

# 국내산 백화사설초 전초 및 뿌리 메타놀층의 면역조절 효과

이은옥 · 이연희 · 백남인<sup>1</sup> · 안규석<sup>2</sup> · 김성훈\*

경희대학교 동서의학대학원 중앙학 실험실, 1: 경희대학교 생명공학연구원, 2: 경희대학교 한의과대학

## Immunomodulatory Effect of Methanol Extracts of Korean Oldenlandiae Herba and Radix

Eun Ok Lee, Yun Hee Rhee, Nam In Baek<sup>1</sup>, Kyoo Seok Ahn<sup>2</sup>, Sung Hoon Kim\*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University  
1: School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University  
2: College of Oriental Medicine, Kyunghee University

For the evaluation of immunomodulatory effect of Korean Oldenlandiae Herb (OH) and Radix (OR), our experiment was performed with methanol extracts of Korean Oldenlandiae Herba and Radix. After administration of methanol extracts of Korean OH and OR for 7 days, Balb/C mice were immunized with sheep red blood cells. Four days later, splenic leukocytes were isolated and immunological experiments were performed. Rosette forming cells and plaque forming cells were significantly increased in Korean OH and OR treated mice compared with PBS treated control. Korean OH and OR also enhanced T and B lymphocytes, macrophage and natural killer cells by flowcytometric analysis. LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were increased by OH and OR compared with untreated control. These results suggest that Korean OH and OR have immunomodulatory activity through regulation of cell-mediated immune and humoral immune response.

Key words : Korean Oldenlandia diffusa, Herba, Radix, immunology, cytokine

### 서 론

백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 백운풀 [Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxb. (=Hedyotis diffusa Willd.)]의 전초로서 꽃의 빛깔이 희고 잎 모양이 뱀의 혀를 닮았다 해서 붙여진 이름이며, 중국의 북건성이 원산지이지만 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 있고, 최근 진주에서 재배하고 있다<sup>1,2)</sup>. 항균, 淸熱, 祛瘀, 해독작용<sup>3,5)</sup> 등의 약리작용을 갖고 있으며, 염증질환이나, 간암, 직장암, 위암 등의 각종 암질환 치료제<sup>3,5)</sup>로 최근 중국에서 널리 연구되는 약초이다. 또한 여러 가지 암주에 대해 항종양효과가 있다고 보고되고 있으며<sup>6,7)</sup> 백화사설초의 항암 물질 연구가 많이 이뤄지고 있다<sup>7,8)</sup>.

그러나 면역반응의 항체 생성 증가<sup>9)</sup> 효과외에는 면역작용에

관한 연구가 많지 않으며, 대부분이 중국산 백화사설초 전초를 이용한 연구가 주이며, 더욱 백화사설초의 뿌리에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않았다.

면역이란 신체가 자기(self)와 비자기(nonself)를 구별하는 능력으로, 조직이나 기관에 손상을 줄 수 있는 모든 병원체나 독소에 저항할 수 있는 신체의 능력을 일컫는다<sup>10)</sup>. 면역반응은 외부에서 들어오는 물질에 대해서 나타나 그들을 제거하며, 효과적으로 제거하지 못하면 질병을 일으킬 수 있다<sup>10,11)</sup>. 면역반응에는 세균, 바이러스 등 항원이 체내에 들어왔을 때 그 항원을 분해, 제거하기 위해 B림프구에서 항체를 만들어내는 체액성 면역과 (humoral immunity) B림프구의 항체생성을 돕거나 직접 세균과 바이러스를 살해하는 T림프구에 의한 세포성면역(cell-mediated immunity)이 있다<sup>12)</sup>.

본 연구는 향후 WTO에 대비하여 한국산 백화사설초의 활용도를 높이고 재배를 촉진하기 위하여, 한국산 백화사설초의 전

\* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인 기령읍 서천리 449-701, 경희대학교  
· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2199  
· 접수 : 2004/01/05 · 수정 : 2004/02/16 · 채택 : 2004/03/22

초와 뿌리 메타놀층을 이용하여 세포성면역, 체액성 면역, 비특이적 면역 및 cytokine 등에 미치는 영향을 검토하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 추출

국내산 백화사설초 전초와 뿌리는 진주의 대도농산에서 공급받았으며 각각 powder 1 kg씩을 상온에서 100 % 메탄올 10 L에 담가 3회 추출하였으며, 추출물은 filter paper로 여과하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하여 분말 (Yield : 전초-3.65 %, 뿌리-0.84 %)을 얻었다.

