

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 잎으로부터 분리된 다당류 추출물의 면역 활성

변의백¹ · 장범수¹ · 성낙윤² · 변의홍²

¹한국원자력연구원
²공주대학교 식품공학과

Immunomodulatory Activity of Crude Polysaccharide Separated from *Cudrania tricuspidata* Leaf

Eui-Baek Byun¹, Beom-Su Jang¹, Nak-Yun Sung², and Eui-Hong Byun²

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute

²Department of Food Science and Technology, Kongju National University

ABSTRACT The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory activity of crude polysaccharide separated from *Cudrania tricuspidata* leaf. *C. tricuspidata* polysaccharide (CTP) was extracted by ethanol precipitation. Immunomodulation activity was tested in macrophage cells (RAW 264.7 and bone-marrow derived macrophage) and splenocytes. CTP treatment significantly increased cell proliferation up to 250 µg/mL in both RAW 264.7 and bone-marrow derived macrophages. In this concentration range (below 250 µg/mL), nitric oxide and cytokine [tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-6] production also significantly increased. Similarly, splenocyte proliferation dose-dependently increased except for the 1,000 µg/mL treated group. Regarding cytokine production activity in splenocytes, CTP treatment significantly increased production of Th 1 type cytokines [interferon (IFN)-γ] production but not Th 2 type cytokines (IL-4). Therefore, the results indicate that CTP may have a potential effect on immunomodulatory activity in various immune cells, and this is useful for development of immune enhancing adjuvant materials as a natural ingredient.

Key words: *Cudrania tricuspidata*, polysaccharide, immunomodulatory activity, macrophage cells, splenocyte

서 론

꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*)은 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로서 한국을 비롯한 일본, 중국, 러시아 동부지역 등에서 주로 서식하며, 일부 아시아지역에서는 전통약초로써 주로 사용되고 있다. 열매는 자수과라고 부르고 열매들이 모여 덩어리를 이루는 형태를 나타내며, 지름이 약 2~3 cm로 둥근 모양이다. 주로 9~10월에 붉은색을 나타내는 이 열매는 해열, 양혈, 근육 이완 등에 매우 효과가 좋다고 알려져 동아시아에서 전통 한방 약재로 주로 사용되고 있다(1). 약리 활성이 가장 널리 알려진 꾸지뽕의 잎, 줄기 부분은 xanthenes, flavonoids 등의 폴리페놀(polyphenol) 성분이 다량 함유되어 있다고 보고되고 있으며, tyrosinase 저해, 항산화, 암세포 독성, 항염증 활성에 대한 연구가 기 보고된 바 있다(2-7). 그러나 꾸지뽕 다당류 추출물의 기능성에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

다당류들은 지금까지 식물체의 구조, 성분 및 에너지원으로써의 역할만이 강조됐으나 최근 세포 표면의 당단백질이 나 당지질에 결합해 있는 당쇄(sugar chain)가 세포 간의 인식과 접촉을 통해서 세포의 분화, 정보 전달, 감염 및 암전이 등의 생명현상에 깊이 관여한다는 사실이 밝혀지면서 현재 다당류의 다양한 생리활성 효과와 기전에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다(8,9). 또한, 최근에는 식용 및 약용으로 사용된 한약재, 식품소재 또는 버섯류 등에서 유래한 다당류가 보체계 활성화(10), 림프구 증식 활성(11), 대식세포 자극 활성(12,13) 및 생리활성 증진을 통한 항암 활성을 유도(14)한다는 과학적인 근거가 보고되면서 여러 가지 다양한 식물류로부터 추출한 다당류에 의한 면역 활성이 더욱 주목받는 추세라 할 수 있다.

면역은 외부 병원성 물질에 대항하는 인체의 주요 방어기전으로서 감염 작용에 대하여 다양한 면역세포들이 작용하여 병원성 미생물의 생체 내 침입을 통제하거나 제거하도록 활성화되어 외부로부터 인체를 보호하는 매우 중요한 자기방어기작이다(15). 면역체계는 크게 선천성면역과 후천성면역으로 분류되는데 각각의 면역단계에 따라 역할을 수행하는 면역세포들이 다르다. 선천성면역에 관여하는 세포로는 대식세포와 수지상세포 등이 있으며, 이들은 감염 초기에

Received 12 April 2016; Accepted 25 May 2016

Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan, Chungnam 32439, Korea

E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr, Phone: +82-41-330-1481

활성화되어 침입을 통제하거나 침입한 병원균에 대한 정보를 내부에 전달하는 역할을 수행한다. 후천성 면역은 주로 면역 T 세포가 매개하는 면역반응으로 감염 증기에 활성화되어 감염된 세포를 직접 죽이거나 병원성 물질에 대한 항체 생산을 촉진하여 무력화시키는 작용을 유도한다(16). 최근 이러한 면역세포들의 활성화를 유도하기 위한 연구들이 다양한 천연물 및 다당류와 같은 소재들을 대상으로 다양하게 이루어지고 있는 추세이다(17-19).

