

유근피 추출물을 함유하는 면역증강용 조성물

박길순^{1,2} · 장인애^{1,2} · 김윤철³ · 이무형^{1,2} · 신혜영¹ · 최두영⁴ · 윤용갑^{1,2*} · 박 현^{1*}

1:원광대학교 인수공통감염병연구센터 및 의과대학 감염생물학교실, 2:한의학대학 방제학교실, 3:약학대학, 4:의과대학 소아과학교실

Composition Comprising the Extract of *Salicis Radicis Cortex* for Immune Activity

Gil-Soon Park^{1,2}, In Ae Chang^{1,2}, Youn Chul Kim³, Moo Hyung Lee^{1,2}, Hye Young Shin¹, Du Young Choi⁴, Yong Gab Yun^{2*}, Hyun Park^{1*}

1: Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, College of Medicine,

2: Department of Oriental Medical Prescription, College of Oriental Medicine,

3: College of Pharmacy, 4: Department of Pediatrics, College of Medicine, Wonkwang University

In the recent, increased concern has been focused on the pharmacology and clinical utility of herbal extracts and derivatives as a drug or adjunct to chemotherapy and immunotherapy. *Salicis Radicis Cortex*, A decoction has been mainly used for improvement of ozena and a diuretic effect in oriental medicine, but there was no study on the molecular mechanism of *Salicis Radicis Cortex* as an immunomodulator. Here we investigated the role of the aqueous extract of *Salicis Radicis Cortex* in the expression of inflammatory mediators, surface molecule, and related receptors *in vitro* and *in vivo*. In murine macrophage RAW 264.7 cells and peritoneal macrophages of C57BL/6N mice, water extract of *Salicis Radicis Cortex* increased the production of secretory TNF-alpha and Nitric oxide, and the expression level of CD14, LPS co-receptor and CD86, co-stimulatory molecule compared to negative natural extract *ex vivo*. Moreover, *i.p.* injection of water extract of *Salicis Radicis Cortex* significantly increased the secretion level of IFN-gamma and TNF-alpha, IL-2, IL-4 and IL-5 in serum of mice *in vivo*. Taken together, these results suggest that *Salicis Radicis Cortex* may regulate the immune response by secreting Th1 and Th2 types of cytokines *in vivo* and the possibility of its as natural immunostimulator.

Key words : *Salicis Radicis Cortex* Nitric oxide, cytokine, co-stimulatory molecule, CD14, Th1 and Th2 immune response, herbal extract

서론

세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응시, 대식세포 및 림프구 활성의 조절은 의약품의 치료 효과의 결정에 있어서 중추적인 역할을 한다. 활성화된 대식세포에 의한 슈퍼옥사이드 음이온 (superoxide anion, O₂⁻), 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 산화질소(nitric oxide, NO)의 생산은 비특이적 면역에 있어서 중요한 세

포독성 및 세포활성억제기작이다. 대식세포에 의한 ROS 및 NO의 생성에 어떤 천연화합물이 영향을 미치는지 많은 연구들이 수행되어 왔다. 대식세포는 항원을 제시하거나(antigen-presenting) 종양을 없애거나(tumoricidal) 및 미생물세포를 죽이는(microbicidal) 세포로서, 세포매개(cell-mediated) 또는 체액성 면역(humoral immunity)에 중심적인 역할을 하는 조절세포로 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식억제활성을 보인다.