### 2. 동물

동물은 체중이 20-25인 6주령의 수컷 Balb/C 생쥐를 대한실험동물센터로부터 공급받아 실험당일까지 고품사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2 °C, 습도 60±5 %, 12시간의 밤/낮 cycle을 유지하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다

### 3. 검액의 투여

각각의 검액을 1일 1회 7일간 경구투여하였다. 대조군에는 약물을 녹이는데 사용한 PBS buffer(pH 7.2)를 경구투여하였다.

### 4. 항원<sup>13-15)</sup>

항원으로 사용된 면양적혈구(sheep red blood cell)는 한국배지(Korea Media Co.)로부터 구입하여 사용하였다. 면양적혈구는 PBS를 가하여 적적 수로 조정하거나 희석하여 사용하며, 4 °C에서 보존하고, 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다.

### 5. 면역<sup>13-15)</sup>

검액을 7일간 경구투여한 후 실험군과 대조군의 복강내에 1×10<sup>9</sup> cells/ml의 농도로 조정된 면양적혈구 부유액을 0.2 ml 주사하여 면역시켰다.

### 6. 비장 임파구 현탁액 조제

면역 실시 4일 후 동물을 처사시키고 비장을 적출하여 cell strainer (70 mesh, sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄하였다. PBS로 2회 세척하고 0.83 % NH<sub>4</sub>Cl 용액을 넣고 5분간 반응시켜 적혈구를 용혈시켰다. 다시 2회 세척하고 배지나 PBS로 부유하여 임파구 현탁액을 조제하였다.

### 7. Rosette forming cell assay

Rosette forming cell assay는 Bach<sup>16)</sup>의 방법에 준하여 실험하였다. Spleen cell을 3×10<sup>6</sup> cells/ml로 PBS에 희석하고 면양적혈구도 PBS로 2번 이상 세척하여 3×10<sup>8</sup> cells/ml로 맞추어 놓았다. Plastic tube에 각각 500 μl 씩 섞고 혼합한 다음 800 rpm

에서 3분간 원심 분리하고 4 °C에서 24시간 incubation 하였다. 0.3 % methylene blue로 염색하고 hematocytometer에 넣고 spleen에 면양적혈구가 4 배 이상 binding 한 forming cell만 계산 하였다.

### 8. Plaque forming cell assay

용혈반 형성 세포수(Plaque forming cell)는 Bacon<sup>17)</sup>의 방법에 준하여 실험하였다. Spleen cell을 5×10<sup>6</sup> cells/ml로 PBS에 희석하고 면양적혈구는 4×10<sup>9</sup> cells/ml로 만들었다. Guinea pig complement (Gibco) 100 μl 와 면양적혈구 200 μl를 혼합하여 ice에서 30분간 방치한 혼합액에 비장 부유액 1 ml을 가하고 slide glass와 cover glass 사이에 이 혼합액 200 μl를 주입한 뒤 37 °C에서 1시간 이상 incubation 한 후 생성된 plaque 수를 count 하였다.

### 9. Flow cytometric analysis

0.2 % BSA solution에 비장세포를 부유시킨 후 FITC conjugated된 항체(CD3, CD4, Mac) 희석액 100 μl을 가하여 10분간 얼음에서 반응시켰다. 다시 PE-conjugated된 항체(CD19, CD8, NK) 희석액을 가하여 얼음에서 30분간 더 반응시켰다. 면역형광염색이 완료된 세포들을 마지막 세척 뒤 500 μl의 완충액에 부유시켜 FACScan(Becton Dickinson, Germany)을 이용하여 분석하였다. Data분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte영역 및 lymphoblast영역을 구분하여 비율(gated, %)로 산출하였다.

