

청피에 함유된 복강 마크로파지의 탐식작용 억제 성분

은재순[#] · 김대근 · 소준노* · 지옥표**

우석대학교 약학대학, *자연과학대학, **성균관대학교 약학대학

(Received October 23, 1998)

A Suppressive Component on Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophage in *Aurantii immaturi pericarpium*

Jae-Soon Eun[#], Dae-Keun Kim, June-No So* and Ok-Pyo Zee**

College of Pharmacy,

*College of Natural Science, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

**College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract—The phagocytic activity of murine peritoneal macrophage was determined by lucigenin chemiluminescence and engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles. The activity-guided fractionation upon the methylenechloride fraction of *Aurantii immaturi pericarpium* led to the isolation of a flavonoid, isosinensetin, as a suppressive component of phagocytosis. Isosinensetin suppressed the lucigenin chemiluminescence and the engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles and enhanced the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophage.

Keywords □ *Aurantii immaturi pericarpium*, Phagocytosis, Macrophage, Chemiluminescence, Isosinensetin, FITC-conjugated *E. coli*.

청피(*Aurantii immaturi pericarpium*)는 Rutaceae에 속하는 귤의 미성숙한 과피로써, 한방에서 理氣劑로 부르고 있으며,¹⁾ 약성이 준열하며 肝, 膽, 胃에 작용하여 疏肝破氣 및 散結化滯 작용이 있는 것으로 알려져 있다.²⁾

청피에 함유된 synephrine은 교감신경 흥분작용,³⁾ nobiletin은 항알러지작용,⁴⁾ auraptene, marmin, tangeretin은 암세포 증식억제작용⁵⁾ 등이 있음이 보고되었다. 본 연구자들은 macrophage의 탐식작용을 증강시키는 성분을 탐색하고자, 수중 생약에 대해 검색하던 중 청피 물추출물이 macrophage의 활성을 증가시킴을 확인하고,⁶⁾ 청피에 함유된 macrophage의 활성 성분을 분리하던 중 methylenechloride 분획에서 복강 macrophage의 phagocytic activity가 현저히 억제됨을

발견하였다.

Macrophage의 탐식능은 lucigenin chemiluminescence(CL) 양을 측정하는 방법을 이용하였는데, CL은 luminol 또는 lucigenin에 의해 증가되며, luminol-dependent CL은 myeloperoxidase-H₂O₂ system과 관련되어 있으나,⁷⁾ lucigenin-dependent CL은 myeloperoxidase와는 관련이 없고 phagocytosis를 하는 동안 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.⁸⁾

Mammalian neutrophils과 macrophages는 pseudopodia formation를 하는 동안 phagocytosing molecule의 cytoskeleton은 cytosolic G-actin monomers로부터 F-actin의 polymerization과 같은 구조적인 변화가 일어난다.⁹⁾ 한편, nitric oxide는 human neutrophils의 F-actin양을 감소시키고 phagosome에서 oxygen metabolites의 생성을 억제하여,¹⁰⁾ murine macrophages의 pseudopodia formation과 phagocyto-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0652-290-1569 (팩스) 0652-290-1567

sis를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

따라서 본 연구에서는 청피에 함유된 macrophage의 phagocytic activity 억제성분을 분리 정제하여 구조를 확인하였고, 이 성분이 macrophage의 nitric oxide 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 청피는 시중 건재상에서 구입하여 사용하였으며, 5 kg을 증류수로 실온에서 3일간 추출한 다음 여과하고 여액을 감압농축한 후, n-hexane, methylenechloride, n-BuOH 및 물로 각각 분획하여 각 분획물을 동결건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

실험동물 - 실험에 사용한 mouse는 BALB/c계 18 ± 2 g 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 5%, light/dark 12시간의 사육조건에서 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기구 - DME(without phenol red), RPMI1640, zymosan, lucigenin는 Sigma Co., FBS, trypsin, thioglycollate는 Difco Co., FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles는 Molecular Probes Co.를 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 96 well plate(white, Berthold), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), luminometer(Berthold 96LP), inverted fluoromicroscope(Zeiss), melting point(uncorrected, Buchi), mass spectrophotometer(VG70-VSEQ UK), IR spectrophotometer(Nicolet model 205 FT-IR), UV-visible spectrophotometer(Shimadzu) 및 NMR spectrometer(Bruker AMX 400)를 사용하여 측정하였다.

복강 macrophage의 분리 - 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고 3일 후 마우스를 경추탈골하여 도살한 다음 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하여 RPMI1640 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양한 다음, 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다.

