

Effect of *Pueraria thunbergiana* Extracts on the Activation of Immune CellsJong-Jin Kim¹, Hyeok-Jae Lee³ and Sung-Tae Yee^{1,2*}¹Department of Biology, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea²Department of pharmacy, College of pharmacy, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea³Department of Clinical Laboratory Science, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

Received July 4, 2012 / Revised July 12, 2012 / Accepted July 24, 2012

In this experiment, the effects of *Pueraria thunbergiana* extracts on the activation of immune cells were studied. An immune cell-activating factor was partially purified from *P. thunbergiana* by means of physiological saline extraction, acetone precipitation, and heating inactivation. *P. thunbergiana* extracts increased the proliferation of spleen cells and induced the production of IL-2, IL-6, TNF- α , and IFN- γ by spleen cells. Also, they increased the proliferation of purified B cells and the production of IgM antibody in a dose-dependent fashion. The extract self-induced NO synthesis in a mouse macrophage cell line (RAW264.7). When cell lines were treated with extracts, the cytokines' (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) production was markedly increased. Therefore, *P. thunbergiana* extract can self-activate spleen cells, B cells, and macrophages. These results might be useful in further studies into a possible immune-activating agent derived from *P. thunbergiana* for the development of functional foods and drugs.

Key words : *Pueraria thunbergiana*, cytokines, B cells, nitric oxide (NO), macrophage

서 론

갈근(*Puerariae Radix*)은 우리나라를 비롯하여 중국 및 일본 등 아시아에서 자생하는 두과식물(Leguminisae)이며, 다년생 낙엽성 활엽 덩굴나무인 칩(*Pueraria thunbergiana*)의 뿌리 부분을 건조한 것이다. 갈근에는 10~15%에 달하는 전분과 9종류의 saponin, 혈관확장, 혈당치 강하, 해열작용 등을 나타내는 flavonoids, 그리고 근육의 긴장이나 경련을 완화시키는 진경작용을 나타내는 iosflavonoide인 daidzein, puerarin 등으로 구성되어 있다. 중국에서 갈근은 한약으로 활발히 이용되고 있으며, 중국산 갈근은 *Pueraria shomsonii* Benth. 또는 *P. pseudo-hirsuta* Tang et Wang의 뿌리를 건조한 것으로 우리나라의 갈근과 다소 차이가 있다[13,16]. 하지만 생태학적으로는 칩은 우리나라 산림 식물 중 가장 왕성한 성장력과 번식력으로 빠르게 산림 전체를 뒤덮어 조림목이나 육림목적 수종의 성장을 억제하거나 기형으로 성장하게 할뿐만 아니라 나무를 고사시켜 문제를 야기하고 있다[17].

면역강화 및 조절기능을 갖는 소재는 동물, 식물, 고등균류 및 미생물체 등에 이르기까지 광범위하게 탐색, 확인되고 있으며 고등균류에서는 단백질 다당체, 식물체에서는 다당류 및 폴리페놀류 등 효능 면에서 뛰어난 성분들이 많음이 밝혀지고 있다. 특히 칩은 우리나라의 전통적인 약재이면서 동남아 각지에서 자생하는 민간요법의 재료로 사용하며, 이의 효능은

한의학에서 발한작용, 감염에 의한 두드러기의 치료 및 지사약, 비장이나 위에 작용하여 갈증해소 및 해열작용으로 널리 활용되고 있다. 칩에 대한 연구는 주로 뿌리 중의 전분에 관한 것들이며 Suzuki 등[19]은 칩 전분의 구조, 화학특성 등을 보고하였으며, 또한 칩의 뿌리에 존재하는 효소에 대한 연구는 Hankins 등[4]의 α -galactosidase에 대한 연구를 시작으로 다양한 연구가 진행되고 있다.

