

마우스 림프구증식과 GM-CSF생성에 미치는 Berberine의 효과

김은영 · 노민희¹ · 정양숙² · 김형수³ · 김광혁*

고신대학교 의과대학 미생물학교실, ¹부산가톨릭대학교 물리치료학과, ²정가정의학, ³대구대학교 물리치료학과

Received April 2, 2007 / Accepted May 8, 2007

Effects of Berberine on Lymphocyte Proliferation and GM-CSF Production in Mice. Eun Young Kim, Min Hee Rho¹, Yang Sook Chung², Hyoung Su Kim³ and Kwang Hyuk Kim*. Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea, ¹Department of Physical Therapy, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea, ²Jung's Family Medicine Clinic, Busan 614-104, Korea, ³Department of Physical Therapy, Taegu University, Daegu 705-714, Korea – Berberine, an alkaloid initially isolated from chinese herbal medicine, has antibiotic activities against a variety of organisms including bacteria, viruses, fungi, protozoans; and chlamydia. Furthermore, berberine has shown a number of beneficial effects, including anti-tumor, anti-inflammation, and vasodilatory effects. In this work we have investigated the effects of berberine on lymphocyte proliferation and GM-CSF production in mice. Mouse splenocytes were incubated with berberine and concanavalin A (Con A) to observe the effects on cell proliferation. The culture supernatants of splenocytes exposed to berberine, berberine plus LPS, and berberine plus Con A were harvested to assay GM-CSF. The cell proliferation of mice splenocytes exposed to berberine only (1 µg/ml) was increased significantly more than PBS (control) group. But the Con A-induced cell growth was inhibited by berberine. The GM-CSF production from mice splenocyte culture exposed to berberine only was increased in comparison with PBS (control) group, but the production of it with LPS or Con A was inhibited by berberine. The present findings may explain lymphocyte proliferating and regulating effects of berberine.

Key words – berberine, lymphocyte proliferation, GM-CSF

서 론

Berberine은 황백(*Phellodendri cortex*) 및 황련(*Coptis rhizoma*)의 주성분인 isoquinoline 계 알칼로이드 물질로 혈압강하작용, 관동맥혈류증가작용, 지사작용, 건위, 정장, 소염, 지혈작용, 항암작용 등의 약리활성과 *Candida albicans* 등의 여러 가지 곰팡이, 박테리아, 원충, 바이러스, 기생충에 대항하여 항균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[1,5,6,18,19].

Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)는 조혈세포의 증식, 숙성, 기능에 작용하는 다형질 발현성의 사이토카인이다[8,9,17]. 이 사이토카인은 비교적 다양한 세포들인 섬유아세포, 내피세포, 비만세포, 대식세포, T세포, B세포 등이 면역, 염증관련 자극물이나 다른 사이토카인에 반응하여 생성되고 있다. 시험관에서 GM-CSF에 의한 세포증식능은 비단 과립구나 대식세포의 전구세포들에만 한정되는 것이 아니라 적혈구의 전구세포들까지도 포함되고 있다[16]. 성숙된 조혈세포에서 GM-CSF는 분화된 세포의 기능을 향진시킴으로서 중성구나 산성구의 생존을 연장시키고 있고 2차 면역반응에 관여하는 중성구나 산성구의 능력을 향

진시켜 superoxide생성, leukotriene합성, arachidonic acid방출 등을 증가시킨다. 또한 식균작용을 나타내는 대식세포, 중성구, 산성구의 활성을 증강시킬 뿐만아니라 암세포에 대한 대식세포, 산성구, 중성구의 항체의존성 세포독성을 증가시킨다. 또한 호흡구로부터의 히스타민방출을 증가시키고 단구로부터 IL-1이나 TNF-α와 같은 사이토카인의 생성을 유도한다[2,3,7,14]. 임상적으로는 암 화학 요법과 골수이식이후 골수회복을 원활하게 하기위하여 재조합 GM-CSF의 이용이 늘고 있다.

본 연구에서는 berberine이 세포성 면역에 미치는 효과를 보기위하여 림프구증식과 GM-CSF생성효과를 보고자 한다.

