed by MTT assay. Cell density was measured at 540 nm. The results are mean±S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Compound-treated groups were significantly different from control group (no treatment) (*p<0.05).

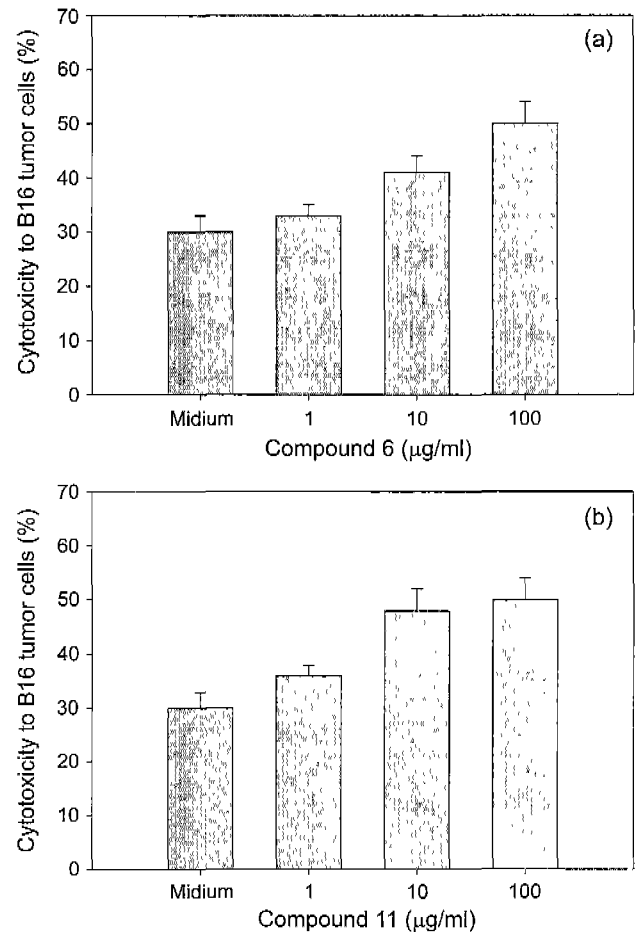


Fig. 2. The effect of compound 6 (a) and 11 (b) on tumoricidal activity of macrophages against B16 melanoma cells. Macrophages were cocultured for 20 hrs with target cells (B16) in the presence of various doses of compounds at an initial effector/target ratio of 10 : 1. The results are mean±S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Compound-treated groups were significantly different from control group (no treatment)(*p<0.05).

phage와 암세포를 함께 배양한 후 macrophage 암세포독성능을 측정하였다. 6과 11을 제외한 화합물은 항암효과에 영향을 미치지 않았으며(data not shown) 임파구의 증식력실험과 유사하게 화합물 6과 11 처리군에서만 유의성있는 항암효과를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 이 두 화합물에 의해 직접적으로 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 단계로 활성화 되었음을 말해준다. 또한 macrophage의 항바이러스효과를 알아본 실험에서 6과 11 화합물은 항바이러스효과에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 알았다(data not shown). 이는 macrophage의 항암작용과 항바이러스작용이 함께 나타나는 것이 아니라, 이들 화합물에 의해 유도되는 macrophage의 항암작용은 항바이러스와는 다른 기전과 분비물질에 의하여 매개됨을 암시한다.

면역활성을 나타내는 6과 11 화합물이 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 좀 더 자세히 규명하기 위하여, macrophage가 분비하는 세포독성물질 nitric oxide (NO)를 측정하였다. 그 결과 NO 생성량이 증가하였다(Table 1). NO는 macrophage가 분비하는 세포독성물질로 잘 알려져 있기 때문에(Hibbs 등, 1988), 이와 같이 이 두 화합물에 의해 NO 생성이 증가된다는 것은 두 화합물에 의한 macrophage의 항암효과가 나타나는 결과를 뒷받침 해준다.

