

## *Ulmus macrocarpa* Hance Water Extract Improved Splenocytes Survival and NK Cell Cytotoxicity

Sung Do Lee<sup>1</sup>, Deok Won Kim<sup>1</sup>, Inhwan Lee<sup>1</sup>, Jong-Hwan Lee<sup>3,7</sup>, Sook Kyung Hyun<sup>2,7</sup>,  
Kyung-Hwa Kang<sup>4,7</sup>, HyeJin Hwang<sup>2,7</sup>, CheolMin Kim<sup>6</sup>, Byoung Woo Kim<sup>5,7</sup> and Kyung Tae Chung<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Korean Physiology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>5</sup>Department of Applied Life Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>6</sup>School of Medicine, Pusan National University, Busan 626-870, Korea

<sup>7</sup>Research Center for Anti-aging Technology Development, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received January 4, 2016 / Revised January 15, 2016 / Accepted January 20, 2016

Ulm cortex is the elm bark or root bark of *Ulmus macrocarpa* Hance and has been used as an ingredient of traditional medicine for anti-inflammatory, analgesic, anti-cancer and wound healing on both the East and the West. This study investigated whether the *Ulmus macrocarpa* Hance Water extract (UMWE) has the *in vivo* and *in vitro* immune activating effect. Animals were orally administrated for 14 days as follows: no treat group with distilled water, cyclophosphamide (CY) group with 120 mg/kg of CY, UMWE 100+CY group with 100 mg/kg of UMWE and 120 mg/kg of CY, UMWE 200+CY group with 200 mg/kg of UMWE and 120 mg/kg of CY, UMWE 100 group with 100 mg/kg of UMWE and UMWE 200 group with 200 mg/kg of UMWE. The immunosuppressive drug CY was intraperitoneally injected to induce immune suppression. Spleen indices showed small changes in CY injected groups but splenocyte indices showed greater decrease in the same groups. However, UMWE appeared to relieve CY's immunosuppression. UMWE also delayed *in vitro* splenocyte death increasing its longevity. These data obtained by MTT assay and 7-amino-actinomycin D which stains preferentially dead than live cells. UMWE alone did not show cytotoxicity based on its apoptotic effect on splenocytes *in vitro* and *in vivo*. Splenic NK cell activity was maintained by UMWE under the presence of CY *in vitro*. The data indicated that UMWE protects splenocytes from the immunosuppressive drug CY under *in vitro* and *in vivo* conditions.

**Key words** : Immune function, NK cell activity, splenocyte survival, cyclophosphamide, *Ulmus macrocarpa* Hance

### 서 론

예로부터 동·서양을 막론하고 면역 기능을 향상시켜 질병을 예방하고 치료하기 위해 식물유래 천연물을 사용해왔다. 최근에는 첨단화된 의료기술로 인해 사람의 수명 증가와 함께 노화와 면역 기능 유지에 대한 관심이 계속 증가하는 추세이며, 따라서 식물유래 천연물을 통해 면역기능에 영향을 주는 연구가 활발하게 진행 중인 것으로 보고 되고 있다[13].

왕느릅나무(*Ulmus macrocarpa* Hance)는 느릅나무과(Ulma-

ceae)에 속하는 관엽교목으로 잎은 광립형 또는 타원형이고 밑은 췌기 모양이며 뽕죽하고 톱니가 있다. 과실은 익과로서 무이(蕪莢)라고 한다. 우리나라 전국 각지에 자생하며, 일본 및 중국 등에도 분포하고 있으며 왕느릅나무의 뿌리 혹은 줄기껍질을 벗겨 햇볕에 건조한 것을 유피(楡皮) 혹은 유근피(楡根皮), 유백피(楡白皮)라고 한다[23, 26]. 전통적으로 한방에서는 유피에 대하여 무독하며 소변불통, 이수, 통립, 소종 및 이관절의 효능이 있고 수종, 단독 및 개선, 늑막염, 위궤양, 위염 등을 치료하는 곳에 사용되며 민간에서는 소염제 및 상처치료 약으로 사용되어 왔다고 알려져 있다[11]. 현재 느릅나무에 관련된 연구로 느릅나무 추출물의 생리활성에 대한 보고가 있으며[12], 또한 항산화[1, 15, 16] 및 항염증[17], 항균[18, 24] 효과가 있음이 보고되었다. 최근에는 느릅나무 추출물에 의한 항암 효과[19], 면역기능 활성화 및 조절 효과[31]도 보고되었으나, 다른 효능들에 비해서는 많은 추가적인 연구가 필요하다.

면역은 인간의 생존에 있어 필수적인 것으로 외부로부터의

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2681, Fax : +82-51-890-2622

E-mail : kchung@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

침범에 대항하는 방어기전으로 내재면역(innate immunity)과 적응면역(adaptive immunity)으로 나뉜다. 일차적인 면역반응인 내재면역은 항원에 특이적으로 반응하지 않고 공통적인 패턴을 인식함으로써 동시에 여러 항원과 반응하여 제거하는 항원 비특이적 면역반응(non-specific immune response)이다. 내재면역 중 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)는 적응면역과 상호 협력을 통해 효율적이고 통합된 항원 비특이적 세포매개면역반응을 나타낸다. NK cell은 세포독성 과립을 방출하는 세포 살해 기능과 cytokine IFN- $\gamma$ 를 분비하여 대식세포와 T 세포를 활성화시키는 두 가지 효과 기능이 있다. 적응면역은 이차면역기관인 비장(spleen)과 흉선(thymus)에서 분화, 성숙되는 B와 T 세포에 의해 수행된다[30, 31, 32].

