

# 천초 추출물의 면역 조절 효과

신혜영<sup>1,2</sup> · 장인애<sup>1,2</sup> · 장문희<sup>1,2</sup> · 김윤철<sup>3</sup> · 윤용갑<sup>1,2\*</sup> · 박 현<sup>1\*</sup>

1: 원광대학교 인수공통·감염병 연구센터 및 의과대학 감염생물학교실, 2: 한의과대학 방제학교실, 3: 약학대학

## Immune-modulator Effect of *Zanthoxyli Pericarpium* Watet Extract

Hye-Young Shin<sup>1,2</sup>, In-Ae Chang<sup>1,2</sup>, Wen-Ji Zhang<sup>1,2</sup>, Youn Chul Kim<sup>3</sup>, Yong Gab Yun<sup>1,2\*</sup>, Hyun Park<sup>1\*</sup>

1: Department of Infection Biology, Zoonosis Research Center, Wonkwang University School of Medicine,  
2: Department of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
3: College of Pharmacy, Wonkwang University School of Medicine

In the recently, 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. Here we investigated the modulatory effects of the extract of *Zanthoxyli Pericarpium* (ZP) in production of inflammatory mediators from Raw264.7 cells and expression of CD86, CD14, toll-like receptor (TLR)-4 from peritoneal macrophage. ZP enhanced the production of NO and TNF- $\alpha$  as well as mRNA expression of iNOS and TNF- $\alpha$ . Treatment of peritoneal macrophage with ZP resulted in the enhanced cell-surface molecules expression of CD86, CD14 and TLR4. We assayed the effect of ZP in cell proliferation and production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . ZP increased Con A-induced cell proliferation and production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . These studies indicate that ZP induces macrophage activation and suggest the possible use of ZP in macrophage - based immunotherapies

Key words : *Zanthoxyli Pericarpium*, TNF- $\alpha$ , Nitric oxide, TLR4

### 서 론

천초는 꼭두서니과의 다년생 풀로서 뿌리를 천초라 하여 예로부터 천연 염료로 이용되어 왔습니다. 뿌리에는 옥시안트라키논색소성분과 글루코시드가 있으며 한의에서는 정혈약, 통경약, 지혈약으로 민간에서는 부기가 있을 때 이뇨약으로, 폐와 간장에 열이 있을 때 해열약으로 인후염, 진통약으로 사용되어 왔다. 하지만 적합한 실험모델에서 그 효과 및 작용기전은 분명하게 규명되지 않았다. 본 연구에서는 대식세포와 splenocyte를 이용하여 세포 독성에 영향을 주지 않는 농도에서 천초의 면역 조절 효과를 검토했다.

대식세포는 외부 병원균의 감염 시 다양한 염증인자 및 항균물질 분비, 식균작용 등을 통해 host defense에 중요한 역할을

을 수행한다. 대식세포는 선천면역계 및 적응면역계 모두에서 중요한 역할을 수행하여 secondary lymphoid organ 뿐 아니라 거의 모든 조직에 광범위하게 분포한다<sup>1)</sup>. 또한 병원균 유래 위험인자 등에 반응하여 이들을 제거하고 각종 cytokines, chemokine 및 inflammatory mediators를 생성하여 개체의 다른 면역체계에 생체 내 감염이나 injury가 있음을 알리는 일차적인 역할을 수행한다<sup>2)</sup>. 대식세포는 보체성분, 인터페론, IL-1 및 TNF와 같은 사이토카인을 생산하여 T-세포로부터 생산되는 여러 가지 사이토카인에 의해 기능이 증강될 수 있다<sup>3)</sup>. 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어 기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암세포의 증식 억제활성을 보인다. 또한 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 반응에도 관여한다<sup>4)</sup>.

여러 위험인자의 인식에는 다양한 면역 수용체들이 관여하는데 이중에서도 TLR가 가장 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. TLR은 현재까지 10여 종류가 선천면역 반응에 관여한다는 것이 알려져 있으며 흥미롭게도 이들 각각 혹은 서로의 조합에 의해 거의 모든 병원균을 인식할 수 있다<sup>5)</sup>.