재료 및 방법

연구재료

실험동물

암컷 Balb/C 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외 것을 한국 효창 사이언스(대구)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

시약

Berberine과 lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였고 concanavalin A (Con A)는 Pharmacia Fine Chemical (Sweden)의 제품을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6422, Fax : +82-51-990-3081
E-mail : ghkim@ns.kosirmed.or.kr

연구방법

림프구 세포증식효과

마우스 비장세포 분리는 다음과 같이 시행하였다. 경부를 탈구하여 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균 적으로 적출하여 4°C의 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 2회 세척하였다. 이를 직경 60 mm 조작배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, USA)에 옮기고 다시 신선한 HBSS를 가한 후 펀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 이 세포 부유 액을 15 ml 원심관(Falcon, Oxnard, U.S.A.)에 옮긴 후 2 - 3 분 동안 실온에 방치한 다음 세포 부유 액의 상층 액을 새로운 15 ml 원심관에 옮겼다. 이 세포를 200 × g에서 5 - 10분 원침한 후 HBSS로 1회 원침 세척한 다음 중류수와 10배 농축 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 혼입된 적혈구를 용해시킨 후 HBSS로 2회 원침 세척하여 사용하였다. 림프구에 대한 세포증식효과는 상기와 같이 준비된 비장세포(2×10^6 cells/ml)를 96 wells microplate에 100 μl 씩 분주하고 berberine 액은 배양액 ml당 1, 10, 30 μg 씩 되게 적하하였다. Con A 농도는 ml당 2 μg이 되게 사용하였다. Con A와 복합으로 berberine을 작용시킬 때는 Con A와 동시에 작용시켰다. 분주가 완료된 plate는 5% CO₂, 37°C 그리고 충분한 습도가 유지되고 있는 배양기에 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 후에 plate의 각 well에 Cell Counting Kit-8액(Dojindo Laboratories, Japan) 10 μl 씩을 적하하고 4시간 추가 배양하였다. Optical density (OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

비장세포배양 상층액

비장세포배양 상층액 준비는 미리 준비된 비장세포 부유 액을 10% 가 되게 소 태아혈청을 가한 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지 (complete 10 % FCS RPMI 1640)로 ml 당 2×10^6 세포가 되도록 조절하여, 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 1 ml 씩 분주한 후 berberine 0.3, 1.0, 3.0 μg을 각각 작용시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 또한 LPS 10 μg 혹은 Con A 2.0 μg과의 복합작용도 함께 시험하였다. 배양시간은 상기의 조건에서 4, 24, 48시간으로 하였다. 각각 일정시간 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300 × g에서 10분간, 10,000 × g에서 30분간 원침 시킨 후 그 상층 액을 수거하여 배양 상층 액에서 GM-CSF 생성을 정량하였다.

GM-CSF 측정

GM-CSF 측정은 Mouse GM-CSF ELISA kit (eBioscience, USA)을 이용하였다. 간략하면 미리 96 wells microplate에 mouse GM-CSF에 대한 capture 항체 100 μl 씩을 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100 μl 씩을 적하하여 실온에서 2시간 동

안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 detection 항체 100 μl 씩을 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 horseradish peroxidase 액 100 μl 씩을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 7 번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질 액 100 μl 씩을 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 50 μl 씩을 가하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군 간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 미만일 때 의의 있는 차로 간주하였다.

결 과

림프구 세포 증식 효과

정상마우스 비장세포에 berberine만을 노출시켰을 때 림프구의 증식은 PBS 노출군인 대조군에 비하여 낮은 농도에서 유의한 상승을 보였다. 즉, 대조군에서의 OD가 0.27을 나타낼 때 berberine 1 μg 노출의 경우 1.02, 10 μg에서는 0.28, 30 μg에서는 0.21을 보여 저농도에서 유의한 증가를 보였고 고농도에서는 약간의 감소를 나타냈다. 그러나 세포자극물인 Con A 노출군에 berberine을 작용시켰을 때는 림프구의 증식이 유의하게 감소하였다. 즉, Con A만을 작용시킨 시험군에서 2.86을 나타낼 때 berberine을 1, 10, 30 μg을 추가하여 작용시키면 1.60, 1.33, 0.46으로 감소하였으며 유의성을 나타냈다($P<0.01$)(Table 1, 2).

