

# 호두 속껍질 없는 것과 있는 것의 물 추출물 투여가 생쥐의 비장세포 및 대식세포의 활성화에 미치는 영향

은재순\* · 박 훈 · 이경아 · 권 진<sup>1</sup> · 안문생<sup>2</sup>

우석대학교 약학대학, 1: 한국재활복지대학, 2: 한국약선연구소

## Effects of the Administration of water extract of Juglandis Semen without Inner cortex and with Inner cortex on Activity of Splenocytes and Macrophages in Mice

Jae Soon Eun\*, Hoon Park, Kyung A Lee, Jin Kwon<sup>1</sup>, Mun Saeng Ahn<sup>2</sup>

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: Korea National College of Rehabilitation & Welfare, 2: Institute of Korea Medicated-Diets

The purpose of this research was to investigate the effects of the administration of Juglandis Semen without inner cortex (JE) or with inner cortex (JEIC) on activity of splenocytes and peritoneal macrophages in BALB/c mice. JE (300 mg/kg, *p.o.*) did not affect the cell viability of T- and B-lymphocytes in murine splenocytes, but JEIC (300 mg/kg, *p.o.*) increased the cell viability of T- and B-lymphocytes. Furthermore, JE decreased the population of B220<sup>+</sup> cells in splenocytes, but JEIC enhanced the population of Thy1<sup>+</sup> cells. Also, JEIC enhanced the population of splenic CD4<sup>+</sup> cells. JE decreased the production of nitric oxide and the phagocytic activity of peritoneal macrophages, but JEIC increased the production of nitric oxide and the phagocytic activity of peritoneal macrophages. These results suggest that JEIC is more potent than JE against the immune response induced by splenocytes and macrophages.

Key words : Juglandis Semen, splenocytes, macrophages

### 서 론

호두나무는 가래나무과 (Juglandaceae)에 속하는 낙엽성 교목으로 서남아시아에서 중국을 거쳐 우리나라에 들어왔다. 우리나라에서는 경기도 이남에서 자생하며, 열매는 가을에 채취하고 종자를胡桃仁, 胡桃肉, 核桃, 核桃仁이라고도 한다. 호두는 자양, 강장, 진해, 補腎固精, 溫肺, 鉤端, 潤腸의 효능이 있어 腎虛喘嗽, 腰痛, 陽萎, 유정, 빈뇨, 大便燥結 등을 치료하는데 사용되어 왔으며, 종자에 함유된 성분의 40-50%는 지방으로 linoleic acid가 많이 함유되어 있으며 단백질, citrulline, juglone, vitamine C 등이 함유되어 있다고 보고되어 있다<sup>1,2)</sup>.

한방에서 호두를 약용으로 사용할 때는 속껍질이 있는 채로 사용하는 경우와 속껍질을 벗기고 사용하는 경우가 있다. 중국

明代의 『本草綱目』에서 천식에는 속껍질을 벗기지 않고 그대로 둔 채 사용해야 한다고 하였다. 유아의 천식에 人蔘胡桃湯을 사용하는 경우 속껍질이 있는 호두를 사용할 때는 천식이 가라앉았다가, 속껍질을 벗긴 호두를 사용하였더니 천식이 재발하였고 이어서 껍질을 벗기지 않는 것을 사용하였더니 천식이 가라앉았다는 예를 들어 천식에 대한 속껍질의 중요성을 강조하기도 하였다<sup>3)</sup>.

清代의 『醫林纂要探源』에서는 호두의 속껍질을 그대로 둔 채 복용하면 腎, 命門에 들어간다 하였고, “連皮則能固能補, 去皮則止於能行能潤耳 (껍질까지 쓰면 튼튼하게 하기도 하고 보양하기도 하는데 껍질을 제거한 것은 다만 소통하게 하고 윤활하게 할 수 있을 뿐이다)”라고 하였다. 한방병리학적으로 천식과 신, 명문은 밀접한 관계가 있고, 인체의 장기 중에서 腎이 면역조절 작용에 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>.

