

손바닥선인장 추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향*

신태균¹, 이선주², 김세재³

제주대학교 수의학과¹, 화학과², 생물학과³, 생명과학연구소^{1,3}

Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models

Tae-Kyun Shin¹, Sun-Joo Lee², Sae-Je Kim³

Department of Veterinary Medicine¹, Chemistry² and Biology³,
Institute of Life Science^{1,3}, Cheju National University

Abstract. The *Opuntia ficus-indica* extract(OFE) has been claimed to have several therapeutic properties including anti-inflammation and anti-rheumatoid arthritis in oriental medicine, but little is known about their effect on macrophages. This study demonstrated that OFE could stimulate TNF-alpha production in cultured macrophages, which is one of important mediators in autoimmune diseases including experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE). *In vivo* study showed that oral administration of OFE exacerbate the onset of clinical paralysis.

This finding suggests that OFE stimulates cytokine production and exacerbates autoimmune inflammatory diseases including EAE.

Key words: autoimmune disease, macrophage, *Opuntia ficus*, TNF-alpha

서 론

선인장은 소화기능의 향상, 창상치유 효과 및 류마치스관절염에 효능이 알려지는 등 민간 요법에 일부 활용되어 오면서 관상용뿐만 아니라 기능성 식물로 재조명되고 있다.¹ 최근 Paik²은 선인장열매 분말을 생쥐에 투여한 결과 항산화능을 확인하였을 뿐만 아니라 선인장에 의한 항궤양 작용을 증명한 바 있다.³ 제주에서 특용작물로 재배되는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)은 다양한 형태의 기호 식품으로 개발되어 시판되고 있으며 성분분석 결과 식이섬유, 비타민 및 플라보노이드 성분등이 다량 함유되어 있다고 한다.⁴ 선인장의 항염증 작용은 이들이 가진 주요 구성 성분에 의한 것으로 추정되나

이에 대한 연구는 거의 없다.^{4,7}

선인장을 민간요법에 활용한 류마치스관절염은 정확한 원인이 규명되어 있지는 않으나 자기면역성 질환의 일종으로 추정되고 있다.⁸ 병변이 나타나는 관절에는 자기면역성 림프구와 큰포식세포(macrophage)가 출현하며 동시에 이들 세포로부터 분비된 종양괴사인자를 비롯한 염증유도성 cytokine이 증가된다.^{9,10} 특히 종양괴사인자는 정상적인 생체에서는 종양세포의 파괴 등 이로운 작용을 하지만 염증이 시작된 이후에는 정상조직도 손상시킬 수 있는 것으로 알려지고 있다.^{9,11} 자기면역성 뇌척수염은 사람의 다발성 경화증의 동물모델로 활용될 뿐만 아니라 류마치스 등과 같은 자기면역성 질병에 대한 동물모델의 원형(prototype)으로 알려져 있

다. 특히 류마치스관절염과 자기면역성 뇌척수염 모델에서는 종양괴사인자가 염증의 시작에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{10,11}

이 연구에서는 제주도에서 재배되는 손바닥선인장(제주도 기념물 35호)의 유효성분 탐색을 위한 기초연구로써 먼저 (1) 선인장추출물이 macrophage에서 종양괴사인자를 유도하는지를 확인한 후 (2) 자기면역성 뇌염 동물에 투여한 후 그 반응을 다각적으로 분석하여 선인장추출물의 생체활성능을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

선인장열매 추출

손바닥선인장 열매를 으갠 다음 70% 메탄올에 2일간 침적하고 그 후 상층액을 회수하여 회전식 진공증발기로 추출하였다.⁴ 그 후 선인장 추출물의 건조용량을 기준으로 100mg/ml 되게 생리식염수로 희석하여 사용하였다.

세포배양

랫트 복강내 macrophage를 유도하기 위하여 mineral oil을 복강내 1ml 주사한 후 3일째 복강내 세포를 회수하였다. 그리고 각 배양병에 5×10^6 cells씩 분주 후 선인장 추출물을 용량별로 첨가하였으며 배양후 6시간, 18시간째 세포를 회수하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 재료로 이용하였다.

