

## 시험관내에서 홍화의 물 추출물이 T 및 B 림프구의 활성화에 미치는 영향

최윤화 · 도정수 · 남상윤\*  
전주대학교 과학기술학부 생명과학전공

### Effect of Water Extract of *Carthamus tinctorious* L. on *In Vitro* Activity of T and B Lymphocytes

Youn-Hwa Choi, Jeong-Su Do, and Sang-Yun Nam\*

Department of Biological Science, School of Science and Technology, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

**Abstract** – Based on the traditional application of *Carthamus tinctorious* L. (CF) as a component of Korean medicinal decoctions, in the present study, we investigated *in vitro* an immunomodulatory activity of water extract of CF (WECF). Water extract of CF significantly increased the *in vitro* proliferative responses of spleen cells (SPC). However, addition of WECF during anti-CD3 activation resulted in a significant decrease in SPC proliferation. Flow cytometric analysis showed that WECF addition changed T and B cell frequencies in anti-CD3-activated spleen cell populations. Using purified cells, it was revealed that WECF is mitogenic to B cells but rather inhibitory to T cell proliferation. Upon anti-CD3 stimulation, high concentration (1 mg/ml) of WECF significantly inhibited T cell proliferation until day 2 of stimulation. At day 3, anti-CD3-activated cells exposed to WECF recovered their proliferation to the level comparable to control. Although B cell proliferation was also inhibited in proliferation at day 1, it recovered sooner and then was rather augmented by WECF at day 3. These data indicate that WECF down-regulates lymphocyte proliferation at early phase of activation but T cells are more vulnerable than B cells to WECF. However, CD4+ and CD8+ T cells did not differ in WECF-mediated immunotoxicity. Data of propidium iodide (PI) staining showed that WECF accelerates activated T cell, but not B cell, apoptosis and WECF concurrently inhibited cytokine production of activated T cells. Taken together, WECF exhibits B cell mitogenic activity and differential toxicity more pronounced to T cells, suggesting a possible *in vivo* application of WECF for specific control of T cells without alteration of B cell activity.

**Key words** – *Carthamus tinctorious* L. (CF), immunomodulation, T cells, B cells, apoptosis, mitogen

홍화는 1년생 초본식물인 잇꽃(*Carthamus tinctorious* L.; CF)의 꽃을 건조한 것으로 한의학에서는 어혈 치료제 및 여성들의 통경약 등으로 사용되어 왔으며,<sup>1-3)</sup> 중국에서도 자궁의 울혈이나 혈전증 및 고지혈증 등의 치료에 사용되어 왔다.<sup>4)</sup>

홍화의 약효에 대한 연구는 주로 홍화의 종자 성분에 집중되어 그 다양한 효능이 보고되고 있다. 즉, 종자 성분은 혈중의 콜레스테롤을 저하시키며,<sup>5-7)</sup> 고혈압 및 혈전증의 치료 효과를 보일 뿐만 아니라,<sup>8,9)</sup> 종양의 발생 및 증식 억제 작용,<sup>10,11)</sup> 골의 보호 및 재생,<sup>12,13)</sup> 항산화 작용<sup>14)</sup> 등의 효능도 나타낸다. 면역반응에 대한 효능에 있어서는 지연형 과민반응과 이식편대 숙주(graft-versus-host; GVH)반응을 억제

하며,<sup>15)</sup> 1형 조력T세포 반응을 다소 억제함<sup>16)</sup> 보고된 바 있다. 그러나 Yaqoob 등<sup>17)</sup>은 T 및 B 세포의 숫적 변화나 CD4+/CD8+ T세포 비율에는 영향이 없다고 보고하고 있다.

홍화 꽃에 대한 연구는 상대적으로 적으나 최근의 연구 결과에 의하면 홍화 추출물도 항 혈전,<sup>2,4)</sup> 등의 작용과 함께 홍화 종자와 같은 항산화 작용<sup>18,19)</sup> 및 신경 보호 작용<sup>20)</sup> 등 다양한 효능을 나타낸다. 아울러, 홍화에 존재하는 활성 성분으로는 적색물질인 carthamin 관련 화합물,<sup>21)</sup> 황색소인 safflower yellow 관련 화합물<sup>20,22,23)</sup> 외에도 페놀계 화합물,<sup>11)</sup> 다당류,<sup>24)</sup> 플라보노이드,<sup>19)</sup> 스테로이드,<sup>25)</sup> rutin과 quercetin<sup>4)</sup> 등이 분리되고 있다.

홍화 꽃 추출물의 면역학적 활성화에 관한 보고는 많지 않으나 항 염증,<sup>26,27)</sup> 종양 발생의 억제<sup>28)</sup> 등의 작용이 보고된 바 있어 어떤 경로를 통해서든 면역 기능을 조절할 수 있을 것으로 추측되며, 최근에는 거식세포 활성화 작용이 보고됨

\*교신저자(E-mail) : sangyun@jj.ac.kr  
(FAX) : 063-220-2054

으로써 홍화 추출물의 작용 대상이 되는 면역세포종의 하나가 거식세포임이 밝혀진 바 있다.<sup>24)</sup> 본 연구에서는 다양한 한의학 처방에 사용되는<sup>2)</sup> 홍화의 물 추출물에 대하여 면역조절 기능과 장차 그 기전을 탐색하고자 하는 목적으로, 시험관내에서 면역세포, 특히 림프구들의 활성화에 미치는 영향을 실험하였으며, 그 결과 홍화 물 추출물의 T 및 B 림프구에 대한 차별적 면역조절작용을 확인하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**실험동물** - 본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 5-6주된 C57BL/6 마우스를 샘타코(오산, 경기)에서 구입하였으며, nude 마우스는 화학연구소(유성, 대전)에서 분양받아 사용하였다. 항온 항습 장치(대중기기, 서울)내에서 사육하면서 7-8주된 마우스를 실험에 사용하였다.