따라서 속껍질이 있는 호두와 속껍질을 제거한 호두를 각각 사용하였을 때 인체의 면역능에 미치는 영향에 차이가 있을 것이라 추정된다.

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2006/08/07 · 수정 : 2006/09/11 · 채택 : 2006/10/02

면역이란 생체가 자기 성분 이외의 이물질, 즉 각종 병원성 미생물, 이종단백질, 다당류, 지질, 수혈이나 동종 조직이식 등이 생체의 항상성을 깨뜨리거나 자기를 위협하는 물질을 배제하기 위해 일어나는 일련의 생체방어반응을 의미한다. 이러한 면역계는 항체 생성에 관련된 체액성면역과 T-lymphocyte에 의해 주도되는 세포성면역으로 분류되며, 또한 T- 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역과 macrophage가 관련된 비특이적면역으로도 분류한다<sup>9)</sup>.

본 연구에서는 호두의 속껍질이 있는 것과 없는 것의 면역 세포에 대한 차이점을 규명하고자, 특이적 면역반응을 주도하는 splenocyte의 proliferation, subpopulation에 대한 영향, 비특이적 면역반응을 주도하는 macrophages의 phagocytosis를 측정할 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷  $20 \pm 2$  g을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도  $20 \pm 3$  °C, 습도  $50 \pm 5\%$ , dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 시약

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), lucigenin, zymosan, MTT, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, lipopolysaccharide (LPS),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN)는 Sigma Co., RPMI 1640, FBS, trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated *E. coli* particle은 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), white multi-well plate (96-well, Nunc), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), luminometer (TECAN, Infinite F200) 등을 사용하였다.

### 3. 검역의 조제

호두는 전라북도 무주에서 구입하여 사용하였으며, 속껍질이 없는 호두 (이하 JE라 함.)와 속껍질이 있는 호두 (이하 JEIC라 함.) 100g을 각각 증류수 1,000ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 6.05g 및 6.81g (수득률; 6.1% 및 6.8%)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 4. Splenocytes 및 macrophages의 분리

생쥐의 splenocytes 분리는 Wysocki<sup>6)</sup> 및 Mizel<sup>7)</sup> 등의 방법

을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 JE 또는 JEIC 300 mg/kg을 1일 1회씩 5일간 경구투여한 다음 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심 분리), splenocytes 부유액으로 하였다.

Macrophage의 분리는 JE 및 JEIC 300 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage에 DPBS를 넣어 20분간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치한 후 분리된 macrophages를 원심분리하여 사용하였다. 세포배양을 할 때 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### 5. Splenocytes의 증식능 측정

세포증식능 측정은 Mosmann<sup>8)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>9)</sup>이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 splenocytes를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100 µl ( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 접종하고 concanavalin A (Con A) 5 µg/ml 또는 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37 °C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MIT 용액 20 µl를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100 µl를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

### 6. Splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로, T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>10)</sup>.

### 7. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $2 \times 10^6$  cells을 분주한 후 macrophage로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법<sup>11)</sup>으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 µg/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100 µl를 혼합하여 96 well module에 넣

고, 37 °C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader 로 흡광도를 측정하였다.

8. 복강 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 macrophage를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다<sup>12,13</sup>. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 µl와 lucigenin 용액 50 µl 및 zymosan 용액 30 µl를 첨가하여 최종 volume이 200 µl가 되도록한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

9. 복강 macrophage의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 µg/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 조정 후, 100 µl를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25 µl를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 µl를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다<sup>14</sup>.

10. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's *t*-test를 실시하여  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Splenocytes의 증식능에 미치는 효과

대조군의 splenocytes에 concanavalin A (Con A)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않았을 때 세포생존율은  $68.7 \pm 3.7\%$ 로 감소하였으며, JE를 투여하고 분리한 splenocytes에 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은  $109.7 \pm 3.5\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여한 군은  $123.1 \pm 4.2\%$ 로 JE 투여군에 비해 세포생존율이 증가하였다. 대조군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하지 않았을 때 세포생존율은  $52.8 \pm 2.1\%$ 로 감소하였으며, JE를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은  $102.7 \pm 3.3\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여한 군은  $132.9 \pm 1.9\%$ 로 JE 투여군에 비해 세포생존율이 증가하였다 (Fig. 1).