면역조절에 관여하는 대부분의 T 세포는 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF-

\* 교신저자 : 박 현, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학  
윤용갑, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학  
· E-mail : hyunpk@wonkwang.ac.kr, yunyg@wonkwang.ac.kr  
· Tel : 063-850-6768, 063-850-6834  
· 접수 : 2007/12/06 · 채택 : 2008/01/15

을 분비하는 Th1 type과 IL-4, IL-6 등을 분비하는 Th2 type이 있다. T 세포에서 분비되는 이런 사이토카인은 세포성 면역반응의 실행단계에서 작용을 나타내며, 면역 세포와 염증계간의 신호 전달 과정에서도 중요한 역할을 한다<sup>6,7)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 Th1세포로부터 생성되는 cytokine으로 단핵구 및 다른 형태의 세포를 자극하여 백혈구의 보충에 중요한 역할을 하는 chemokine을 분비토록 하며, 염증성 백혈구를 활성화시켜 미생물을 죽이도록 한다<sup>8)</sup>.

IFN- $\gamma$ 는 T 세포에 작용하여 Th1세포의 분화를 촉진시킴과 동시에 Th2세포의 증식을 억제한다<sup>9)</sup>. IFN- $\gamma$ 는 type II interferon이라고 하며 CD4 T 세포나 CD8 T 세포에 의해 만들어져 면역 반응을 조절하기 때문에 immune interferon이라고 부른다. IFN- $\gamma$ 는 T세포, B세포, neutrophils, NK cell, vascular endothelial 세포에 작용하여 그들을 활성화시킬 수 있으며 macrophage activating factor로 작용하여 MHC class I, II 발현을 증가시키기도 한다<sup>10)</sup>.

이에 저자들은 천초 추출물을 가지고 선천 면역과 후천 면역에 관계되는 여러 가지 인자를 연구의 대상으로 하여 실험하였다. 대식세포를 이용하여 inflammatory mediator의 생산, CD86, TLR4와 CD14 발현을 관찰하고 splenocyte를 이용하여 세포 증식과 Th1 cytokine 생성에 관한 연구를 통하여 천초의 면역 조절 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 조제

한국식물추출물은행으로부터 전통적인 생약추출 방법인 약탕기를 사용하여 추출한 후 여과하여 건조 시킨 생약시료를 분양 받아 실험에 이용하였다. 천초를 자연 건조시킨 후 잘게 세절하여, 건조된 천초 1 kg에 증류수 2 L를 가하여 70°C에서 가열추출을 3회 행한 후, 여과하고 가압 농축하여 동결건조 한 후 천초 추출물 3 g을 수득하였다.

### 2. Mouse splenocytes 와 macrophages 준비

C57BL/6 마우스로부터 spleen을분리하여micro slide glass로 잘개 으갠 뒤, 0.4  $\mu$ m nylon cell strainer로 여과하였다. 1200rpm에서 10분간 원심분리 한 후 증류수를 이용하여 적혈구를 파괴하였다. Splenocyte를 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell수를 측정하였다. C57BL/6 마우스 복강에 3% thioglycollate를 주입하고, 4일 뒤 경추 탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 PBS를 넣어 peritoneal macrophage를 분리하였다. 분리된 macrophage는 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후cell 수를 측정하였다.

### 3. Nitric oxide 측정

peritoneal macrophage를 96 웰 마이크로 플레이트에 웰 당  $4 \times 10^5$ 씩 분주한 후 50  $\mu$ g/ml 또는 100  $\mu$ g/ml의 천초 추출물을 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 후에 상층액을 취하여 Griess reagent를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 nitric

oxide의 농도를 구한다.

### 4. TNF- $\alpha$ 측정

peritoneal macrophage와 splenocytes를 96 웰 마이크로 플레이트에 웰 당  $4 \times 10^5$  cells씩 분주한 후 50  $\mu$ g/ml 또는 100  $\mu$ g/ml의 천초 추출물을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 처리하였다. LPS는 대조군으로 1  $\mu$ g/ml을 처리하였다. 상층액을 취하여 sandwich ELISA 방법으로 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하였다.

### 5. FACS 측정

세포에  $1 \times 10^6$ 에 non-specific binding을 피하기 위해 Fc-blocker를 4°C에서 30분간 처리하고 세척을 하였다. Monoclonal antibody, isotype-matched control로 ice에서 30분간 staining을 하였다. Staining된 세포는 FITC anti-mouse CD86, PE anti-mouse TLR4, PE-anti-mouse CD14로 staining을 한 후, FACS Cabilibur (Becton-Dickinson)으로 분석을 하였다.