따라서 본 연구에서는 예로부터 전통약재로 쓰여 오던 꾸지뽕으로부터 다당류 성분을 추출하고 추출된 다당류 성분의 면역 활성화에 관하여 알아보기 위하여 대식세포주(RAW 264.7), 마우스 골수세포로부터 분화된 대식세포(macrophage) 및 비장에서 유리시킨 비장세포(splenocyte) 등의 다양한 면역세포에 처리하여 면역세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다.

재료 및 방법

꾸지뽕으로부터 다당류 성분 추출

본 실험에 사용된 꾸지뽕 잎은 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 꾸지뽕 잎을 증류수로 2~3회 수세하여 음건한 후 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하였다. 꾸지뽕 조다당 추출물을 얻기 위하여 꾸지뽕 잎 분말 100 g을 증류수 2 L에 넣고 100°C에서 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 원심분리기(Combi-514R, Hanil)를 이용하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액 300 mL에 에탄올(95% ethanol) 700 mL를 첨가하여 4°C에서 24시간 정치하여 생성된 조다당 침전물을 원심분리(3,000 rpm, 15 min) 한 다음 분리하고 동결건조 하여 꾸지뽕 조다당 추출물(CTP)로 사용하였다.

RAW 264.7 세포 배양

마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1% antibiotics(100 unit/mL penicillin and 100 unit/mL streptomycin)가 포함된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640 배지(Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Thermo, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

마우스로부터 적출한 골수세포로부터 대식세포로의 분화 유도

본 연구에 이용된 실험동물은 한국원자력연구원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 사용하였다(KAERI-IACUC-2014-006). C57BL/6 마우스로부터 골수 채취용 주사기(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용해 대퇴부

골수를 채취하였다. 채취한 골수를 차가운 phosphate buffered saline(PBS, Invitrogen Co., Waltham, MA, USA)으로 3회 세척한 후, 적혈구를 제거하기 위하여 red blood cell (RBC) lysis buffer(Invitrogen Co.)를 5 mL 처리하여 10분간 방치하였다. PBS로 3회 세척하여 적혈구 찌꺼기를 완전히 제거하였다. 미분화 골수세포의 골수세포로 분화는 Byun 등(20)의 방법에 의하여 수행하였다. 미분화 골수세포를 대식세포로 분화시키기 위하여 10% FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Life Technology)에 2 mM L-glutamine, 100 unit/mL penicillin/streptomycin, 50 μM mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate, 25 ng/mL macrophage colony stimulating factor(MC-SF, R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 첨가하여 배양하였다. 배양 4일 후 대식세포로의 분화 유무를 확인하기 위하여 특이항체(FITC-conjugated anti-CD11b)를 사용하여 유세포 분석기로 분석한 결과 95% 이상이 대식세포로 분화되었음을 확인하였으며(21), 추후 CTP 면역 활성화 실험에 사용하였다.

RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포에 대한 세포 증식을 측정

CTP의 RAW 264.7 세포 및 미분화 골수세포로부터 분화된 대식세포에 대한 세포 증식을 평가를 MTT assay를 통하여 알아보았다. 96 well plate에 3×10⁴ cells/well(RAW 264.7) 및 1×10⁵ cells/well(골수 분화 대식세포)이 되도록 분주하여 100 ng/mL의 lipopolysaccharide(LPS)와 농도별(0, 62.5, 125, 250 및 500 μg/mL) CTP를 각각 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 각각의 well에 10 μL 처리하고 2시간 동안 반응시킨 후 배양 상등액을 제거하고 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co.)를 100 μL씩 첨가한 다음 micro plate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다.

RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포에 대한 NO 분비능 측정

CTP의 처리가 NO 분비량에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 48 well plate에 1×10⁵ cells/well(RAW 264.7) 및 2×10⁵ cells/well(골수 분화 대식세포)이 되도록 세포를 분주하여 100 ng/mL의 LPS와 농도별(62.5, 125, 250 μg/mL) CTP를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 원심분리기(Hanil)를 이용하여 원심분리(3,000 rpm, 15 min) 한 후 분리된 배양 상등액에서 NO 함량을 측정하였다. 배양 상등액 100 μL에 동량의 Griess(Sigma-Aldrich Co.) 시약을 넣어 암실에서 10분간 반응시킨 후 micro plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포에 대한 cytokine 분비능 측정

CTP의 처리가 cytokine 분비량에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 48 well plate에 1×10^5 cells/well(RAW 264.7) 및 2×10^5 cells/well(골수 분화 대식세포)이 되도록 세포를 분주하여 100 ng/mL의 LPS와 농도별(62.5, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) CTP를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 원심분리기(Hanil)를 사용하여 원심분리(3,000 rpm, 15 min) 한 후, 분리된 배양 상등액에서 cytokine (TNF- α 및 IL-6)의 함량을 측정하였다. Cytokine 함량은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cytokine의 농도는 kit에 포함된 TNF- α 와 IL-6의 표준용액(2,000 pg/mL)을 희석하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

마우스 비장으로부터 비장세포 유리

CTP의 처리에 따른 비장세포의 활성능 실험은 Kim 등 (22)의 방법에 따라 수행하였다. 1주간의 순화를 마친 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 비장을 무균적으로 적출하여 10%의 FBS(Gibco)와 항생제 penicillin과 streptomycin(100 unit/mL, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich Co.)을 함유한 RPMI-1640(Life Technology) 배지로 세척한 후 tissue grinder(Corning Costar, Corning, NY, USA)로 균질화하여 비장세포를 유리시켰다. 세포현탁액에 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer(BD Biosciences)를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다.

