

Composition for the Immunity Stimulatory Activity Comprising *Calystegia dahurica* (Herb.) Choisy Water Extract

Myeongguk Jeong*, Hyeokjin Kwon*, Seohye Jeong**, Yerin Seo**,
Minguk Kim** and Go-Eun Choi†***

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

Calystegia dahurica (Herb.) Choisy is a natural product that has not been studied for efficacy or active ingredients. The purpose of this study is to investigate the activation effect of natural killer cells using a natural extract composition based on *Calystegia dahurica* (Herb.) Choisy extract (CDCE). We evaluated the activity of natural killer cells in natural products using PBMCs from healthy participants. All natural products were extracted with 50% ethanol. Based on the results of the cell viability assay, PBMCs of healthy participants were treated with extracts at various concentrations. Then, analysis was performed using flow cytometry to measure the cd107a surface expression of natural killer cells. As a result, treatment with a single extract of PBMCs increased the expression of cd107a in a concentration-dependent. Furthermore, it was confirmed that the treatment of the extract composition showed the highest expression of cd107a. In conclusion, it is expected that the extract composition containing CDCE according to this study can be used for prevention or treatment of cancer cells, tumor cells, and immune diseases.

Key Words: *Calystegia dahurica* (Herb.) Choisy, *Saussurea neoserrata* Nakai, *Nypa fruticans* Wurmb, PBMC, NK cell, CD107a, Cytotoxicity

암은 21세기 모든 국가에서 사망의 주요 원인이며(Bray et al., 2018), 암 발병 시 신체 활동의 장애, 수면 장애, 삶의 질 저하를 초래한다(Dehkordi et al., 2009). 다양한 유형의 암 치료를 위해 방사선 요법, 화학 요법 및 수술 등의 치료법들이 사용될 수 있다. 하지만 이러한 치료법들의 경우 부작용을 초래할 수 있으며, 흔히 두통, 피로, 탈모, 구토, 설사, 복통, 구강염증 등이 발생할 수 있다(Tan et al., 2019). 이러한 부작용으로 인해 환자의 경우 치료 기피, 중단으로 이어질 수 있다. 최근 기존 항암 치료법의 한계를 극복, 보완할 수 있는 치료법 중 하나로 자연살해세포 기반 면역 치료가 주목받고 있으며(Lorenzo-Herrero et al.,

2018), 자연살해세포의 경우 직접적으로 암 및 종양의 발생, 증식, 전이 및 재발을 막는데 효과적이라는 사실이 입증되고 있다(López-Soto et al., 2017). 자연살해세포는 악성세포, 병원체에 감염된 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 선천면역 체계의 림프구이며(Scott-Algara and Paul, 2002), CD3(T-세포 공동 수용체)가 없는 상태에서 표현형 마커 CD56(신경세포 부착 분자)의 발현에 의해 특징지어진다(Becker et al., 2016). 자연살해세포 세포독성 공격은 즉각적이며 T 세포와 달리 항원 사전 감각없이 암세포나 바이러스에 감염된 세포에 대한 초기 방어를 제공한다(Kwon et al., 2018). 자연살해세포는 주로 세포 사멸을 유

Received: September 19, 2022 / Revised: September 22, 2022 / Accepted: September 22, 2022

* Graduate student, ** Undergraduate student, *** Professor.

† Corresponding author: Go-Eun Choi. Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea.

Tel: +82-51-510-0563, Fax: +82-51-510-0568, e-mail: gechoi@cup.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

도할 수 있는 granzyme B 및 perforin을 함유한 세포용해 과립의 방출을 포함하는 기전에 의해 표적세포를 사멸시키며, 직접적인 세포용해 및 IFN-gamma 생산을 통하여 광범위한 종양세포를 효율적으로 인식하고 제거할 수 있다(Viel et al., 2013).