Cyclophosphamide (CY)는 DNA alkylating agent로 주로 항암제로 쓰이나, 또한, 면역억제를 유발하여 자가 면역질환의 치료 및 수혈, 골수 이식 중 면역관용 유도(Tolerance induction)를 위해 사용되고 있다[5, 7]. CY는 면역억제 기능뿐만 아니라 식물유래 천연물의 면역조절 기능 연구를 위하여 면역억제를 나타내는 동물모델을 유도하는데 많이 사용하고 있다[29].

따라서 본 연구에서 왕느릅나무의 열수 추출물이 면역기관인 비장세포의 생존을 유지 혹은 사멸을 지연하며 세포매개면역기능 활성화에 도움을 주는 것인지를 검토하였으며, 면역기능 향상 연구를 위하여 면역이 약화된 마우스의 면역체계와 유사한 모델을 획득하기 위해 면역억제제인 cyclophosphamide (CY)를 사용하여 인위적으로 면역기능이 저하되는 마우스 모델을 유도하였다.

이 모델을 통하여 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 면역세포의 생존 및 사멸, 그리고 NK cell activity 통하여 조사하였으며, 왕느릅나무의 열수 추출물이 면역세포 생존 유지 및 사멸 지연, NK cell 기능 활성화에 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료의 추출

왕느릅나무 껍질(*Ulmus macrocarpa* Hance)은 건조 상태로 Dae-Han herbal medicine Inc. (Busan, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 건조된 왕느릅나무 껍질에 증류수를 가한 후 95°C에서 6시간 추출하였으며, 추출된 용액은 80 mesh filter에 여과하여 75°C 이하에서 2시간 동안 감압농축기를 사용하여 농축시켰으며, 농축물은 -40°C의 동결건조기를 이용하여 48 시간 동안 건조시켰다. 최종적으로 약 9.33%의 수율로 분말화된 왕느릅나무 껍질 열수 추출물을 획득하였다. 획득한 왕느릅나무 열수 추출물은 UMWE (*Ulmus macrocarpa* water extract, 왕느릅나무 열수 추출물)라고 명명하였으며, 제조제가 포함된 desiccator내에 넣어 4°C에서 냉장보관

하였다.

### 실험동물

실험동물은 12주령의 특정 병원체 부재(specific pathogen free) 수컷 BALB/c mouse와 C57BL/6 mouse를 (주)SAMTAKO에서 분양 받아 식수와 mouse 전용 사료를 자유로이 공급하며 실험동물 사육실에서 1주일간 적응 기간을 둔 후 실험에 사용하였다. 실험동물 사육실의 온도는 24°C $\pm$ 1, 습도는 55 $\pm$ 5%를 유지하였으며 자연광과 인공조명을 동반한 명암교대를 12시간씩 유지하였다. 실험동물의 사육관리 및 동물실험은 동의대학교 동물윤리 심사위원회의 심의 및 동물실험기준(R2014-07)을 준수하였다.

### 면역억제 유도 모델

12주령의 수컷 BALB/c mouse가 사용되었으며 실험 전 mouse 체중 측정을 통해 평균값을 구한 뒤 체중 편차에 맞게 개체 수를 군별 6마리로 설정 하였으며, 실험군은 아무 처리를 하지 않은 비처리군, CY 투여군(120 mg/kg), UMWE를 100 mg/kg의 농도로 식이하며 CY (120 mg/kg)를 투여한 군, UMWE를 200 mg/kg의 농도로 식이하며 CY (120 mg/kg)를 투여한 군, UMWE 100 mg/kg과 200 mg/kg의 농도로 식이한 군, 총 6군으로 설정하여 실험을 진행 하였다. UMWE의 경구 투여는 존대를 사용하여 실행하였으며 경구투여를 하기 위한 시료의 조제는 3일 마다 각 실험군의 평균 체중을 측정하여 측정값을 토대로 100 mg/kg과 200 mg/kg의 농도가 되게 멸균수에 녹인 후 0.2  $\mu$ m filter로 여과 멸균하여 경구투여 하였다[28]. 또한 비처리군과 CY 투여군에는 동량의 멸균수를 경구투여 하였다. 총 식이는 14일간 매일 진행 하였으며, 면역억제 유도[30]를 위하여 희생 2일 전 CY를 120 mg/kg의 농도로 복강 내 주사하여 면역억제 유도 모델을 획득하였으며, 비처리군 및 UMWE만을 식이한 군에는 동량의 멸균된 saline을 복강 내 주사하였다[9].

