

배(梨)의 메탄올 추출물이 마우스의 비장세포 증식능과 Cytokine 생성능에 미치는 영향

황유경 · 표명윤[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received November 16, 2004; Revised January 12, 2005)

Effects of Pear (*Pyrus pyrifolia*) Methanol Extracts on the Proliferation and the Cytokines Production of Mouse Splenocytes

Yoo-Kyung Hwang and Myoung-Yun Pyo[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Abstract — This study was performed to investigate the potential of pear (*Pyrus pyrifolia*) as a immune-modulating functional food by assay of splenocytes proliferation and induction of cytokines (IFN- γ , IL-4) *in vitro*. When mouse splenocytes were exposed to various concentration (0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml) of pear methanol extracts (P-M) without mitogens, splenocytes proliferation (SP) was significantly increased. Also, SP to mitogens, concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS) were significantly increased by P-M when compared with controls. When splenocytes were cultured with P-M in the presence of Con A, cytokine (IFN- γ , IL-4) levels in culture supernatant were significantly enhanced in a dose-dependent manner except 2.5 mg/ml when compared with control group. Therefore, our study suggest that the pear has the potential of being an immune-modulating functional food.

Keywords □ pear, splenocytes proliferation, IFN- γ , IL-4

생체의 면역계는 각종 이물질 및 병원체의 침입에 대항하는 숙주의 장기, 면역관련세포, 각종 인자 등으로 구성되어 있는 매우 복잡한 계통이며, 면역계내에서 또는 생체내의 다른 계통과 서로 복잡하게 상호작용을 하고 있다. 이러한 생체의 정상적인 면역기능이 환경오염물질, 의약품의 부작용, 질병 및 노화 등과 같은 매우 다양한 위해요인으로 인하여 억제되거나 또는 알레르기 등과 같이 비정상적으로 항진되는 바람직하지 않은 변화가 일어날 수 있다. 최근에는 지금까지 인류가 섭취해 온 천연물질로부터 변화된 면역기능을 조정하여 정상으로 회복시키거나 이러한 변화를 최대한 경감시키고 생체방어능력을 증강시키는 물질을 발굴하려는 연구가 매우 활발히 이루어지고 있다.¹⁻³⁾

배 과실은 우리 몸에 유익한 알카리성 식품으로 품종에 따라

차이는 있으나 가식율이 80~82%, 수분함량이 85~88% 정도이며 열량의 주성분은 탄수화물로 이 중 당분은 10~13%이다. 특히 식이섬유 함량이 높아 변비 및 정장작용이 탁월하고 다환방향족탄화수소류의 체외배출을 촉진하는 효과가 있다고 한다.^{4,5)} 배과피의 폴리페놀분획 성분이 간의 총지질과 중성지방을 감소시키고 혈장의 지질과 총콜레스테롤을 감소시키는 작용이 있다고 보고되었으며,⁶⁾ 고혈당 생쥐의 인슐린 분비 복원율을 높이고⁷⁾ 고혈압 환자의 혈압을 낮추며,⁸⁾ 배즙이 어린이들의 gastric myoelectric activity를 높이고,⁹⁾ 철분흡수 증가¹⁰⁾ 및 항산화효과도 보고되었다.¹¹⁾ 또한 쇠 등¹²⁾은 배의 폴리페놀 성분 투여로 OVA 항원주사로 증가된 histamine^o 감소되었다고 보고하였다. 이와같이 배의 다양한 생리활성이 알려지면서 가능성 식품 소재로서 배에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서는 배의 면역기능조절 관련 기능식품소재로서의 가능성을 연구하고자 일차적으로 배의 메탄올 추출물이 비장세포의 증식능과 cytokines(IFN- γ , IL-4) 생성능에 미치는 영향을

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9573 (팩스) 02-710-9573
(E-mail) mypyo@sdic.sookmyung.ac.kr

*in vitro*에서 측정하였다.

실험 방법

실험물질 및 추출

본 실험에 사용한 신고(*Pyrus pyrifolia*)는 전남 나주시에 있는 나주배연구소로부터 제공받아 저온실에 보관하였다. 저장 후 1개월 이내에 신선한 것을 선택하여 과피와 과속의 폐기부분을 제거한 후 잘게 자른 과육 1kg을 methanol 1l로 수육상에서 3시간 동안 추출하는 조작을 2회 반복하고 추출물을 합하여 감압농축하였다. 이를 동결건조하여 얻은 methanol 추출물(pear-methanol extracts, P-M)의 수득율은 6.79%이었으며, 실험에 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

실험시약 및 기기

본 실험에서 사용한 시약은 RPMI medium 1640 powder, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Co.에서, 그리고 concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Co.에서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)는 Amresco에서 구입하였으며, Mouse IL-4 set, Mouse IFN- γ set는 PharMingen에서 구입하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 특급으로 구입하여 사용하였다. 실험기기로는 CO₂ incubator(New Brunswick Scientific Inc.), ELISA microplate reader (ELX800, BIO-TEK instruments) 등을 이용하였다.