산골취(*Saussurea neoserrata* Nakai)는 국화과에 속하는 여러해살이 식물이다. 효능으로는 항염증, UVB로 인한 신경세포 손상 예방 등이 있으며, 유효성분으로는 페놀산의 일종인 protocatechuic acid (3,4-dihydroxy benzoic acid) 등이 보고되었다(Lee et al., 2021a; Lee et al., 2021b). 해죽순(*Nypa fruticans* Wurmb)은 야자과에 속하며 동아시아의 갯벌과 습지에서 자라는 야자수의 일종이다. 효능으로 항고혈당, 항동각수용성, 항당뇨병 및 항산화 효과를 포함하는 다양한 생물학적 활성이 있는 것으로 보고된 바 있으며, 폴리페놀 및 플라보노이드와 같은 다양한 화합물을 포함하고 있다(Yusoff et al., 2015). 선메꽃(*Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy)은 메꽃과에 속하는 여러해살이 식물이며, 효능 및 유효성분 등 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 체내 면역력을 일정 수준 이상으로 유지시킬 수 있다면, 그 자체로 새로운 의미의 포괄적 예방법이라고 할 수 있다. 따라서 자연살해세포 기능의 활성을 근본적으로 회복할 수 있는 천연 식물자원 추출물을 발굴하여 인체 내 면역력을 일정 수준 이상으로 향상시켜 다양한 감염성 질환, 암 치료 및 암으로부터 예방하는 방법을 모색하고자 한다.

본 연구에서 사용한 PBMC는 신체적으로 특정한 질환을 가지고 있지 않으며, 연구의 목적과 수행되는 검사 및 실험에 관한 내용을 듣고 자발적으로 연구에 참여할 것을 동의서에 서명한 20세 이상의 건강한 성인 중 50명을 대상으로 항응고제(EDTA) 튜브를 사용하여 말초혈액

을 채혈하였다. 본 연구는 부산가톨릭대학교 기관생명윤리위원회의 심의를 거쳐 수행되었다(CUPIRB-2020-022). Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 용액을 이용한 밀도구배 원심분리에 의해 항응고제(EDTA) 튜브의 혈액으로부터 PBMC를 분리하였다. 분리된 세포를 차가운 PBS에서 2회 세척하고 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Paisley, UK)이 보충된 RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) 배지에 배양하였다. 모든 과정은 채혈 후 4시간 이내에 수행되었다. 만성 골수성 백혈병 암세포인 K-562 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Paisley, UK)이 보충된 RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

산골취(*Saussurea neoserrata* Nakai), 해죽순(*Nypa fruticans* Wurmb), 선메꽃(*Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy)은 건조 형태의 진초를 다음 인터내셔널(Hanam, Korea)에서 구입하였다. 에탄올 추출물의 제조는 (Adebiyi et al., 2017)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료를 분쇄한 뒤 50% 에탄올을 시료 1 : 에탄올 10의 비율로 혼합하여 80°C에서 3시간 중탕을 3회 반복 추출하였다. 추출물을 감압농축기로 감압농축한 후 동결건조기(Ilshin Lab, Yangju, Korea)를 사용하여 -80°C에서 동결건조 후 분말형태의 시료를 얻었다. 각 추출물별 농도에 따른 PBMC의 생존율을 측정하기 위해 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 생존율을 분석하였다. 세포를 96 well plate에 well당 2×10^5 개가 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 농도별(0, 0.02,

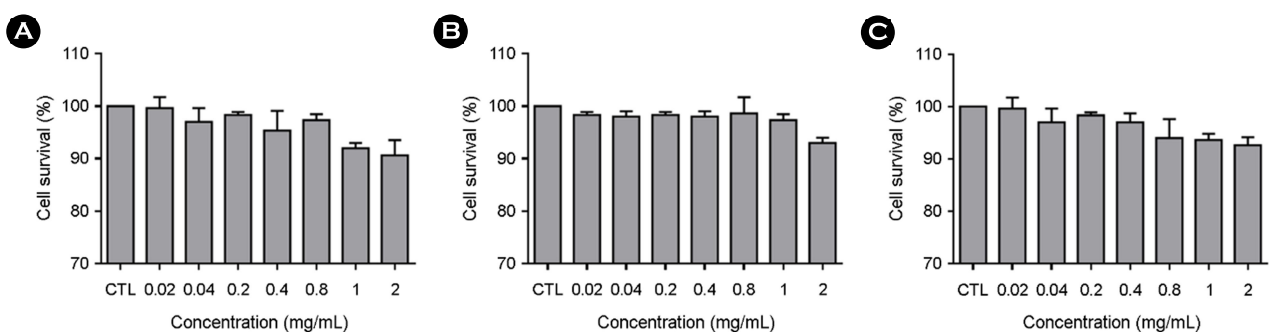


Fig. 1. Cytotoxicity of the three extracts in culture with PBMC. Cytotoxicity of PBMC was determined in the culture of PBMC treated with increasing doses of the three extracts for 24 h, followed by the analysis of relative metabolic activity by CCK-8 assays. (A) Cytotoxicity of the *Saussurea neoserrata* Nakai, (B) Cytotoxicity of the *Nypa fruticans* Wurmb, (C) Cytotoxicity of the *Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy. The summarized data (A-C) is shown as mean \pm SD from three independent experiments.