비장세포에 대한 세포 증식률 측정

CTP의 처리가 비장세포의 세포증식능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 96 well plate에 well당 1×10^6 개의 비장세포를 분주한 후, 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 Concanavalin A(Con A, Sigma-Aldrich Co.)와 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$) CTP를 처리하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, WST-1[®](Daeil Lap Science, Seoul, Korea) 용액을 각각의 well에 10 μL 씩 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 비장세포의 증식능을 평가하였다.

비장세포에 대한 cytokine 분비능 측정

CTP의 처리가 비장세포의 cytokine 분비능에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 비장 조직으로부터 유리시킨 비장세포를 48 well plate에 well당 2×10^6 개씩 분주한 후 3 $\mu\text{g/mL}$ 의 Con A(Sigma-Aldrich Co.)와 농도별(0, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) CTP를 처리하여 24시간 동안 반응시키고 배양 상등액에 존재하는 cytokine(IL-2, 4, 5 및 IFN- γ)의 함량에 관하여 측정하였다. Cytokine의 측정은 ELISA

kit(eBioscience)을 이용하여 측정하였다.

통계처리

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Student's *t*-test로 **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

CTP의 처리가 RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포의 세포 증식률에 미치는 영향

본 연구는 CTP의 면역 활성화에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여 다양한 농도의 CTP를 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 마우스에서 분리한 미분화 골수세포에서 분화시킨 대식세포에 처리하여 대식세포의 증식률에 미치는 영향에 관하여 관찰하였다. RAW 264.7 대식세포주 및 골수 분화 대식세포에 대한 세포 증식률의 평가는 농도별(62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) CTP를 각각의 면역세포에 24시간 처리한 후 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). 또한, 양성대조구로서 LPS(100 ng/mL)를 사용하여 비교하여 보았다. LPS 처리군의 경우 RAW 264.7 대식세포주 및 골수 분화 대식세포에 대한 세포 증식률이 약간 감소하는 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 CTP 처리군의 경우 RAW 264.7 대식세포주 및 골수 분화 대식세포 두 세포 모두에서 세포 생존율이 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리구에서 가장 높게 증가하다가 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 면역 활성화 실험 시 CTP의 최적농도를 250 $\mu\text{g/mL}$ 로 선택하여 추후 RAW 264.7 대식세포주 및 골수 분화 대식세포에 대한 NO 및 cytokine의 분비능 평가 시 CTP의 농도를 250 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서 평가하였다.

CTP의 처리가 RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포의 NO 분비능에 미치는 영향

꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP의 면역 활성화 유도능에 관해 알아보기 위하여 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 골수세포에서 분화시킨 대식세포에 CTP를 농도별로 처리한 후, 세포 배양 상등액에 존재하는 NO 생성량에 관하여 평가하였다(Fig. 2). 양성대조구로서 LPS 처리군의 경우 RAW 264.7 대식세포주에서 PBS(control) 처리군이 1.8 ± 0.75 μM , LPS 처리군이 12.3 ± 1.63 μM 로 LPS 처리구에서 NO의 함량이 유의적으로 증가하였으며, 골수 분화 대식세포의 경우도 이와 유사하게 PBS(control) 처리군이 1.3 ± 0.87 μM , LPS 처리군이 17.7 ± 0.94 μM 로 LPS 처리구에서 유의적인 증가를 나타냈다. CTP 처리구의 경우 양성대조구인 LPS 처리구 수준처럼 NO 분비 유도능이 증가하지는 않지만, 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 골수세포에서 분화시킨 대

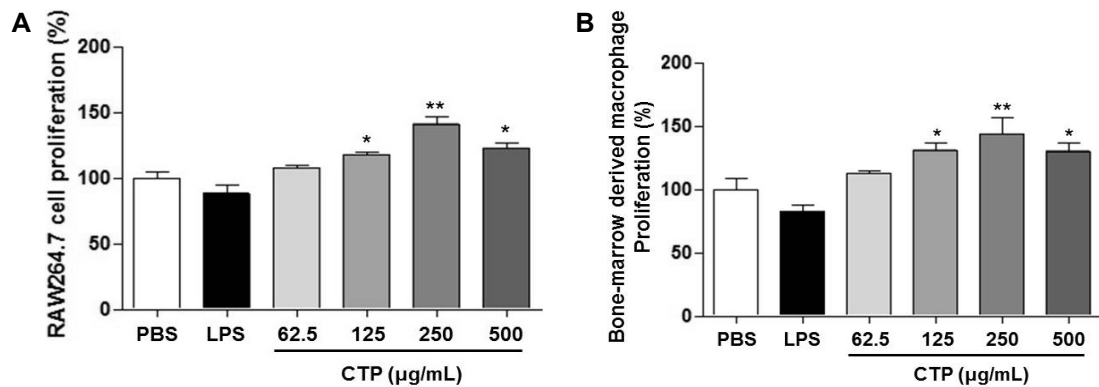


Fig. 1. Cell proliferation activity of *Cudrania tricuspidata* polysaccharide (CTP) in macrophage cell line (RAW 264.7) and bone-marrow derived macrophage. CTP was treated at the concentration of 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL in RAW 264.7 cells (A) and bone-marrow derived macrophage (B). Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 100 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, cell proliferation was evaluated by MTT assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **P*<0.05, ***P*<0.01 compared to control (PBS) group.