실험동물

3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행 중앙연구소로부터 분양받아 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험동물실에서 2~3주간 적응시킨 후, 체중 23±2g의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21~24°C, 습도는 40~60%, 명암교대는 12시간을 유지하였다.

비장세포액 조제

마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지액에 넣고 teflon pestle을 이용하여 200 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer를 가하여 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지액을 가하여 trypan blue exclusion method¹³⁾로 1×10⁷ cells/ml의 비장세포액이 되도록 조정하였다.

비장세포 증식능 측정

비장세포액(1×10⁷ cells/ml)을 96 well plate에 well 당 100 μl씩 가하고 각 well에서 배 메탄을 추출물의 최종농도가 0.16,

0.31, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml가 되도록 10% FBS-RPMI 배지액에 녹여 well 당 20 μl씩 가하였다. 여기에 mitogen(Con A; 2 μg/ml, LPS; 50 μg/ml) 또는 10% FBS-RPMI 배지액을 20 μl 가한 후 예비실험결과 임파구 증식능이 최고에 달한 배양시간을 택하여 72시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 비장세포의 증식정도는 생존세포의 효소작용에 의해 MTT 시약이 환원되어 생성되는 formazan의 양을 측정함으로써 세포독성 연구에 자주 사용되며 ³H-thymidine uptake assay의 결과와 유사한 것으로 보고된¹⁴⁾ MTT assay¹⁵⁾를 이용하여 측정하였다. 즉, 배양 후 각 well에 MTT 용액(5 mg/ml)을 50 μl씩(250 μg/ml) 가하고 4시간 동안 배양한 후에 원심분리(400 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 제거하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO) 원액을 well당 50 μl씩 가하고 10분 이내에 ELISA reader로 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

Cytokines(IFN- γ , IL-4) 생성능 측정

정상 마우스를 ether로 치사시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하여 위와 같은 방법으로 비장세포액을 조제한 후, 24 well flat bottomed plate에 세포액 500 μl(4×10⁶ cells/ml)을 가하였다. 30분간 배양(37°C, 5% CO₂)하여 안정시킨 후, 각 well에서 배 메탄을 추출물의 최종농도가 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50 mg/ml가 되도록 100 μl 가하고 Con A(2 μg/ml) 100 μl와 10% FBS-RPMI 배지 300 μl를 가하여 24시간 동안 배양하여 얻은 배양액을 -70°C에 보관하면서 사용하였다. PharMingen에서 제공한 sandwich ELISA법에 준하여 배양액 중의 cytokine 생성량을 측정하였다. 즉, anti-mouse IFN- γ monoclonal antibody 또는 anti-mouse IL-4 monoclonal antibody를 96 well flat bottomed plate(Dynex Immulon 4HBX)에 도포한 후 acetate plate sealer로 밀봉하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 washing buffer로 3회 세척하고 blank well을 제외한 well에 각각 200 μl의 10% FBS-PBS를 가하고 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 3회 세척 후 비장세포를 배양하여 얻은 배양액을 각 well에 100 μl씩 duplicate로 가하고, 검량선을 작성하기 위해서는 recombinant mouse IFN- γ 를 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 pg/ml, recombinant mouse IL-4를 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 pg/ml 농도로 희석하여 100 μl씩 duplicate로 가한 후, plate를 acetate plate sealer로 봉하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 5회 반복 세척한 후 biotinylated anti-mouse IFN- γ polyclonal antibody 또는 biotinylated anti-mouse IL-4 polyclonal antibody용액을 well당 100 μl씩 가하고 2시간 후에 다시 5회 세척하고 100 μl의 avidin-horseradish peroxidase conjugate용액을 각 well에 가하였다. 실온에서 30분간 방치한 뒤 plate를 7회 세척하고, 각 well에 tetraminebezdine(TMB)과 hydrogen peroxidase를 같은 부피로 혼합한 TMB substrate 용액을 100 μl씩 가하고 15분 후

50 μ l의 2 N-H₂SO₄를 가하여 반응을 정지시킨 다음 30분이내에 ELISA reader을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 자동적으로 cytokines(IFN- γ , IL-4) 함량을 산출하였다.