또한, 방사성치료 또는 화학치료와 같은 항암 치료시 조혈모 세포들이 조혈과정 중 손상을 입게 되어 연속적으로 관련된 조혈세포와 면역세포들이 감소되고, 이로 인해 종종 조혈과 면역작용의 형성에 장애가 발생한다. 결과적으로, 환자들은 종종 빈혈

* 교신저자 : 윤용갑, 박현, 원광대학교 인수공통감염병연구센터

· E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6834

· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6768

· 접수 : 2007/01/08 · 수정 : 2007/01/24 · 채택 : 2007/02/09

과 림프구 감소증, 혈소판 감소증 또는 과립 백혈구 감소증을 경험하게 되며, 이것은 심각하고 치명적인 감염을 일으키고 환자들의 사망률을 높이게 된다. 임상적으로, 항암치료나 골수이식후에 골수성장인자인 G-CSF, GM-CSF, IL-1~12, N-CSF 및 EPO 등을 사용하고 있으며, 이들 성장인자는 서로 상승작용을 일으키면서 CFU 와 BFU에서부터 세포 분화 및 생성을 촉진시키고 세포의 이동, 식세포작용, 슈퍼옥사이드 생성, 항체 자극에 따른 백혈구의 세포 독작용 등도 증가시킨다.

유근피(*Salicis radice cortex*)는 버드나무과의 낙엽교목인 버드나무의 뿌리껍질로, 높이 약 20m, 지름 약 80cm이다. 5월 개화, 암수딴그루, 열매 식과 5월 결실 종류는 여러 가지로 약 300종이 있으며 주로 북반구의 난대에서 한대 그리고 남반구에도 몇 종이 분포한다. 이 약물의 성미는 고신, 한하고, 간, 신. 방광염에 작용하는데, 정열하고 습을 제거하며 풍을 헤치고 부스럼을 삭이는 효능이 있어 방광염, 황달형안염, 풍습성관절염, 소변불리, 습진, 치통이뇨, 해열제, 이뇨제, 폐농양, 구내염, 치은염 치료제로 쓰여 왔고, 민감에서는 옷이 오르면 가지를 태운 연기를 쏘여 열매의 솜털을 붙여 지혈하는데 사용했다. 아스피린의 원료가 되는 물질도 버드나무류의 뿌리에서 추출한 것이다.

화학 성분은 살리실산, 점액질 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으나, 버드나무 뿌리껍질인 유근피의 면역 증강 효과에 대한 작용은 아직까지 밝혀진 바 없다.

이에 저자들은 천연약품자원으로부터 면역 증강 효과를 갖는 물질을 확인하던 중 본 발명의 유근피 추출물이 암세포의 증식을 억제하는 NO 생성 증가효과, T-세포와 관련된 사이토카인 발현 증가 효과 및 CD 14의 발현 증가 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

한국식물추출물은행으로부터 분양받은 유근피를 자연 건조시킨 후 잘게 세절하여 건조된 유근피 3kg에 100% 물 120L를 가하여 70℃에서 가열 추출을 3회 행한 후, 여과하고 감압 농축하여 동결건조한 후 유근피 추출물 635.5g을 수득하였다.

2. mouse splenocytes 와 macrophages 준비

C57BL/6 mouse로부터 spleen을 분리하여 micro slide glass로 잘게 으갠 뒤 0.4um nylon cell strainer로 여과하였다. 1200rpm, 10분간 원심분리한 후 증류수를 이용하여 적혈구를 파괴하였다. Splenocytes를 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell수를 측정하였다. C57BL/6 mouse 복강에 3% thioglycollate를 주입하고, 4일 뒤 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 PBS를 넣어 peritoneal macrophage를 분리하였다. 분리된 macrophage는 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell수를 측정하였다.

3. Nitric oxide analysis

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 4×10^5 cells/well씩 분주한 후 100 ug/ml의 상피 유근피 물 추출물을 처리하였다. 37℃, 5%

CO₂ 조건에서 24시간 배양한 후, 상층액을 취하여 Griess reagent를 이용해 595nm에서 NO의 양을 측정하였다. Peritoneal macrophage도 마찬가지로 1×10^6 cells/well을 분주한 후 NO를 측정하였다.

4. TNF-a analysis

RAW264.7과 peritoneal macrophage에 유근피 추출물 100ug/ml을 첨가한 후, 37℃에서 24시간, 48시간 처리하였다. LPS는 양성 대조군으로 10 ug/ml을 처리하였다. 상층액을 취하여 sandwich ELISA 방법으로 TNF-a의 양을 측정하였다.

