

녹각 추출액의 면역학적 특성에 관한 연구

김현식 · 허인회 · 이상준* · 안형수*

중앙대학교 약학대학, (주) 종근당*, 동덕여자대학교 약학대학*

(Received September 28, 1994)

Studies on the Immunological Characteristic of Cervi cornu Extract

Huyn-Sik Kim, In-Hoi Huh, Sang-Joon Lee* and Hyung-Soo Ann*

*College of Pharmacy, Dong Duk Women's University, Seoul 136-714, Korea

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Chong Kun Dang Corp., Seoul 152-070, Korea

Abstract—These experiments were conducted to investigate the effects of Cervi cornu extract on lymphocyte blastogenesis in spleen, thymus, lymph node, born marrow cells of Balb/c mouse, haemagglutination reaction against sheep red blood cell (SRBC), plaque forming cell (PFC) assay against SRBC and IL-2 production. Lymphocyte blastogenesis was determined by [³H]-thymidine incorporation. According to the lymphocyte blastogenesis test on the immune cell. Cervi cornu extract was showed a potent mitogenic activity on the spleen and lymph node cells, but had mild mitogenic activity on the thymus and born marrow cells. Mitogenic active component of Cervi cornu extract was identified to be materials where molecular weights are higher than 5,000 by membrane filtration method. Cervi cornu extract was shown to increase mitogenic effect on the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated spleen cells significantly, but decrease mitogenic effect on the Con A stimulated spleen cell at the concentration 0.3%, 1% and 3%. Cervi cornu extract didn't show to be haemagglutination reaction and showed to inhibit the Con A-induced haemagglutination reaction against SREC. Result of SRBC-PEC test. Cervi cornu extract significantly increase the number of PEC at the concentration of 0.1% and 1%. When IL-2 or IL-4 production was determined by proliferation of CTLL-2 cells. Cervi cornu extract was not shown to stimulate the production of IL-2. From the above results, it is shown that Cervi cornu extract increased antibody production by B cells, but nor IL-2 production by helper T cells.

Keywords □ Cervi cornu extract, mitogenic activity, lymphocyte blastogenesis, SRBC-PEC, LPS, Con A

면역학의 발전으로 많은 질환이 면역계의 이상에 의해 발생되고 있음이 점차 밝혀져 가고 있으며, 최근에는 암 치료에 있어서도 종래의 외과적 수술, 방사선 요법 및 화학요법과 병용하여 면역요법제가 사용되고 있다.^{1,2)}

1981년 Ehrlich가 arbin과 ricin을 면역학적 연구에 응용한 이래, 생약에서 면역계에 작용하는 여러 lectin compound가 보고되어 있다.^{3,4)} 따라서 최근에는 Macrophage 등의 면역세포를 자극하여 면역 능력을 조절하는 면역 조절제(Immunomodulator)를 생약이나

균주로부터 찾아내는 연구들이 활발히 진행되고 있는데,⁷⁾ 이 중에서 Con A는 특이하게 T cells을 자극하나 B cells에는 작용하지 않으며,⁸⁾ lymphopolysaccharide(LPS)라는 다당체는 B cells에만 특이하게 작용하는 mitogen으로 알려져 있는데,⁹⁾ 이와 같이 lectin류나 고분자 다당체에 의해 면역 세포의 증식이 유도되면, thymidine의 세포내 DNA에로의 도입이 현저히 증대되고 면역세포가 자극되며, 각종 면역세포의 기능과 세포의 분화 증식을 조절하는 lymphokines와 cytokines의 생리활성 물질의 분비가 많아진다.

따라서 최근에 동물성 생약에서 면역조절에 작용

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

하는 많은 물질이 연구되고 있어, 본 연구자는 동물 생약중에서 매화록(梅花鹿) *Cervus nippon Temminck* 및 마록(馬鹿) *Cervus elaphus Linné*(사슴과, *Cervidae*)의 사슴 뿔 중에 털이 없고 골질화된 뿔인 녹각(*Ceriv cornu*)을 사용하여 면역조절 사용을 시험하였다.^{10,11} 녹각은 溫補肝腎, 強筋骨, 活血消腫에 효능이 있는 약제로 한방에서 널리 중요하게 사용되고 있는데,¹⁰ 특별하게 알려진 성분이나 약리작용은 없으나, 고질 25%, 인산칼슘 50~60%, 탄산칼슘, 질소화합물 등이 함유되어 있으며, 복합지질인 proteolipids, ganglioside, sphingomyeline 및 cholesterol 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고, 녹각의 면역 작용에 대한 연구는 없었으나, 고분자 물질의 약리작용이 추정되는 바, 녹각 추출액을 분자량 5,000 이하를 통과시킬 수 있는 membrane을 이용하여 농축한 액으로부터 면역조절에 대한 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 시료