### 6. 마우스 splenocyte의 증식에 미치는 효과

마우스로부터 spleen을 취하여 fractionation하지 않은 splenocyte를 분리한 다음 96 웰 마이크로 플레이트에  $1 \times 10^6$  세포를 분주한다. 천초 추출물 50  $\mu$ g/ml을 24시간 동안 Con A 없이 혹은 Con A를 넣은 다음 mouse splenocyte의 증식을 MTS assay를 통해 조사해 보았다

## 결 과

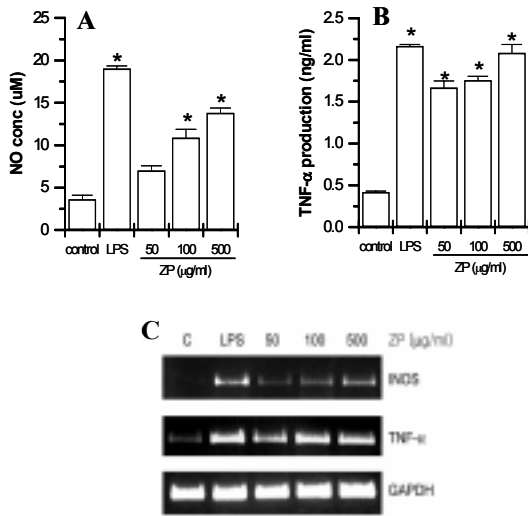
### 1. 천초 추출물이 NO 및 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 효과

천초 추출물의 면역 조절 효과를 알아보기 위해 Raw 264.7 세포에서 NO 와 염증 매개 물질(inflammatory mediator)인 TNF- $\alpha$  생성을 측정하였다. Raw 264.7 세포에 천초 추출물 50, 100, 500  $\mu$ g/ml과 positive control로서 LPS 1  $\mu$ g/ml을 24시간 처리한 후 Griess 방법과 ELISA 방법으로 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 각각 측정된 결과 LPS 처리군과 비슷한 양상으로 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1A, B). 천초 500  $\mu$ g/ml에서 가장 많이 분비되는 것을 관찰 하였다. 또한 실험에 사용된 농도의 범위에서 세포 독성은 보이지 않았다.

### 2. 천초 추출물이 CD86, CD14와 TLR4 발현에 미치는 효과

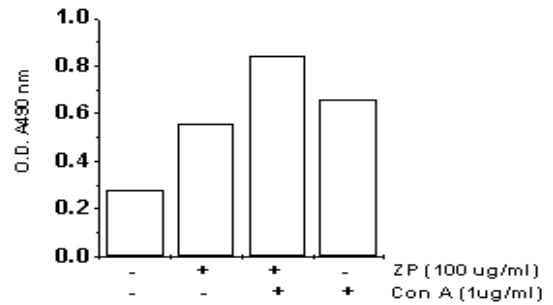
TLR4는 non-self를 인식하는 수용체로 작용하며 선천성 및 후천성 면역 세포의 면역 반응을 활성화시킴으로써 생체를 감염으로부터 방어하는 리셉터로 알려져 있다. 본 연구에서는 천초 추출물이 세포 표면 마커인 CD86과 CD14, TLR4 발현에 영향을 미치는지 알아보았다. C57BL/6 마우스로부터 대식세포를 분리하여  $1 \times 10^6$  세포에 100  $\mu$ g/ml 천초 추출물과 TLR4의 리간드로 알려진 LPS를 24시간 처리한 뒤 flow cytometry를 이용하여 발현 정도를 측정하였다. 세포표면 마커인 CD86 그리고 LPS와 LBP 복합체의 공동 수용체인 TLR4와 CD14의 발현이 천초를 처리하지 않은 군에 비해 증가하는 것을 관찰하였고 또한 그 양상은

LPS와 유사하였다(Fig. 2).



**Fig. 1.** Effect of ZP in NO and TNF- $\alpha$  production and mRNA expression. RAW 264.7 cells were treated with LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or 50, 100, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ZP and then incubated. After 24h of culture, NO (A) and TNF- $\alpha$  (B) production were measured by the Griess method and ELISA respectively. Total RNA was prepared and RT-PCR was performed (C). The PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. These experiments were repeated three times and similar results were driven. GAPDH was used as an internal control. The data represent the mean  $\pm$  S.E. for three determinations. \* $p < 0.05$ ; significantly different from the untreated value.

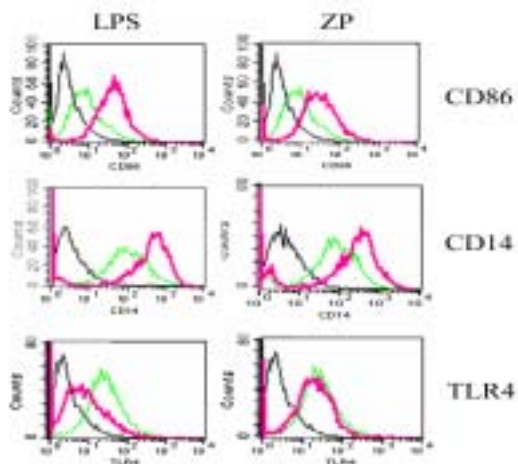
마우스로부터 분리한 splenocytes( $1 \times 10^6$  cells/well)에 천초 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 24시간 동안 천초 단독 또는 Con A와 함께 처리하였을 때 mouse splenocyte의 증식을 MTS assay를 통해 조사해 보았다. 천초 Con A와 함께 처리하였을 때뿐만 아니라 추출물 단독처리했을 때에도 모두 세포증식을 증가시켰음을 확인하였다(Fig. 3).