5. 마우스 대식세포의 세포표면 분자의 발현

마우스 일차 대식세포를 분리하여 1×10^6 세포에 유근피 추출물 100 ug/ml을 37℃, 24시간 처리하였다. 세포는 두번 세척을 하고, 세척된 세포 100ul에 opsonized-labeled particle (Fluoresbrite carboxylate Microspheres (2.57% solids-latex)(108 particles/ml) 100ul를 첨가해 37℃에서 30분간 shaking incubation을 하였다. Ice cold PBS를 첨가해 반응을 멈추게 한후, 세포를 FACS분석 하였다.

6. FACS analysis

세포 1×10^6 에 non-specific binding을 피하기 위해 Fc-bloker를 4℃에서 30분간 처리하고 세척을 하였다. Monoclonal antibody, isotype-matched control로 ice에서 30분간 staining을 하였다. Staining된 세포는 FITC anti-mouse MHC class II, FITC anti-mouse CD80, CD86, PE-anti-mouse Toll like receptor 4 (TLR4)/MD-2, PE-anti-mouse CD14로 staining을 한 후, FACS Calibur (Becton-Dickinson)으로 분석을 하였다.

7. 마우스 혈청내의 IFN-r 생산 효과

마우스에 유근피 물 추출물 4mg/500ul를 복강에 주입하고 7일 후에마우스의 혈액을 심장에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 그리고 CBA키트(cytokine assay kit, BD science)를 이용하여 혈청내의 사이토카인 분비 정도를 확인하였다.

8. 급성독성 시험

6주령의 특정병원체부재(specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹 당 2마리씩의 동물에 유근피 추출물 100mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 유근피 추출물 투여 후 동물의 폐사 여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

결 과

1. 유근피 추출물의 NO 및 TNF-a 분비 효과 확인

RAW 264.7 세포와 peritoneal macrophage에 유근피 추출물 100ug/ml, LPS 10ug/ml을 24시간, 48시간 처리한 후 Griess 반응으로 NO 생성을 측정하였고 ELISA 방법으로 TNF-a를 측정하

였다. 유근피 추출물이 NO 생성에 미치는 효과와 염증 매개물질인 TNF-a 분비능력을 알아보기 위해 실험을 실시 한 결과 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 RAW 264.7 과 peritoneal macrophage 모두에서 공통적으로 NO와 염증 매개물질 (inflammatory mediator)이 증가하였다.

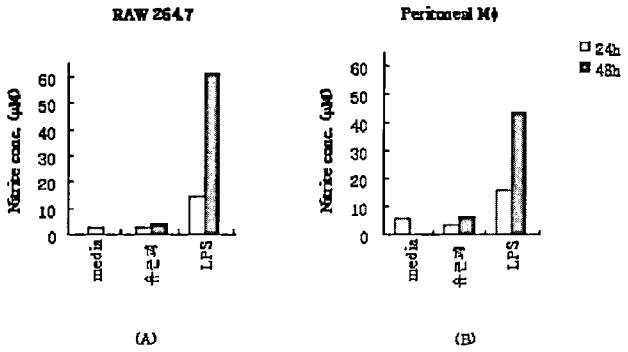


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *salicis Radicis Cortex* of NO production in RAW 264.7 cells and murine peritoneal macrophages. NO production was determined by the Griess as nitrite accumulation in the medium after 24hr in RAW 264.7 cell (A) or 48hr in murine peritoneal macrophages (B).