TNF- α 는 주로 LPS에 의해 자극된 macrophage가 분비하는 cytokine으로 알려져 있으며 항암작용을 나타낼 뿐 아니라 염증반응에도 관여한다(Thomas 등 1984). 6과 11 화합물이 macrophage를 활성화하여 TNF- α 를 분비하게 하는지 알아보기 위하여 이 두 화합물을 처리한 macrophage의 상층액으로부터 TNF- α 분비량을 측정해 보았다. 실험결과 대조군에 비하여 macrophage의 TNF- α 생성량이 증가하였다(Table 1). TNF- α 와 NO는 macrophage가 분비하는 세포 독성물질로 알려져 있어 화합물

Table I. The effect of compounds 6 and 11 on the production of NO and TNF- α by macrophages

		NO (μ M/mL)	TNF- α (unit/mL)
Medium		1.2 \pm 0.2	22.3 \pm 1.2
Compound 6	1 μ g/mL	1.3 \pm 0.3	24.5 \pm 2.4*
	10	2.1 \pm 0.4*	30.1 \pm 3.3*
	100	2.6 \pm 0.1*	35.2 \pm 2.9*
Compound 11	1 μ g/mL	1.5 \pm 0.2*	26.9 \pm 3.8*
	10	2.7 \pm 0.5*	36.7 \pm 2.1*
	100	3.1 \pm 0.2*	40.3 \pm 1.7*

Macrophages were pretreated with various doses of compounds for 20 hrs. Culture supernatants were collected for NO₂⁻ assay and TNF- α bioactivity. The results are mean \pm S.D. of quintuplicates from a representative experiment. Compound-treated groups were significantly different from control group (no treatment) (*p<0.05).

6과 11에 의하여 macrophage가 TNF- α 분비량에 증가를 보이는 결과는 NO 생성량에 영향을 미치는 결과와 함께 이 두 화합물이 macrophage의 항암효과에 영향을 미치는 것을 뒷받침해준다.

시행된 연구 결과를 종합해 보면, 화합물 6과 11은 그 효과가 매우 크진 않지만 면역세포들의 활성화 가능성을 제시하고 있다. T cell과 B cell의 세포증식력을 증가시키며 macrophage의 기능에도 변화를 주고 있어 이들 화합물들은 식물 자원으로부터 손쉽게 얻을 수 있어 새로운 면역조절제로서 가능성을 제시해준다. 이러한 가능성은 질병치료와 예방에 응용될 수 있을 것이며 또한 복잡한 면역세포들간의 활성을 연구하는데도 도움이 될 것이다.

참고문헌

- Adams, D. O. and Hamilton, T. A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 283-318.
- Bae, K. H. (2000). *The Medicinal Plants of Korea*, Kyo-Hak Publishing Co. Seoul, Korea, pp.79.
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay; Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Choi, S.Z., Kwon, H.C., Chung, A.K., Choi, S.U., Kim, K.R., Lee, S.M., Pyo, S.N. and Lee, K.R. (2001). Triterpenes and Phenolic Constituents from *Viscum album L.* *Yakhak Hoeji.* 45, 591-598.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141, 2407-2412.
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, I. and Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-92.
- Kim, K. R., Son E. H., Rhee, D. K., and Pyo, S. (2002). Inhibitory effects of simazine on various functions of peritoneal macrophages. *J. Appl. Pharmacol.* 10, 224-229.
- Klimetzek, V. and Remold, H. G. (1980). The murine bone marrow macrophages, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immunol.* 53, 257-265.
- Seljelid, R., Figenschau, Y., Bøfigwald, J., Rasmussen, L. T. and Austgulen, R. (1989). Evidence that tumor necrosis factor induced by aminated β_1 -3D polyglucose is mediated by a concerted action of local and systemic cytokines. *Scand. J. Immunol.* 30, 687-694.
- Thomas, P. M. and Edginton, S. (1984). Hummam monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* 132, 1980-1986.
- Wagner, H. and Proksch, A. (1985). *Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants in Economic and Medicinal Plant Research*, Vol. 1, Academic Press, New York, pp 113.