RNA의 분리, cDNA합성 및 PCR

RNA분리를 위하여 total RNA isolation system (Promega)을 사용하였으며 RNA의 양은 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. cDNA 합성은 advantage RT-for PCR kit(Clontech)을 사용하여 합성하였다. cDNA합성이 끝난 후 TNF-alpha primer (295 bp; SENSE: 5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C -3'; ANTISENSE: 5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3')를 이용하여 통상적인 방법에 따라 PCR을 수행하였으며 반응산물을 전기 영동한 후 UV lamp하에서 사진촬영하였다.¹¹

자기면역성 뇌염 유도:

랫트척수 조직을 분리하여 조직유제를 만든 후 면역항원으로 사용하였다. 면역방법으로는 rat spinal cord homogenates(1mg/ml)와 동량의 complete Freund's adjuvant(supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* 1mg/ml)를 혼합하여 immersion을 만든후 7-8주령의 Lewis rat(Charles River Japan, Kanakawa, Japan)의 뒷발바닥에 피하주사하였으며, 면역 후 매일 임상증상을 관찰하였다.^{12,13} 임상적으로 나타나는 마비증상은 면역 10일 이후부터 체중의 증가둔화 또는 감소와 함께 꼬리끝의 유약성 마비를 grade(G) 0.5, 꼬리의 마비를 G1, 뒷다리의 불완전 마비를 G2, 뒷다리의 완전 마비를 G3로 표기하였다.¹³

선인장추출물의 투여실험:

선인장 추출물이 자기면역성 질병의 경과에 미치는 영향을 위하여 면역전후 각각 1주간 선인장추출물(100mg/kg/day)을 경구투여하였으며 대조군으로는 희석액인 증류수를 사용하였다.

조직검사

임상소견상 마비로부터 완전히 회복한 21일째 각 실험군 별로 3마리씩 척수를 채취하였다. 척수 조직은 파라핀 포매조직절편을 H-E 염색하여 조직을 검사하였다. 병변의 정도는 면역후 21일째 조직에서 혈관주위세포침윤 부위의 수를 계산하여 실험군간에 비교하였다.

결 과

선인장 추출물이 macrophage의 TNF 생성능에 미치는 영향

Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양된 macrophage에 선인장 추출물 0.1mg/ml을 첨가후 6시간(lane 1) 및 17시간(lane 2) 배양한 예에서 모두 TNF-alpha의 특이 band (분자량 295bp)가 인정되었으며 band의 intensity로 보아 대조군(lane 5)에 비해 TNF-alpha의 발현이 현저히 자극되었음을 알 수 있었다. 그러나 과량의 선인장 추출물(10mg/ml)을 첨가한 macrophage에서는 세포독성이 나타났으며 (data not shown), TNF-alpha의 transcription도

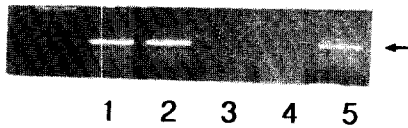


Fig. 1. RT-PCR of tumor necrosis factor-alpha on macrophages stimulated with *Opuntia ficus* extract for 6 hr (lane 1 and 3) and 17 hr (lane 2 and 4).lane 1,2: 0.1mg/ml; lane 3,4: 10mg/ml; lane 5: control. TNF-alpha specific band (295 bp)(arrow) were evident in OFE treated macropahges(lane 1 and 2), while that was weakly detected in control group (lane 5). However, the high dose of OFE (10mg/ml) showed no signal of TNF-alpha.

확인되지 않았다(lane 3, 4).