**시약 및 기기** - 본 실험에 사용되어진 기본 세포배양액으로는 IMDM(Hyclone, New Logan, UT., USA)을 사용하였고 여기에 항생제(100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml Fungizone; Life Technologies, Grand Island, NY., USA),  $5 \times 10^{-5}$  M의 2-mercaptoethanol (2ME), 10%의 우태혈청(fetal bovine serum; Morgate, Melbourne, Australia)을 넣은 완전 배양액을 사용하였다. B 세포 자극을 위하여 10 µg/ml의 *E. coli*(O111:B4)에서 추출한 당지질(lipopolysaccharide; LPS L-2630, Sigma Chemicals, St. Louis, MO. USA)을 사용하였다. 항원제시세포(antigen-presenting cell; APC)의 전처리에는 mitomycin C(Sigma Chemicals)를, 세포의 증식능 측정에는 [<sup>3</sup>H]methyl-thymidine (New England Nuclear, Boston, MA. USA)을 사용하였다.

T 및 B 세포 분리를 위해 사용되는 자력이용분리장치(magnetic cell separation system; MACS)용 자성구슬(magnetic bead)은 Miltenyi Biotech(Auburn, CA. USA)사로부터 구입하였다. ELISA용 항체 및 표준품 키트는 Biosource International Inc., (Camarillo, CA., USA) 또는 R & D System (Minneapolis, MN. USA)로부터 구입하였으며 기질 용액인 3, 3', 5, 5-tetramethylbenzidine (TMB) 및 pristane은 Sigma Chemical사로부터 구입하여 사용하였다. 세포의 아포토시스는 Apoptosis kit (BD Pharmingen, San Diego, CA. USA)를 사용하여 측정하였다. 세포 표면항원의 검사를 위해서는 PE (phycoerythrin)-anti-Thy1.2, FITC (fluorescein isothiocyanate)-anti-CD4, PE-CD8, FITC-CD19 (이상 BD Pharmingen) 등의 항체를 사용하였다.

마우스 유지용 항온 항습 장치는 대중기기(서울)로부터 구입하였다. 약제의 열탕추출은 대용약탕기(서울)를 사용하였고 약제 추출물의 동결건조를 위해서는 Cleanvac 8 (Biotron, 부천, 경기)을 사용하였다. 12 well cell harvester

는 Skatron Instruments사 (Sterling, VA. USA)에서, liquid scintillation counter 및 ELISA시 흡광도 측정시 사용한 plate reader는 Packard Instrument사 (Meriden, CT. USA)로부터 구입하였다. 유식세포의 분석을 위해서는 유식세포 분석기 (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CD)와 Lysis-II 프로그램 (Becton Dickinson Co.) 및 Winmdi software (Joe Trotter, The Scripps Research Institute)를 사용하였다.

**약제** - 증류수 2 L에 분쇄 시료 500 g을 넣고 약탕기를 사용하여 2시간 동안 가열하여 열탕 추출하였다. CF 물추출액(water extract of CF; WECF)을 동결건조기를 사용하여 건조시킨 결과 98.3 g을 얻었으며, 사용시까지 4°C에 보관하였다. 약제는 사용 직전에 적정 농도로 용해시킨 후 고압멸균하여 실험에 사용하였다.

**항체** - 항 CD3항체는 pristane을 nude mice에 주입한 다음, 2주 후에  $5 \times 10^5$ 개의 145-2C11 하이브리도마 세포를 주입하고, 1-2주일 후에 복수를 채취하여 얻었다.

**비장세포의 준비** - 마우스로부터 비장을 적출한 다음 주사바늘을 사용하여 단일 세포 부유액으로 유리시키고, 멸균 증류수에 9초 동안 노출시키는 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 파괴시킨 후 인산염 완충액(PBS)으로 세척하였다. Trypan blue 색소배제법을 이용하여 생존세포의 수를 측정 후 완전배양액에 부유시켰다.

**T 및 B 세포의 분리** - T 세포의 분리하기 위해서는 마우스의 림프절 세포를 사용하였다. 말초 림프절 세포를 주사침을 사용하여 유리시키고 9초동안 멸균 증류수에 노출시키는 저장액 충격 방법으로 적혈구를 파괴시킨 후 인산염 완충액(PBS)으로 세척한 후 trypan blue 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다. 얻어진 림프절 세포로부터 T 세포를 분리하기 위하여 플라스틱 배양접시를 이용하여 37°C에서 1시간 배양한 후 부착성 세포 즉, 단구-거식세포 및 B 세포를 제거한 후 항 B220 항체를 부착시킨 미세한 자성구슬을 사용하여 남아있는 B 세포를 제거하고 순수한 T 세포를 얻었다.

B 세포를 분리하기 위해서는 비장세포를 사용하였다. 비장세포 부유액을 플라스틱 배양접시에 넣어 37°C에서 1시간 배양한 후 37°C로 유지한 배양액을 가하여 조심스럽게 흔들어 비부착성 세포를 제거하였다. 다시 배양액을 가하여 약하게 부착된 세포를 얻었으며 이로부터 혼재된 T세포는 항 Thy1.2 항체를 부착시킨 자성구슬을 사용하여 제거하였다. 유식세포 분석 결과에 의하면 분리한 T 및 B 세포의 순도는 각각 95 및 98% 이상이였다.

항원제시 세포(APC)로 사용할 B 세포는 비장세포를 플라스틱 배양접시에 넣고 37°C에서 1시간 배양한 후 얻은 약하게 부착된 세포를 수거하여 사용하되, mitomycin C (50 µg/ml)를 가하여 37°C에서 20분간 처리한 후 3회 원심세척 후 사용하였다.

**세포의 자극 배양** - 비장세포 또는 림프구를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포농도로 부유시킨 후 다양한 농도의 CF 추출물을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일 동안 배양하였다.