**Fig. 3** Effect of ZP on proliferation of splenocytes. Isolated splenocytes ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) from C57BL/6N mice were cultured with ZP at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere for 24hr. Proliferation of splenocytes was performed by MTS assay.

4. 천초 추출물이 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 효과

C57BL/6 마우스로부터 분리한 splenocyte에 천초 추출물 또는 Con A를 처리하고 24시간 후에 상층액에서 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$  생성을 측정하였다. IFN- $\gamma$  생성은 천초 추출물 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 Con A 보다 많이 증가하였고, TNF- $\alpha$  생성은 천초 추출물 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 control에 비해 10-12배 정도 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A, B).



**Fig. 2.** Effect of ZP on the expression of CD86, CD14 and TLR4 in PM. PM wastreated for 24h at  $37^\circ\text{C}$  with LPS (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or ZP (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After washing,  $1 \times 10^6$  cells/tube, cells were stained for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  with FITC-labeled monoclonal antibodies to CD86 and PE-labeled monoclonal antibodies to TLR-4 and CD14 (unstained control (green lines), antibody stained control (red lines)). These cells were also stained with isotype-matched control antibody (black lines). The expression levels of cell surface molecules were determined using FACS analysis. Data are representative of at least three independent experiments.

3. 천초 추출물이 세포 증식에 미치는 효과

천초 추출물이 세포 증식에 영향을 주는지 알아보기 위해,

**Fig. 4.** Effect of ZP on IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in splenocytes. Culture supernatant was collected from none and Con A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or ZP (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated splenocytes, which are culture 24h. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  level in culture supernatant was measured using ELISA.

고찰 및 결론

본 연구에서는 선천 면역과 후천 면역에 관여하는 인자를 중심으로 천초 추출물의 면역 조절 효과를 대식세포와 splenocyte를 이용하여 확인하였다. 천초 추출물은 NO, TNF- $\alpha$  생성과 CD86 그리고 TLR4, CD14의 발현을 증가시켰다. 또한 splenocyte의 증식과 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 생성을 증가시켰다. 지금까지 현존하는 모든 생물체들은 자기와 생물학적으로 구별되는 비자기 감염원과의 끊임없는 상호작용을 통하여

자신을 감염원으로부터 방어할 수 있는 면역체계를 발전시켜왔다. 자연 면역 반응에 관여하는 중요한 면역 세포는 대식세포다. 대식세포는 항바이러스 효과뿐만 아니라 항암 작용도 가지고 있다. 이러한 항암작용은 대식세포가 활성화 단계를 거쳐 여러 가지 기능이 변화되면서 암세포를 죽일 수 있는 fully activated macrophage 상태로 전환되어서 나타난다<sup>11)</sup>. 활성화된 대식세포는 다양한 염증성 매개물질과 사이토카인을 분비하게 된다. 그 중에서 NO는 대식세포의 항 미생물작용과 항암 작용의 중요한 매개물 이라는 사실이 밝혀졌다. 암세포 사멸에 관한 최초의 발견은 암세포와 대식세포를 함께 배양했을 때 대식세포를 자극함으로써 암세포가 사멸되는 현상을 통해 밝혀 졌다<sup>12)</sup>. NO는 유도성 산화질소 합성 효소로부터 guanine nitrogen을 이용해 합성되며 생체내에서 강력한 활성을 나타내며 생체 방어에 대단히 중요한 인자이다. 따라서 천초가 직접적으로 대식세포를 활성화시키는 지 알아보기 위하여, 대식세포로부터 분비되는 중요한 매개물질인 NO와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 먼저 측정 한 결과, positive control로 사용한 LPS와 유사한 양상으로 NO, TNF- $\alpha$  생성량을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 1A, B). NO는 macrophage가 분비하는 세포 독성물질로<sup>13)</sup>, TNF- $\alpha$ 는 LPS에 의해 자극된 macrophage에서 분비되는 항암작용 cytokine으로 잘 알려져 있기 때문에<sup>14)</sup>, 이와 같이 천초에 의한 NO 와 TNF- $\alpha$ 의 생성 증가는 macrophage 활성화를 통한 선천 면역 반응에 관여함을 나타낸다. TLR은 박테리아, 곰팡이에서 유래한 pathogen-associated molecular patten을 인식하는 수용체이다. TLR4는 LPS 수용체로 LPS와 결합하여 염증성 세포활성물질의 분비를 자극한다. 즉, TLR4, MD2, CD14로 구성된 수용체 복합체는 LPS를 인식하여 숙주세포에 위험신호를 보내고 면역 반응을 시작한다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 천초는 LPS와 유사하게 TLR4와 co-receptor인 CD14의 발현을 증가시킴을 확인했다(Fig. 2).