### 비장 지수 산출

희생 전 각 실험군의 체중을 측정하고 mouse를 희생하여 비장을 적출한 뒤 비장 무게를 측정 하였다. 각 실험군의 체중 차이에 의한 오차를 최소화한 후 표준화하기 위하여 실험군의 체중과 비장의 무게를 바탕으로 비장 지수를 다음과 같이 산출하였다[3].

$$\text{Spleen weight index} = \frac{\text{Spleen weight} \times 100}{\text{Body weight}}$$

### 총 비장세포 계수 및 비장세포 지수 산출

적출한 비장을 RPMI 1640 배지에서 멸균한 stainless mesh (0.038 aperture, Sigma-Aldrich, Korea)를 사용하여 단일세포 현탁액을 만들었다[32]. 현탁액을 원심분리하여 상층액을 제

거하고 RBC lysis buffer (Biolegend, USA)를 첨가하여 적혈구를 용혈 시켰다. 원심분리를 통해 용혈층을 제거하고 RPMI 1640 배지로 세척 후 10% FBS가 포함된 complete RPMI 1640 배지에 비장세포를 재현탁 하였다. 그 후 비장세포 현탁액을 trypan blue exclusion method를 이용하여 hemocytometer 상에서 계수하여 각 실험에 사용하였다.

비장세포 지수는 계수한 총 비장세포 수와 비장세포의 무게를 사용하여 다음과 같이 산출하였다[21].

$$\text{Splenocyte Index} = \frac{\text{Splenocyte number} \times 10^7}{\text{Spleen weight}}$$

### 세포 생존능 측정

BALB/c mouse의 비장세포에 대한 UMWE 시료의 세포 생존능 작용은 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 방법 (MTT assay)으로 측정 하였다 [22]. UMWE 시료는 10 mg/ml의 농도로 RPMI 1640 배지에 녹인 후 0.2  $\mu\text{m}$  filter (Watman, UK)로 여과 멸균하여 stock solution을 조제한 후 complete RPMI 1640 배지를 사용하여 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용 하였다. 비장세포( $5 \times 10^5$  cells)를 96-well microplate의 각 well마다 접종한 뒤 희석한 UMWE 시료를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 시간대 별로 배양 후 세포의 생존능을 측정 하였다. 배양된 세포를 원심분리(3,000 rpm, 15 min, 20°C)하여 상층액을 제거한 뒤 complete RPMI 1640 배지를 100  $\mu\text{l}$  첨가하고 MTT solution (5 mg/ml)을 20  $\mu\text{l}$  첨가하여 4시간 동안 추가로 배양하였다. 배양한 세포는 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 formazan crystal elution solvent를 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 15분간 차광 및 교반하여 생성된 formazan crystal을 용해한 후 microplate spectrophotometer (Bio-rad, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

### 세포사멸 측정

UMWE를 처리한 BALB/c mouse 비장세포를 7-amino-actinomycin D (7-AAD) stain로 염색하여 비장세포의 형태학적 변화 및 사멸을 시간대 별로 Motic AE31 형광현미경(Motic, China)을 이용하여 관찰하였다[6, 27]. 비장세포( $5 \times 10^5$  cells)는 세포 생존능 시험과 같은 방법을 사용하여 접종한 후 배양하였다. 배양된 비장세포를 원심분리(2,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상층액을 제거한 뒤 cold phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 2회 세척하였다. 세척된 비장세포를 PBS 100  $\mu\text{l}$ 에 재현탁한 후 7-AAD staining solution (Bio legend, USA)을 5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 4°C 암실에서 30분간 세포를 염색하였고 염색된 세포를 상온에서 형광현미경으로 관찰하였다.

### In vivo apoptotic splenocyte 측정

각 군에서 비장세포( $5 \times 10^5$  cell/100  $\mu\text{l}$ )를 채취한 후 바로

annexin V reagent (Merck, Germany) 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 현탁한 후 실온에서 20분간 배양하였다. 배양된 세포는 Muse cell analyzer (Merck)를 이용하여 제작회사의 사용방법에 따라 total apoptotic cell을 측정하였다[14].

### 자연살해세포 활성 측정

자연살해세포 활성 실험에 사용한 mouse의 림프 암세포는 YAC-1 cell line을 사용하였으며 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받았다. 암세포인 YAC-1 세포와 mouse의 비장세포는 10% fetal bovine serum (Gibco, Rockville, US)과 1% pen strep (Gibco, Rockville, US)이 포함된 RPMI 1640 (Hyclone, Logan, US)배지에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 후 사용하였다.

BALB/c mouse 비장세포는 IL-2 (500 ng/ml)을 첨가 후 RPMI 1640배지에서 2일간 배양하였다[20]. 배양된 BALB/c 비장세포( $5 \times 10^5$  cells) 50  $\mu\text{l}$ 와 YAC-1 림프암세포( $5 \times 10^4$  cells) 50  $\mu\text{l}$ 를 round-bottom 96-well microplate에 접종하였다. 접종한 세포들을 5분간 2500 rpm에서 원심분리를 이용하여 서로 접촉시켜 반응시킨 후 각 well에 면역억제를 유도하기 위해 면역억제제인 CY 1 mg/ml 또는 UMWE 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + CY 1 mg/ml로 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 2일간 배양하였다. 배양한 세포는 반응종료 45분 전 10x lysis buffer 10  $\mu\text{l}$  첨가한 후 다시 배양하고 2,500 rpm에서 4분간 원심분리 후 상층액 50  $\mu\text{l}$ 를 96-well flat bottom microplate에 옮겨 담았다. 상층액에 substrate mix 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 차광하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 각 well에 50  $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 첨가하여 1시간 동안 반응을 정지시켰다. 반응이 종료된 각 well을 microplate spectrophotometer (Bio-rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다[8].