복강 macrophage의 lucigenin chemiluminescence

측정 - 분리한 복강 macrophage를 DME(without phenol red) 배지에 부유시켜 측정용 96 well microplate(white)의 각 well 당 1×10^6 cells씩 분주하고, 희석된 각 sample 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l를 넣고 37°C에서 15 분간 전처리한 후 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 5 분 간격으로 60 분 동안 lucigenin chemiluminescence(CL)를 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다.^{12,13)}

복강 macrophage의 phagocytosis에 의한 engulfment

측정 - FITC-conjugated *E. coli* particles을 HBSS에 현탁시켜 sonification 한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250 μ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 5×10^5 cells/ml 되도록 조정한 후, 100 μ l를 96 well에 분주하고 1 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, sample 10 μ g/ml 및 *E. coli* 현탁액 25 μ l를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.¹⁴⁾

복강 macrophage의 nitric oxide의 측정

- 분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 1×10^6 cells을 분주한 후, 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군으로 분류하여 37°C CO₂-incubator에서 24 시간 배양한 후 생성된 nitric oxide(NO)양을 Griess 시약으로 측정하였다.¹⁵⁾ 즉 배지 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

활성물질 분리 - 활성을 나타낸 methylenechloride엑스 3 g을 n-hexane : EtOAc(3 : 1)을 유출용매로 silica gel chromatography를 실시하여 8개의 분획으로 나누었으며, 각 분획에 대하여 macrophage의 phagocytic activity를 측정된 결과 7번 분획에서 높은 활성을 나타냈다. 7번 분획을 n-hexane : chloroform : MeOH(10 : 10 : 1)을 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하고 Sephadex LH 20 column으로 정제하여 흰색 침상결정(chloroform) com-

pound I, 17 mg을 얻었다.

Compound I - colorless needles(MeOH): mp 196~197°C: UV λ max(MeOH) 240, 275, 335: EIMS m/z (70eV, rel. int.) 372(M^+ , 70), 357 (100): 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.59(1H, dd, $J=8.3$, 2.0Hz, H-6'), 7.42(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.99 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6.62(1H, s, H-3), 6.44 (1H, s, H-6), 4.01, 3.99, 3.98, 3.96(each 3H, s, OCH_3), 3.96(6H, s, $OCH_3 \times 2$): ^{13}C -NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 177.9(C-4), 160.5(C-2), 156.5(C-7), 156.4 (C-9), 152.0(C-5), 151.8(C-4'), 149.3(C-3'), 130.7 (C-8), 124.1(C-1'), 119.6(C-6'), 111.2(C-5'), 109.0 (C-10), 108.6(C-2'), 107.2(C-3), 92.5(C-6).

결과 및 고찰

Phagocytic activity 효과 - 청피 물추출물을 n-hexane, methylenechloride, n-BuOH 및 물로 분획하여 CL을 측정된 결과 methylenechloride 분획에서 CL이 현저히 감소되었다. Methylenechloride 분획에 함유된 CL 감소 성분을 정제하고자, n-hexane : EtOAc(3 : 1)을 유출용매로 silica gel column chromatography로 분리하여 8개의 소분획을 얻은 후 CL을 측정된 결과 7번 소분획에서 감소되었다. 7번 소분획을 n-hexane : chloroform : MeOH(10 : 10 : 1)을 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하고 Sephadex LH 20 column으로 정제하여 단일 성분을 얻어, 각종 spectral data를 이용하여 구조를 확인한 결과 isosinensetin¹⁶⁾임을 확인하였다(Fig. 1). Isosinensetin을 처리시 CL은 농도의존적으로 감소되었으며, 이때 IC_{50} 은 23.6 $\mu g/ml$ 이었다(Fig. 2). 또한

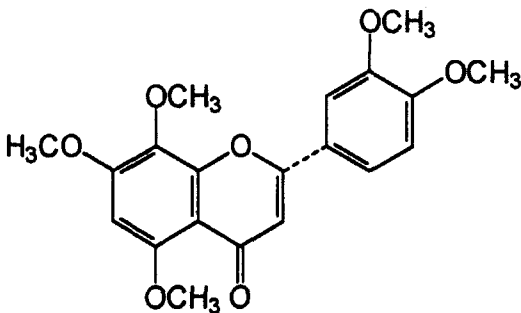


Fig. 1. Structure of compound I.

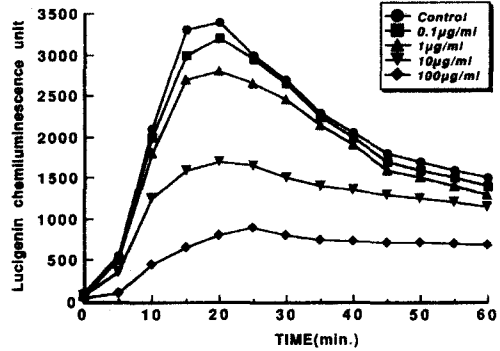


Fig. 2. Effect of isosinensetin on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages.

The macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI1640 media mixed with isosinensetin and opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 60 min. Other procedures were described as detailed materials and method section. The data represents the mean of 5 experiments.