칩은 당분, 섬유질, 단백질, 철분, 인, 비타민 등 영양 성분과 생리 활성물질을 함유하고 있어 영양학적으로 유용하며, 한방에서도 많이 사용하고 있다. 특히 칩에서 isoflavone [12], oligosaccharide, 저분자 peptide, phytate, 식이섬유, 식물성 sterols, phenol 성분, saponin 등 생리 활성 물질들의 기능이 밝혀지면서 기능성 식품으로도 주목을 받고 있다[2,10,14,20]. 이미 많은 연구가 이루어진 녹차 polyphenol의 항산화 효과 [6]와 같이 칩의 polyphenol류인 catechin도 항산화 효과[9] 외에 해열, 해독[2,8] 등 간장병과 관련한 약리작용 등이 알려져 있다[1,5,9,15,18]. 이외에 칩의 추출성분이 지질의 과산화물 생성을 방지하는 효과나 생체에 대해 지질막등의 보호작용, 식용유지에 대한 효과[8] 및 구강 미생물에 대한 항균효과[11], Rat의 골다공증 치료효과[7], NF- κ B를 억제하여 지질과산화물 생성억제 및 라디칼소거 활성효과[18] 등이 보고되었다. 하지만 칩 추출물의 면역세포에 대한 직접적인 활성은 보고되지 않았다.

본 실험은 칩 추출물의 면역학적 활성을 평가하기 위한 목적으로, 생쥐의 비장세포의 성장률 및 cytokine 분비에 미치는 효과, 비장세포에서 분리한 B세포의 성장률 및 항체생산효과,

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3752, Fax : +82-61-750-3708

E-mail : sungtae@sunchon.ac.kr

그리고 대식세포주인 RAW264.7 세포의 NO₂⁻ (Nitrite) 및 cytokine 분비를 측정하여 침 추출물의 면역학적 활성효과를 검증하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육 상자(18×20 cm)당 6개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 생쥐는 2주일간 실온에서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8-12주 사이의 생쥐를 실험에 사용하였다.

사용 시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640와 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic), FCS (fetal calf serum)는 GibcoBRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 2-ME (2-mercaptoethanol), sodiumbicarbonate (NaHCO₃), sulfanilamide 와 N-1-naphthyl-ethylen-diamine는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell proliferation Assay)는 Promega (Madison, WI, USA) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체는 Pharmingen (San diego, CA, USA) 제품을 사용하였다.

침 추출물 제조

침을 충분히 건조하여 갈아서 분말로 만든 후, 각각 3차 증류수를 넣고 100℃에서 3 시간 진탕 배양한 다음, 25℃에서 3,000 rpm (30 min)으로 원심 분리하여 상층액을 회수하고, 분리한 상층액 중 일부는 Whatman (filter papers 2, 110 mm)로 3번 filter 하여 4℃에 보관하며 사용하였다. 일부 추출물은 아세톤으로 처리(추출물과 아세톤 비율은 1:2)하여 침전시킨 후, 4℃에서 15,000 rpm (10 min)으로 원심 분리 후, 충분히 건조시킨 다음에 3차 증류수에 희석하여 투석막에 넣어 3차 증류수로 이틀 간 투석시켜서 다시 회수하여 실험에 사용하였다. 모든 추출물은 110℃에서 충분히 건조시킨 후 건조중량을 측정하여 사용하였다.

비장세포 분리

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 먼저 생쥐의 비장을 분리한 다음, 핀셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 5×10⁶ cells/ml 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well당 100

μl씩 첨가하였다. 이때, 실험 재료를 농도별로 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

B세포 분리

위의 방법에서 분리한 비장세포를 10 ml의 10% FBS-RPMI 1640에 희석한 후, 40 μl anti-Thy1.2 mAb ascites를 넣고 4℃에서 60분간 incubation하였다. 그 후 4℃, 1,200 rpm에서 6분간 원심 침전한 후에 5 ml의 10% FBS-RPMI 1640 배지에 희석하고, 250 μl rabbit complement를 첨가하여 37℃ water bath에서 45분간 배양하였다. 그 다음 최소영양배지(MEM)로 1,200rpm에서 6분간 원심침전을 두 번 반복하고, 10% FBS-RPMI 1640 배지 500 μl에 희석하여 Sephadex G-10 column을 통과시켜서 B 세포만을 순수분리하였다.

세포증식 측정법

세포증식 측정은 Cell titer 96[®] Aqueous One Solution Cell proliferation Assay (Promega, USA)를 사용하였으며, 세포 배양액 100 μl에 Cell titer 용액을 15 μl씩 첨가하여 4-8시간 동안 배양한 다음 Microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로 450 nm에서 O.D.값을 측정하여 증식정도를 측정하였다.

대식세포주 배양법

생쥐 단핵/대식세포 계열의 세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포배양은 RPMI 1640 배지에 sodium bicarbonate (NaHCO₃, 2 g/l), 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 units/ml streptomycin sulfate, 25 μl/ml amphotericin B), 2-ME (2-mercaptoethanol, 50 μM), 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였다.