0.04, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2 mg/mL) 추출물을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 CCK-8 용액을 첨가하였다. 30분 배양기에서 반응 후 Varioskan LUX microplate reader (Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 산골취(*Saussurea neoserrata* Nakai) 에탄올 추출물은 농도 0.02~0.8 mg/mL 사이의 농도에서 95% 이

상 생존하였으며, 1 mg/mL에서 $92 \pm 0.81\%$, 2 mg/mL에서 $90.66 \pm 2.35\%$ 생존하였다(Fig. 1. (A)). 해죽순(*Nypa fruticans* Wurmb) 에탄올 추출물은 농도 0.02~1 mg/mL 사이에서 95% 이상 생존하였으며 2 mg/mL 농도에서 $93 \pm 0.81\%$ 생존하였다(Fig. 1. (B)). 선메꽃(*Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy) 에탄올 추출물은 0.02~0.4 mg/mL 사이의 농도에

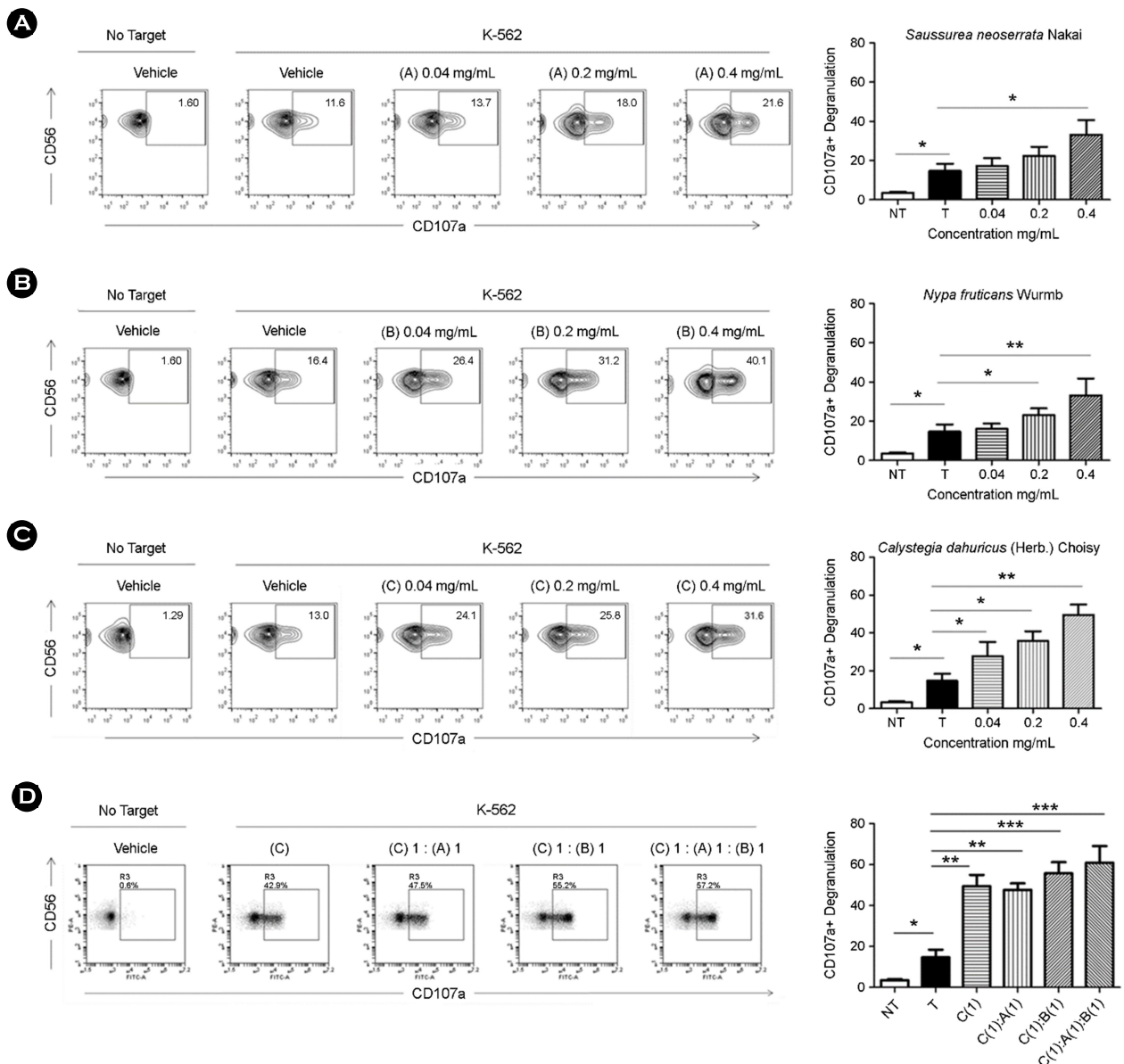


Fig. 2. The three extracts enhances the natural cytotoxicity of NK cells. PBMCs exposed at varying concentrations for 20 h and then mixed with K562. After 2 h incubation at 37°C, cytotoxic degranulation of NK cells was measured by cell surface expression of CD107a on CD3-CD56+ NK cells. (A) The expression of CD107a of the *Saussurea neoserrata* Nakai, (B) The expression of CD107a of the *Nypa fruticans* Wurmb, (C) The expression of CD107a of the *Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy. (D) The combination treatment (1:1 and 1:1:1, respectively) with the *Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy. The right column shows Representative flow cytometry profiles. The left column shows the percentage of CD107a+ NK cells in four independent experiments. Data are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by one-way ANOVA with the Dunnett's test.