- a) 녹각(鹿角); 시중에서 구입(한국 의약품 수출입 협회 검정품)
- b) Scintillation cocktail solution; beckmann
- c) RPMI-1640; Gibco
- d) Sheep Red Blood Cells(SRBC); Korea Media
- e) [³H]-Thymidine; Specific activity 2.0 Ci/mol, NEN
- f) Fetal Bovine Serum(FBS); Gibco
- g) Glass filter paper; 934-AH, Whatman Co.
- h) Phosphate buffered saline(PBS); Gibco
- i) Concanavalin A(Con A); Sigma
- j) Lipopolysaccharide(LPS); Difco.
- k) Interleukin-2(human) (IL-2); 한국 과학원
- l) 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT); Sigma 이외의 시약은 1급으로 사용하였다.

실험기기

- a) Cell havester; Nunc 8 halls
- b) Scintillation counter; Beckmann, LS3801
- c) Microscope; Leita Co.
- d) Haemocytometer; Supe rior

- e) CO₂ Incuvator; Korea Manhattan Co.
- f) Stirred cell filtrator; Amicon
- g) 96 Microplate(96 well, V type); Corning
- h) Microplate reader; Dynatech

실험동물

한국 화학 연구소에서 사육한 6~7주령의 Balb/c mouse를 사용하였다.

녹각추출법

시판 녹각을 구입하여 각질 부분을 떼어 버리고 cartilage 부분만 10×10 mm 정도의 크기로 잘라 40 g을 취하고 여기에 증류수 500 ml를 가하고 5분간 방치하면서 녹각을 물에 완전히 적신 후 전기곤로 위에 올려놓고 정확히 1분간 끓인 다음 가용성 분획을 취하여 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 다시 상등액을 취하여 0.22 μm 여과지를 통해 여과하여, 여액을 stirred cell filtrator에 넣고, 질소 가스압으로, membrane(5,000<)를 통해서 분자량 5,000 이하의 물질을 여과시켜 20배로 농축하여 시료로 사용하였다.

분자량에 의한 분리 및 mitogenic 활성 확인 실험¹²⁾

녹각은 동물로 부터 유래된 것이므로 고분자 물질의 가능성이 시사되는 바 분자량 5,000 이하를 통과시킬 수 있는 membrane를 이용하여 녹각 추출액을 여과시켜 통과된 것(분자량 5,000 이상)과 통과되지 않은 것(분자량 5,000 이하), 원액의 mitogenic 활성을 비장 세포의 단세포 부유액에서 측정하였다.

Mitogen에 의한 증식(Blasto화) 반응 실험¹³⁻¹⁵⁾

세포부유액 조제; 6~7주령 Balb/c mouse로부터 비장, 흉선, 임파선 및 골수를 적출하여, RPMI-1640 배지중에서 100 mesh 망으로 분쇄하여 단세포 부유액을 만든다. 이 부유액을 RPMI-1640배지로 3회 세척 후, haemocytometer로 세포의 수를 세고, complete RPMI-10 배지(10% Fetal Calf Serum(FCS)함유 RPMI-1640 배지에 2 mM L-glutamine, 50 μM 2-mercaptoethanol이 함유된 배지)으로 2×10⁶ cells/ml의 세포 농도로 조제한다.

Mitogen 용액의 조제; Con A와 LPS를 RPMI-1640배지에 용해(100 μg/ml의 용액)하여 여과 멸균하고, 이 액을 completed RPMI-10 배지로 희석하여 사용한다.