Cytokine 분비량 측정

대조군으로 LPS와 anti-CD3를 첨가하거나 또는 침 추출물을 배양세포에 첨가하여 배양한 상층액을 24시간 후에 회수하여, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)로 상층액에 포함된 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α의 양을 측정하였다. 즉, flat-bottomed microwell plate에 goat anti-mouse cytokine 1차 항체를 coating buffer (0.1M NaHCO₃, pH 8.2)를 이용하여 4℃에서 overnight incubation 한 후, 10% FBS-PBS용액으로 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. 실험에서 채취한 배양 상층액을 적당한 비율로 희석하여 plate에 각각 넣어서, 실온에서 4시간 incubation시킨 후, biotinylated anti-cytokine 2차 항체를 첨가하였다. 그리고, avidin-conjugated alkaline phosphate를 넣고, 실온에서 1시간 incubation시키고, 기질로 p-nitrophenyl phosphate를 넣은 후 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사이토카인의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 각종 사이토카인의 측정 한계치는 10 pg/ml이었다.

면역글로불린 농도 측정

대조군으로 LPS를 첨가하거나 또는 칩 추출물을 배양세포에 첨가하여 배양한 상층액을 48시간 후에 회수하여 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)로 상층액에 포함된 IgM, G1, G2a, G2b, G3 농도를 측정하였다. 이때 각종 면역글로불린의 측정 한계치는 100 µg/ml이었다.

일산화질소 측정

안정된 NO산화물인 NO₂⁻ (Nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 대식세포주(RAW264.7)를 적당한 조건 하에서 48시간 배양한 배양 상층액을 96 well plate에 100 µl씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1 : 1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 64 µM에서부터 0.5 µM까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

비장세포의 증식반응

비장은 말초 림프기관으로, 주로 T세포, B세포 및 대식세포 등으로 구성되어 있으며, 외부 항원의 침입에 대해 T세포, B세포 및 대식세포는 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 유도한다. 따라서 칩 추출물이 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 비장세포에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 먼저 칩의 물 추출물과 아세톤 추출물을 이용하여 생쥐 비장세포의 증식을 확인하였다. 분리된 비장세포를 96 well plate에 5×10⁵/well 로 첨가하고 대조군과 T세포를 자극하는 anti-CD3 mAb (0.01, 0.1 µg/ml), B세포를 자극하는 LPS (1, 10 µg/ml), 그리고 칩 추출물(1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/ml)을 처리

하여 48시간 배양 후 증식반응을 측정하였다. 실험 결과, 물 추출물과 투석 후 아세톤으로 침전시킨 추출물은 비장세포의 증식을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 물 추출물에서는 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/ml 농도 의존적으로 비장세포 증식이 관찰되었으며, 아세톤 추출물에서도 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/ml 농도 의존적 세포생장이 관찰되었다. 그리고 물 추출물 보다 아세톤 추출물이 비장세포를 1.6배 더 증식시키는 결과를 나타났다. 이상의 결과로 칩 추출물에 생쥐 비장세포를 증식시키는 물질이 포함되어 있다는 것을 알 수 있으며, 아세톤으로 침전시킨 칩 추출물이 비장세포를 더 증식시킬 수 있다는 것이 나타났다.

비장세포의 사이토카인 생산 효과

비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 가지 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 즉, 비장세포의 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인에 따라 사이토카인이 매개하는 면역반응과 증식하는 세포의 종류를 구분할 수 있다. 따라서, 비장세포 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보았다. 분비되는 사이토카인의 측정하기 위해 분리한 비장세포를 24 well plate에 5×10⁶/well로 첨가하고, 물 체액 추출물과 아세톤으로 농축시킨 칩 체액 추출물에서 최대 증식반응을 유도하는 농도인 300 µg/ml을 처리하여 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. Table 1에 나타난 것과 같이, 비장세포 중에서 B세포의 증식을 유도하는 LPS는 IL-6와 TNF-α을 유도하였고, T세포의 증식을 유도하는 α-CD3 mAb는 IL-2, IFN-γ 분비를 유도하였다. 칩 추출물은 IL-6, TNF-α, IL-2, IFN-γ 분비를 유도하였다. IL-6의 생산량은 B세포의 증식을 유도하는 LPS를 처리한 경우 현저히 높은 양을 분비했으며, 대조군에 비해, 물 추출물과 아세톤 추출물이 약