선인장 추출물이 자기면역성 질병에 미치는 영향

선인장추출물을 면역과 동시에 1주간 투여한 실험군에서는 마비증세가 나타난 평균 일자가 13일인 반면 대조군은 14일로 하루 빠르게 나타났다(Table 1). 더구나 마비정도는 대조군에서 꼬리끝의 미약한 마비만 1-2일간 발현된 반면(평균 grade 0.5), 선인장 추출물을 투여한 예에서는 꼬리의 마비가 분명하게 나타났다(평균 grade 1.3). 또한 마비지속기간도 선인장추출물을 투여한 경우 평균 3일인 반면 대조군은 1.6일로 두배이상 길었다(Fig. 2, Table 1). 이와 같은 소견으로 보아 선인장추출물은 면역계 세포의 초기활성화를 통해 자기면역성 뇌염을

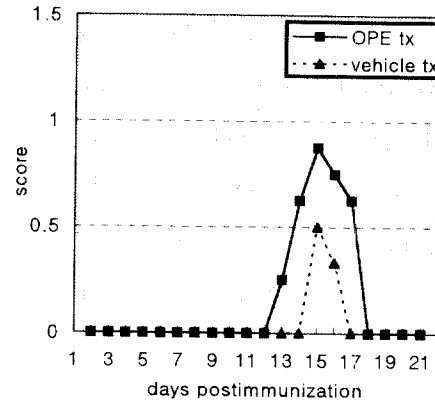


Fig. 2. Clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis treated with *Opuntia ficus* extract. Oral administration of *Opuntia ficus* extract exacerbates clinical score of paralysis in EAE rats, while control animals treated with vehicle showed mild paralysis. The figure shows mean values of 4(OFE treatment) and 3 animals(vehicle treated control).

촉진시키는 것으로 나타났다. 그러나 뇌조직항원(MBP)을 면역하기전 선인장추출물을 1주간 처리한 경우는 선인장추출물투여군과 대조군사이에서 마비증상의 발현에는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다(data not shown).

고 찰

선인장은 전통적으로 창상의 치유, 항염증제로 민간에서 이용되어 왔으나 이에 대한 약리학적 효

Table 1. Effect of the oral administration of *Opuntia ficus* extract(OFE) in Lewis rats with EAE.

Parameters	Control	OFE-treated* (Day 0 to day 7 PI)
Number of animals examined	n = 3	n = 4
Incidence of clinical EAE	3 / 3	4 / 4
First onset of clinical EAE	14.0 ± 0.0	13.0 ± 0.4
Duration of paralysis	1.6 ± 0.3	3.0 ± 0.7
Maximums clinical severity (scale from 0.5 to 3)	0.5 ± 0.0	1.3 ± 0.3

* OFE(100mg/kg/day) was orally administered from day 0 to day 7 postimmuniazation of rat spinal cord homogenates supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* H37RA(1mg/ml). The value is expressed by mean ± standard error.

과는 규명된 것이 많지 않다. 이 연구에서는 제주 산 손바닥선인장 추출물이 면역계세포에 미치는 영향을 시험관내 및 실험동물의 질병모델에서 관찰하였다. 그 결과 손바닥선인장추출물은 배양된 macrophage에서 종양괴사인자를 유도할 수 있음을 확인하여 지금까지 구전되어 오던 선인장의 효능중 항암 및 항염증작용이 적어도 종양괴사인자에 의해 조절될 수 있다는 것을 알 수 있었다. 종양괴사인자 외의 다른 cytokine에 대하여는 이번 실험에서 조사되지 않았으나 다양한 종류의 cytokine이 생산될 수 있음을 시사하고 있다.

종양괴사인자는 암세포의 파괴에 결정적으로 작용하는 중요한 인자이며 병원체의 사멸에도 깊이 관여한다. 이와같이 생체방어에 중요한 역할을 하는 종양괴사인자는 뇌조직과 같은 신체의 특정 부위에 과량 생산될 경우 조직손상을 초래하기도 한다. 특히 자기면역성 질병의 유도에는 침윤된 세포로부터 감마인터페론, 종양괴사인자가 중요한 역할을 하며¹¹, 실제 이들 물질의 작용을 억제한 경우 자기면역성뇌염에 의한 마비증세가 호전된다고 한다¹⁴. 본 실험에서 선인장추출물을 경구투여한 후 자기면역성 질병의 경과를 확인한 결과 마비증세가 훨씬 심하게 발현되는 점으로 보아 선인장추출물에 의해 pro-inflammatory cytokine의 생산이 촉진될 수 있었을 것으로 생각된다. 그러나 선인장추출물이 종양괴사인자 이외의 다른 cytokine의 생산에도 영향을 미친 것인지 아니면 접착분자와 같은 다른 인자에 작용한지는 더 추구해 볼 과제라 생각된다. 따라서 민간에서 류마치스의 완화목적으로 선인장을 이용한 것은 적어도 종양괴사인자를 비롯한 cytokine의 작용보다 다른 기전에 의한 약리작용일 것으로 생각된다.