### 통계 분석

실험 결과에 대한 모든 값은 평균 $\pm$ 표준오차로 표기하였다.

## 결과 및 고찰

### UMWE 식이 mouse의 비장 및 비장세포 지수 변화

비장은 척추동물에서 발견되는 가장 큰 2차 림프기관으로 white pulp내에 periarteriolar lymphoid sheaths (PALS)라고도 불리는 T cell rich region과 B cell rich zone을 통해 신체의 면역반응에 관여 한다[2]. 따라서 비장 지수 및 비장세포 지수의 변화는 in vivo에서 면역세포의 변화라고 볼 수 있다. 2주간 식이과정 후 각 군의 비장지수를 산출하여 그 결과를 비교하였을 때 각 군 간에 큰 변화는 보이지 않았으나 CY가 투여된 세 군은 다소 감소한 경향을 보였다(Fig. 1A). 그러나 이 차이는 비장세포 지수를 비교하였을 때 두드러지게 나타났다(Fig. 1B). CY만을 투여한 군에서 가장 낮게 나타났으며 UMWE를

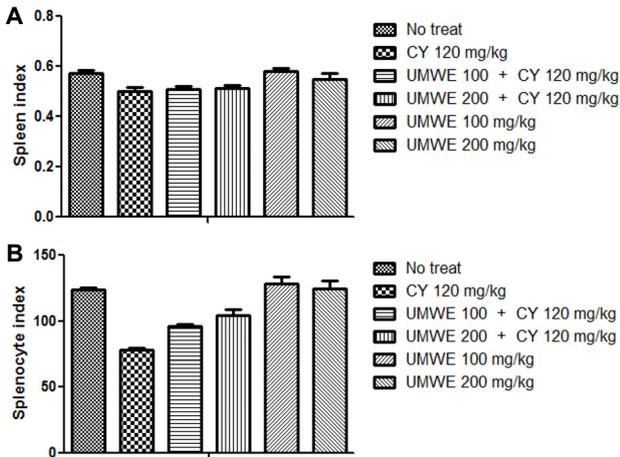


Fig. 1. Spleen and splenocyte indices. Spleen (A) and splenocytes (B) indices from each group were compared. Results were expressed as mean ± standard deviation.

식이한 후 CY를 투여한 군은 농도 의존적으로 비장세포 지수가 CY만을 투여한 군에 비해 증가되었다. 이미 알려진 것과 같이 CY 투여 군에서 면역세포의 수가 감소하여 CY가 *in vivo*에서 작용을 하였다는 것을 나타내며, UMWE를 식이한 후 CY를 투여한 군에서 농도에 따라 비장세포 지수가 회복되었다는 것은 UMWE가 CY의 면역억제 작용을 부분적으로 방어하였다고 여겨진다.

**UMWE에 의한비장세포의 생존 유지**

비장세포의 대부분은 T 세포와 B 세포로 구성된 림프구로 이루어져 있다. 비장세포의 생존은 림프구의 생존을 뜻하며, 이는 면역기능 유지를 지속하는데 중요하다고 할 수 있다.

UMWE에 의한 비장 세포의 생존능에 미치는 영향을 확인하기 위해 *in vitro* 상태에서 비장세포에 UMWE를 첨가하여 비장 세포의 생존 변화를 측정하였다.

아무런 처리를 하지 않은 BALB/c mouse 비장세포( $5 \times 10^5$  cells)를 96-well microplate에 접종한 후 UMWE 시료를 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하였으며, 8 시간 마다 MTT assay 방법으로 생존한 비장세포를 측정하였다. 이때 T 세포와 B 세포의 mitogen인 PHA와 LPS를 처리하여 대조군으로 삼았다. 아무것도 첨가되지 않은 비장세포는 배양 개시 8시간 후에 거의 50%가 사멸하였으며 그 후 완만하게 사멸이 증가하는 패턴이 24시간 동안 지속되었다. 그러나, UMWE 시료를 함유한 비장세포 군의 생존이 각 측정 시간 대마다 농도 의존적으로 비처리군에 비해 높게 유지되었으며, 또한 UMWE 농도 의존적으로 생존률이 높게 나타났다(Fig. 2A).

그러나, UMWE를 2주간 식이한 후에 비장을 적출하여 *in vitro*에서 비장세포 생존률을 측정하였을 때는 아무런 식이를

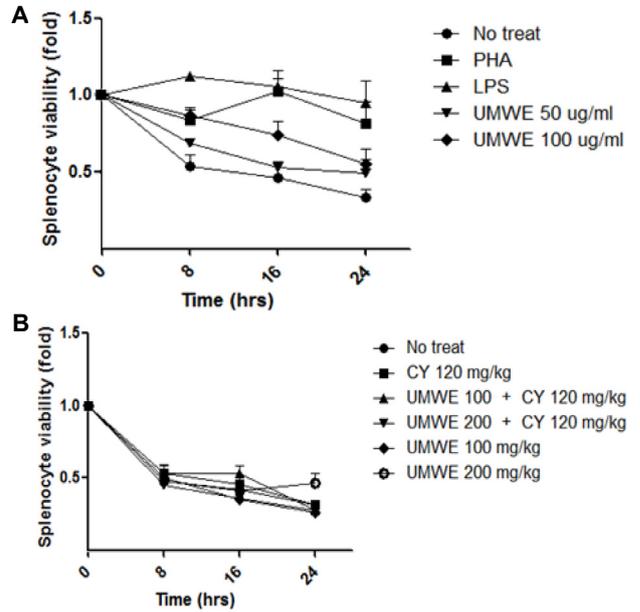


Fig. 2. Viability of the splenocytes by UMWE. MTT method was used for measuring cell viability. The viability of UMWE groups was greater than that of no treat group *in vitro* (A). However, *in vivo* test showed no significant effect of UMWE (B). Results were expressed as mean ± standard deviation.