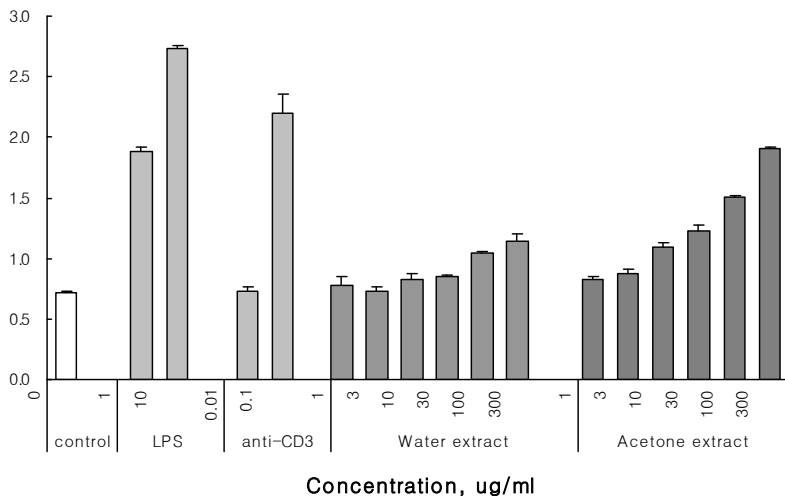


Fig. 1. The effect of *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts on the proliferation of spleen cells. The spleen cells (C57BL/6, 5×10⁵ cells/well) were stimulated with α-CD3 mAb, LPS or starfish extracts at various concentrations for 2 days.

Table 1. Effect of *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts on the production of various cytokines

Conditions	Cytokines, ng/ml			
	IL-6	TNF- α	IL-2	IFN- γ
Control	0.084 \pm 0.015	0.130 \pm 0.001	0.009 \pm 0.000	0.640 \pm 0.495
LPS (10 μ g/ml)	0.663 \pm 0.016	2.879 \pm 0.027	0.016 \pm 0.001	199.020 \pm 2.333
Anti-CD3 (1 μ g/ml)	0.237 \pm 0.007	1.620 \pm 0.016	0.405 \pm 0.000	1047.330 \pm 38.184
Water extract (300 μ g/ml)	0.188 \pm 0.005	1.337 \pm 0.001	0.018 \pm 0.005	14.790 \pm 1.414
Acetone extract (300 μ g/ml)	0.194 \pm 0.004	1.335 \pm 0.022	0.017 \pm 0.000	74.970 \pm 3.818

The C57BL/6 splenic cells (5×10^6 /well) were cultured with various stimulators for 24 hr, and the supernatants were assayed for cytokine activity, ELISA were used to quantitative levels of murine cytokines.

2.3배 정도의 분비되었다. TNF- α 분비의 경우에 대조군에 비해, 물 추출물과 아세톤 추출물은 약 10배 정도의 분비되었다. IL-2의 생산량은 T세포의 증식을 유도하는 anti-CD3를 처리한 경우 현저히 높은 양을 분비했으며, 대조군에 비해, 물 추출물과 아세톤 추출물에서 약 2 배 정도 분비되었다. IFN- γ 의 생산량은 T세포의 증식을 유도하는 anti-CD3를 처리한 경우 현저히 높은 양을 분비했으며, 대조군에 비해 물 추출물은 약 23 배 정도, 아세톤 추출물은 약 120배 분비되었으며, 물 추출물보다 아세톤 추출물이 약 5 배 정도 IFN- γ 의 분비량이 높았다. 이상의 결과로 칩 추출물은 비장세포를 직접 자극하여 IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ 분비를 유도하는 것으로 나타났다.

B세포의 증식반응

비장세포의 cytokine 분비를 분석한 결과, 칩 추출물 처리 시 T 세포가 분비하는 IL-2, IFN- γ 보다 B 세포가 분비하는 IL-6, TNF- α 가 증가하였다. 이상의 결과로 칩 추출물은 비장세포의 B 세포를 자극하여 세포증식 및 cytokine분비를 유도하는 것으로 예상되어, 비장세포에서 B세포를 분리 후 칩의 물 추출물과 아세톤 추출물의 직접적인 효과를 살펴보았다. 먼저, 분리한 B세포를 3×10^5 /well 로 첨가 후, 칩 추출물을 농도

별로 처리하여 2일간 배양하여 증식반응을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이, α -CD3 mAb에 의해서는 증식반응이 유도되지 않고, LPS에 의해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있으며, 칩의 물 추출물을 첨가하였을 때, 농도 의존적인 B 세포의 증식이 유도되었다. 칩 아세톤 추출물의 경우도 농도 의존적으로 B 세포가 증식되었다. B 세포의 증식 역시 아세톤으로 농축시킨 칩 추출물이 물 추출물보다 약 1.7배 B세포의 증식을 유도하였다. 이상의 실험 결과로, 칩 추출물은 비장세포 중에서 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 것을 알 수 있었다.