T 및 B 세포의 활성화를 위해서는 항 CD3 항체(145-2C11를 주입하여 얻은 복수액의 1/1000 희석액) 또는 LPS를 가하여 활성화시켰다.

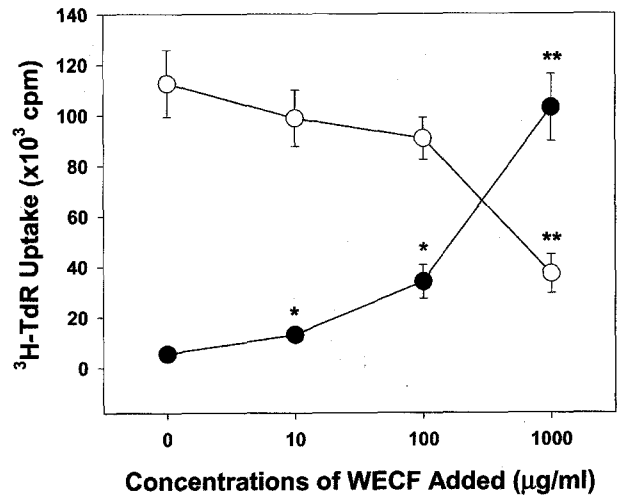
**배양된 세포의 증식능 측정(tritiated thymidine 흡수법)** - 세포의 증식능을 측정하기 위하여 항 CD3 항체 또는 LPS를 첨가하여 세포를 자극한 후 [<sup>3</sup>H]methyl-thymidine을 1 μCi/well씩 첨가하여 6시간 동안 배양하였으며 이때 흥화 추출물의 효능을 시험하기 위해서 WECF를 0-1000 μg/ml의 농도로 첨가하였다. 배양 후 12 well cell harvester를 이용하여 glass-filer filter paper 위에 세포를 수거하였으며, 방사활성(radioactivity)은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

**세포내 사이토카인 측정(intracellular staining)** - 2일 동안 항 CD3로 자극 배양한 세포를 수거한 후 50 ng/ml의 PMA와 1 μg/ml의 ionomycin을 가하여 37°C에서 6시간 배양되 최종 2시간 동안 monensin(2 μM)에 노출시켜 세포의 분비를 차단하였다. 배양이 끝난 세포를 원심 세척한 후 wash buffer (1% FBS, 0.1% sodium azide을 가한 PBS)를 사용하여 다시 2회 원심 세척하였다. 다시 세포를 4% paraformaldehyde에 부유시켜 4°C에서 10분간 고정시킨 후 2회 세척한 다음 permeabilization buffer(5 mg/ml의 saponin을 첨가한 wash buffer)로 2회 원심 세척하였다. 세포를 상기 buffer에 재부유시킨 후 항사이토카인 항체를 가하여 각각 4°C에서 30분간 반응시키고 permeabilization buffer(2회) 및 wash buffer(2회)로 원심 세척한 후에 유식세포 분석기를 사용하여 분석하였다.

**세포 표면 항원 염색 및 유식세포 분석(flow cytometry)** - 세포 부유액을 PBA(0.5% bovine serum albumin; BSA, 0.1% sodium azide/PBS)에 부유시킨 후  $2-5 \times 10^5$  세포를 항체를 이용하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 원심세척 후 4% paraformaldehyde로 고정시켜 유식세포 분석기를 사용하여 분석하였으며, 생존 세포만을 분석하기 위해서 forward scatter/side scatter gating을 통해 죽은 세포를 배제하고 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**흥화 물추출물이 비장세포의 증식에 미치는 영향** - 시험관 내에서 CF 물추출물이 비장세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서 비장세포 부유액에 WECF를 가한 후 3일 간 배양하여 비장세포의 증식 반응을 티미딘흡수법으로 측정하여 비교하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 WECF를 가하지 않은 대조군의 경우 방사활성은  $5.4 \times 10^3 \pm 1.1$  cpm



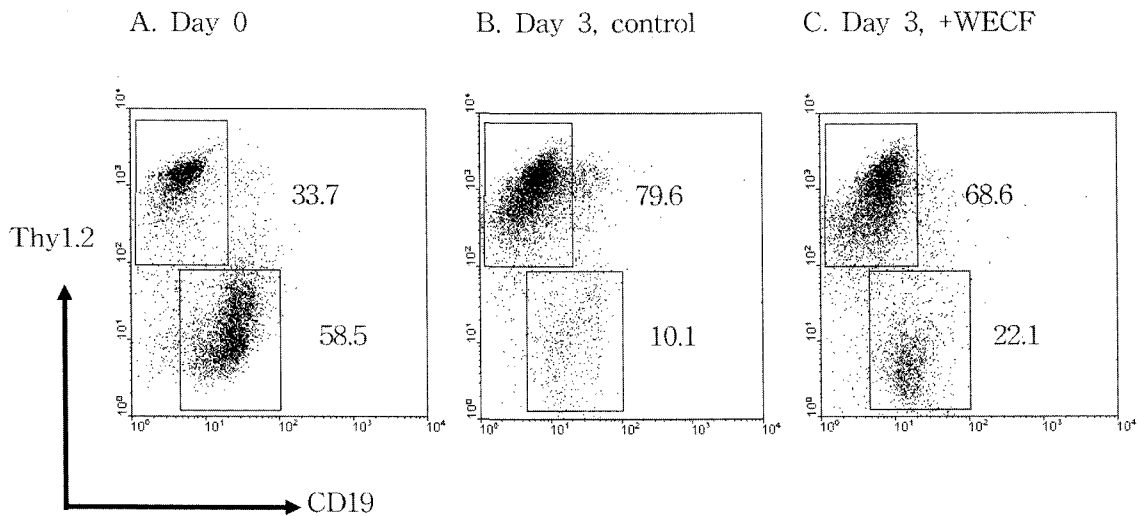
**Fig. 1.** Effect of WECF on spleen cell proliferation. Spleen cells were exposed to WECF for 3 days in the absence (●) or presence (○) of anti-CD3. Data represent the means ± SE of 3 separate experiments.