선인장의 주요 구성성분중 색소성분인 플라보노이드⁴는 여러 식물에서 다양한 구조로 존재하고 있다. 특히 플라보노이드는 염증의 시작에 중요한 혈구의 이동 및 침윤에 결정적 역할을 하는 세포접착분자를 억제하는 것으로 알려지고 있을 뿐만 아니라^{5,7,15}, 항산화능^{2,16}과 peroxynitrite의 제거¹⁷에도 관여한다고 한다. 이와같은 접착분자의 발현증가¹³와 peroxynitrite의 생성은 자기면역성 질병에서 관찰되는 소견으로써 정도의 차이는 있으나 본 실험모델의 척수에서도 영향을 받았을 가능성을 배제할 수 없다^{18,19}. 그러나 본 실험에서 선인장추출물을

투여한 실험결과 뇌염에 의한 마비증세를 악화시켰으므로 시험관내 자극시험에서 확인된 종양괴사인자의 발현과 관련성이 있을것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 선인장추출물은 macrophage에서 종양괴사인자를 유도할 수 있어 건강한 생체에서는 항염증작용을 가질 수 있으나 자기면역성 질병이 시작된 경우에는 염증을 촉진시킬 가능성이 높은 기호식품으로써 주의가 요망된다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 학술연구조성비(지역개발연구과제)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- 1 송주택, 정현철, et al. 한국식물대보감. pp. 684-685. 한국자원식물연구원. 제일출판사. 1989.
- 2 Paik S. Effects of *Opuntia ficus-indica* fruit on the passive avoidance and anti-oxidation in the senescence-accelerated mouse. Cheju National University, Graduate School, MS thesis, 1998.
- 3 이후장. 랫트의 스트레스성 위궤양에 대한 *Opuntia dillenii* Haw(선인장)의 항궤양작용에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 석사학위 논문, 1997.
- 4 이영철, 김홍만, et al. 선인장의 성분분석 및 가공식품의 품질개선시험. 한국식품개발연구원, 1997.
- 5 Gerritsen ME, Carley WW, et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. Am J Pathol 147:278-292. 1995.
- 6 Kunizane H, Ueda H, et al. Screening of phagocyte activators in plants; enhancement of TNF production by flavonoids. Yakugaku Zasshi 115:749-755. 1995.
- 7 Panes J, Gerritsen ME, et al. Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation *in vivo*. Microcirculation. 3:279-286. 1996.

- 8 Gay S, Gay RE, et al. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: Two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* **52**:39-47. 1993.
- 9 Cunnane G, Hummel KM, et al. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)* **46**:1-7. 1998.
- 10 Leistad L, Ostensen M, et al. Detection of cytokine mRNA in human, articular cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Scand J Rheumatol* **27**:61-67. 1998.
- 11 Tanuma N, Kojima T, et al. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **73**:197-206. 1997.
- 12 Shin T, Kim H, et al. Expression of protein kinase C in the spinal cord of rats with EAE. *Korean J Vet Pathol* **1**:26-32. 1997.
- 13 Shin T, Kojima T, et al. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **56**:171-177. 1995.
- 14 Ruddle NH, Bergman CM, et al. An antibody to lymphotoxin and tumour necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* **172**:1193-1200. 1990.
- 15 Wolle J, Hill RR, et al. Selective inhibition of tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcription factor NF-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**:1501-1508. 1996.
- 16 Hollman PC, van Trijp JM, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* **418**:152-156. 1997.
- 17 Haenen GR, Paqueay JB, et al. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Comm* **236**:591-593. 1997.
- 18 MacMicking JD, Willenborg DO, et al. Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J Exp Med* **176**:303-307. 1992.
- 19 Okuda Y, Nakatsuji Y, et al. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **62**:103-112. 1995.