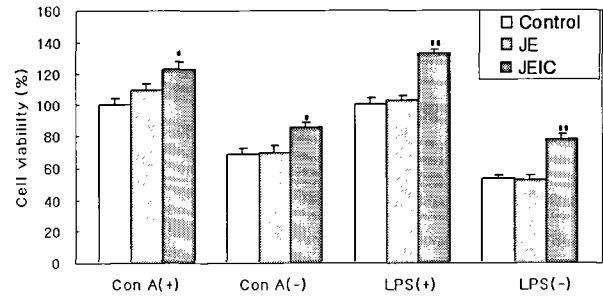


Fig. 1. Effects of the administration of Juglandis Semen without inner cortex (JE) or with inner cortex (JEIC) on the cell viability of splenocytes in mice. Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS). The data represents the mean ± SE of 5 mice. \*: Significantly different from JE-administered group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ ). Con A(+): Concanavalin A treated group, Con A(-): Concanavalin A non-treated group, LPS(+): Lipopolysaccharide treated group, LPS(-): Lipopolysaccharide non-treated group.

2. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

Splenocytes 중 대조군의 B220 positive 세포 (B220<sup>+</sup>)는  $36.5 \pm 1.8\%$  이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1<sup>+</sup>)는  $24.7 \pm 2.1\%$  이었다. JE를 투여하고 분리한 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는  $30.3 \pm 1.6\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으나, Thy1<sup>+</sup> 세포는  $23.5 \pm 2.2\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. JEIC를 투여하고 분리한 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는  $32.8 \pm 1.9\%$ 로 JE 투여군에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1<sup>+</sup> 세포는  $29.5 \pm 2.1\%$ 로 JE 투여군에 비해 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는  $14.8 \pm 1.2\%$  이었고, CD8<sup>+</sup> 세포는  $7.6 \pm 0.4\%$  이었으며, JE를 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는  $15.2 \pm 1.1\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는  $19.0 \pm 1.2\%$ 로 JE 투여군에 비해 증가하였다. JE를 투여하고 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포는  $7.4 \pm 0.8\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여하고 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포는  $7.9 \pm 0.3\%$ 로 JE 투여군에 비해 별 차이가 없었다 (Fig. 2).

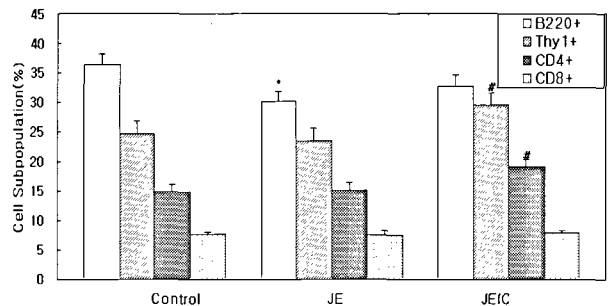


Fig. 2. Effects of the administration of JE or JEIC on the subpopulation of splenocytes in mice. Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 m, at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. #: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ). \*: Significantly different from JE-administered group ( $p < 0.05$ ).

3. 복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과  
 대조군의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide(NO) 생성량은 48 시간 후에  $0.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$  이었으나, LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때는  $25.9 \pm 4.1 \mu\text{M}$ 로 증가하였다. JE를 투여하고 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은  $14.1 \pm 3.0 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여한 군은  $39.6 \pm 5.1 \mu\text{M}$ 로 JE 투여군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 3).

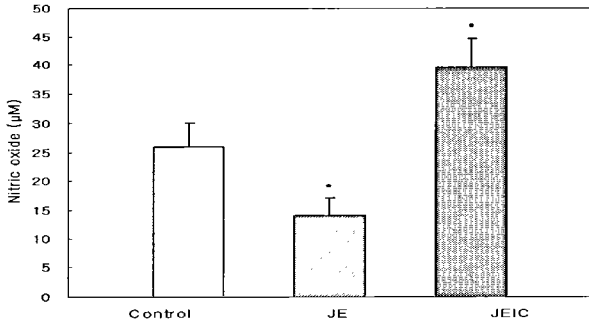


Fig. 3. Effects of the administration of JE or JEIC on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages. Samples (300 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages ( $1 \times 10^7$  cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hr in the presence of LPS and  $\gamma$ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice.  $^{\dagger}$ : Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).  $^{\ast}$ : Significantly different from JE-administered group ( $p < 0.05$ ).

4. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과  
 Chemiluminescence은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>. JE를 투여하고 분리한 macrophages로부터 생성되는 chemiluminescence의 양은 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여한 군은 JE를 투여한 군에 비해 증가하였다 (Fig. 4). 또한, FITC-conjugated *E. coli* particle의 탐식도 동일한 결과를 나타내었다(Fig. 5).

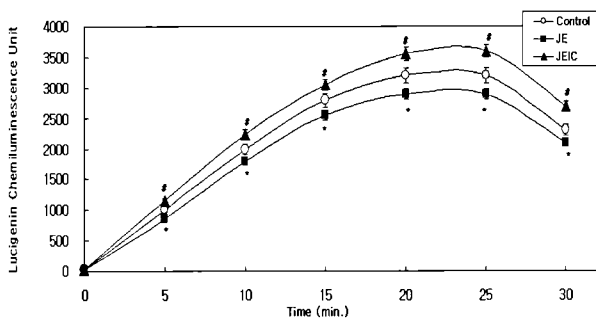


Fig. 4. Effects of the administration of JE or JEIC on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. Samples (300 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice.  $^{\dagger}$ : Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).  $^{\ast}$ : Significantly different from JE-administered group ( $p < 0.001$ ).

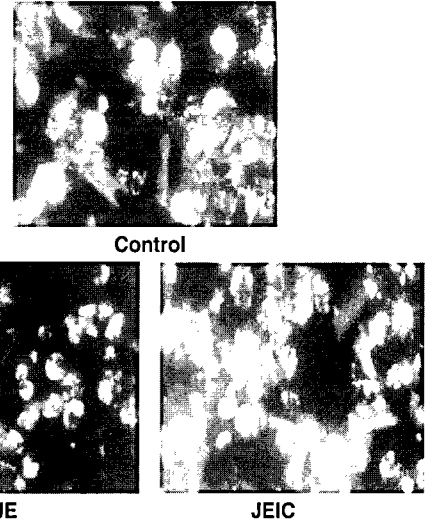


Fig. 5. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from JE- or JEIC-administered mice. Photographs (taken at 200 $\times$ magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control, JE (300 mg/kg)- and JEIC (300 mg/kg)-administered mice. The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

## 고찰

흉선세포는 thymus의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte ( $\text{CD4}^+$ ) 및 cytotoxic T lymphocyte ( $\text{CD8}^+$ )로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는  $\gamma$ -IFN 및 IL-2가, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 T, B 임파구 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 한편 B 임파구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

JE를 투여하고 분리한 splenocytes에 T cell mitogen인 concanavalin A를 처리하였을 때 세포의 생존율은 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여하고 분리한 splenocytes에 concanavalin A를 처리하였을 때 세포의 생존율은 JE를 투여한 군에 비해 유의성 있게 증가하였다. JE를 투여하고 분리한 splenocytes에 B cell mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하였을 때 세포의 생존율은 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여하고 분리한 splenocytes에 lipopolysaccharide를 처리하였을 때 세포의 생존율은 JE를 투여한 군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이 결과는 호두의 속껍질이 있는 경우가 속껍질이 없는 경우에 비해 splenocytes의 T 및 B 세포의 생존율을 증가시켜 면역능을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

JEIC가 splenocytes의 세포생존율을 증가시켰기 때문에 splenocytes의 T 및 B 세포의 subpopulation을 측정하여 보았다. JE를 투여하였을 때 splenocytes의  $\text{B220}^+$  세포의 population은 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여하였을 때는  $\text{Thy1}^+$  세포의 population이 증가하였다. JE를 투여하였을 때 splenic  $\text{CD4}^+$  세포 및  $\text{CD8}^+$  세포의 population은 대조군과 별 차이가

없었으나, JEIC를 투여하였을 때는 splenic CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 JE 투여군에 비해 증가하였다. 이는 JEIC가 splenocytes의 T 세포의 population을 증가시키며, T 세포 중 CD4<sup>+</sup> 세포의 population을 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 의미하는 것이다.