면역글로블린 M 생산

면역세포 중에서 B세포는 외부에서 침입한 항원에 대해서 면역글로블린을 생산하여 체액성 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 B세포의 증식을 유도하는 것으로 확인된 칩 추출물이, B세포의 면역글로블린 생산을 유도하는지를 확인하였다. 실험 결과, 대조군에 비해 칩 추출물을 처리 시 물 추출물은 IgM의 분비가 2배 정도 아세톤 추출물은 약 6배 정도 증가하였고, 물 추출물 보다 아세톤 추출물이 약 3배 정도의 IgM이 생산된 것을 알 수 있었다(Table 2). 이상의 실험

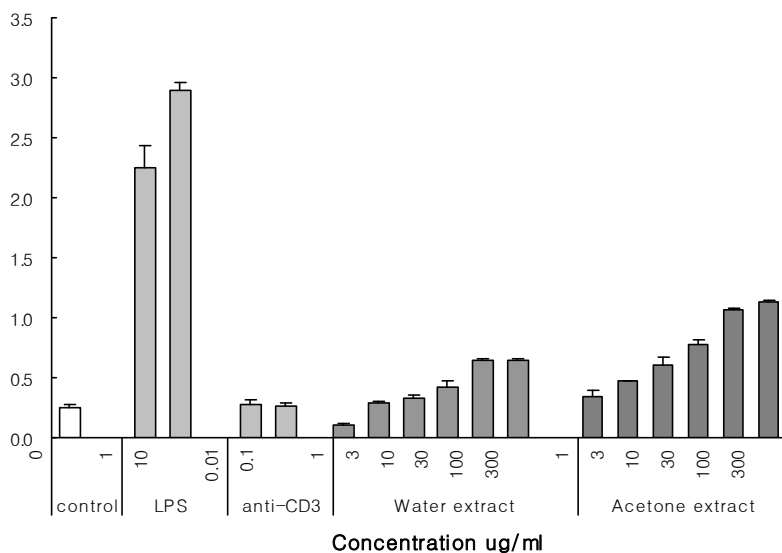


Fig. 2. The effect of *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts on the proliferation of B cells. The B cells (C57BL/6, 5×10^5 cells/well) were stimulated with α -CD3 mAb, LPS or *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts for 2 days. The spleen cells were treated with anti-Thy1.2 and rabbit complements and then passed by G-10 column. The passed cells were used as purified B cells in this experiment.

Table 2. Effect of *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts on the production of various Ig's

Conditions	Immuglobulin, ng/ml				
	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Control	19.443±0.094	4.768±0.024	<0.1	4.700±0.000	<0.1
LPS (10 µg/ml)	1026.900±127.279	10.993±1.662	<0.1	42.700±7.071	1.775±0.070
Anti-CD3 (1 µg/ml)	21.776±6.552	5.360±0.625	<0.1	<0.1	<0.1
Water extract (300 µg/ml)	40.630±2.969	3.143±0.107	<0.1	<0.1	<0.1
Acetone extract (300 µg/ml)	112.890±8.909	3.043±0.178	<0.1	3.700±0.000	<0.1

The purified B cells (C57BL/6, 3×10^5 cells/well) stimulated either in medium alone or in medium that contained LPS, α -CD3 mAb or *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts for 48 hr, and supernatants were assayed for IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 level. ELISA were used to quantitative levels of murine IgM, IgG subclass.

결과로 칩 추출물은 B세포의 증식뿐만 아니라 IgM의 생산도 유도하는 것을 알 수 있었다.