GM-CSF의 생성

정상마우스 비장세포에 berberine만을 노출시켜 배양하였을 때 세포로부터 생성되어 나타나는 GM-CSF를 정량 분석하였다. 비장세포 만의 배양에서 GM-CSF의 생성은 시간이

Table 1. Effect of berberine on the proliferation of mouse splenocytes

Conc. of Berberine	Optical density (450 nm)
Berberine, 1 μg	1.02±0.10*
Berberine, 10 μg	0.28±0.01
Berberine, 30 μg	0.21±0.01
Control	0.27±0.01

Mouse splenocytes were exposed to berberine, and PBS (control) each for 72 hr. Proliferation was determined as described in materials and methods. Data are mean±SD.

* $P<0.01$ compared to the control.

Table 2. Effect of berberine on the Con A-induced proliferation of mouse splenocyte

Agents	Optical density (450 nm)
Con A, 2 µg + Berberine, 1 µg	1.60±0.15**
Con A, 2 µg + Berberine, 10 µg	1.33±0.01**
Con A, 2 µg + Berberine, 30 µg	0.46±0.03**
Con A, 2 µg	2.86±0.11

Mouse splenocytes were exposed with Concanavalin A (Con A) or Con A+ berberine each for 72 hr. Proliferation was determined as described in materials and methods. Data are mean±SD. **P<0.01 compared to the Con A group.

경과되면서 증가하는 양상을 보였다. 즉 배양 4시간 까지는 생성을 보이지 않다가 24시간 째에는 0.88 pg, 48시간 째에는 1.94 pg로 증가를 나타냈다. Berberine을 작용하더라도 4시간 째 까지는 생성을 보이지 않았지만 berberine 0.3, 1.0 µg을 가하였을 때 시간이 경과되면서 대조군에 비하여 증가하는 양상을 보였다. 그러나 3.0 µg을 가하였을 때는 24시간 째 까지는 증가를 보였지만 48시간 째는 오히려 대조군보다 감소하였다(Fig. 1). LPS만을 10 µg/ml 작용시켰을 때와 여기에 berberine을 상기와 같은 량으로 작용시켰을 때를 비교하면 berberine 0.3 µg을 추가로 가하였을 때에는 4시간 째에서도 GM-CSF의 생성을 볼 수 있었다. 그러나 24시간 째에서 감소를 보이다가 48시간 째에서 다시 증가를 보였다. 1.0, 3.0 µg/ml로 작용량을 증가시키면 각 시간대에서 GM-CSF의 생성이 LPS 단독군에 비하여 감소를 보였다(Table 3). Con A만을 2 µg/ml 작용시켰을 때에는 GM-CSF의 생성이 시간이 경과되면서 대조군에 비하여 큰 증가를 보였으며 여기에 berberine을 0.3 µg을 추가하였을 때 Con A단독군에 비하여 감소하였으나 시간이 경과되면서 약간의 증가를 보였다. 1.0, 3.0 µg/ml를 작용시켰을 때에는 전 시간대에서 Con

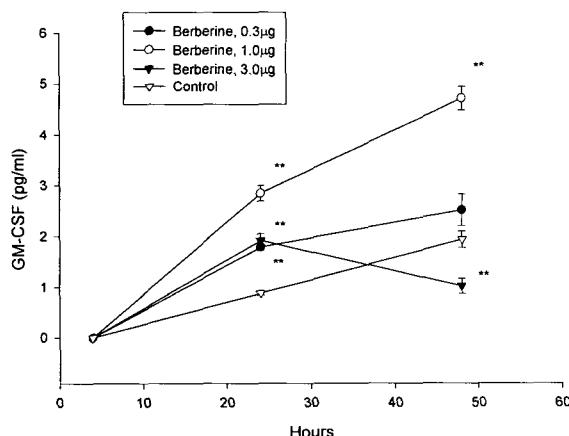


Fig. 1. Production of GM-CSF by mice splenocytes exposed to berberine. Splenocytes were cultivated with 0.3, 1.0, and 3.0 µg for 4, 24, and 48 hrs respectively. Data shown are mean ± SD. **P<0.01 compared to the control.

Table 3. Production of GM-CSF in cultures of mouse splenocytes with LPS and berberine

	GM-CSF (pg/ml)		
	4 hr	24 hr	48 hr
LPS, 10 µg	0	12.32±0.64	17.34±1.29
LPS, 10 µg+Berberine, 0.3 µg	3.20±0.64**	10.95±1.29	25.09±1.93*
LPS, 10 µg+Berberine, 1.0 µg	0	8.68±1.94	13.23±0.65
LPS, 10 µg+Berberine, 3.0 µg	0	6.39±1.07*	11.86±1.15*
Control (PBS)	0	0.88±0.04	1.94±0.16

Mouse splenocytes were cultivated with LPS and berberine for 4, 24, and 48 hr. GM-CSF was measured in the culture supernatant. Data are mean±SD. *P<0.05, **P<0.01 compared to the LPS group.