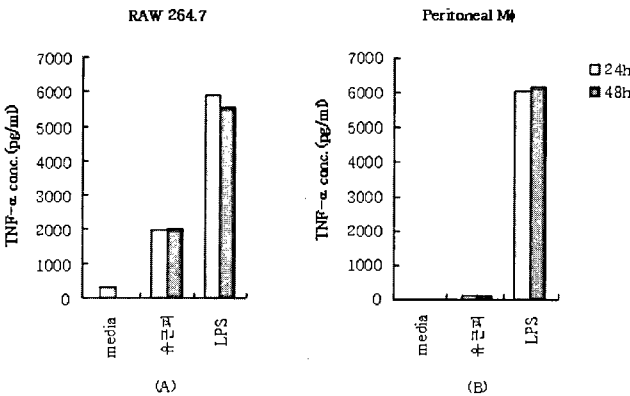


Fig. 2. Effect of the aqueous extract of *salicis Radicis Cortex* of TNF-a secretion in RAW 264.7 cells and murine peritoneal macrophages. TNF-a secretion was subsequently analyzed by ELISA in the medium after 24hr in RAW 264.7 cell (A) or 48hr in murine peritoneal macrophages (B).

2. 마우스 대식세포의 세포표면분자의 발현에 미치는 영향

마우스 대식세포를 분리하여 1X10⁶ 세포에 유근피 추출물을 100ug/ml을 24시간 처리한 뒤 1% BSA로 블로킹하고, CD86과 CD80 세포표면 항체로 FACS 분석을 실시하였다. 각 항체의 양은 0.25ug/1X10⁶으로 처리한 후 LPS 10ug/ml을 처리한 양성 대조군과 비교하여 결과를 분석하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보여지는 바와 같이, 항원 존재세포(antigen presentation cell)에서 발현하는 B7 분자인 CD86의 발현이 상기 유근피 추출물 처리시 음성대조군(천공 및 정향)에 비해 증가하였고, LPS와 LBP 복합체(complex)의 공동 수용체(co-receptor)인 CD14의 발현이 현저히 증가하였다.

3. 마우스 혈청 내의 IFN-r 생산 효과

C57BL/6N 마우스에 유근피 물 추출물을 복강 주입하고 7

일 후에 마우스의 혈액을 심장 채혈하여 혈청을 분리하였다. 그리고 CBA kit를 이용하여 혈청내의 사이토카인 분비 정도를 확인하였다. 결과는 Fig 4.에서 보는바와 같이 유근피 추출물을 복강 주입하였을 때, TNF-a, IFN-r, IL-2, IL-4 및 IL-5의 사이토카인의 발현이 증가하였다.

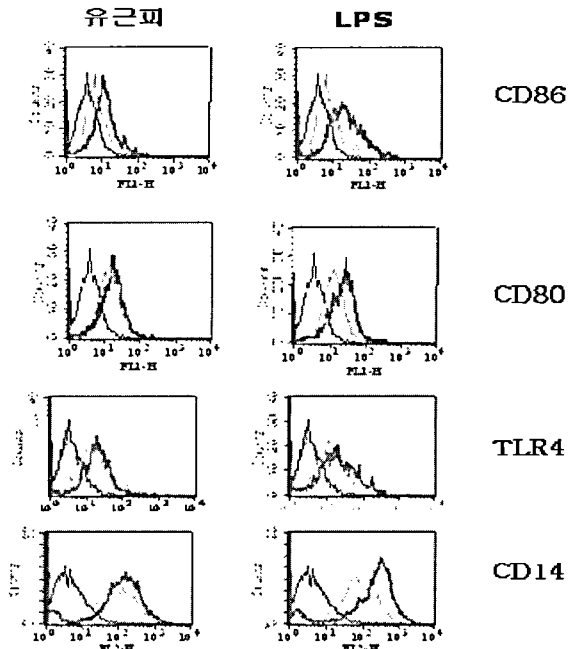


Fig. 3. Effect of the aqueous extract of *salicis Radicis Cortex* on the expression of co-stimulatory molecules and TLR-4 receptor in murine peritoneal macrophages (PM) *in vitro*. PM were treated for 24hr at 37°C with PBS, salicis Radicis Cortex extracts and LPS. After washing, 1X10⁶ cells/tube cells were stained for 30min at 37°C with FITC-labeled mpmoclonal antibodies to CD86, CD80, CD14 and TLR-4. These cells were also stained with isotype-matched control antibody (black line). The expression levels of cells surface molecules were determined using FACS analysis. Data are representative of at least three independent experiments.