실험 결과 및 고찰

비장세포 증식능에 미치는 영향

배의 추출물(P-M)이 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 일차적으로 *In vitro*에서 비장세포 중 T 세포를 자극하여 증식을 유도하는 miotogen 또는 B 세포를 자극하여 증식을 유도하는 mitogen¹⁶⁾을 정상 마우스의 비장세포에 P-M과 동시에 처리하여 배양하거나, P-M만을 비장세포에 가하여 배양하여 비장세포의 증식정도를 MTT assay로 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

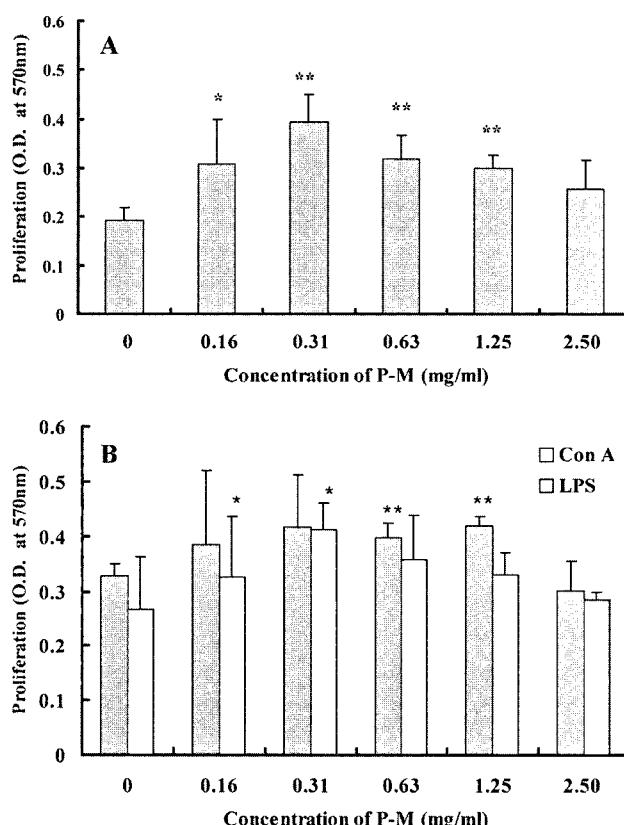


Fig. 1 – Effects of P-M on proliferation of mouse splenocytes *in vitro*. Mouse splenocytes were stimulated without (A) or with (B) mitogens (Con A; 2 μ g/ml, LPS; 50 μ g/ml) in the presence of various concentration of pear methanol extracts (P-M) for 72 hrs. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. Results are the mean \pm S.D. of 3 different experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from controls (* p <0.05, ** p <0.01).

마우스 비장세포 증식의 최적조건을 결정하기 위하여 Con A 농도별(1, 2, 4 μ g/ml), LPS 농도별(25, 50, 100 μ g/ml)로, 배양시간별(24, 48, 72 hr)로 증식정도를 예비실험한 결과, Con A 2 μ g/ml, LPS 50 μ g/ml의 농도와 72시간 배양에서 최고의 임파구 증식능이 관찰되었다.

Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 비장세포에 P-M만을 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 mg/ml 농도별로 가하여 72시간 배양 후 측정된 O.D. 값이 P-M을 가하지 않고 비장세포만을 배양한 대조군의 O.D. 값에 비하여 각각 58, 103, 65, 55, 33% 정도 유의성 있게 증가되었다. Con A 또는 LPS를 첨가하여 배양한 대조군(Fig. 1B)의 O.D. 값이 mitogens을 첨가하지 않고 비장세포만을 배양한 대조군(Fig. 1A)보다 높아 Con A 또는 LPS에 의해 비장세포 증식이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1(B)에서 mitogen에 의한 비장세포 증식에 미치는 P-M의 영향을 보면, 비장세포에 P-M과 Con A를 동시에 첨가하여 배양한 실험군의 O.D. 값이 Con A만을 첨가하여 배양한 군의 O.D. 값보다 고농도인 2.50 mg/ml을 제외한 모든 농도에서 약 17~28% 정도 증가되는 현상을 보였다. 또한 P-M과 LPS를 동시에 첨가하여 배양한 실험군의 O.D. 값도 LPS만을 첨가하여 배양한 군의 O.D. 값보다 증가되는 현상을 보였으며, 특히 0.31 mg/ml 농도에서는 현저히(약 54%) 유의성 있게(p <0.01) 증가되었다. 이러한 실험결과로 배의 메탄을 추출물은 그 자체가 비장세포를 자극하여 증식을 증가시키고, T 세포를 자극하는 Con A 또는 B 세포를 자극하는 LPS mitogen으로 유도되는 비장세포 증식도 증가시켜 세포성 면역 및 체액성 면역기능을 향진 시킬 수 있음을 시사해 주고 있다.