서 95% 이상 생존하였으며 0.8 mg/mL에서 94±2.94%, 1 mg/mL에서 93.66±0.94%, 2 mg/mL에서 92.66±1.24% 생존하였다(Fig. 1. (C)). 추출물에 대한 평가를 위해서는 3개의 물질에 대해 생존율이 95% 이상인 농도(0.04, 0.2, 0.4 mg/mL)를 사용하였다. 추출 혼합물의 경우 연구된 바가 없어 임의의 배합 비율(1:1, 1:1:1)을 사용하였으며, 이후 모든 실험에 사용하였다.

자연살해세포 세포독성 탈과립의 측정을 위해 세포 표면 CD107a의 발현을 Flow cytometry를 사용하였으며(Lee et al., 2021c)를 참고하여 변형된 방법을 사용하였다. 수집된 PBMC를 U-bottom plate (Thermo Scientific, MA, USA)에 1×10^6 개씩 분주하고 농도별(0, 0.04, 0.2, 0.4 mg/mL) 에탄올 추출물을 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 환경에서 20시간 배양하였다. 공동 배양 후 표적세포를 1:1의 Effector: Target 비율에 맞춰 분주 후 2시간 배양하여 자극하였다. 자극 후 세포를 V-bottom plate (Thermo Scientific, MA, USA)에 옮기고 유세포 분석을 위해 염색하였다. 염색을 위해 CD3-PerCP (Becton Dickinson, MA, USA), CD56-PE (Becton Dickinson, MA, USA), and CD107a-FITC (Becton Dickinson, MA, USA) 항체를 사용하여 빛 차단 후 4°C에서 1시간 염색하였다. 모든 데이터는 BD Accuri C6 plus (Becton Dickinson, MA, USA) 유세포 분석기에서 수집되었고 FlowJo version 10.8.1 (Becton Dickinson, OR, USA) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 산골취(*Saussurea neoserrata* Nakai), 해죽순(*Nypa fruticans* Wurmb), 선메꽃(*Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy) 각 에탄올 추출물의 단일 처리시 자연살해세포의 CD107a 발현 정도가 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 효과가 가장 탁월한 선메꽃 추출물과 자연살해세포의 활성을 증진시키는 것으로 확인된 두 가지 추출물(산골취, 해죽순)과 함께 1:1:1로 조합하였을 때 자연살해세포 세포 표면 CD107a 발현 정도가 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 2). 선메꽃 추출물을 유효 성분으로 함유하는 자연살해세포의 활성 증진용 조성물은 면역 활성화와 관련한 Granzyme B 및 Perforin의 발현을 증가시키므로써 자연살해세포의 활성을 증진시킬 수 있다.