면역글로불린 G 생산

항원 자극 시 처음에는 IgM 항체가 주로 생성되나, 항원 자극에 의해 B세포가 분화함에 따라 생성되는 항체의 형이 IgM에서 IgG, IgA 또는 IgE로 바뀌게 된다. 이러한 과정을 개별형 전환(isotype switching)이라 한다. B세포가 생산하는 항체 종류의 변화를 관찰하기 위해 IgG subtype인 G1, G2a, G2b, G3 각각의 농도를 측정하였다. 그 결과, IgG1은 칩의 물과 아세톤 추출물을 처리했을 때 어느 정도 분비되는 것처럼 보였지만, 대조군과 비교했을 때, 거의 분비 되지 않았다. IgG2b는 역시 아세톤 추출물에서 분비되는 것처럼 보였지만, 대조군과 비교했을 때 거의 분비 되지 않았다. IgG2a와 IgG3의 경우는 무처리 군은 거의 생산하지 않았고, 칩을 처리했을 때 거의 생산 하지 않은 것으로 알 수 있었다(Table 2). 이상의 실험 결과로 칩 추출물이 IgG subtype로의 개별형 전환을 유도하지 않는 것을 알 수 있었다.

대식세포주의 일산화질소 생산

대식세포에 의해 탐식된 박테리아는 살균작용에 의해 분해 된다. 박테리아를 제거하기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 알려진 것으로 일산화질소(nitric oxide; NO)가 있다. 따라서 칩의 물 추출물과 아세톤 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다.

대식세포주(RAW264.7)를 96well plate에 5×10^4 /well로 첨가한 후, LPS (10 µg/ml) 또는 물 추출물과 아세톤 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양 후 상층액에 포함된 일산화질소의 산화된 형태인 NO²의 농도를 Greiss반응을 이용하여 측정하였다. 실험 결과, Fig. 3에 나타난 것과 같이, 칩의 물 추출물을 첨가하였을 때 농도 의존적으로 일산화질소 분비가 증가하였다. 물 추출물보다 아세톤 추출물이 NO²를 더 유도하는 것으로 나타났으며, 특히 300 µg/ml에서 NO²가 가장 많이 일산화질소를 유도하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로, 칩 추출물이 대식세포를 활성화시켜 일산화질소 생산을 직접적으로 유도하는 것으로 사료된다.

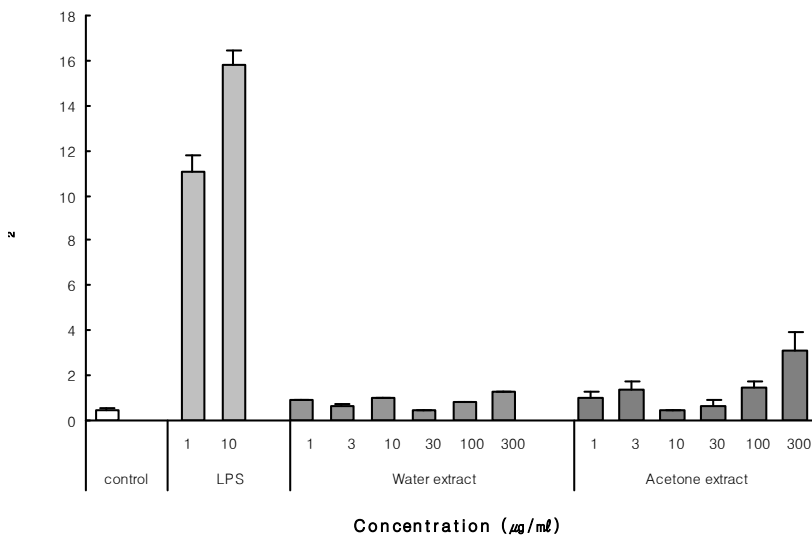


Fig. 3. Effect of *Pueraria thunbergiana* water and acetone extracts on the production of nitric oxide. RAW 264.7 (5×10^4 cells/well) were cultured either in medium alone or in medium that contained LPS or *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts for 48 hr.

Table 3. Effect of *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts on the secretion of various cytokines

Conditions	Cytokines, ng/ml			
	IL-6	TNF- α	GM-CSF	IL-1 β
Control	0.402 \pm 0.014	9.306 \pm 0.238	0.137 \pm 0.028	0.000 \pm 0.000
LPS (10 μ g/ml)	39.900 \pm 7.318	54.360 \pm 2.280	1.010 \pm 0.045	0.016 \pm 0.000
Water extract (300 μ g/ml)	2.235 \pm 0.031	22.721 \pm 0.461	0.145 \pm 0.010	0.004 \pm 0.000
Acetone extract (300 μ g/ml)	3.480 \pm 0.031	33.669 \pm 1.671	0.165 \pm 0.025	0.014 \pm 0.000

The RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated either in medium alone or in medium that contained LPS or *Pueraria thunbergiana* water extracts and acetone extracts for 24 hr, and supernatants were assayed for IL-1 β , IL-6, TNF- α , and GM-CSF activity. ELISA were used to quantitative levels of murine cytokine.