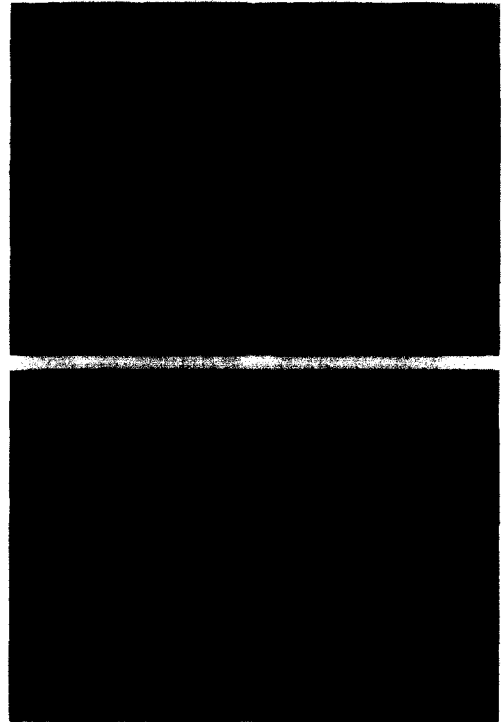


Fig. 3 - Photomicrographs of the engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages treated with isosinensetin (10 $\mu g/ml$). Photographs (taken at 400X magnification) showing the uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in control (A) and the macrophages treated with isosinensetin (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

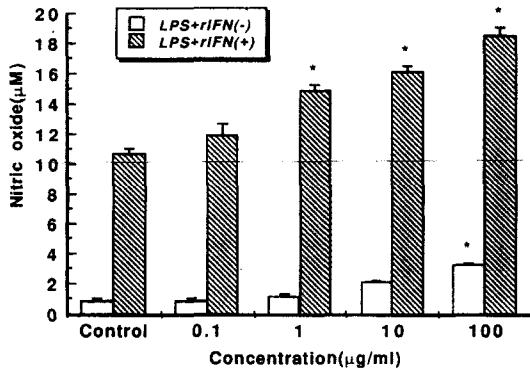


Fig. 4—Effect of isosinensetin on nitric oxide production of murine peritoneal macrophages. Thioglycollate(3%) was injected *i.p.* for 3 days and the macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI1640 media with isosinensetin, LPS and γ -IFN. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments. * Significantly different from control group ($p < 0.01$).

FITC-conjugated *E. coli* particles을 이용하여 isosinensetin 처리시 복강 macrophage의 탐식능이 현저히 감소됨을 확인하였다(Fig. 3).

Nitric oxide 생성 효과 - Isosinensetin은 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때는 100 μ g/ml에서 nitric oxide의 생성을 증가시켰고, LPS와 -IFN를 처리하였을 때는 1 μ g/ml이상에서 nitric oxide의 생성을 증가시켰다(Fig. 4). Nitric oxide는 murine macrophages의 pseudopodia formation과 phagocytosis를 억제한다는 Jun 등¹¹⁾의 보고와 비교하였을 때, 본 실험의 결과만으로 isosinensetin에 의한 phagocytosis의 억제가 nitric oxide의 생성이 촉진된 결과라고 단정할 수는 없지만 nitric oxide가 일부 관여하고 있을 가능성이 있다고 추정된다.

결 론

청피에 함유된 isosinensetin은 murine peritoneal macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하였으며 phagocytic activity를 억제하였다.

감사의 말씀

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 韓國生藥學教授協議會 : 本草學. p. 428, 서울 (1995).
- 2) 辛民教 : 原色臨床本草學. 南山堂. p. 380, 서울 (1986).
- 3) Kinoshita, T., Sameshita, M. and Sankawa, U. : Isolation of a sampathomimetic substance from chinese medicinal drugs originated from Citrus species. *Shoyakugaku Zasshi*, **33**, 146 (1979).
- 4) Chun, Y. T. and Sankawa, U. : Screening of anti-allergic effect in traditional medicinal drugs and active constituents of Aurantii Fructus Immaturus. *Shoyakugaku Zasshi*, **43**(4), 314 (1989).
- 5) Satoh, Y., Tashiro, S., Satoh, M., Fujimoto, Y., Xu, J-Y and Ikekawa, T. : Studies on the bioactive constituents of Aurantii Fructus Immaturus. *Yakugaku Zasshi*, **116**(3), 244 (1996).
- 6) Yum, J. Y. and Eun, J. S. : Effect of Aurantii nobilis pericarpium and Aurantii immaturi pericarpium on Immunocytes in mice. *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**(3), 173 (1998).
- 7) Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, **45**, 1 (1984).
- 8) Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr., R. B. : Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leukocyte Biol.*, **41**, 450 (1987).
- 9) Sheterline, P. and Rickard, J. E. : The cortical actin filament network of neutrophil leukocytes during phagocytosis and chemotaxis. *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 141-165 (1989).
- 10) Forslund, T. and Sundqvist, T. : Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. and Biophysical Research Communications*, **233**, 492 (1997).
- 11) Jun, C. D., Park, S. K., Kim, J. M., Kim, J. D. and Chung, H. T. : Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Korean. J. Immunol.*, **18**, 635

- (1996).
- 12) Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, **112**, 163 (1988).
 - 13) Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, **174**, 259 (1994).
 - 14) Chok, P. W., Choon, S. P. and Benjamin, H. S. :
A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immuno. Methods*, **162**, 1 (1993).
 - 15) Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. : Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, **59**(9), 3280 (1991).
 - 16) Machida, K. and Osawa, K. : On the Flavonoid Constituents from the Peels of Citrus hassaku Hort. ex Tanaka. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1092 (1989).