96 well microplate 위에 적당한 농도로 희석된 검체시료를 각 well에 50 μl씩 넣는다. 계속, 세포 부유액을 100 μl씩 가하고 배지, Con A, LPS 용액을 각각

3 well씩 첨가한 후, 5% CO₂-95% O₂ incubator에서 37°, 48시간 배양한다. 배양 마지막 4시간 전에 각각의 well에 0.5 µCi의 ³H-thymidine이 함유된 complete RPMI-1640 배지를 20 µl씩을 가하고 배양 후 nunc cell harvestor을 이용하여 세포를 흡입 여과하여, 유리여과지 위해 세포를 수집하고, 10분간 건조 후 액체 scintillation counter을 이용하여 방사선량을 측정한다. 이 세포내에 incorporation된 ³H-thymidine의 양으로부터 세포의 증식정도를 측정한다.

Haemagglutination 반응실험¹⁶⁾

면양으로부터 해파린 처리된 혈액을 채취하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 제거하고 적혈구 상층의 기타 혈구 성분을 충분히 제거한 후 PBS로 3회 세척한 다음 최종 PBS로 희석하여 2%의 적혈구 현탁액을 제조하였다. 96 well round bottomed plate의 각 well에 25 µl의 PBS를 가하고, 각각 추출액을 첫번째 well에 25 µl를 넣고 혼합 후 여기서 다시 25 µl를 취하여 같은 조작을 반복함으로써 2배로 serial dilution을 하여 2⁴까지 희석한다. 따로이 대조 약물로 Con A(100 µg/ml in PBS 용액)를 녹각과 동일하게 처치 하였으며, 또한 녹각 성분이 Con A 유도 적혈구 응집반응에 대하여 어떤 작용을 하는지 알아보기 위하여 녹각 추출액을 위와 같이 처치하고, 각각의 well에 Con A를 5 µl씩 넣은 후 2% 적혈구 현탁액을 각각의 well에 25 µl씩 가하고 37° C incubator에서 1~2시간 배양후 적혈구 응집반응 정도를 검토하였다.

면양 적혈구 용혈반 형성실험(Haemolytic plaque forming cell(PEC))^{14,17)}

세포 부유액 조제; 비장 적출 5일 전에, (주) Korea media로부터 공급받은 면양적혈구를 일정량 취해 PBS 10 ml/씩으로 3회 세척한 후 haemocytometer를 이용하여 세포수를 세고, 여기에 PBS를 넣어 2×10⁹ cells/ml 만든 다음, 6~7주령 Balb/c mouse의 복강 내로 0.2 ml를 투여하여 잠작시킨 mouse로부터 비장을 적출하여, RPMI-1640 배지중에서 100 mesh망으로 분쇄하여 단세포 부유액을 만든다. 이 세포 부유액에 적혈구 용혈 완충액(0.83 g NH₄Cl, 0.109 g NaHCO₃ 및 0.004 g Na₂-EDTA add to 100 ml with D. W) 5 ml를 가하여 37°C에서 5분간 용혈시킨 후, RPMI-1640 배지 8 ml를 가하고, 원심분리(1,200 rpm, 5분간)하여 상등액을 걸러낸다. 세포를 RPMI-10 배

지(10% FCS 함유 RPMI-1640에 20 mM L-gilutamine, 50 µM 2-mercaptethanol이 함유된 배지)으로 2×10⁶ cells/ml의 농도로 세포 부유액을 조제한다. 이 세포 부유액에 녹각 추출물을 0.01%, 0.1%, 1%를 각각 가하여 37°C, 5% CO₂-95% O₂ incubator에서 48시간 배양한 후 세포를 수집하여 PFC assay를 하였다.

용혈반 실험; 배양 후 수집한 세포를 supplemented complete RPMI-10 배지 (10% FCS함유 RPMI-1640에 1 mM sodium pyruvatem 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol이 함유된 배지)으로 희석하여 1×10⁷ cells/ml가 되도록 한다. 이 세포 부유액 및 10% SRBC, supplemented complete 배지, 1.50% diluted guinea pig complement(in supplemented complete 배지)을 각각 50 µl씩 넣어 섞은 혼액을 Cunningham chamber에 넣고 vaseline으로 밀봉한 후, 37°C, incubator에서 3시간 배양하고 형성된 용혈성 plaque의 수를 센다.