\*, *P*<0.05; \*\*, *P*<0.01 vs each control without WECF.

이였으며, 10, 100 및 1,000 μg/ml의 WECF를 가한 경우, 각각  $13.0 \times 10^3 \pm 2.2$  cpm (*p*=0.037),  $34.0 \times 10^3 \pm 6.6$  cpm (*p*=0.013) 및  $102.8 \times 10^3 \pm 13.2$  cpm (*p*=0.002)으로 현저한 증식 반응을 보여 WECF가 비장세포의 증식을 유도함을 확인하였다. 이는 WECF의 활성 성분이 림프구에 대하여 세포의 분열을 유도하는 마이토젠으로 작용함을 나타내는 결과이다.

또한 면역반응에서 중추적인 역할을 하고 있는 T 세포가 항원 자극에 의해 활성화하는 경우 활성화 T 세포의 증식에 WECF가 미치는 영향을 간접적으로 확인하기 위하여 항 CD3 항체로 자극하면서 WECF를 가하여 증식 반응을 비교하였다. 그 결과, 항 CD3 자극에 의하여 비장세포의 증식은 증가하였으나, WECF 처리의 결과는 앞서의 실험에서와는 정반대로 나타났다. 즉, 대조군,  $112.5 \times 10^3 \pm 13.2$  cpm에 비해 1,000 μg/ml의 WECF를 가한 경우  $37.0 \times 10^3 \pm 7.7$  cpm (*p*=0.0078)으로, 고 농도(1,000 μg/ml)의 WECF는 세포들의 증식을 현저히 억제하였다(Fig. 1).

**흥화 물추출물이 활성화 비장세포 내 T 및 B 세포군의 분포에 미치는 영향** - 상기 실험(Fig. 1)에서 T 세포 자극이 존재하는 경우에 WECF가 비장세포의 증식을 억제하였으므로 WECF가 비장세포를 구성하고 있는 T 및 B 세포의 증식에 대한 영향에 차이가 있을 것으로 생각하여 그 분포를 확인하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 배양하기전 비장세포의 경우 T 세포와 B 세포는 각각 33.7%와 58.5%였다. 항 CD3 자극에 의하여 T 세포의 분포는 79.6%로 증가하였으며 상대적으로 B 세포의 분포는 10.1%로 감소하였다(Fig. 2B). CD3 자극 배양시 1,000 μg/ml의 WECF를 가



**Fig. 2.** Effect of WEFCF on distributional change of activated spleen cells. Fresh spleen cells (A) were stimulated with anti-CD3 in the absence (B) or presence (C) of WEFCF (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) for 3 days. Harvested cells were stained with anti-Thy1.2 for T cells and anti-CD19 for B cells. Representative data from 3 separated experiments with similar results were shown.

한 경우에 B 세포의 분포가 22.1%로 다소 증가하였으며 반면에 T세포의 분포는 68.6%로 감소하였다(Fig. 2C). 이와 같은 결과는 WEFCF가 림프구의 증식에 대한 영향을 미치며 T 및 B 세포간에 차이가 있음을 보여준다.

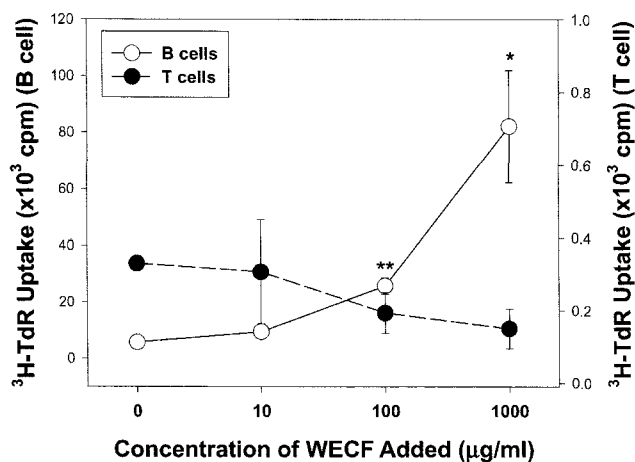
**홍화 물추출물이 T 및 B 세포의 증식에 미치는 영향** - 상기 실험 결과를 보다 확실하게 관찰하기 위하여 T 세포와 B 세포를 순수분리한 후 WEFCF를 가하고 3일간 배양하여 증식의 유도를 실험하여 비교하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 WEFCF는 농도에 의존하여 T 세포의 증식을 다소 억제하였다. 그러나, B 세포의 증식은 대조군( $5.8 \times 10^3 \pm 1.5$  cpm)에 비해 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $25.8 \times 10^3 \pm 3.0$  cpm;  $p=$

0.0037) 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ( $82.2 \times 10^3 \pm 19.8$  cpm;  $p=0.018$ )의 WEFCF를 가한 경우 현저한 증식 반응을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 WEFCF 중에 B 세포에 대한 마이토젠으로 작용하는 성분이 존재하며 그 성분은 T 세포에 대해서는 오히려 다소 증식을 억제하는 차별적 작용을 가진 물질임을 보여준다.