하지 않은 비장세포의 생존률에 비해 아무런 차이가 나타나지 않았다. 또한, CY를 투여한 군의 비장세포의 생존률 역시 다른 군의 비장세포의 생존률과 거의 동일하게 8시간 경과 후에 약 50%만 생존하였다(Fig. 2B). 식이 별 각 군의 비장세포는 *in vitro*에서 추가적인 생존의 자극을 받지 않는다면 동일하게 사멸한다고 여겨진다.

**UMWE에 의한 비장세포의 사멸 지연**

UMWE에 의한 BALB/c mouse 비장세포의 사멸 지연에 미치는 영향을 7-AAD stain을 이용하여 확인 하였다. 7-AAD는 사멸되어 가는 세포의 막을 통과하여 형광으로 나타나는 특성으로 flow cytometry 방법에 사용된다. 이 특성을 이용하여 7-AAD를 처리한 세포를 형광현미경에서 관찰하여 형광을 나타내는 세포 수를 산정함으로써 저비용으로 사멸된 세포를 정량화 할 수 있다. MTT 방법에 의한 생존률 측정과 동일하게 아무런 처리를 하지 않은 BALB/c mouse 비장세포( $5 \times 10^5$  cells)를 96-well microplate에 접종한 후 UMWE 시료를 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하며, 0, 12, 24 시간에 형광현미경으로 관찰하며 사진을 촬영한 후 7-AAD에 의해 염색된 비장세포를 측정하였다(Fig. 3A, 3B). 배양시간이 지속 될수록 모든 경우 비장세포의 사멸이 증가하는 것이 확인되었으며, 세포를 계수한 결과 UMWE 50 µg/ml의 농도로 처리한 비장세포의 사멸이 아무 처리하지 않은 비장세포에 비해 지연되는 것으로 나타났다. 그러나,