비장세포의 cytokine(IFN- γ , IL-4) 생성능에 미치는 영향

배의 메탄을 추출물이 Con A로 유도되는 비장세포의 cytokine 생성능에 미치는 영향을 알아 보기 위해 마우스 비장세포에 Con A와 P-M을 농도별로 동시에 가하여 배양한 후 배양액 중의 IFN- γ 와 IL-4의 생성량을 측정하여 그 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

보조 T 세포(helper T 세포, Th cell)는 다른 임파구의 활성화를 촉진하며 각종 세포활성물질을 생성하는데, 생성하는 세포활성물질의 종류의 차이에 따라 type 1 T 세포(Th1)와 type 2 T 세포(Th2)의 아집단으로 분류된다.¹⁷⁾ IFN- γ 는 Th1 세포가 생성하는 대표적인 특징 cytokine이며, IL-4는 Th2 세포에서 분비되는 대표적인 cytokine으로 이들은 T 세포 subset를 구분할 때도 주로 이용된다.^{18,19)}

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Con A를 가한 비장세포에 P-M을 농도별로 첨가하여 배양 후 배양액 중의 IFN- γ 량을 측정한 결과, Con A만을 가한 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였으며 특히 0.63 mg/ml 이상의 농도에서는 유의성 있게(p <0.05) 현저히 증가되었다. 또한 IL-4의 생성량(Fig. 3)이 2.50 mg/ml 농도

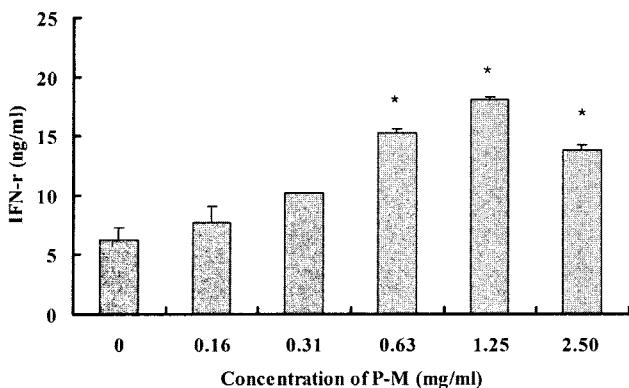


Fig. 2 – Effect of P-M on IFN- γ production from splenocytes stimulated with T cell mitogen (Con A) *in vitro*. Splenocytes from normal mice were cultured with pear metanol extracts (P-M) in the presence of Con A (2 μ g/ml) for 48 hrs. Cytokine level in culture supernatant was determined by ELISA. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 separate experiments (duplicated for experiment). Significant difference from controls (* p <0.05).

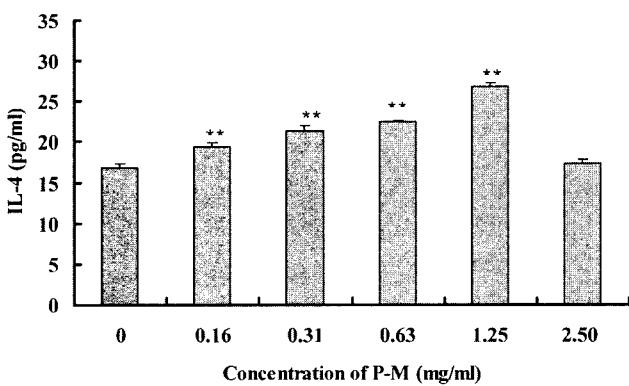


Fig. 3 – Effect of P-M on IL-4 production from splenocytes stimulated with T cell mitogen (Con A) *in vitro*. Significant difference from control group (** p <0.01). Other legends and methods are the same those as described in Fig. 2.

를 제외하고는 농도의존적으로 유의성 있게(p <0.01) 증가되었으며, 특히 P-M의 농도가 1.25 mg/ml일 때에는 대조군에 비하여 약 33% 정도 뚜렷이 증가하였다.