**홍화 물추출물이 활성화 T 및 B 세포의 증식에 미치는 영향** - 상기 실험에서 WEFCF는 비장세포의 증식을 유도하지만 T 세포를 활성화시킨 경우에는 비장세포의 증식을 오히려 억제하였으므로 T 세포와 B 세포가 활성화시킨 후 WEFCF에 의한 영향을 실험하였다. 순수 분리한 T 세포를 항 CD3 항체로 자극하면서 WEFCF를 가하여 3일 동안 매일 증식 반응을 관찰한 결과, 자극 배양 1일 및 2일 후에는 대조군( $5.5 \times 10^3 \pm 0.8$  cpm 및  $187.5 \times 10^3 \pm 26.8$  cpm)에 비해 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 WEFCF를 가한 경우에 유의하게 저하되었다( $1.4 \times 10^3 \pm 0.2$  cpm;  $p=0.0068$  및  $104.4 \times 10^3 \pm 13.0$ ;  $p=0.049$ ) (Fig. 4A). 그러나 배양 3일 후에는 증식 억제 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다.

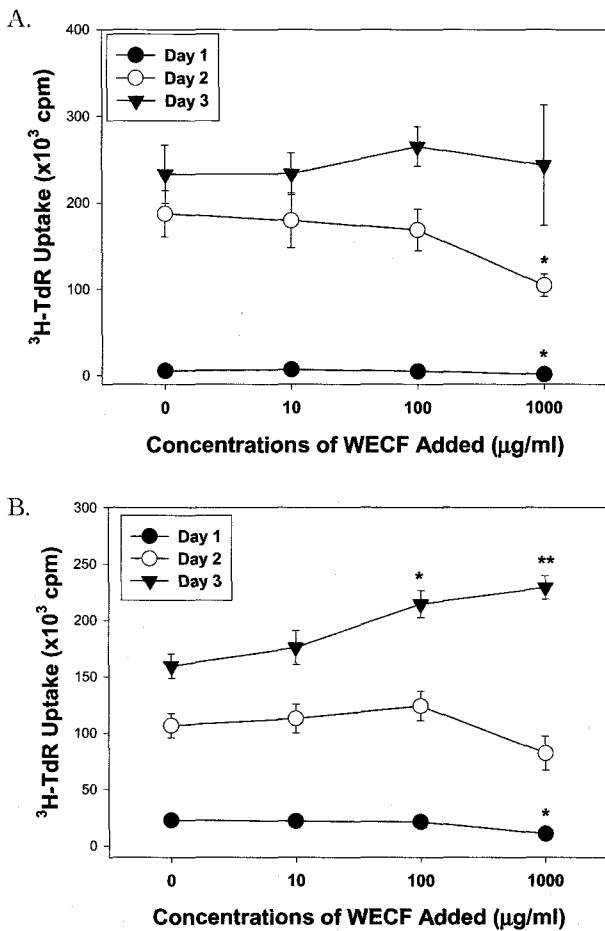
순수 분리한 B 세포를 LPS로 자극하면서 WEFCF를 가하여 3일 동안 매일 증식 반응을 관찰한 결과, 자극 배양 1일 후에는 대조군( $22.7 \times 10^3 \pm 3.8$  cpm)에 비해 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 WEFCF에 의하여 유의하게 저하되었으나( $10.7 \times 10^3 \pm 1.3$  cpm;  $p=0.04$ ), 배양 3일 후에는 대조군( $159.4 \times 10^3 \pm 10.7$  cpm)에 비해 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $214.4 \times 10^3 \pm 12.1$  cpm;  $p=0.027$ ) 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ( $229.2 \times 10^3 \pm 10.4$  cpm;  $p=0.009$ )의 WEFCF를 가한 경우 현저히 증가하였다(Fig. 4B).

이와 같은 결과는 WEFCF에 활성화한 T 세포의 증식을 현저히 억제하는 성분이 존재하며 그 성분에 대한 민감성 역



**Fig. 3.** Induction of T and B cell proliferation by WEFCF. T and B cells were exposed to WEFCF for 3 days. Data represent the means  $\pm$  SE of 3 separate experiments.

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs each control without WEFCF.

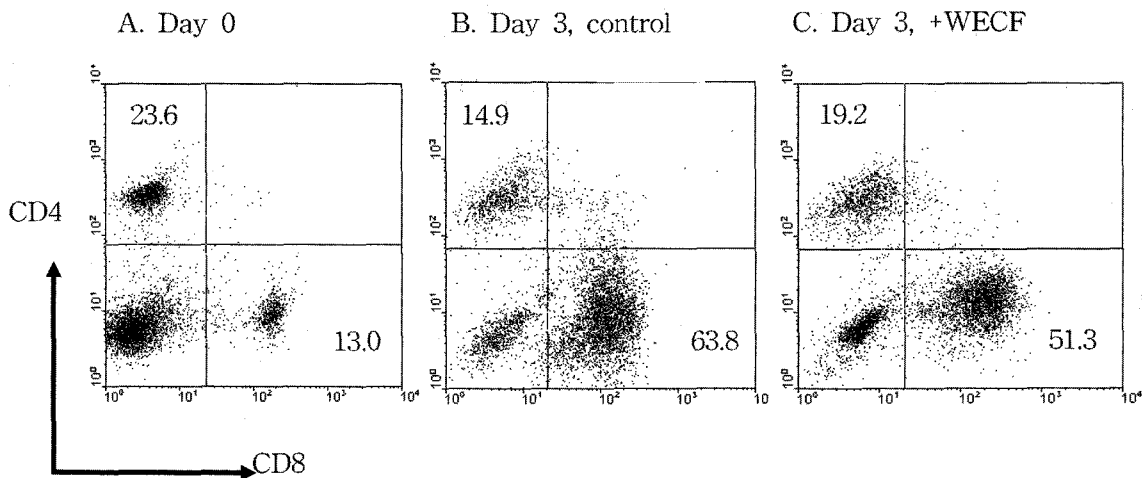


**Fig. 4.** Effect of WECF on activated T and B cell proliferation. T and B cells were exposed to WECF for 3 days while they were stimulated with anti-CD3 or LPS, respectively. Data represent the means  $\pm$  SE of 3 separate experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs each control without WECF.