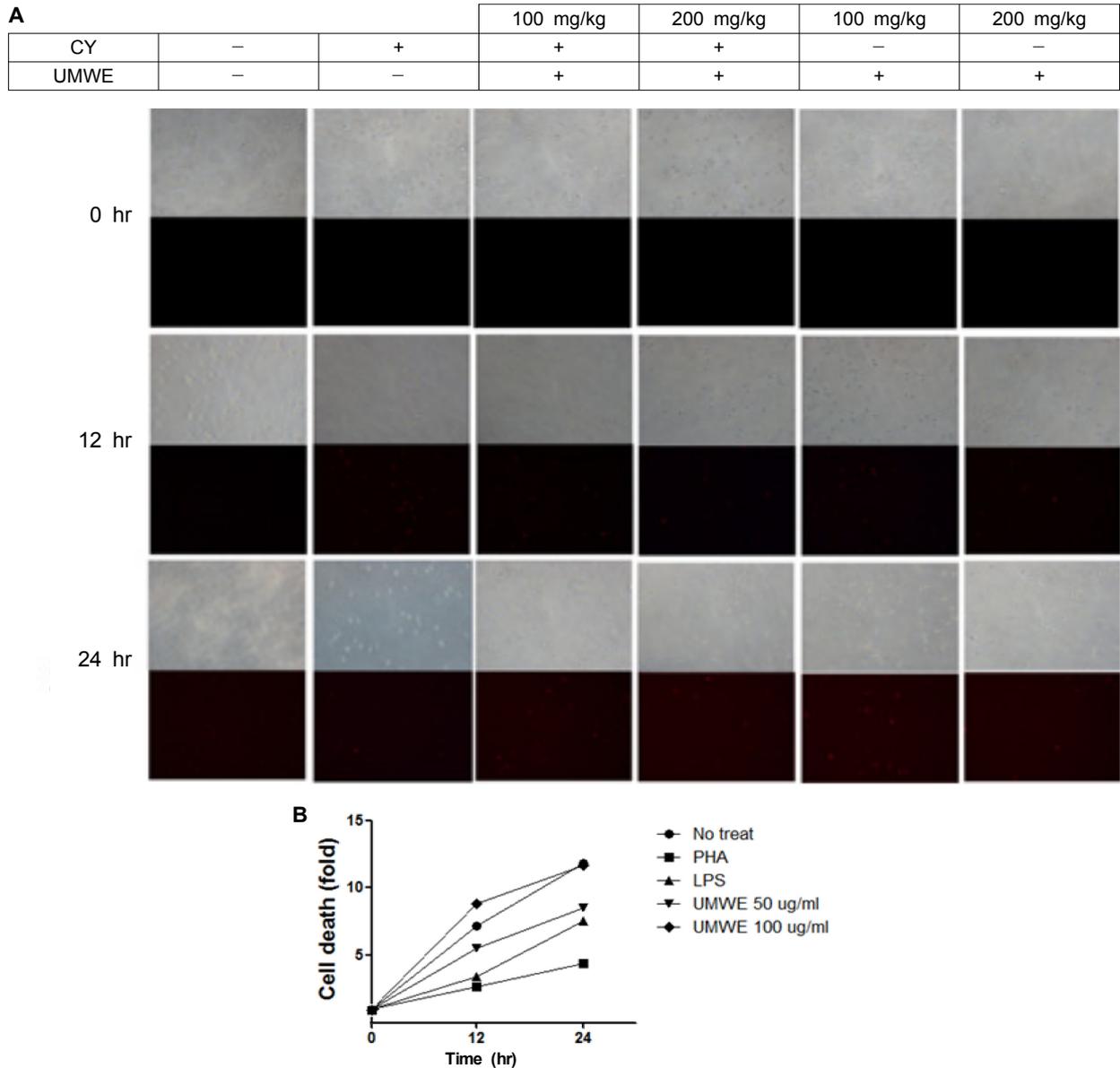


Fig. 3. Cell death delay of splenocytes by UMWE. A. Splenocytes were incubated with the indicated samples as well as 7-AAD for 24 hr. Top panel showed phase-contrast cells and bottom panel showed fluorescently-stained cells by 7-AAD. B. Cells at each time point were counted and presented as a graph.

UMWE 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 비장세포의 사멸은 아무 처리하지 않은 비장세포와 거의 같게 나타났다. 이 결과는 MTT 측정 방법과 차이가 나는 것으로 아마도 MTT는 효소의 반응결과임으로 효소의 불활성과 세포막 변화 간에 시간차가 있을 수 있기 때문이라 추측된다.

**In vivo 조건에서 UMWE에 의한 비장세포의 apoptosis 영향**

apoptosis는 세포의 능동적인 작용에 의해 진행되며 개체발생에 있어 항상성의 유지 등을 위해 필요한 과정이며 면역세포의 항상성 유지와도 밀접한 관련이 있다. In vivo 조건에서

UMWE에 의해 CY로 인한 비장세포 사멸이 방어가 이루어지는가에 대한 조사를 각 군별 비장의 apoptosis 세포를 측정하여 확인하고자 하였다. Total apoptotic cell은 annexin V assay를 이용하여 Muse cell analyzer (Merck)로 확인 하였다. CY를 투여한 군 내에서는 약 9%로 apoptotic cell의 차이가 나타나지 않아, UMWE 식이군에서 CY에 의한 apoptotic cell의 감소를 위한 영향이 없는 것으로 보여진다(Fig. 4). 비장은 이차면역기관으로 이미 성숙한 면역세포가 유입되어 모여 있는 곳이며, 항원의 유입이 없다면 B 세포의 증식도 없다. Splenocyte index와 연관 지어 보면 CY를 투여한 군 내에서는 비장으로 유입되는 주된 면역세포인 림프구의 apoptotic cell의 비율은

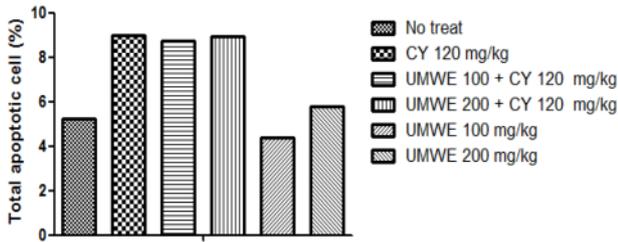


Fig. 4. Total splenocyte apoptotic cells measured by annexin V stain. Splenocytes from each group were mixed with annexin V staining solution and analyzed with a Muse cell analyzer according to the manufacturer's manual.

비슷하나, UMWE를 식이한 경우가 식이하지 않은 경우 보다 CY에 의해 손상이 감소하여 더 많은 림프구가 비장에 도달하여 존재하는 것으로 여겨진다. 이에 대한 보다 자세한 실험은 현재 FACS 분석으로 진행되고 있어 조만간 그 결과가 발표될 것으로 예상된다.

UMWE만을 식이한 군은 농도에 따라 비식이군(5.25%)에 비해 100 mg/kg UMWE의 경우 4.40%로 낮게 total apoptotic cell이 관찰되었으며, 200 mg/kg UMWE의 경우 5.80%로 비식이군 거의 일치하여 나타났다. 이 결과 역시 splenocyte index와 일치하는 결과로서 UMWE 자체로는 비장에 아무런 사멸 영향을 주지 않으며 보호하는 것으로 생각된다.

**비장세포의 NK cell 활성**

자연살해세포(natural killer cell, NK cell)은 내재면역반응 및 적응면역 모두에서 작용하는 림프구로서 내재면역반응으

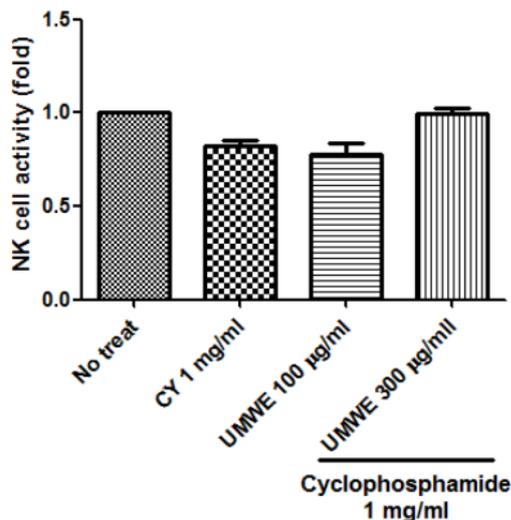


Fig. 5. UMWE-treated Splenic NK cell activity was enhanced in the presence of CY. Splenic NK cell activity was assayed against YAC-1 under no treat, CY (1 mg/ml), and UMWE (100 µg/ml or 300 µg/ml)+CY (1 mg/ml) conditions. Results were expressed as mean ± standard deviation.