T 세포에서 분비되는 cytokines들은 macrophage를 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에<sup>17)</sup> 복강 macrophages에서 분비되는 nitric oxide 및 phagocytic activity를 측정하였다. 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다<sup>18)</sup>.

JE를 투여하여하고 분리한 복강 macrophages로부터 분비되는 nitric oxide (NO)의 양이 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여하였을 때는 JE 투여군에 비해 증가하였다. 또한, JE를 투여하였을 때 macrophages의 탐식능은 대조군과 별 차이가 없었으나, JEIC를 투여하였을 때는 JE 투여군에 비해 증가하였다. 이를 확인하기 위해 FITC-conjugated *E. coli*를 이용하여 macrophages의 engulfment를 측정하고 결과 동일한 실험결과를 나타내었다. JE를 투여하였을 때 NO 생성 및 탐식능이 감소하였으나, JEIC를 투여하였을 때는 NO 생성 및 탐식능이 JE 투여군에 비해 증가하였다는 것은 JEIC가 macrophages를 활성화시키고 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과 호두 속껍질이 있는 상태로 추출한 것을 투여 하였을 때가 속껍질이 없는 상태로 추출한 것을 투여 하였을 때보다 비장세포 및 대식세포에 의한 면역능을 활성화시켰다. 추후 호두 속껍질에 함유된 면역능을 증강시키는 성분을 분리하여 구조를 확인하고 그에 대한 작용기전을 연구할 예정이다.

## 결 론

호두 속껍질이 없는 것 (JE)과 있는 것 (JEIC)을 각각 물로 추출하여 생쥐에 투여하였을 때 면역능에 미치는 영향은 다음과 같다.

JEIC를 투여하였을 때 비장세포의 T 및 B 세포의 생존율은 JE 투여군에 비해 증가하였다. JE를 투여하였을 때 비장세포의 B 세포 population은 대조군에 비해 감소하였으며, JEIC를 투여하였을 때는 비장세포의 T 세포 population이 JE 투여군에 비해 증가하였다. JEIC를 투여하였을 때 splenic CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 JE 투여군에 비해 증가하였다. JE를 투여하였을 때 복강 macrophages로부터 분비되는 nitric oxide양이 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여하였을 때는 nitric oxide양이 JE 투여군에 비해 증가하였다. JE를 투여하였을 때 복강 macrophages의 탐식능은 대조군에 비해 감소하였으나, JEIC를 투여하였을 때는 탐식능이 JE 투여군에 비해 증가하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 호두 속껍질이 있는 것이 없는 것보다 면역능을 활성화시키는 작용이 강력하다고 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (우석대학교 헬스케어기술개발사업단).

## 참고문헌

1. 배기환, 한국의 약용식물학, 교학사, p 49, 2001.
2. 한국약용식물학회지, 종합약용식물학, 학창사, p 137, 2000.
3. 江蘇新醫學院編: 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p 1546, 1978.
4. 劉正才 外: 中醫免疫, 重慶, 重慶出版社, pp 15-20, 1983.
5. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 2ed. Saunders, p 5, 1994.
6. Wsocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:2844, 1978.
7. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol. 120:1497, 1979.
8. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65:55, 1983.
9. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129:23, 1990.
10. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179:873-879, 1994.
11. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity, 59(9):3280, 1991.
12. Boudard, F., Vallot, N., Çabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174:259, 1994.
13. 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.
14. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immunol. Methods, 162:1, 1993.
15. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and

- extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 45:1, 1984.
16. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). U.S.A. pp 279-282, 1994.
17. Charles, A.J., Paul, T., Mark, W. The immune system in health and disease. 4ed, Garland Pub., p 463, 2000.
18. 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. Leucocyte Biol.* 41:450-455, 1987.