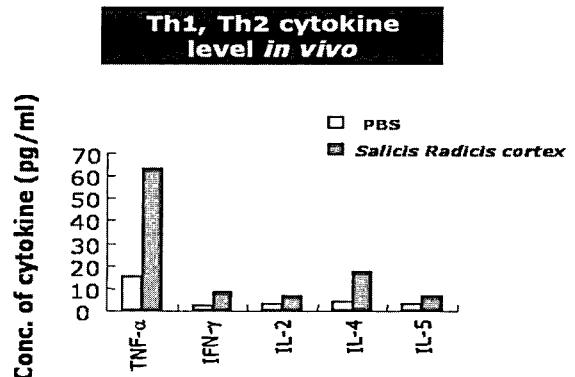


Fig. 4. Effect of the aqueous of *Salicis Radicis Cortex* on serum cytokine production *in vivo*. 7-week-old C57BL/6N mice were I.P injection with the aqueous extract of *Salicis Radicis Cortex*. A control group was given PBS. 5 types of cytokine were measured in serum isolated from mice using BD Mouse Th1/Th2 cytokine CBA kit according to the recommended manufacture.

4. 급성독성 시험

각 그룹당 2마리씩의 동물에 유근피 물 추출물을 100 mg/kg

의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 추출물은 랫트에서 각각 100 mg/kg까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD50)은 100 mg/kg이상인 안전한 물질로 판단되었다.

고 찰

최근에 들어 화학요법이나 면역요법의 치료제나 첨가제로서 천연물을 임상에 사용하려고 하는 관심은 더 증가되고 있는 추세이다. 천연물은 숙주의 면역체계에서 종종 "foreign" 으로서 인식되기 때문에 면역세포들을 증가시킴으로써 면역촉진 효과를 갖는다. 대식세포는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주 방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식억제활성을 보인다. 또한 TNF- α 와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 반응에도 관여한다. 버드나무의 뿌리껍질인 유근피는 방광염, 황달형간염, 풍습성관절염, 소변불리, 습진, 치통이뇨, 해열제, 이노제, 폐농양, 구내염, 치은염 치료제로 쓰이고 있으며 아스피린의 원료가 되는 물질이기도 하다.

본 연구에서는 대식세포 활성화에서 유근피의 면역조절 효과를 실험 하였다. 유근피 추출물은 RAW 264.7 세포와 복강대식세포로부터 NO와 TNF- α 의 분비를 증가시켰다. 또한 항원 존재 세포에서 발현하는 B7 분자인 CD86의 발현이 음성대조군에 비해 증가하였고 LPS와 LBP복합체의 공통 수용체인 CD14의 발현이 현저히 증가하였다. In vivo 모델에서는, 유근피를 경구 투여한 마우스의 혈액에서 혈장을 분리하여 TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 및 IL-5의 사이토카인을 측정 한 결과 모두 증가하여 Th1과 Th2 반응에 관여함을 보여줬다. 이러한 결과는 유근피가 대식세포로부터 분비된 NO 생성증가와 T cell로부터 분비되는 사이토카인의 조절을 통해 면역 증강효과를 나타내고 있음을 제시해준다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RIT05-03-02)지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Han, S.B., Lee, C.W., Kang, M.R., Yoon, Y.D., Kang, J.S., Lee, K.H., Yoon, W.K., Lee, K.H., Park, S.K., Kim, H.M. Pectic polysaccharide isolated from *Angelica gigas* Nakai inhibits melanoma cell metastasis and growth by directly preventing cell adhesion and activating host immune functions. *cancer letters*, 1-10, 2006.
2. Yang, H.Z., Xu, S., Liao, X.Y., Zhang, S.D., Liang, Z.L., Liu,