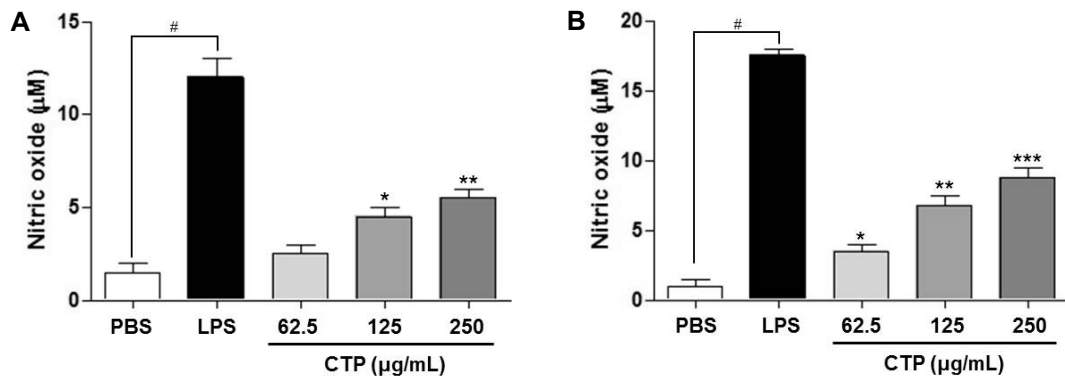


Fig. 2. Nitric oxide (NO) production activity of *Cudrania tricuspidata* polysaccharide (CTP) in macrophage cell line (RAW 264.7) and bone-marrow derived macrophage. CTP was treated at the concentration of 62.5, 125, and 250 µg/mL in RAW 264.7 cells (A) and bone-marrow derived macrophage (B). Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 100 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, NO production in culture supernatant was estimated by Griess reagent assay. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared to control (PBS) group.

식세포 모두에서 처리 농도 의존적으로 배양 상등액의 NO 생성량이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다.

대식세포는 선천면역계를 담당하는 면역세포로 초기 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다. 면역반응 초기에 외부로부터 유입된 항원에 대항하기 위하여 대식세포가 활성화되며, 활성화된 대식세포는 NADPH oxidase와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 superoxide anion (O_2^-)과 nitric oxide(NO)를 합성하고 cytokine을 분비함으로써 미생물 및 암세포를 죽이거나 감염으로부터 손상된 세포 및 조직을 탐식하여 제거하는 역할을 수행한다(23). 또한, NO 분비능의 증가는 면역세포 내 면역 활성을 유도 및 유지하는 중요한 수단인 nuclear factor(NF)- κ B를 활성화해 면역작용을 활발하게 유도시켜 면역조절자(immunomodulator)로 인식된다(24). 따라서 NO 분비능의 증가는 대식세포의 활성화와 밀접한 관련을 가지는 인자이며, 본 연구에서도 CTP의 처리에 따라 NO 분비능이 증가한 것으

로 미루어 보아 꾸지뽕 다당류 추출물이 면역조절자로서 면역 활성에 매우 효과가 있을 것으로 생각한다.

CTP의 처리가 RAW 264.7 및 골수 분화 대식세포의 cytokine 분비능에 미치는 영향

꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP의 cytokine 분비 유도 효과에 관하여 알아보기 위하여 CTP를 농도별로 처리한 후 세포 배양 상등액에 존재하는 cytokine 함량에 관하여 평가하였다(Fig. 3). LPS 처리군의 경우 대식세포의 면역 활성화와 밀접한 관련이 있는 TNF- α 및 IL-6의 분비능을 대식세포주인 RAW 264.7 세포($1,084.5 \pm 163.50$ pg/mL, $1,324.9 \pm 213.79$ pg/mL)와 골수세포($1,615.4 \pm 123.83$ pg/mL, $1,791.7 \pm 145.61$ pg/mL)에서 분화시킨 대식세포 모두에서 유의적으로 증가시키는 것으로 관찰되었고, CTP 처리군의 경우 양성대조구인 LPS 처리구 수준처럼 cytokine 분비 유도능이 증가하진 않았지만 CTP의 농도가 증가할수록 배양