대식세포의 사이토카인 생산 효과

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-1 β , IL-6, IL-12, GM-CSF, 그리고 TNF- α 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. IL-1 β 는 국소 염증반응을 매개하며 혈관 내피세포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하는 표면분자의 발현을 증가시키는 사이토카인이며, IL-6는 간세포가 피브리노젠과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 활성화시키는 B세포 성장인자로 작용한다. IL-12는 NK 세포를 활성화시키는 인자이고 GM-CSF는 성장과 분화를 자극하며 TNF- α 는 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이다. 따라서 쑥 추출물이 대식세포를 활성화시켜 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여, 배양한 대식세포주를 24 well plate에 5×10^5 /well로 첨가하여, 최대 일산화질소 생산을 유도하는 농도인 300 μ g/ml을 처리하고 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 측정결과, Table 3에 나타난 것과 같이 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 IL-6, GM-CSF와 TNF- α , IL-1 β 의 생산량이 대조군에 비해 현저히 증가하였으며 쑥 추출물도 대조군에 비해 많은 양의 IL-6, TNF- α , IL-1 β 생산을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 추출물에 의해 유도된 대식세포의 IL-6은 대조군에 비해 물 추출물은 약 6배 아세톤 추출물은 약 7배 정도 분비했으며, 아세톤 추출물이 물 추출물에 비해 약 1.5배 정도 더 분비 되는 것으로 나타났다. TNF- α 생산량은 대조군에 비해 물 추출물은 약 2배정도 아세톤 추출물은 약 4배 정도 차이가 났으며, 물 추출물보다 아세톤 추출물이 약 1.5배 정도 차이가 났다. IL-1 β 는 대조군에 비하여 물 추출물과 아세톤 추출물 처리 시 증가되었으며, 물 추출물에 비해 아세톤 추출물이 3.5배 정도 더 분비되는 차이를 보였다. 하지만 GM-CSF는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다. 이상의 결과로, 쑥 추출물은 대식세포를 강력하게 활성화시켜 많은 양의 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 생산을 유도하였으며, 물 추출물보다 아세톤 추출물이 효과적이었다.

감사의 글

본 연구는 순천대학교 학술연구비 공모과제의 지원을 받아

수행하였으며 이에 감사드립니다.

References

- An, C. G. 1998. Antioxidative effect of spice and their synergism with catechin and ascorbic acid. Ph. D. Thesis. Sook-Myoung University, Seoul Korea.
- Choo, M. K., Park, E. K., Yoon, H. K. and Kim, D. H. 2002. Antithrombotic and antiallergic activities of daidzein, a metabolite of puerarin and daidzin produced by human intestinal microflora. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1328-1332.
- Han, S. H., Kim, J. B., Min, S. G. and Lee, C. H. 1995. The effects of puerariae radix catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 713-719.
- Hankins, C. N., Kindinger, J. I. and Shannon, L. M. 1980. Legume alpha-galactosidases which have hemagglutinin properties. *Plant Physiol.* **65**, 618-622.
- Jo, H. J., Lee, S. K., Lee, H. J., Kang, H. Y., Choi, D. H. and Lee, T. S. 2008. A study on the extractives and anti-oxidation activity of phellodendron amurense and *pueraria thunbergiana*. *Korean Forest Bioenergy Soc.* **27**, 19-25.
- Kang, J. E., Chae, I. S., Song, Y. B. and Kang, J. S. 2008. Effects of green tea on weight gain, plasma and liver lipids and lipid peroxidation in pair fed rats. *Korean J. Nutr.* **40**, 602-611.
- Kim, C. S., Ha, H. K., Kim, H. J., Lee, J. H. and Song, K. Y. 2002. *Pueraria lobata* ohwi as an osteoporosis therapeutics. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 710-718.
- Kim, M. J. 1998. Effects of extracts from mugwort and *puerariae radix* roots on the blood ethanol concentration and liver function. M.D. Thesis, Konkuk University, Seoul, Korea.
- Kim, S. H. 1996. The study on the antioxidant effects of crude catechin extracted from *pueraria thunbergiana* root. M.D. Thesis, Konkuk University, Seoul Korea.
- Kinjo, J., Takeshita, T., Abe, Y., Terada, N., Yamashita, H., Yamasaki, M., Takeuchi, K., Murasaki, K., Tomimatsu, T. and Nohara, T. 1988. Studies on the constituents of *pueraria lobata*. IV. Chemical constituents in the flowers and the leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1174-1179.
- Lee, H. O., Kim, C. H., Lim, J. A., Lee, M. H. and Baek, S. H. 2004. Antimicrobial effect of *puerariae thunbergiana* extracts against oral microorganism. *J. Dental Hygiene Sci.* **4**,