- B.H., Bai, J.Y., Jiang, C., Ding, J., Cheng, G.F., Liu, G. A Novel Immunostimulator, N2-[O-Benzyl-N-(acetylmuramyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyI]-N6-trans-(m-nitrocinnamoyl)-L-lysine, and Its Adjuvancy on the Hepatitis B Surface Antigen. *J. Med. Chem.* 48:5112-5122, 2005.
3. Lin, Y.L., Liang, Y.C., Lee, S.S., Chiang, B.L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Leukocyte Biology.* 78:533-543, 2005.
4. Hsu, H.Y., Hua, K.G., Lin, C.C., Lin, C.H., Hsu, J., Wong, C.H. Extract of Reishi Polysaccharides Induces Cytokine Expression via TLR4-Modulated Protein Kinase Signaling Pathways. *The Journal of Immunology.* 173:5989-5999, 2004.
5. Shao, B.M., Dai, H., Xu, W., Lin, Z.B., Gao, X.M. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 323:133-141, 2004.
6. Chen, H.S., Tsai, Y.F., Lin, S., Lin, C.C., Khoo, K.H., Lin, C.H., Wong, C.H. Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 12:5595-5601, 2004.
7. Han, S.B., Park, S.K., Ahn, H.J., Yoon, Y.D., Kim, Y.H., Lee, J.J., Lee, K.H., Moon, J.S., Kim, H.C., Kim, H.C., Kim, H.M. Characterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of *Acanthopanax koreanum*. *International Immunopharmacology.* 3:683-691, 2003.
8. Fu, S.L., Hsu, Y.H., Lee, P.Y., Hou, W.C., Hung, L.C., Lin, C.H., Chen, C.M., Huang, Y.J. Dioscorin isolated from *Dioscorea alata* activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 339:137-144, 2006.
9. Nakaya, T.A. Panax ginseng Induces Production of Proinflammatory Cytokines via Toll-like Receptor. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 24:93-100, 2004.
10. Han, S.B., Yoon, Y.D., Ahn, H.J., Lee, H.S., Lee, C.W., Yoon, W.K., Park, S.K., Kim, H.M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. *International Immunopharmacology.* 3:1301-1312, 2003.
11. Wang, M., Guilbert, L.J., Ling, L., Li, J., Wu, Y.Q., Xu, S., Pang, P., Shan, J.J. Immunomodulating activity of CVT-E002, a proprietary extract from North American ginseng (*panax quinquefolium*), *Journal of Pharmacology.* 53:1515-1523, 2001.
12. Wang, M., Guilbert, L.J., Li, J., Wu, Y.Q., Pang, P., Basu, T.K., Shan, J.J. A proprietary extract from North American

- ginseng(*panax quinquefolium*) enhances IL-2 and IFN- γ productions in murine spleen cells induced by Con-A. *International Immunopharmacology*. 4:311-315, 2004.
13. Roswitha F., Thomas, M., Brigitte, T., Paul, G.S. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Panax ginseng* root in RAW 264.7 cells. *British Journal of Pharmacology*. 134:1663-1670, 2001.
 14. Pae, H.O., Oh, H., Yun, Y.G., Oh, G.S., Jang, S.I., Hwang, K.M., Kwon, T.O., Lee, H.S., Chung, H.T. Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica*(Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacol Toxicol*. 91(1):40-48, 2002.
 15. Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Rios, J.L., Buschiazzi, H., Zaidenberg, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts, *Fitoterapia*. 73(7-8):569-575, 2002.
 16. Shin J.Y., Song, J.Y., Yun, Y.S., Yang, H.O., Rhee, D.K., Pyo, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 24(3):469-482, 2002.
 17. Wang, J.Z., Mao, X.J., Ito, H., Shimura, K. Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta Med*. 57(4):335-336, 1991.
 18. Park, H.H., Seo, Y.B. 桑寄生의 免疫調節作用에 對한 實驗的 研究. *大韓本草學會誌*. 16(1), 2001.