Interleukin-2 및 4 assay^{14,18,19)}

세포배양; 활성 log-phase 성장을 하는 CTLL-2 세포를 수집하여, complete RPMI-10 배지으로 3회 세척하거, 세포 유지시 첨가된 IL-2를 완전히 제거한 후 complete RPMI-10 배지를 이용하여 1×10⁵ cells/ml의 농도로 세포를 준비한다.

따로이 비장세포에 녹각 추출액 0.01%, 0.1%, 1%를 첨가하여 2일간 37°C, 5% CO₂-95% O₂ incubator에서 배양 후 상등액을 취하여 96 well platelet A1-A12까지 50 µl씩 가하고, 여기에 complete RPMI-10 배지 50 µl를 다시 가해 2배 희석하고, 여기서 다시 50 µl를 취해 같은 조작을 반복함으로써 2배로 serial dilution을 하여 2⁸ 까지 희석하였다. 각각의 well에 미리 준비된 CTLL-2 세포 현탁액(1×10⁵ cells/ml)을 50 µl씩 가한 후 37°C, 5% CO₂-95% O₂ incubator에서 2일간 배양한 후 세포증식을 MTT assay method를 이용하여 측정하였다. 대조군으로써 IL-2(150 U/ml)을 위와 동일하게 희석하여 배양하였다.

MTT assay; 2일간 배양한 후 각각의 well에 MTT 용액(2 mg/ml in PBS) 50 µl씩을 가하고 37°C, 5% O₂ incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 원심 분리(2000 rpm, 10 min)하여 상등액을 제거하고 생성된 formazan 결정에 200 µl의 dimethyl sulfoxide를 첨가하고, microplate shaker에서 5분간 shaking하여 용해 하였다. 이것을 microplate reader로

570 nm에서 흡광도(O.D)를 측정한다.

통계 처리 방법

모든 결과는 pharmacological calculations software중의 Student's t-Test를 사용하여 유의성 검정을 하였고, 그리고 ED₅₀값은 Probits의 Quantal Dose-Respond을 사용 computer로 처리하였다.^{20,21)}

결과 및 고찰

분자량에 따른 분리 및 mitogenic 활성 확인

녹각의 추출액을 Amicon^R stirred cell filtrator를 이용하요 분자량 5,00 이상과 이하를 분리 수집할 수 있는 membrane을 넣고 교반하면서 질소 가스압으로 분자량 5,000 이하를 통과시켜 분자량 5,000 이상을 6배 농축시켜, 이들을 각각 원액과 함께 비장 세포의 단세포 부유액에서 mitogenic 활성을 시험한 결과는 Table I과 같다.

Table I—Indentification of expected molecular weight on the Mitogenic active component of Cervi cornu extract by membrane filtration method
Unit; cpm

Conc(%)	Original solution	5,000* ↑	5,000 ↓
0.5%	4,260	5,568	942
1%	6,618	10,224	736
2.5%	9,926	15,066	798
5%	13,480	20,056	900

* Molecular weight

**Control; 1,070 cpm

Table I에서 보는 것과 같이 활성물질이 분자량 5,000 이상의 고분자이며, 이 membrane을 전혀 빠져 나가지 않음을 알 수 있다.

Haemagglutination test

각종 생약으로부터 1,000여종의 lectin 화합물들이 알려져 있으며, 이들은 Con A와 같이 lymphocytes mitogen으로서 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이들 lectin 화합물들은 특이하게 haemagglutination 반응을 일으키는 것으로 알려져 있고, 따라서 본 연구자는 녹각추출물의 면양 적혈구에 대한 응집반응을 시험 해 본 결과는 Table II와 같다.

Table II에서 보는 바와 같이 Con A(0.1 mg/ml)는 2⁹ (512)의 titer를 나타내는데 비해 녹각 추출물은 전혀 응집반응을 나타내지 않았으며, 각각의 well에 Con A을 5 μl씩 가한 후 녹각 추출액을 2배씩 dilution을 하여 첨가한 응집 반응시험으로부터 오히려 Con A의 응집반응을 억제하는 것으로 관찰되었다. 이때 Con A 5 μl로 유발된 응집 반응을 녹각 추출물이 2⁹ titer이내 까지 억제시키는 효과를 나타내었다. 위 결과로보아 활성물질은 lectin 화합물이 아닌 것으로 사료된다.