이상의 결과로 배 메탄을 추출물의 직접 노출에 의해 비장세포의 Th1 반응과 Th2 반응이 모두 증가되었음을 알 수 있고 IFN- γ 와 IL-4에 영향을 받는 B 세포 반응에도 배의 메탄을 추출물이 영향을 미칠 것으로 예측이 되어 생체내에서의 체액성 면역기능에 대한 실험을 진행 중이다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2004년도 교내특별연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

결 론

배의 메탄을 추출물 자체가 *in vitro*에서 비장세포의 증식능을 증가시키고, T 세포 mitogen인 Con A와 B 세포 mitogen인 LPS로 유도되는 비장세포 증식능도 항진시켰다. 또한 P-M은 cytokine(IFN- γ , IL-4)의 생성을 농도의존적으로 유의성 있게 증가시켜 세포성 및 체액성 면역반응을 증강시킬 수 있는 가능성 을 시사해 주어 배의 면역조절 기능식품 소재로서의 개발가능성에 대한 계속적인 연구가 필요하다.

참고문헌

- 1) 표명운, 현수미, 양기숙 : 상황버섯 추출물이 정상마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. *한국응용약물학회* 9, 194 (2001).
- 2) Metdani, S. N. and Ha, W.-K. : Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 861 (2000).
- 3) Cross, M. L. and Gill, H. S. : Immunomodulatory properties of milk. *Br. J. Nutr.* 84, 81 (2000).
- 4) 손동수, 조광식, 송장훈, 김명수, 강삼석, 홍성식, 김윤경 : 우리 배 이야기. 농촌진흥청 원예연구소, 서울 p. 18 (2003).
- 5) Yang, M., Kim, S., Lee, E., Cheong, H.-K., Chang, S.-S., Kang, D., Choi, Y., Lee, S.-M. and Jang, J.-Y. : Sources of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in non-occupationally exposed koreans. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 42, 250 (2003).
- 6) Choi, H. J., Park, J. H., Han, H. S., Som, J. H., Son, G. M., Bae, J. H. and Choi, C. : Effects of polyphenol compound from korean pear on lipid metabolism. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 299 (2004).
- 7) Kim, J. S. and Na, C. S. : Effects of pear phenolic compound on the STZ-treated mice for induction of diabetes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 1107 (2002).
- 8) Na, C. S., Yun, D. H., Choi, D. H., Kim, J. S., Cao, C. H. and Eun, J. B. : The effects of pear pectin on blood pressure, plasma renin, ANP and cardiac hypertrophy in hypertensive rat induced by 2K1C. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 700 (2003).
- 9) Moukarzel, A. A. and Sabri, M. T. : Effect of gastric myoelectric activity on carbohydrate absorption of fruit juice in children. *J. Clin. Gastroenterol.* 30, 162 (2000).
- 10) Ballot, D., Baynes, R. D., Bothwell, T. H., Gillooly, M., MacFarlane, B. J., MacPhail, A. P., Lyons, G., Derman, D. P., Bezwoda, W. R. and Torrance, J. D. : The effects of fruit juices and fruits on the absorption of iron from a rice meal. *Br. J. Nutr.* 57, 31 (1987).
- 11) Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X. and Liu, R. H. : Antioxidant and antiproliferative activity of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*

- 50, 7449 (2002).
- 12) Choi, H. J., Han, H. S., Park, J. H., Bae, J. H., Woo, H. S., An, B. J., Bae, M. J., Kim, H. G. and Choi, C. : Effect of polyphenol compounds from korean pear on immunofunctional activity. *Korean J. Food Culture.* **18**(4), 303 (2003).
- 13) Mischell, B. and Shiigi, S. : *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freman and company, 14 (1980).
- 14) Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L. and Pizzoferrato, A. : *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterial.* **14**, 359 (1993).
- 15) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods* **65**, 55 (1983).
- 16) Mischell, B. and Shiigi, S. : *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freman and company, 156 (1980).
- 17) Abul, K. and Andrew, H. : *Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed., Saunders, 262 (2003).
- 18) Kurt-Jones, E., Hamberg, S., Ohara, J., Paul, W. and Abbas, K. : Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness. *J. Exp. Med.* **166**, 1774 (1987).
- 19) Swain, S., Brandley, L., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A., Duncan, D., Hedrick, S., Dutton, R. and Huston, G. : Helper T cell subsets: Phenotype, function and role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev.* **123**, 115 (1991).