### 10. Cytokine assay

비장 임파구 현탁액에 lipopolysaccharide(LPS, 2 μg/ml, Sigma)을 처리하여 배양 후 4, 8, 16, 24시간에 soup을 모아 cytokine을 정량하였다. Tumor necrosis factor(TNF-α, cat# 551502)와 interleukin-6(IL-6, cat# 550950) 측정은 Becton Dickinson 사의 Mouse ELISA kit를 사용하였으며 manufacturer protocol에 의해 실시 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 11. 통계처리

모든 데이터는 Mean ± SE로 표시하였고, Student's t test로 대조군과 비교하여 p value 를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Rosette forming cell 형성에 미치는 영향

림프구와 적혈구를 섞으면 T세포의 표면에 존재하는 glycoprotein인 CD2<sup>18)</sup>와 적혈구가 부착하여 rosette을 형성한다. 이러한 원리를 이용하여 마우스에 면양 적혈구로 면역시킨 뒤, 7일간 시료를 투여한 후 비장세포를 분리하여 세포부유액을 조제하였다. 이들에 면양적혈구를 혼합시켜 재부유한 후 rosette 형성을 관찰한 결과는 Table 1과 같다. Rosette forming cell 형성에서는 대조

군이  $58 \pm 5.56$  인 데 비해 국내산 전초, 국내산 뿌리 모두 유의적으로 증가하였다. 특히 국내산 뿌리  $50 \text{ mg/mouse}$ 를 투여한 경우  $80.2 \pm 5.52$ 로 가장 효과적인 결과를 보였다. 이는 국내산 백화사설초 전초와 뿌리 모두 T림프구에 의한 세포성 면역(cell-mediated immunity)반응을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Effects of Korean Oldenlandia diffusa on Rosette Forming Cells response in the spleen of Balb/C mice immunized with sheep red blood cells

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	$10^3\text{RFC}/10^6$ spleen cells
Normal	10	0	$52 \pm 1.2^a$
Control	10	0	$58 \pm 5.56$
Herba	9	25	$72.3 \pm 3.32^{**}$
	9	50	$75.2 \pm 4.45^{**}$
Radix	10	25	$76.5 \pm 3.68^{**}$
	8	50	$80.2 \pm 5.52^{**}$

a : Mean  $\pm$  SE, \*\*: Statistically significant value compared with control data.  $p < 0.01$ .

2. 용혈반 세포 형성에 미치는 영향

면양의 적혈구로 면역시킨 마우스의 비장세포를 면역적혈구와 보체를 혼합하여 배양하게 되면 항체생산세포는 면역글로블린을 방출하게 되며, 방출된 면역글로블린은 주위의 적혈구에 결합하게 된다. 여기에 보체가 결합하면 항체가 붙은 적혈구는 용해되고 용혈반(Plaque forming cell)이 형성하게 된다. 이러한 원리를 이용하여 시료를 동물에 7일 동안 투여한 후 비장을 적출하여 이들이 항체생성에 미치는 영향을 실험한 결과 국내산 백화사설초 뿌리, 전초의 순으로 유의하게 용혈반 형성 세포를 증가시켰다(Table 2). 특히 국내산 뿌리의 경우 대조군에 비해 1.8배에 가까운 용혈반 세포형성을 증가시켜 가장 효과적임을 나타내었다. 용혈반 형성 세포가 항체를 생성하는 세포수와 비례적인 관계이므로<sup>19)</sup> 국내산 백화사설초는 마우스에서 B림프구의 항체생성을 통한 체액성 면역(humoral immunity)반응을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Effects of Korean Oldenlandia diffusa on Plaque Forming Cells response in the spleen of Balb/C mice immunized with sheep red blood cells

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	PFC/ $10^6$ spleen cells
Normal	10	0	$138 \pm 22.3^a$
Control	10	0	$142.4 \pm 31.2$
Herba	9	25	$211.5 \pm 30.2^*$
	9	50	$221.3 \pm 28.4^*$
Radix	10	25	$236.2 \pm 21.9^*$
	8	50	$257.6 \pm 23.2^*$

a : Mean  $\pm$  SE, \*\*: Statistically significant value compared with control data.  $p < 0.05$ .