면역세포에 대한 mitogenic 활성

녹각 추출물로 Balb/c mouse의 비장 세포, 흉선 세포, 임파선 세포 및 골수 세포에 대한 mitogenic effect를 관찰한 결과는 Table III-VI와 같다.

Table III-IV에서 보는 바와 같이 비장 세포에서는 48 hr, 1.0%에서 최고의 활성도를 나타냈으며, Con A와 유사한 활성도를 나타낸다. 또한 흉선세포에서는

Table II—Effect of Cervi cornu extract on the Haemagglutination of sheep red blood cells.

Group	→ dilution factor											
	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²
Con A	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	+/-	-	-	-
(0.1 mg/ml)	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²	2 ²³	2 ²⁴
Cervi cornu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
extract	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²	2 ²³	2 ²⁴
Cervi cornu	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²
extract	+/-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
+	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²	2 ²³	2 ²⁴
Con A(5 ml)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Table III—Mitogenic effect of Cervi cornu extract on the spleen cells

Group	days		
	[³ H]-thymidine incorporation (cpm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
control	1,966± 15	3,565± 457	2,982± 423
Con A (2.5 µg/mg)	18,940± 303 [†]	83,159± 1,072 [†]	30,834± 177 [†]
0.01%	4,212± 383 [†]	7,459± 87 [†]	8,304± 644 [†]
0.03%	8,070± 326 [†]	15,290± 1,578 [†]	24,213± 1,956 [†]
0.1%	14,630± 202 [†]	37,611± 302 [†]	32,205± 435 [†]
0.3%	21,945± 573 [†]	58,820± 2,219 [†]	24,871± 603 [†]
1.0%	26,970± 734 [†]	72,748± 1,206 [†]	14,196± 1,118 [†]
3.0%	26,026± 714 [†]	19,874± 260 [†]	—

Each values represents the mean± S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

Table IV—Mitogenic effect of Cervi cornu extract on the thymus cells

Group	days		
	[³ H]-thymidine incorporation (cpm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
control	220± 10	52± 8	50± 4
Con A (2.5 µg/mg)	1,401± 123 [†]	7,356± 897 [†]	6,679± 243 [†]
0.01%	542± 28 [†]	329± 39 [†]	474± 33 [†]
0.03%	570± 27 [†]	383± 58 [†]	733± 51 [†]
0.1%	544± 15 [†]	440± 49 [†]	720± 48 [†]
0.3%	462± 31 [†]	622± 114 [†]	1,069± 84 [†]
1.0%	453± 13 [†]	975± 79 [†]	2,072± 86 [†]
3.0%	401± 19 [†]	847± 86 [†]	2,067± 128 [†]

Each values represents the mean± S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

Table V—Mitogenic effect of Cervi cornu extract on the lymph node cells

Group	days		
	[³ H]-thymidine incorporation (cpm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
control	781± 72	1,990± 36	4,684± 583
Con A (2.5 µg/mg)	30,399± 6,134 [†]	71,115± 2,128 [†]	7,723± 425 [†]
0.01%	1,206± 27 [†]	6,231± 203 [†]	19,539± 641 [†]
0.03%	1,800± 65 [†]	12,858± 286 [†]	41,688± 1,116 [†]
0.1%	3,198± 95 [†]	28,978± 1,687 [†]	55,731± 1,532 [†]
0.3%	6,516± 324 [†]	67,209± 1,209 [†]	45,877± 1,006 [†]
1.0%	10,164± 2,568 [†]	90,548± 259 [†]	23,759± 1,778 [†]
3.0%	12,010± 951 [†]	33,380± 1,577 [†]	—

Each values represents the mean± S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

Table VI—Mitogenic effect of Cervi cornu extract on the bone marrow cells

Group	days		
	[³ H]-thymidine incorporation (cpm)		
	24 hr	48 hr	72 hr
control	4,951± 39	1,414± 13	405± 11
Con A (2.5 µg/mg)	5,634± 263	1,278± 74	577± 8
0.01%	5,042± 38	1,323± 178	202± 4
0.03%	4,952± 94	1,250± 2	536± 62
0.1%	4,969± 79	1,543± 179	819± 39 [†]
0.3%	5,015± 24	2,072± 331*	1,954± 40 [†]
1.0%	5,118± 57	3,280± 116 [†]	3,558± 56 [†]
3.0%	3,916± 178 [†]	3,898± 156 [†]	—