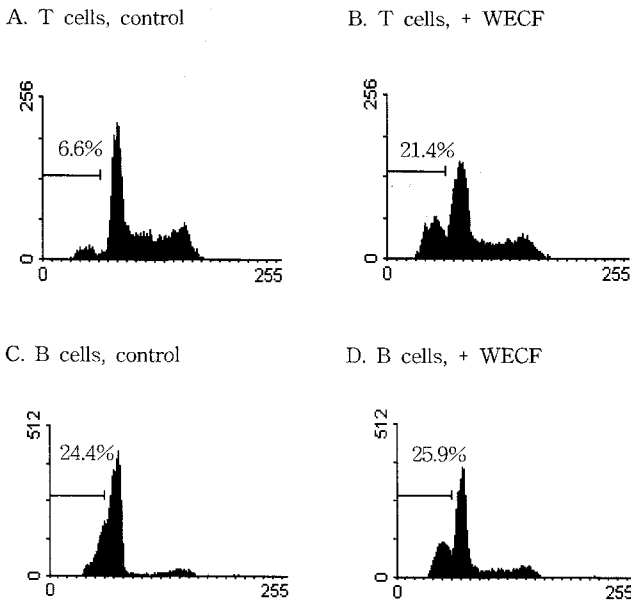
시 T 세포와 B 세포간에 차이가 있음을 보여준다. 이러한 차이는 Fas 등<sup>29)</sup>과 같이 세포의 사멸에 작용하는 분자로서 T 및 B 세포의 표면에 존재하는 신호전달 분자들의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

**흥화 물추출물이 CD4<sup>+</sup> T와 CD8<sup>+</sup> T 세포 증식에 미치는 영향의 차이** - WECF가 특히 T 세포의 증식을 억제하였으므로 T 세포중 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 아군들이 WECF에 대하여 동일하게 영향을 받는지를 알아보기 위하여 자극 배양 전과 3일 배양 후에 아군들의 분포 변화를 비교하였다. 자극 배양하기 전에 비장세포 중의 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포는 각각 23.6 및 13.0%로 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율은 1.82였다 (Fig. 5B). 3일간 배양한 후에는 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율이 역전되어 대조군에서 0.23이었으며 (Fig. 5B), WECF를 가한 경우에는 0.37이었다 (Fig. 5C). 이와 같은 결과는 CD8<sup>+</sup> T 세포가 WECF에 대해 다소 민감성이 더 높음을 보여주는 것이나 CD4<sup>+</sup> T 세포에 비해 상대적으로 활성이 더 높아진 결과에 기인하는 것으로 생각되며 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 비율에는 큰 차이가 없어 두 T 세포 아군이 WECF에 의하여 영향을 받는 것은 비슷한 것으로 판단된다.

**흥화 물추출물이 T 및 B 세포의 아포토시스에 미치는 영향** - 상기 결과 (Fig. 4A 및 4B)는 활성화 T 세포가 고농도의 WECF에 민감하게 작용하여 배양 2일 후까지 증식이 억제되는데 T 세포의 증식억제가 WECF에 의한 T 세포의 아포토시스 유도 때문인지를 확인하고자 PI 염색 방법으로 분석하여 비교하였다 (Fig. 6). T 세포를 자극 배양 2일 후에 아포토시스를 비교한 결과 대조군 (Fig. 6A; 6.6%)에 비해 WECF (1,000 µg/ml) 처리군 (Fig. 6B; 21.4%)에서 현저하게 높았으며, 반면에 B 세포의 경우에는 대조군 (Fig. 6C; 24.4%)과 WECF 처리군 (Fig. 6D, 25.9%) 간에 큰 차이를



**Fig. 5.** Effect of WECF on distributional change of T cell subsets in activated spleen cells. Fresh spleen cells (A) were stimulated with anti-CD3 in the absence (B) or presence (C) of WECF (1,000 µg/ml) for 3 days and then harvested cells were stained with PE-anti-CD4 and FITC-anti-CD8. Representative data from 3 separated experiments with similar results were shown.



**Fig. 6.** Effect of WECF on T and B cell apoptosis. Purified T and B cells were stimulated with anti-CD3 or LPS, respectively, for 2 days in the presence of WECF, and then harvested cells were stained with PI. Representative data from 3 separated experiments with similar results were shown.

보이지 않았다. 따라서 고농도의 WECF에 의한 활성화 T 세포의 증식억제는 아포토시스 증가에 기인하는 것으로 판단된다.

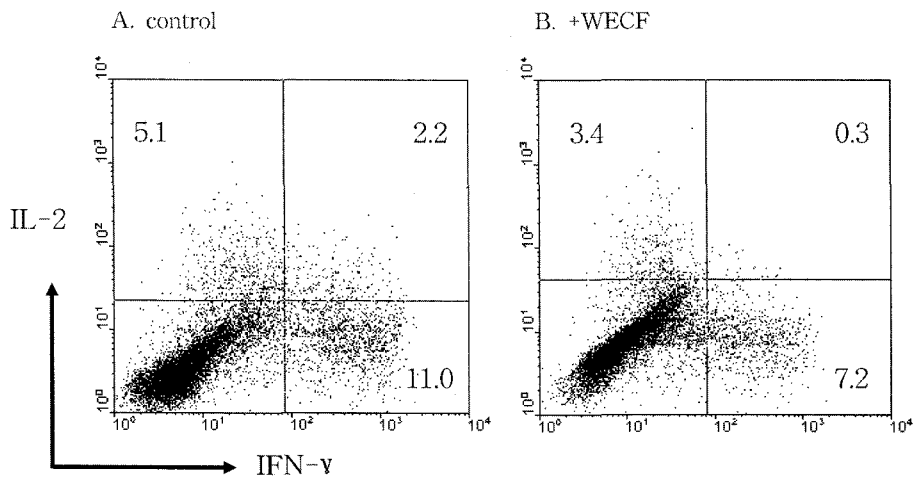
본 연구에서는 WECF가 어떤 종류의 아포토시스 관련 분자들에 작용하는지는 확인하지 않았다. 그러나 활성화하기 전의 휴지기 T 세포에 대한 영향(Fig. 3)과 활성화한 후의 T 세포에 대한 영향(Fig. 4A)을 비교할 때 WECF 성분

이 휴지기 T 세포의 아포토시스를 유도하기 보다는 T 세포가 자극되어 활성화한 후 야기되는 활성화유도 세포사(activation-induced cell death)<sup>30,31</sup>를 촉진시키는 것으로 생각된다.