로 표적세포에 작용하여 세포살해를 담당하고, 사이토카인을 분비하여 세포독성 T 세포의 반응을 보조한다. 즉, NK cell은 내재면역 및 적응면역 반응의 교집합으로서 작용되는 주요한 역할을 한다. 정상 BALB/c mouse에서 추출한 비장세포를 세 가지 다른 조건에서 mouse 림프암세포인 YAC-1 cell에 대한 NK cell의 활성을 확인하였다. CY를 1 mg/ml의 농도로 처리한 조건에서 비처리 조건에 비해 NK cell 활성이 약 0.2 배(fold) 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나, CY와 함께 UMWE를 100 µg/ml과 300 µg/ml을 같이 처리한 조건에서 UMWE 300 µg/ml 농도가 비처리 조건과 거의 같은 0.98배의 NK cell 활성이 나타나는 것이 확인되었다(Fig. 5). 이는 UMWE이 CY에 의한 억제제를 방어하여 NK cell을 정상화시켰다고 생각된다.

결론적으로 UMWE의 식이는 CY에 의한 면역억제에 대해 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 부분적으로 비장 면역세포를 보호하며, *in vitro*에서 비장 NK cell도 보호하여 면역기능을 유지하는데 영향을 준다고 생각된다. 하지만 이러한 왕느릅나무 열수 추출물에 의한 면역세포 보호 메커니즘에 대한 명확한 연구결과가 없어 최종 결론을 이끌어 낼 수는 없으나, 현재 진행 중인 FACS 분석과 같은 새로운 실험 결과가 얻어지고 있어 향후 어떠한 메커니즘에 의한 것인지 곧 밝혀질 것으로 예상된다.

**감사의 글**

이 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술진흥원의 산업 기술연구기반구축사업(항노화산업 지원을 위한 인프라구축 및 제품개발, N0000697) 일환과 동의대학교 교내일반연구과제(2015AAA179)의 연구비 지원을 받아 수행되었음을 감사드립니다.

**References**

1. Choi, W. H., Oh, Y. S., Ahn, J. Y., Kim, S. R. and Ha, T. Y. 2005. Antioxidative and protective effect of *Ulmus davidiana* var. japonica extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 479-483.
2. Cesta, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* **34**, 455-465.
3. Collins, F. M., Congdon, C. C. and Morrison, N. E. 1975. Growth of *Mycobacterium bovis* (BCG) in T lymphocyte-depleted mice. *Infect. Immun.* **11**, 57-64.
4. Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **4**, 11-22.
5. Emadi, A. Jones, R. J. and Brodsky, R. A. 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 638-647.
6. Fetterhoff, T. J., Holland, S. P. and Wile, K. J. 1993. Fluorescent detection of non-viable cells in fixed cell preparations. *Cytometry Suppl.* **6**, 27.
7. Goldstein, M. Roos, W. P. and Kaina, B. 2008. Apoptotic