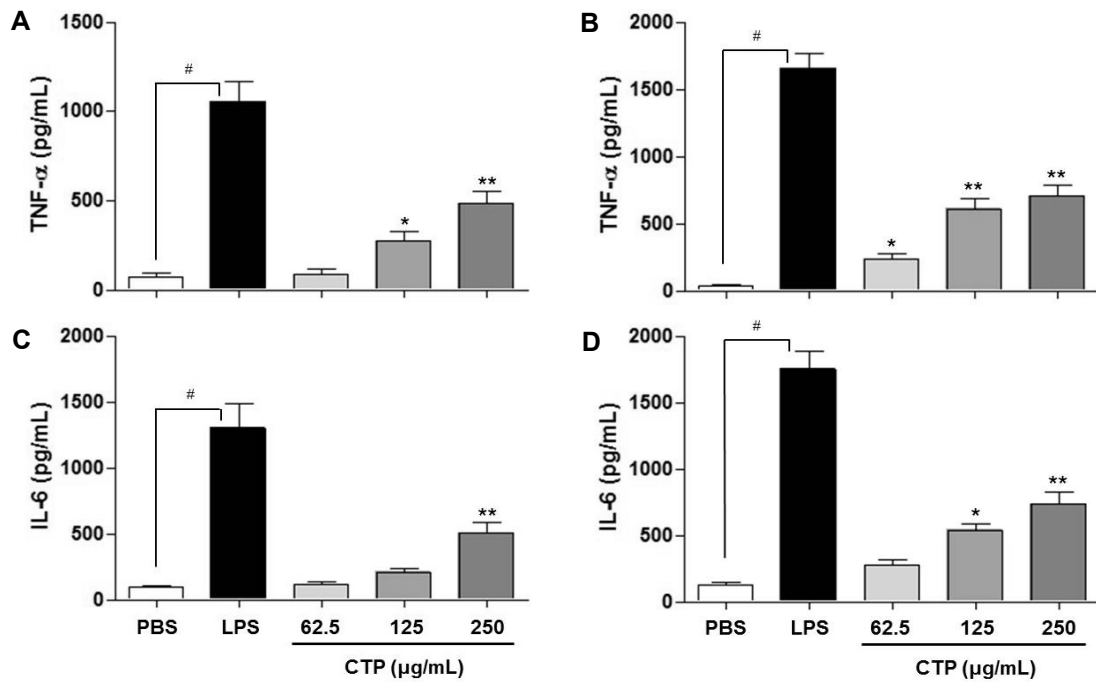


Fig. 3. Cytokine (TNF- α and IL-6) production activity of *Cudrania tricuspidata* polysaccharide (CTP) in macrophage cell line (RAW 264.7) and bone-marrow derived macrophage. CTP was treated at the concentration of 62.5, 125, and 250 $\mu\text{g/mL}$ in RAW 264.7 cells (A and C) and bone-marrow derived macrophage (B and D). Lipopolysaccharide (LPS) was also treated at the concentration 100 ng/mL as a specific mitogen to macrophage cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of * P <0.05, ** P <0.01 compared to control (PBS) group.

상등액의 cytokine 함량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 따라서 CTP의 처리는 NO 유도 분비능 실험에서와 유사하게 cytokine의 분비량 또한 증가시키는 것으로 나타났고, 이러한 NO 및 cytokine의 분비능 증가는 면역 활성화와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각한다.

면역세포는 면역 cytokine을 분비함으로써 미생물 등의 외부 항원에 대한 여러 면역세포 간의 협력을 조절하므로 이들의 생성과 분비는 면역반응의 조절에서 매우 중요한 역할을 수행한다(25). 선천면역계를 담당하는 대식세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등이 있으며, 이들 중 TNF- α 는 대식세포의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 암세포를 직접 죽일 수 있는 강력한 세포독성을 나타내기도 하지만 지속되는 외부자극으로 그 양이 지나치게 많아지면 급성 및 만성 염증을 일으킨다고 보고된다(26). 또한, IL-6는 면역반응, 조혈작용 및 염증반응을 조절하는 데 관여하는 cytokine으로서 plasma 세포 분화를 촉진하여 B림프구의 항체 생성을 활성화시키며, 면역글로불린의 합성에 관여하고 다른 cytokine과 협력하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 작용을 한다고 알려져 있다(27). 이러한 cytokine들은 직접적으로 선천면역계를 활성화시킬 뿐만 아니라, 간접적으로 T세포 관련 후천면역계를 자극시켜 숙주의 면역반응에 중대한 촉매로서의 역할을 수행한다고 보고된다(28). 따라서 본 연구에서도 TCP의 처리에 따라 TNF- α 및 IL-6의 분비능이 증가한 것으로 미루어 보아 꾸

지뽕 다당류 추출물이 면역반응의 연결자인 cytokine의 분비능을 증가시켜 대식세포의 활성화를 유도한 것으로 판단된다.

CTP의 처리가 비장세포 증식률에 미치는 영향

인체 면역기관 중 비장조직은 혈액을 통해 운반되는 외래 항원에 대한 면역반응을 담당하는 장기로 면역 B 세포 및 면역 T 세포가 다수 분포하고 있으며, 림프구의 성숙과 분화가 이루어지는 기관으로서 매우 중요한 의미가 있다. 특히 비장세포는 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 면역 활성화의 지표로 이용될 수 있어 면역 활성을 평가하기 위한 귀중한 수단으로 사용된다(29).