Table 4. Production of GM-CSF in cultures of mouse splenocytes with Con A and berberine

	GM-CSF(pg/ml)		
	4 hr	24 hr	48 hr
Con A, 2 µg	7.76±0.64	196.17±15.49	473.54±16.77
Con A, 2 µg+Berberine, 0.3 µg	3.20±0.64**	212.14±9.68	485.41±28.39
Con A, 2 µg+Berberine, 1.0 µg	1.02±0.15**	136.41±5.81*	407.40±10.97*
Con A, 2 µg+Berberine, 3.0 µg	0.95±0.06**	130.02±3.22*	240.47±7.17*
Control (PBS)	0	0.88±0.04	1.94±0.16

Mouse splenocytes were cultivated with Con A and berberine for 4, 24, and 48 hr. GM-CSF was measured in the culture supernatant. Data are mean±SD. *P<0.05, **P<0.01 compared to the Con A group.

A단독군보다 감소를 나타냈다(Table 4). 즉 대체적으로 LPS나 Con A작용군에 berberine을 추가하였을 때 감소하는 양상을 보였다.

고찰

Berberine은 *Coptis chinensis* French (Ranunculaceae), *Hydratis canadensis* (Ranunculaceae), *Arcangelisia flava* (Menispermaceae)와 같은 식물들에 의해서 생성되는 benzodioxolquinolizine alkaloid이다[13]. Berberine은 중국의 경우에는 오랜기간 항생제로 이용하였으며 이 약제가 갖는 넓은 항균활성도와 낮은 독성 때문에 고농도로 사용되었다[10]. 더불어 항암작용이 거론되면서 그 활성의 기전들이 보고되고 있다[4,11].

Marinova 등[15]은 tubulointerstitial nephritis(TIN)를 인위적으로 유발시킨 BALB/c 마우스에서 CD3, CD4, CD9, sIg limp프구의 수가 berberine의 투여에 의해서 감소됨으로서 TIN 모델에서 면역억제효과가 나타남을 보고하였다. 본 실

험에서도 먼저 berberine이 림프구세포증식에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스 비장세포에 berberine만을 작용시켰을 경우 낮은 농도(1 µg/ml)에서는 증식을 촉진시켰지만 높은 농도(30 µg/ml)에서는 증식이 저해됨을 보였다. 그러나 상기의 세포에 Con A와 함께 작용시키면 berberine 낮은 농도에서도 Con A 단독처리군에 비하여 세포성장이 저해됨을 알 수 있었다(Table 1, 2). 이러한 결과는 Con A가 갖고 있는 세포증식 자극능을 조절하고 있음을 보여준 것이다.

Iizuka 등[12]은 IL-6를 생성하여 생체 불건강 상태를 유도하는 사람 식도암세포주인 YES-2세포를 누드마우스에 접종한 다음 *Coptidis rhizoma* 추출액을 투여하였을 때 IL-6의 생성이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 *C. rhizoma*의 주성분인 berberine을 YES-2세포에 노출시켰을 때 IL-6의 생성이 감소되는 것을 *in vitro*에서도 관찰하여 *C. rhizoma*가 식도암세포에 치료적 효과를 나타내는 것은 berberine에 의한 암세포 IL-6 생성능 저하와 관련이 있을 것으로 제의한 바 있다. 본 실험에서는 시험관내에서 마우스 비장세포에 berberine을 작용시켜 생성되는 GM-CSF를 정량 분석하였을 때 낮은 농도(0.3, 1.0 µg/ml)에서 생성의 증가를 보였지만 높은 농도(3.0 µg/ml)에서는 감소하는 결과를 보였다(Fig. 1). LPS와 복합으로 berberine을 작용시켰을 때에도 낮은 농도에서는 LPS 단독처리군에 비하여 유의한 증가를 보였지만 berberine 1.0 µg/ml 이상의 농도에서는 생성이 저해되었다. 이러한 경향은 Con A와 복합으로 처리하였을 때도 같은 경향을 보였다(Table 3, 4). 이러한 결과는 berberine의 농도에 따라 GM-CSF의 생성이 크게 차이가 날 수 있고 LPS나 ConA와 같은 세포자극물에 의한 GM-CSF의 과도한 생성을 berberine이 조절한 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 berberine이 세포성 면역에 미치는 효과를 보기 위하여 림프구증식과 GM-CSF생성을 보고자 하였다. 마우스 비장세포에 berberine을 작용시켰을 때 저농도에서 세포 성장을 촉진함으로서 림프구증식에 자극제로서의 역할을 담당할 것으로 보인다. GM-CSF의 생성은 berberine 단독처리에 의해서 증가됨으로서 GM-CSF생성의 증가로 인한 세포성 면역반응의 상승이 예상되고 LPS나 Con A에 의한 GM-CSF의 생성을 저해함으로서 과도한 GM-CSF생성을 중간에서 차단 할 것으로 보인다. 따라서 이러한 결과들은 앞으로의 추가적인 연구결과들이 있게 되면 임상에서의 면역요법과 항염증작용에 berberine이 이용될 가능성을 시사한다 하겠다.