**홍화추출물이 T 세포의 사이토카인 생산에 미치는 영향**  
 - 항원 인식 후 T 세포의 반응은 사이토카인의 생산으로 나타난다. 따라서 WECF에 의한 T 세포의 아포토시스의 유도과정에서 활성화의 억제가 동반되는지를 사이토카인의 생산을 세포내 염색 방법으로 비교함으로써 확인하였다. 배양 2일째에 항 CD3로 자극 배양한 세포를 수거하여 다시 PMA와 ionomycin으로 자극하여 IL-2 및 IFN $\gamma$  생산을 비교한 결과 대조군의 경우 IL-2 및 IFN $\gamma$  생산 세포의 빈도가 각각 7.3 및 13.2%였으며(Fig. 7A), 1,000  $\mu$ g/ml의 WECF를 가한 경우에는 3.7 및 7.5%로 감소하였다(Fig. 7B). 본 실험의 결과로 고농도의 WECF는 T 세포의 활성화유도 세포사 과정인 아포토시스 뿐만 아니라 사이토카인 생산을 저해함을 확인하였다.

본 연구에서는 WECF내에 존재하는 활성 성분에 대해서는 다루지 않았다. 본 연구에서 확인된 림프구 증식 억제 작용이 어느 성분에 의한 것인지는 다음 연구의 과제가 될 것이다.

이상의 결과는 WECF를 적정 농도로 사용하면 B 세포의 활성화에는 영향을 주지 않으면서 T 세포만의 활성을 억제할 수 있음을 보여 준다. T 세포는 면역반응에서 중추적인 역할을 담당하고 있으며<sup>32</sup> 그 활성화의 이상 증가는 자가면역 질환,<sup>33</sup> 알러지<sup>34</sup> 등 많은 질환을 야기한다. 따라서 본 연구 결과는 홍화 추출 성분의 투여를 통하여 T 세포의 활성을 조절함으로써 이들 질환을 치료하는데 이용될 수 있는 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다.



**Fig. 7.** Effect of WECF on cytokine production of T cells. Purified T cells were stimulated with anti-CD3 in the absence (A) or presence (B) of WECF (1,000  $\mu$ g/ml) for 3 days. Harvested cells were restimulated with PMA plus ionomycin for 6 hrs, and then stained with PE-anti-IL-2 and FITC-anti-IFN- $\gamma$ . Representative data from 3 separated experiments with similar results were shown.

## 결 론

홍화의 면역 조절작용과 그 기전을 탐색해 보기 위하여 홍화의 물추출물(WECF)을 사용하여 시험관내에서 면역세포, 특히 림프구의 증식에 대한 영향을 실험하였다.

WECF를 가하여 3일간 배양한 후 증식을 측정 한 결과 WECF는 B 세포의 증식을 유도하는 마이토젠으로서 작용하였으며 반면에 T 세포의 증식을 오히려 다소 억제하였다. 항 CD3 항체와 LPS를 사용하여 활성화한 T 세포와 B 세포를 비교한 결과 배양 초기에는 고농도(1,000 µg/ml)의 WECF가 T 및 B 세포의 증식을 억제하였다. 그러나 배양 후 3일째에 B 세포는 WECF에 의해 증식이 오히려 증가된 반면에, T 세포는 배양 2일 후까지 계속 억제되어 WECF의 억제 작용에 대한 민감성이 더욱 높았다. 이때 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup> T 세포 간에는 민감성에 차이가 없었다. 증식 억제시 WECF는 T 세포의 아포토시스를 유도하였으며 사이토카인의 생산도 억제하였다. 이러한 결과는 홍화를 사용함으로써 생체 내에서 B 세포에 영향을 주지 않고 T 세포만의 활성을 조절할 수 있음을 암시한다.