상기 실험에서 꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP의 처리가 선천면역 반응에서 중요한 역할을 수행하는 대식세포의 세포 증식률을 증가시키고, 대식세포의 활성화와 밀접한 관련이 있는 대식세포 활성화 인자인 NO 및 cytokine의 분비능을 증가시키는 것으로 확인할 수 있었다. 그 외 CTP의 처리가 다른 면역세포인 비장세포의 면역 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 마우스 비장에서 유리시킨 비장세포에 농도별 CTP를 처리하여 나타나는 면역 활성 효과에 관하여 관찰하였다(Fig. 4). CTP의 처리가 비장세포의 증식률에 미치는 영향에 관하여 관찰하기 위하여 농도별(62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$) CTP를 비장세포에 24시간 동안 처리한 후 WST-1 방법을 통하여 평가하였다. 또한,

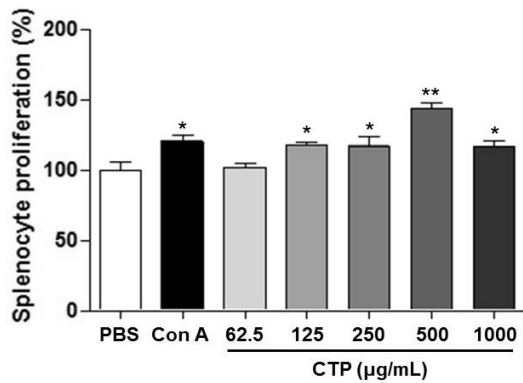


Fig. 4. Cell proliferation activity of *Cudrania tricuspidata* polysaccharide (CTP) in splenocyte separated from mouse spleen. CTP was treated at the concentration of 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 µg/mL in splenocyte. Concanavalin A (Con A) was also treated at the concentration of 3 µg/mL as a specific mitogen to splenic T cells. After 24 h, cell proliferation was evaluated by WST-1 reagent. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **P*<0.05, ***P*<0.01 compared to control (PBS) group.

비장세포에 다수 포함된 면역 T 세포의 마이토젠인 Con A (3 µg/mL)를 사용하여 CTP 처리군과 비교하여 보았다. 마이토젠 처리군인 Con A 처리군의 경우 비장세포의 증식능을 유의적으로 증가시키는 것으로 관찰되었으며, 농도별 CTP 처리군의 경우 CTP의 처리 농도가 증가할수록 세포증

식능이 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한, CTP의 처리에 따른 비장세포의 증식률은 500 µg/mL 처리군에서 최대로 증가하였으며, 그 이상의 농도인 1,000 µg/mL의 농도에서는 감소하는 것으로 관찰되었다. 따라서 비장세포에 대한 CTP의 면역 활성 평가 시 CTP의 최적농도를 비장세포의 증식능이 가장 높게 증가하였던 500 µg/mL로 선택하여 추후 비장세포의 cytokine의 분비 유도능 평가 시 CTP의 농도를 500 µg/mL 이하에서 평가하였다.

CTP의 처리가 비장세포 cytokine 분비에 미치는 영향

꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP의 처리가 주요 면역기관인 비장으로부터 유도시킨 비장세포에 면역 활성화에 미치는 영향에 관하여 알아보기 위하여 농도별(125, 250, 500 µg/mL) CTP를 비장세포에 처리하여 비장세포가 분비하는 cytokine에 관하여 Th 1 type 및 Th 2 type으로 나누어 측정하였다(Fig. 5). 면역 T 세포의 마이토젠인 Con A를 처리한 처리군의 경우 Th 1 type(IL-2 184.9±24.74 pg/mL, IFN-γ 617.5±107.38 pg/mL) 및 Th 2 type(IL-4 198.2±37.84 pg/mL, IL-5 725.1±168.71 pg/mL)의 모든 cytokine의 분비능이 증가하는 것으로 관찰되었다. CTP 처리군의 경우 마이토젠인 Con A 처리군 수준만큼 cytokine의 분비를 증가시키지는 않았지만 Th1 type의 cytokine인 IL-2 및 IFN-γ의 분비능이 CTP 처리 농도 의존적으로 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었으며, Th 2 type의 cy-