Each values represents the mean± S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

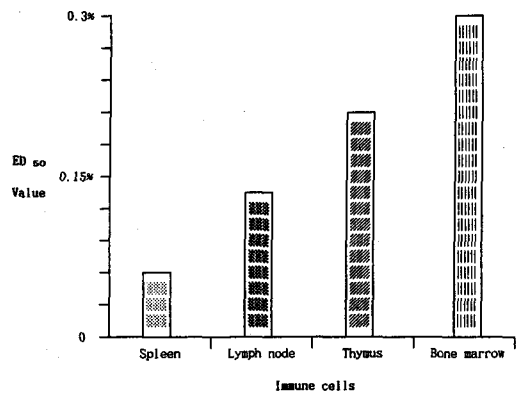


Fig. 1—ED₅₀ value of mitogenic effect of Cervi cornu extract in immune cells

72 hr에서 최고의 활성도를 나타내나, Con A보다는 낮은 활성도를 나타내며, 임파선 세포에서는 48 hr, 1.0%에서 최고의 활성도를 나타내며, Con A와 유사한 활성도를 나타낸다. 그리고 골수세포에서는 용량의 존성은 있으나 감수성이 약한 것을 알 수 있다.

또한 각 면역세포에 대한 mitogenic 활성도를 ED₅₀값으로 분석하여 본 결과 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 비장 세포의 ED₅₀ 값이 0.06%로 가장 낮고, 골수 세포에 대한 ED₅₀ 값이 0.3%로 가장 높다. 이것으로 미루어 녹각 추출물은 비장 세포에 대한 작용이 가장 크며, 임파선(0.14%), 흉선(0.19%), 골수 세포순으로 감수성이 감소됨을 알 수 있었다.

따라서 세포의 population으로부터 유추해 보면 비장 세포에서는 다른 세포에 비해서 B cells이 많이 분포되어 있으므로 B cells에 대한 작용이 강할 것으로

사료되며, 또한 흉선과 임파선 세포에 대한 활성 작용으로 보아 T cells에도 작용하는 거승로 사료된다.

성숙 단계에 있어서도 녹각 추출물은 비장 세포와 임파선 세포에 대한 활성으로 보아 말초 세포 전 상태에서 강한 감수성이 있는 것으로 사료된다.

녹각 추출물이 Con A 및 LPS와의 병용투여에 미치는 영향

녹각 추출물이 T cells의 특이적인 mitogen인 Con A와 B cells의 특이적인 mitogen인 LPS의 작용에 어떤 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 병용 배양한 결과는 Table VII과 같다.

Table VII에서 보는 바와 같이 녹각 추출물이 Con A의 작용을 용량 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었으며, LPS에 대한 작용은 0.3%, 1%, 3%에서 유의성있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

녹각 추출물의 면양 적혈구 용혈반 형성(PEC)에 미치는 영향

녹각 추출물의 mitogenic effect 시험에서 나타난 것과 같이 녹각 추출물이 B cells의 활성화에 관여되는 것으로 추정되어 B cells의 활성도를 특이적으로 알아보기 위하여 SRBC로 감작된 비장 세포의 단세포 부유액에 녹각 추출물을 0.01%, 0.1%, 1% 가하고 4 8 hr 배양 후 세포수를 세고, B cells의 특이적인 반응인 면양 적혈구 용혈성 형성 실험을 하여 본 결과 Table VIII과 같다.

Table VIII에서 보는 바와 같이 녹각 추출물이 세포의 증식에 용량 의존적으로 작용하고 있으며, 0.1%, 1.0%에서 유의성 있게 적혈구 용혈반 형성을 증가시켰다. 이와 같은 것으로 보아 녹각 추출물이 B cells

의 증식에 관여 하여 항체 생성 능력을 증가 시키는 것으로 추정할 수 있었다.