## 인용문헌

1. 김성규, 김현정, 정병희, 차재영, 조영수(2000) 홍화 (*Carthamus tinctorius*)의 부위별 이화학적 특성, *생명과학회지* **10**: 431-435.
2. Shabghai Science Technology Publishing Co. (1985) The Encyclopedia of Chinese Medicine. 689-691, Beijing.
3. Namba, T. (1986) Coloured illustrations of wakan-yaku, 1st ed., Vol. 2, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka.
4. Zheng, H. Z., Dong, Z. H., and She, Q. (1998) Mordern Research and Application of Traditional Chinese Medicine, pp. 2063. Xueyuan press, Beijing.
5. Hotta, M., Ogata, K., Nitta, A., Hosika, K., Ynagi, M., and Yamaxaki, K. (1989) Useful plant of the world, pp. 221. Heibonsha L.T.D Publishers, New York.
6. 김준한, 전선민, 박영애, 최명숙, 문광덕(1999) 홍화 종실 분말 식이가 고지방-고콜레스테롤 섭취 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향, *한국식품영양학회지* **28**: 625-631.
7. Sato, M., Yoshida, S., Nagao, K., and Imaizumi, K. (2000) Superiority of dietary safflower oil over olive oil in lowering serum cholesterol and increasing hepatic mRnase for the LDL receptor and cholesterol 7alpha-hydroxylase in exogenously hypercholesterolemic(exHC) rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1111-1117.
8. Liu, F., Wei, Y., Yang, X. Z., Li, F. G., Hu, J., and Cheng, R. F. (1992) Hypotensive effects of safflower yellow in spontaneously hypotensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin II level, *Acta Pharm. Sin.* **27**: 785-787.
9. Tian, J., Jang, W., Wang, Z., Wang, C., and Fu, F. (2003) Effects of safflower flavone on local cerebral ischemia and thrombosis formation in rats. *Chin. Tradit. Herb Drugs.* **34**: 741-743.
10. Futakuchi, M., Cheng, J. L., Hirose, M., Kimota, N., Cho, Y. M., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., and Shirai, T. (2002) Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP), *Cancer Letters* **178**: 131-139.
11. Bae, S. J., Shim, S. M., Park, Y. J., Lee, J. Y., Chang, E. J., and Choi, S. W. (2002) Cytotoxicity of Phenolic Compounds Isolated From Seeds of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) on Cancer Cell Lines), *Food Sci. Biotechnol.* **11**: 140-146.
12. Kim, H. J., Bae, Y. C., Park, R. W., Choi, S. W., Cho, S. H., Choi, Y. S., and Lee, W. J. (2002) Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats, *Calcif. Tissue Int.* **71**: 88-94.
13. 정수연, 최현진, 정면우, 안미령, 유태무, 류항목, 양지선 (1999) 홍화씨의 경골 골절 치유에 미치는 영향, *약학회지* **43**: 526-534.
14. 백남인, 방면호, 송정춘, 이상양, 박남규(1999) 紅花 (*Carthamus tinctorius* L.) 씨의 항산화활성 물질, N-feruloylserotonin, *한국농화학회지* **42**: 366-368.
15. Thomas, I. K. and Erickson, K. L. (1985) Dietary fatty acid modulation of murine T-cell responses in vivo, *J. Nutr.* **115**: 1525-1534.
16. Wallace, F. A., Miles, E. A., Evans, C., Stock, T. E., Yaqoob, P., and Calder, P. C. (2001) Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines, *J. Leukoc. Biol.* **69**: 449-457.
17. Yaqoob, P., Newsholme, E. A., and Calder, P. C. (1994) The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation, *Immunology.* **82**: 603-610.
18. Hotta, Y., Nagatsu, A., Liu, W., Muto, T., NArumiya, C., Lu, X., Yajima, M., Ishikawa, N., Miyazeki, K., Kawai, N., Mizukami, H., and Sakakibara, J. (2002) Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction, *Mol. Cell. Biochem.* **238**: 151-162.
19. Lee, J. Y., Chang, E. J., Kim, H. J., Park, J. H., and Choi, S. W. (2002) Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*, *Arch. Pharm. Res.* **25**: 313-319.
20. Zhu, H., Wang, Z., Ma, C., Tian, J., Fu, F., Li, C., Guo, D., Roeder, E., and Liu, K. (2003) Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: in vivo and in vitro studies, *Planta Med.* **69**: 429-433.
21. Takahashai, Y., Miyasaka, N., Tasake, S., Miura, I., Urano, S., Ikura, M., Hikichi, k., Matsumoto, T., and Wada, M. (1982) Constitution of two coloring matters in the flower petals of *Carthamus tinctorius* L., *Tetrahedron Lett.* **23**: 5163-5166.

22. Onodera, J. I., Obara, H., Osone, M., Maruyama, Y., and Sato, S. (1981) The structure of safflomin-A, a component of safflower yellow, *Chem. Lett.* 433-436.
23. Takahashai, Y., Saito K., Yanagiya, M., Ikura, M., Hikichi, K., Matsumoto, T., and Wada, M. (1984) Chemical constituent of safflor yellow B, a quinochalcone C-glycoside from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L., *Tetrahedron Lett.* **23**: 2471-2474
24. Ando, I., Tsukumo, Y., Wakabayashi, T., Akashi, S., Miyake, K., Kataoka, T., and Nagai, K. (2002) Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- $\kappa$ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages, *International Immunopharmacology.* **2**: 1155-1162.
25. Paiter, R., Lundin, R. E., and Fuller, G. (1972) A new steroid from safflower, *Phytochemistry.* **11**: 819-822.
26. Kasahara, Y., Kumaki, K., and Katagiri, S. (1991) Pharmacological studies on flower petals of *Carthamus tinctorius*. (II)Anti-inflammatory effect, *Shoyakugaku Zasshi.* **45**: 306-315.
27. Kasahara, Y., Kumaki, K., Sato, T., and Katagiri, S. (1989) Pharmacological studies on flower petals of *Carthamus tinctorius*. Central actions and anti-inflammation, *Shoyakugaku Zasshi.* **43**: 331-338.
28. Kasahara, Y., Kumaki, K., and Katagiri, S. *et al.* (1994) Carthami Flos and its component, stigmasterol, inhibit tumour promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis, *Phytother Res.* **8**: 327-331.
29. Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes, *J. Exp. Med.* **181**: 71-77.
30. Kabelitz, D., Pohl, T., and Pechhold, K. (1993) Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes, *Immunol. Today.* **14**: 338-339.
31. Orchansky, P. L. and The, H. S. (1994) Activation-induced cell death in proliferating T cells is associated with altered tyrosine phosphorylation of TCR/CD3 subunits, *J. Immunol.* **153**: 615-622.
32. Green, D. R., Flood, P. M., and Gershon, R. K. (1983) Immunoregulatory T-cell pathways, *Annu. Rev. Immunol.* **1**: 439-463.
33. Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N. (1990) Thymus and autoimmunity: capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease, *J. Exp. Med.* **172**: 537.
34. O'Hehir, R. E., Garman, R. D., Greenstein, J., and LLamb, J. R. (1991) The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens, *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 67-95.

(2004년 11월 10일 접수)