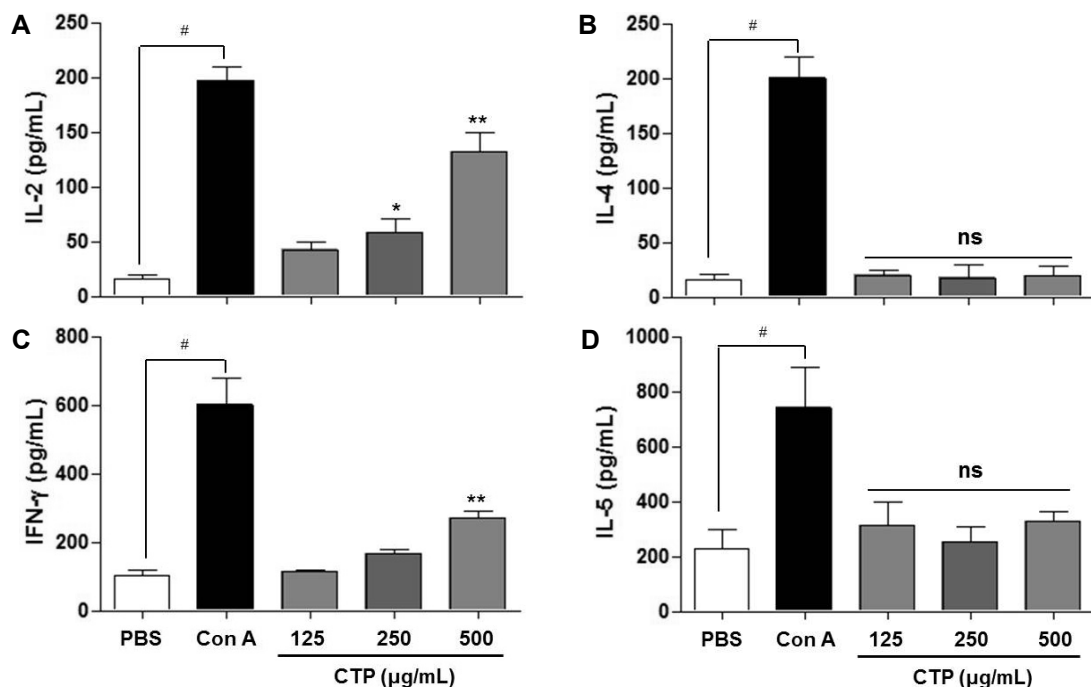


Fig. 5. Cytokine (IL-2, 4, 5, and IFN-γ) production activity of *Cudrania tricuspidata* polysaccharide (CTP) in splenocyte separated from mouse spleen. CTP was treated at the concentration of 125, 250, and 500 µg/mL in splenocyte. Concanavalin A (Con A) was also treated at the concentration of 3 µg/mL as a specific mitogen to splenic T cells. After 24 h, cytokine productions in culture supernatant were measured by using ELISA kit. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of **P*<0.05, ***P*<0.01, compared to control (PBS) group. NS denoted no significance.

tokine인 IL-4 및 IL-5의 분비능의 경우 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아 꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP의 처리는 알레르기 유발률과 밀접한 관련이 있는 Th2 type cytokine의 분비에는 크게 영향을 주지 않으며, 면역 활성화에 관련이 있는 Th1 type의 cytokine의 분비량을 증가시켜 면역 활성을 유도하는 것으로 생각한다.

비장세포의 활성화가 일어나면 대식세포와 마찬가지로 다른 여러 종류의 면역반응을 조절 및 유도하기 위하여 면역 반응의 매개물질인 cytokine을 분비하게 된다. 비장세포에서 분비되는 대표적인 cytokine으로는 IL-2, 3, 4, 5, 6, 10, 13 및 IFN- γ 등이 있는데 이들 중 IL-2는 항원 및 mitogen과 결합하여 B 세포, NK 세포 및 대식세포의 증식을 조절하는 인자이며, IFN- γ 는 병원성 미생물의 침입에 대하여 숙주를 방어할 수 있는 다른 면역세포들의 활성을 유도하는 물질로써 세포 매개 면역반응에서 중요한 역할을 수행한다(30). 따라서 IFN- γ 및 IL-2 cytokine의 유도분비능 측정은 비장세포 면역 활성화 여부를 판단하는 매우 중요한 지표로 알려져 있다(28). 면역 T 세포는 cytokine과 일부 전사인자(transcription factor)들의 활성화에 의하여 Th1 세포와 Th2 세포로 분화하며 각각의 세포에서 분비되는 cytokine의 경우 면역증강 유도 및 알레르기 유발에 밀접한 관련이 있다고 보고된다(31). Th1 세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 등이 있고, Th2 세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로는 IL-4, 5, 10, 13이 있다. 특히 Th1 세포가 분비하는 cytokine이 증가할 경우 면역 활성화에 밀접한 관련이 있으며, Th2 세포가 분비하는 cytokine이 증가할 경우 알레르기 질환이나 아토피 질환의 유발과 밀접한 상관관계가 있다고 보고된다(32).