세포매개 면역 중 T세포는 면역계 중 가장 중요한 부분을 차지하고 있으며 외부로부터 침입하는 바이러스, 박테리아, 기생충에 대해 저항력을 가지고 대항할 수 있도록 한다. T 세포는 항체를 생산하는 B세포에 작용하여 항체를 만들도록 하며, 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키기도 하고 cytotoxic T cell에 작용하여 그들을 활성화시킨다. Th1 세포로부터 분비되는 사이토카인 중에 TNF- $\alpha$ 는 IFN- $\gamma$ 에 의해 생성이 증가하며, 또한 IFN- $\gamma$ 에 의해 유도된 NO의 생성을 증폭시킴으로써 auto-crine signal로서 작용을 한다. 본 연구에서는 splenocyte를 이용하여 천초 추출물이 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시킴을 확인하였다.

또한 splenocyte를 이용하여 천초 추출물 단독처리 하였을 때 또는 Con A와 같이 처리하였을 때 모두에서 세포의 증식을 증가시켰다. 이러한 결과는 천초에 의한 세포의 증식이 Th1 사이토카인의 생성을 증가시킴으로써 적응면역 반응에 관여하고 있음을 제시해 주고 있다.

이 연구를 통해 천초 추출물은 면역 조절제로서 동물을 비롯한 사람에게도 면역 증강을 유도 할 수 있는 가능성을 시사하며 인 수 공통감염 모델에의 적용에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부 (교육인적 자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2007-359-E00011). 또한 산업자원부 지방기술혁신사업(RIT05-03-02)지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Janeway, C.J., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216, 2002.
2. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296: 301-305, 2002.
3. Nacy, C.A., Meltzer, M.S. T-cell-mediated activation of macrophages, *Curr. Opin. Immunol.* 3(3):330-335, 1991.
4. Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A., Yamazaki, S. Secretino of TNF- $\alpha$ , IL-8 and Nitric oxide by Macrophages Activated with *Aguricus blazei* Murill Fractions in vitro. *Cell structure and function* 26(2):103-108, 2001.
5. Akira, S. and Takeda, K. Toll-like receptor signaling. *Nature Rev. Immunol.* 4: 499-511, 2004.
6. Khayyamian, S., Hutloff, A., Buchner, K., Grafe, M., Henn, V., Kroczek, R.A., Mages, H.W. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 6198-6203, 2002.
7. Marzo, A.L., Vezys, V., Williams, K., Tough, D.F., Lefrancois, L. Tissue-level regulation of Th1 and Th2 primary and memory CD4 T cells in response to listeria infection. *J Immunol.* 168: 4504-4510, 2002.
8. Kimer, A.K., Vollmar, A.M. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis.* 60: 68-70, 2001.
9. Chang, T.T., Stevens, S.R. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferon-gamma therapy. *Am J Clin Dermatol.* 3: 175-183, 2002.
10. Kim, K.A., Kim, S., Chang, I., Kim, G.S., Min, Y.K., Lee, M.K., Kim, K.W., Lee, M.S. IFN gamma/TNF alpha synergism in MHC class II induction: effect of nicotinamide on MHC class II expression but not on islet-cell apoptosis. *Diabetologia.* 45: 385-393, 2002.
11. Adams, D.O., Hamilton, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 2: 283-318, 1984.
12. Jeong, H.J., Koo, H.N., Oh, E.Y., Chae, H.J., Kim, H.R., Suh, S.B., Kim, C.H., Cho, K.H., Park, B.R., Park, S.T., Lee, Y.M., Kim, H.M. Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor-kappaB

- activation. *Int J Immunopharmacol.* 22: 923-933, 2000.
13. Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 157: 87-94, 1988.
14. Mavrier, P., Edgington, T.S. Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism. *J Immunol.* 132: 1980-1986, 1984.
15. Fitzgerald K.A., Palsson-McDermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* 413: 78-83, 2001.