- 45-48.
12. Lee, K. T., Sohn, I. C., Kong, E. A., Kim, D. H., Choi, S. K., Choi, J. W. and Park, H. H. 1999. Antioxidative and cytoprotective effects of isoflavones isolated from *pueraria thunbergiana* flowers. *Yakhak Hoeji* **43**, 736-742.
 13. Lim, Y. 1991. Faculties in department of herbology. Oriental Herbology. Publishing Co. Seoul. pp. 167-244.
 14. Moon, B. K., Jeon, K. S. and Hwang, I. K. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean and on processing conditions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **12**, 527-583.
 15. Oh, M. J. 1990. Antioxidative components of *Pueraria* root. *Kor. J. Food Sci.* **22**, 793-798.
 16. Park, J. H. and Lee, J. G. 2000. The encyclopedia of medicinal plants. Shinilbooks. pp. 440.
 17. Pyon, J. Y., Shen, H. I. and Kwon, K. W. 2006. Effect of cutting, mulching and spot application of herbicides to cot stumps on control of kudzu vine in forest. *Kor. J. Weed Sci.* **26**, 346-352.
 18. Song, H. S., Park, Y. H., Kim, S. K., Moon, W. K., Kim, D. W. and Moon, K. Y. 2004. Downregulatory effect of extracts from mistletoe (*viscum album*) and pueraria Root (*pueraria radix*) on cellular NF- κ B activation and their antioxidant activity. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* **33**, 1594-1600.
 19. Suzuki, A., Hizukuri, S. and Takeda, Y. 1981. Structure of amylo maize amylose. *Cereal Chem.* **66**, 22-25.
 20. Zheng, G., Zhang, X., Meng, Q., Gong, W., Wen, X. and Xie, H. 2002. Protective effect of total isoflavones from pueraria lobata on secondary osteoporosis induced by dexamethasone in rats. *Zhong yao cai.* **25**, 643-646.

초록 : 칩 추출물의 면역세포 활성화 효과

김종진¹ · 이혁재³ · 이성태^{1,2*}

(¹순천대학교 생명산업과학대학 생물학과, ²순천대학교 약학대학 약학과, ³서남대학교 임상병리학과)

동양에서 한약 재료로 사용되는 칩(*Pueraria thunbergiana*)은 항산화, 항균효과 및 골다공증 치료 등의 다양한 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있지만, 생태학적으로는 산림생태계를 파괴하는 종으로 알려져 있다. 본 연구는 칩의 면역학적 효과를 검증하여 유용한 자원으로 활용하는데 목적이 있다. 칩 추출물을 이용하여 생쥐 비장에 있는 면역세포 활성화 작용을 실험한 결과, 칩 추출물은 첫째, 농도 의존적으로 생쥐 비장세포의 증식 유도하였으며 IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ 의 cytokine 생산을 증가시켰다. 둘째, 특히 비장세포 중 칩 추출물은 B세포를 자극하여 세포증식 및 IgM의 생산을 증가시켰다. 셋째, 대식세포주의 일산화질소 생산을 유도하였으며, 또 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 cytokine 분비를 유도하였다. 이상의 실험 결과, 본 실험에서 사용한 칩 추출물은 B세포와 대식세포 같은 면역세포의 증식과 각종 사이토카인을 생산을 유도하기 때문에, 면역반응을 조절하는 성분이 포함되어 있는 것으로 생각되며 특히, 아세톤 추출물이 물 추출물에 비하여 효과적이었다. 따라서 추가적인 실험을 통해, 면역반응을 조절하는 성분을 분리 정제하여 그 특성을 명확히 규명한다면, 각종 의약품이나 건강식품을 개발할 수 있는 원재료로서 칩을 이용할 수 있으며, 부수적으로 산림생태계에 복원에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.