요 약

본 연구는 꾸지뽕 잎으로부터 추출된 다당류인 CTP의 처리가 면역세포의 활성화에 미치는 영향에 관하여 평가하였다. CTP는 에탄올 침전법에 의하여 추출하였고, 면역 활성화능의 평가는 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 미분화 골수세포로부터 유도 분화시킨 대식세포 및 마우스 비장으로부터 유리시킨 비장세포에 CTP를 농도별로 처리하여 관찰하였다. 선천면역계에서 중요한 역할을 수행하는 대식세포에 CTP를 처리하였을 때 세포 증식률, NO 및 cytokine 분비능이 CTP 처리 농도 의존적으로 증가하는 것으로 관찰되었을 뿐만 아니라 비장세포에서도 이와 유사하게 세포 증식률이 증가하고 Th 1 type의 cytokine 분비능 또한 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로 미루어보아 꾸지뽕 다당류 추출물인 CTP는 다양한 면역세포의 활성을 증가시키는 것으로 생각하며 이를 활용하여 다양한 식품 및 건강보조식품을 개발한다면 그 경제적 가치가 매우 클 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 미래창조과학부에서 시행하는 방사선기술개발사업(NRF-2012M2A2A6011335)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Jung GT, Ju IO, Choi SR, You DH, Noh JJ. 2013. Food nutritional characteristics of fruit of *Cudrania tricuspidata* in its various maturation stages. *Korean J Food Preserv* 20: 330-335.
- Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS. 2006. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 5580-5583.
- Jeong GS, Lee DS, Kim YC. 2009. Cudraticusxanthone A from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol* 9: 241-246.
- Lee BW, Lee JH, Lee ST, Lee HS, Lee WS, Jeong TS, Park KH. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 5548-5552.
- Shi L, Dong Q, Ding K. 2014. Structure elucidation and immunomodulatory activity *in vitro* of a xylan from roots of *Cudrania tricuspidata*. *Food Chem* 152: 291-296.
- Ryu YB, Curtis-Long M, Lee JW, Kim JH, Kim JY, Kang KY, Lee WS, Park KH. 2009. Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem* 17: 2744-2750.
- Zheng ZP, Tan HY, Chen J, Wang M. 2013. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study. *Fitoterapia* 84: 242-247.
- Paulson JC. 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for?. *Trends Biochem Sci* 14: 272-276.
- Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
- Zhu H, Zhang Y, Zhang J, Chen D. 2008. Isolation and characterization of an anti-complementary protein-bound polysaccharide from the stem barks of *Eucommia ulmoides*. *Int Immunopharmacol* 8: 1222-1230.
- Bao X, Wang Z, Fang J, Li X. 2002. Structural features of an immunostimulating and antioxidant acidic polysaccharide from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Planta Med* 68: 237-243.
- Hwang YC, Shin KS. 2008. Characterization of immunostimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J Food Sci Technol* 40: 220-227.
- Lee MS, Shin KS. 2013. Macrophage activation by polysaccharides from Korean's commercial and traditional soy sauces. *Korean J Food Nutr* 26: 797-805.
- Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Chio HJ, Shin KS. 2014. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean *Citrus* Hallabong. *Carbohydr Polym* 111: 72-79.
- Ankathatti Munegowda M, Xu S, Freywald A, Xiang J. 2012. CD4⁺ Th2 cells function alike effector Tr1 and Th1 cells through the deletion of a single cytokine IL-6 and IL-10

- gene. *Mol Immunol* 51: 143-149.
16. Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2005. The IL-4 receptor α -chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells from CD25⁻CD4⁺ precursors. *J Immunol* 175: 6107-6116.
 17. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303.
 18. Mahomoodally F, Mesaik A, Choudhary MI, Subratty AH, Gurib-Fakim A. 2012. *In vitro* modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. *Asian Pac J Trop Med* 5: 440-447.
 19. Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U. 1997. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *Int J Immunopharmacol* 19: 359-370.
 20. Byun EB, Sung NY, Byun EH, Song DS, Kim JK, Park JH, Song BS, Park SH, Lee JW, Byun MW, Kim JH. 2013. The procyanidin trimer C1 inhibits LPS-induced MAPK and NF- κ B signaling through TLR4 in macrophages. *Int Immunopharmacol* 15: 450-456.
 21. Kim K, Sohn H, Kim JS, Choi HG, Byun EH, Lee KI, Shin SJ, Song CH, Park JK, Kim HJ. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 stimulates production of tumour necrosis factor and monocytes chemoattractant protein-1 in macrophages through the Toll-like receptor 4 pathway. *Immunology* 136: 231-240.
 22. Kim JH, Sung NY, Byun EH, Kwon SK, Song BS, Choi JI, Yoon Y, Kim JK, Byun MW, Lee JW. 2009. Effects of γ -irradiation on immunological activities of β -glucan. *Food Sci Biotechnol* 18: 1305-1309.
 23. Morel F, Doussiere J, Vignais PV. 1991. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 201: 523-546.
 24. Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89: 873-891.
 25. Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: an in vitro cytokine study using mouse macrophage. *Clin Chim Acta* 327: 123-128.
 26. Ryu HS. 2008. Effects of *Job's Tears (Yul-Moo)* extracts on mouse splenocyte and macrophage cell activation. *Korean J Food Nutr* 21: 1-6.
 27. Cha JH, Kim YS, Lee EM. 2010. Effects of *Prunellae Spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Oriental Obstet Gynecol* 23: 91-100.
 28. Kim KO, Kim HS, Ryu HS. 2006. Effect of *Sorghum bicolor L. Moench (Sorghum, su-su)* water extracts on mouse immune cell activation. *J Korean Diet Assoc* 12: 82-88.
 29. Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. 2000. In vivo effects of chronic treatment with [Met⁵]-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci* 66: 829-834.
 30. Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cell and tissues of the immune system. In *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. WB Saunders Co., Sydney, Australia. p 264-269.
 31. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiernemann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. 2001. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 16: 178-182.
 32. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.