녹각 추출물이 IL-2 및 IL-4 생성에 미치는 영향

녹각 추출물이 면역세포중 T cells의 함량이 많은 임파선과 흉선에서 강한 mitogenic 활성을 나타내는 것으로 보아 T cells의 증식에도 작용하는 것으로 추정되어, 본 연구자는 T cells 중에서 B cells의 항체 생산을 유도하며, cytotoxic T cells 증식을 도와주는 helper T cells의 증가에 대해서 녹각 추출물이 어떤 작용을 하는지 알아보기 위하여 IL-2 및 IL-4 assay 시험을 하였다.

IL2-의 생성에는 T 임파구 가운데 특이하게 helper T cells이 관여되는 것으로 알려져 있으며, CTLL-2 세포는 IL-2 및 IL-4에 의해서 log phase로 성장하는 세포로 알려져 있다.

따라서 본 연구자는 비장 세포의 단세포 부유액에 녹각 추출물을 0.01%, 0.1%, 1%로 가하고 48시간 배

Table VII—Mitogenic effect of Cervi cornu extract on the Con A and LPS stimulated spleen cells

Group	[³ H]-thymidine incorporation (cpm)		
	-	+ Con A	+ LPS
		(2.5 µg/ml)	(75 µg/ml)
control	2,286± 25	45,453± 1,671	35,632± 666
0.01%	7,230± 649 [†]	43,456± 1,352	35,080± 301
0.03%	12,202± 634 [†]	45,606± 637	34,566± 1,239
0.1%	24,943± 1,155	42,225± 1,220	34,636± 772
0.3%	33,046± 503 [†]	37,765± 1,201	40,542± 771 [†]
1%	38,264± 782 [†]	37,214± 215 [†]	43,116± 188 [†]
3%	39,836± 179 [†]	35,257± 950 [†]	40,918± 722 [†]

Each values represents the mean±S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

Table VIII—Effect of Cervi cornu extract on the haemolytic plaque forming cell and number Con A and LPS stimulated spleen cells

Group	Number of cells/ml	Number of PFC	PFC/10 ⁶ spleen cell
control	4.77×10 ⁶	25.50± 3.52	169.85± 24.42
0.01%	5.01×10 ⁶	21.00± 1.46	140.00± 9.74
0.1%	5.52×10 ⁶	44.17± 2.85 [†]	294.35± 18.86 [†]
1%	5.82×10 ⁶	56.33± 4.05 [†]	375.43± 27.03 [†]

Each values represents the mean±S. E from 3 times (*p<0.05, [†]p<0.01)

Table IX—Effect of Cervi cornu extract on the helper T cells on spleen cells

Diluting factor	Unit; O. D. X 1,000				
	Control	0.01%	0.1%	1%	IL-2*
2 ¹	31.3	0	0	0	193.3
2 ²	15.7	0	0	0	213.7
2 ³	0	0	0	0	182.7
2 ⁴	0	0	0	0	171.7
2 ⁵	0	0	0	0	125.3
2 ⁶	0	0	0	0	98
2 ⁷	0	0	0	0	64.3
2 ⁸	0	0	0	0	53.7

*IL-2; 150 U/ml, [†]Each values represents the mean from 3 times

양 후 상등액을 가지고 IL-2 or IL-4 assay를 시행하였다.(Table IX)

Table IX에서 보는 바와 같이 녹각 추출물이 IL-2의 생성을 유도하지 못하는 것으로 보아 helper T cells의 증식에는 전혀 작용하지 않는다는 것을 추정할 수 있었다.

결 론

Balb/c mouse의 면역세포에 대한 녹각 추출액의 면역학적 특성을 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 막 여과법을 이용하여 분자량 5,000 이상과 이하의 물질을 각각 분리 농축한 액을 가지고 lymphocyte 증식반응을 시험한 결과, 분자량 5,000 이상의 물질을 농축한 녹각 추출액에서 원액보다 더 강한 면역세포에 대한 mitogenic 활성을 나타내었다.

2. 적혈구의 응집반응 시험 결과, 녹각 추출액은 응집 반응을 전혀 일으키지 않았으며, Con A의 응집반응을 다소 억제하였다.

3. 면역세포에 대한 mitogenic 활성 시험에서, 녹각 추출액은 비장 세포 및 임파선 세포에 대한 활성도는 크나, 흉선 세포와 골수 세포에 대한 활성도는 낮다. 또한 각각의 면역 세포에 대한 녹각 추출액의 mitogenic 효과를 ED₅₀값으로 비교해 본 결과, 비장 세포의 ED₅₀값이 0.06%로 가장 낮았고, 임파선(0.14%), 흉선(0.19%), 골수(0.30%) 세포 순으로 높아졌다.