- death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition, and Chk/p53 signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 20-32.
8. Huang, G. C., Wu, L. S., Chen, L. G., Yang, L. L. and Wang, C. C. 2007. Immuno-enhancement effects of Huang Qi Liu Yi Tang in a murine model of cyclophosphamide-induced leucopenia. *J. Ethnopharmacol.* **109**, 229-235.
  9. Huyan, X. H., Lin, Y. P., Gao, T., Chen, R. Y. and Fan, Y. M. 2011. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white bloodcells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *International Immunopharmacol.* **11**, 1293-1297.
  10. Hamerman, J. A., Ogasawara, K. and Lanier, L. L. 2005. NK cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunol.* **17**, 29-35.
  11. Jeong, J. T. 2007. An analysis of the research of pharmacological effects for the *ulmus davidiana* planch. dissertation, Chosun University, Gwangju, Korea.
  12. Jeong, K. Y. and Kim, M. L. 2012. Physiological activities of *Ulmus pumila* L. extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 104-109.
  13. Kim, K. H., Kang, I. K., Kang, E. J., Yang, E. K. and Park, S. N. 2004. A research trend of natural product on well-being industry. *J. Soc. Cosmet.* **30**, 329-343.
  14. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P. M., Kuijten, G. A. M., KeeHnen, R. M. J., Pals, S. T. and van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B Cells undergoing apoptosis. *Blood.* **84**, 1415-1420.
  15. Lee, Y. J. and Han, J. P. 2000. Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from *Ulmus davidiana*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 893-899.
  16. Lee, S. E., Kim, Y. S., Kim, J. E., Bang, J. K. and Seong, N. S. 2004. Antioxidant activity of *Ulmus davidiana* var. japonica N. and *Hemiptelea davidii* P. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **12**, 321-327.
  17. Lee, E. H., Park, C. W. and Jung, Y. J. 2013. Anti-inflammatory and immune-modulating effect of *Ulmus davidiana* var. japonica Nakai extract on a macrophage cell line and immune cells in the mouse small intestine. *J. Ethnopharmacol.* **146**, 608-613.
  18. Lee, H. Y., Kim, C. K., Sung, T. K., Mun, T. K. and Lim, C. J. 1992. Antibacterial activity of *Ulmus pumila* L. extract. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1-5.
  19. Lee, K. H., Cho, C. H. and Yoon, W. H. 2004. *In vivo* anti-tumor activity of mansonone E isolated from *Ulmus davidiana* var. japonica NAKAI. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 199-202.
  20. Lafreniere, R. and Rosenberg, S. A. 1985. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* **45**, 3735-3741.
  21. Leung, H. Y., Ma, C. W., Tang, Q. T. and Ko, K. M. 2011. Long-Term treatment with a compound polysaccharide-based health product (InfinitusPolysac Plus) enhances innate and adaptive immunity in mice. *Chinese Medicine* **2**, 178-185.
  22. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
  23. Pak, C. H. 1999. Korean Folk Medicine, pp. 53, PNU Press, Korea.
  24. Park, J. S., Shim, C. J., Jung, J. H., Lee, G. H., Sung, C. K. and Oh, M. J. 1999. Antimicrobial activity of *ulmi cortex* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1022-1028.
  25. Parham, P. 2009. *The Immune System*, pp 21-22, 3rd edition. Garland Science: New York, NY, USA.
  26. Seo, B. I., Ju, Y. S., Choi, H. Y., Park, Roh, S. S., Koo, J. S., Kim, J. J. and Kim, D. Y. 2011. Illustrated Book of Herbal Plants in Oriental Medicine, pp. 353-357, DaeWondang, Korea.
  27. Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., Krall, W. J., Braun, J. and Giorgi, J. V. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* **13**, 204-208.
  28. Shimizu, S. 2004. The Laboratory mouse. *Elsevier*.
  29. Wang, J., Tong, X., Li, P., Cao, H. and Su, W. 2012. Immuno-enhancement effects of ShenqiFuzheng Injection on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice. *J. Ethnopharmacol.* **139**, 769-775.
  30. Winkelstein, A. 1973. Mechanism of Immunosuppression : Effects of Cyclophosphamide on Cellular Immunity. *Blood* **41**, 273-284.
  31. Yang, Y. L., Kim, Y. J., Kim, K. H. and Oh, E. G. 2001. Separation of glycoprotein and its anticancer immunostimulating activity from dried barks of slippery elm [*Ulmus parvifolia*]. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 547-553.
  32. Yang, S. X. and Li, X. Yu. 1990. Enhancement of T lymphocyte proliferation and suppression of antibody producing cell formation by methionine-enkephalin. *Acta Pharmacologica Sinica* **11**, 355-359.

**초록 : 왕느릅나무 추출물에 의한 비장세포 생존률 및 NK cell 세포독성 증가**

이성도<sup>1</sup> · 김덕원<sup>1</sup> · 이인환<sup>1</sup> · 이종환<sup>3,7</sup> · 현숙경<sup>2,7</sup> · 강경화<sup>4,7</sup> · 황혜진<sup>2,7</sup> · 김철민<sup>6</sup> · 김병우<sup>5</sup> · 정경태<sup>1,7\*</sup>  
(<sup>1</sup>동의대학교 임상병리학과, <sup>2</sup>동의대학교 식품영양학과, <sup>3</sup>동의대학교 생명공학과, <sup>4</sup>동의대학교 한의학과, <sup>5</sup>동의대학교 생명융용학과, <sup>6</sup>부산대학교 의과대학, <sup>7</sup>동의대학교 항노화산업 지원센터)

면역에 대한 관심은 점차 증가하는 추세이며, 식물유래 천연물을 이용한 면역기능 증강에 관련된 연구 역시 활발히 진행되고 있다. 왕느릅나무 껍질은 줄기 혹은 뿌리의 껍질을 뜻하며 전통적으로 동·서양 할 것 없이 항염, 진통, 항암, 상처치료에 사용되어 왔다. 본 연구는 왕느릅나무 열수 추출물(*Ulmus macrocarpa* water extract, UMWE)이 면역기능에 끼치는 영향을 조사하기 위해 실시되었다. 실험은 UMWE를 농도 100 mg/kg 또는 200 mg/kg로 식이한 군, UMWE를 농도 100 mg/kg 또는 200 mg/kg으로 식이하면서 면역억제물질인 cyclophosphamide (CY, 120 mg/kg)를 투여한 군, CY만을 투여한 군, 아무 것도 처리하지 않은 비처리군, 총 6개 군으로 나누어 2주간 매일 식이하면서 진행하였다. 각 군에서 획득한 비장지수와 비장세포 지수를 비교하였을 때 UMWE 식이가 CY에 의한 비장세포의 감소를 완화시키는 것으로 나타났으며, *in vitro* 실험에서 MTT방법과 7-amino-actinomycin D 방법을 통해 비장세포의 생존을 유지하며 사멸을 지연하는 것이 확인되었다. 또한, UMWE는 YAC-1에 대한 비장 NK 세포 활성을 면역억제제 CY가 존재하는 조건에서도 정상적으로 유지시켜 면역기능 유지에 영향을 주는 것으로 나타났다.