요약하면, 우리의 결과는 이전에 인식되지 않았던 선메꽃 추출물이 자연살해세포 효과에 대한 기능을 촉진할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 보여준다. 이러한 맥락에서 추후 연구를 통해 자연살해세포에 대한 선메꽃 작용 메커니즘에 대한 새로운 통찰력을 제공할 필요가 있다. 따라서 우리의 연구는 인체 내 대사 작용으로 인해 선메꽃 추출물을 항암제로 고려하는 데 주의가 필요하지

만(Kwon et al., 2018), 예방 및 치료관점에서 화학 예방 및 화학 요법 잠재력을 활용하는 효과적인 전략 개발에 기여할 수 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Undergraduate Research Program (URP) support project, Korea Foundation for the Advancement of Science & Creativity (KOFAC) and a grant of the National Research Foundation of Korea (NRF) by the Ministry of Science, (No. 2019R1C1C1004820).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Adebiyi OE, Olayemi FO, Ning-Hua T, Guang-Zhi Z. *In vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *grewia carpinifolia*. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2017. 6: 10-14.
- Becker PS, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, Tonn T, Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for nk cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016. 65: 477-484.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2018. 68: 394-424.
- Dehkordi A, Heydamejad MS, Fatehi D. Quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy. *Oman Medical Journal*. 2009. 24: 204.
- Kwon HJ, Lee H, Choi GE, Kwon SJ, Song AY, Kim SJ, Choi WS, Hwang SH, Kim SC, Kim HS. Ginsenoside fl promotes cytotoxic activity of nk cells via insulin-like growth factor-1-dependent mechanism. *Frontiers in Immunology*. 2018. 9: 2785.
- Lee GH, Choi GE, Hyun KY. Protocatechuic acid isolated from *saussurea neoserrata* nakai extract reduces the inflammation in human keratinocytes. *Proceedings of the Korean Society for Experimental Animal Research Conference*. 2021a. 176-176.
- Lee GH, Choi GE, Hyun KY. Syringin isolated from *saussurea*

- neoserrata* nakai extract regulated antioxidant and neuro-protective activities in human dermal fibroblasts. Proceedings of the Korean Society for Experimental Animal Research Conference. 2021b. 177-177.
- Lee Y, Shin H, Kim J. *In vivo* anti-cancer effects of resveratrol mediated by nk cell activation. Journal of Innate Immunity. 2021c. 13: 94-106.
- López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of metastasis by nk cells. Cancer Cell. 2017. 32: 135-154.
- Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Sordo-Bahamonde C, Gonzalez-Rodriguez AP, Vitale M, Gonzalez S. Nk cell-based immunotherapy in cancer metastasis. Cancers. 2018. 11: 29.
- Scott-Algara D, Paul P. Nk cells and hiv infection: Lessons from other viruses. Current Molecular Medicine. 2002. 2: 757-768.
- Tan S, Turner J, Kerin-Ayres K, Butler S, Deguchi C, Khatri S, Mo C, Warby A, Cunningham I, Malalasekera A. Health concerns of cancer survivors after primary anti-cancer treatment. Supportive Care in Cancer. 2019. 27: 3739-3747.
- Viel S, Charrier E, Marçais A, Rouzaire P, Bienvenu J, Karlin L, Salles G, Walzer T. Monitoring nk cell activity in patients with hematological malignancies. Oncoimmunology. 2013. 2: e26011.
- Yusoff NA, Yam MF, Beh HK, Razak KNA, Widyawati T, Mahmud R, Ahmad M, Asmawi MZ. Antidiabetic and antioxidant activities of *nypa fruticans* wurmb. Vinegar sample from malaysia. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2015. 8: 595-605.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.3.206>

Cite this article as: Jeong M, Kwon H, Jeong S, Seo Y, Kim M, Choi GE. Composition for the Immunity Stimulatory Activity Comprising *Calystegia dahuricus* (Herb.) Choisy Water Extract. Biomedical Science Letters. 2022. 28: 206-210.