참 고 문 헌

- Amin, A. H., T. V. Subbaiah and K. M. Abbasi. 1969.

- Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can. J. Microbiol.* **15**, 1067-1076.
- Bussolino, F., J. M. Wang, P. Defilippi, F. Turrini, F. Sanavio, C. J. Edgell, M. Aglietta, P. Aeese and A. Mantovani. 1989. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* **337**, 471-473.
 - Cebon, J. S. and G. J. Lieschke. 1994. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for cancer treatment. *Oncol.* **51**, 177-188.
 - Chang, K. S. S., C. Gao and L. C. Wang. 1990. Berberine-induced morphological differentiation and down-regulation of c-Ki-ras protooncogene expression in human teratocarcinoma cells. *Cancer Lett.* **55**, 103-108.
 - Chi, C. W., Y. F. Chang, T. W. Chao, S. H. Chiang, F. K. Perg and W. Y. Lui. 1994 Flowcytometric analysis of effect of glucocorticoid receptors in human Hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* **54**, 2099-2107.
 - Colombo, M. L. and E. Bosisio. 1996. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. *Pharmacol. Res.* **33**, 127-134.
 - Costello, R. T. 1993. Therapeutic use of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). A review of recent experience. *Acta Oncol.* **32**, 403-408.
 - Dedhar, S., L. Gaboury, P. Galloway and C. Eaves. 1988. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9253-9257.
 - Gasson, J. C., J. K. Fraser and S. D. Nimer. 1990. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): regulation of expression. *Prog. Clin. Biol. Res.* **338**, 27-41.
 - Ghosh, A. K., F. K. Bhattacharyya and D. K. Ghosh. 1985. Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp. Parasitol.* **60**, 404-413.
 - Hano, K. 1957. Pharmacological studies on metabolism of cancer tissues: Pharmacological studies on carcinostatic effects of some plant components and their derivatives (1). *Gann* **48**, 443-450.
 - Iizuka, N., K. Miyamoto, S. Hazama, S. Yoshino, K. Yoshimura, K. Okida, T. Hukumoto, S. Yamamoto, A. Tangoku and M. Oka. 2000. Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an antiinflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett.* **158**, 35-41.
 - Kuo, C. L., C. C. Chou and B. Y. M. Yung. 1995. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett.* **93**, 193-200.
 - Lopez, A. F., J. M. Elington, A. B. Lyons, P. M. Tapley, L. B. To, L. S. Park, S. C. Clark and M. A. Vadas. 1990. Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J. Cell Physiol.* **145**, 69-77.
 - Marinova, E. K., D. B. Nikolova, D. N. Popova, G. B. Gallacher, N. D. Ivanovska. 2000. Suppression of experimental autoimmune tubulointerstitial nephritis in

- BALB/c mice by berberine. *J. Immunopharma.* **48**, 9-16.
16. Markowicz, S. and E. G. Engleman. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **85**, 955-961.
17. Ruef, C. and D. L. Coleman. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev Infect. Dis.* **12**, 41-62,
18. Sun, D., S. N. Abraham and E. H. Beachey. 1988. Influence of berberine sulfate on synthesis and expression of Pap fimbrial adhesion in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents & Chemother.* **32**, 1274-1277.
19. Sun, D., S. N. Abraham and E. H. Beachey. 1988. Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane. *Antimicrobial Agents & Chemother.* **32**, 1370-1374.