4. 녹각 추출액은 0.3%, 1%와 3% 농도에서 LPS 유도 mitogenic 효과를 유의성 있게 증가시켰으나, Con A 유도 mitogenic 효과는 유의성 있게 억제시켰다.

5. PFC 시험 결과, 녹각 추출액이 0.1%, 1%에서 PFC의 수를 유의성 있게 증가시키는 것으로 보아 B cells의 항체 생산능을 증가시키나, IL-2 or IL-4 assay 시험 결과, IL-2를 전혀 생산하지 못한 것으로 보아 helper T cells에는 작용하지 않는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) 安部 茂; 最近の 癌の 免疫 療法劑; 藥學 ツヤナル, 25, 1927-1931 (1989).
- 2) 野本 龜久雄; 免疫 療法劑; 藥學 ツヤナル, 21,

- 231-236 (1985).
- 3) Sharn, N. and Lis, H., Cell agglutinating and sugar-specific proteins; *Science*, 177, 949-959 (1972).
- 4) Barondes, S. H., Soluble lectines; A new class of extracellular proteins, *Science*, 223, 1259-1264 (1984).
- 5) 정시련, 김장환, 소명숙, 김무경, 현대금, 전경희; 미꾸라지 렉틴 성분의 생화학적 특성, 약학회지, 35, 44-455 (1991).
- 6) Ken'icih, I. and Ikw, S., Induction of nonspecific cell-mediated cytotoxic reactivity from non-immune spleen cells treated with Aloctin A., *Int. J. Immunopharmac.* 8, 781-787 (1986).
- 7) AHN, Y. H. and Kim. J. H., Effects of squalene on the immune response in mice(I), Humoral immune responses of squalene, *Arch. Pharm. Res.* 14, 370-378 (1991).
- 8) Palacios, R., Cimcanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptor for activation, *J. Immunol.* 128, 337-342 (1982).
- 9) Hiernax, J. R., Baker, P. J., Delishi, C. and Budbach, J. A., Modulation of the immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 128, 1054-1058 (1982).
- 10) 지형준, 이상인, 대한 약전의 한약(생약) 규격집 주해서; 한국 메디칼 인덱스 사, pp. 99, 103 (1988).
- 11) 申 估求; 申氏 本草學, 수문사, pp. 71-77 (1973).
- 12) 小澤 光, 新藥開發のために 藥效 screenign法, Vol I, 清至書院, pp. 175-190 (1984).
- 13) John, E. C., Ada, M. K., David, H. M., Etham, M. S. and Warren, S., Current protocols in immunology, National institutes of health press. Vol I., p. 3.1.3 (1991).
- 14) 한종현, 오찬호, 은재순, 감초가 면역반응에 미치는 영향(I), 약학회지, 35, 154-164 (1991).
- 15) 한종현, 오찬호, 은재순, 감초가 면역반응에 미치는 영향(II), 약학회지, 35, 174-181 (1991).
- 16) 山川 民夫, 免疫 生化學 研究法, 日本 生化學會編, pp. 32-37 (1986).
- 17) Cunningham, A. J. and Szenberg, A., Haemolytic plaque assay using chamber method., *Immunology*, 14, 599-603 (1986).
- 18) Gills, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A., T cell growth factor, parameters of production and quantitative microassay for interleukin 2 activity,

- J. Immunol.* **120**, 2027-2032 (1978).
- 19) McMurray, D. N., Mintzer, C. L., Bartow, R. A. and Pair, R. L., Dietary protein deficiency and Mycobacterium bovis BCG effect interleukin02 activity in experimental pulmonary tuberculosis, *Infection and Immunity*, **57**, 2606-2611 (1989).
- 20) Diem, B. J. and Lentner, C., Documenta geigy sciebtific tables, Geigy, New York, p. 158 (1975).
- 21) Tallarida, R. J. and Murray, R. B., Manual of pharmacologic calculations with computer programs, second edition, Springer-Verlag, N. Y, pp. 31-35 (1986).