3. 림프구 활성화에 미치는 영향

면양의 적혈구로 면역시킨 마우스의 비장에서 세포를 분리하여 면역반응에 관여하는 림프구의 활성을 살펴보기 위해 각각의 항체를 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. CD3는 T림프구, CD19은 B림프구, CD4는 T림프구 중 helper T림프구, CD8은 cytotoxic T림프구, Mac은 마크로파지, NK은 Natural killer cell의 항체이다<sup>20)</sup>. 분석결과 국내산 전초나 뿌리에서 T림프구, B

림프구, T림프구 중 helper T림프구와 cytotoxic T림프구 모두 대조군에 비해 현저히 증가시켰다. 또한 마크로파지와 Natural killer cell도 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다(Table 3). 이는 국내산 백화사설초 전초와 뿌리 모두 신체내에서 일어날 수 있는 모든 면역계에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of Korean Oldenlandia diffusa on portion of lymphocyte in the spleen of Balb/C mice immunized with sheep red blood cells

Samples	Dasage (mg/mouse)	CD3	CD19	CD4	CD8	Mac	NK
Normal	0	$5.2 \pm 0.1^a$	$0.8 \pm 0.1$	$4.8 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.2$
Control	0	$7.9 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.1$	$6.1 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.1$
Herba	25	$51.2 \pm 0.1$	$11.2 \pm 0.1$	$48.9 \pm 0.3$	$21.3 \pm 0.3$	$5.8 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$
	50	$60.2 \pm 0.1$	$12.2 \pm 0.3$	$58.1 \pm 0.3$	$22.2 \pm 0.3$	$4.8 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.2$
Radix	25	$58.8 \pm 0.1$	$9.8 \pm 0.2$	$55.7 \pm 0.1$	$21.5 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.2$
	50	$65.5 \pm 0.1$	$12.2 \pm 0.3$	$64.2 \pm 0.1$	$25.6 \pm 0.2$	$5.2 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.1$

a : Mean  $\pm$  SE,

4. Cytokine분비에 미치는 영향

면양의 적혈구로 면역시킨 마우스의 비장에서 세포를 분리하여 비장 임파구 현탁액에 LPS( $2 \mu\text{g/ml}$ , Sigma)을 처리하여 배양 후 soup을 모아 cytokine을 정량하였다. LPS로 면역력을 약화시키거나 염증상태를 인공적으로 유발시키면 마크로파지는 활성화되고 활성화된 마크로파지는 면역활성 조절물질로 TNF- $\alpha$ , IL-1와 IL-6를 분비한다<sup>21-22)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 면역반응에 관여하는 백혈구가 혈관내피세포에 부착을 촉진하며 백혈구의 미생물 살해능력을 증가시켜 식작용을 유도하며, 여러 가지 cytokine생성에 작용하여 효과적인 염증반응을 촉진시킨다. 그러나 과량의 TNF- $\alpha$ 는 조직을 손상시키거나 혈구응집을 유도하거나 체온상승도 유발할 수 있다<sup>23)</sup>. IL-6는 B림프구와 T림프구의 증식과 분화를 촉진시키며 B림프구 분화의 마지막 단계에 작용하여 항원에 대한 immunoglobulin의 생산을 증가시키는 면역활성물질이다<sup>24)</sup>. 국내산 전초와 뿌리 모두 어느 농도에서나 8시간에서 가장 높은 TNF- $\alpha$  activity를 보이다가 감소하는 추세를 보이고 있으며, 뿌리 보다는 전초에서 강한 활성을 나타내었다(Fig. 1).

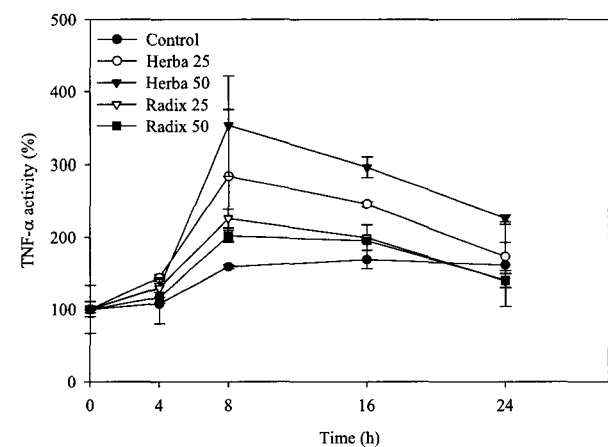


Fig. 1. Effects of Korean Oldenlandia diffusa on TNF- $\alpha$  activity in the spleen of Balb/C mice immunized with sheep red blood cells. All data are presented Mean  $\pm$  SE.

IL-6의 경우는 국내산 전초와 뿌리는 400 % 가까이 활성이 증가함으로써 interleukin 반응에 영향을 끼치고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이로써 국내산 백화사설초 전초와 뿌리 모두 TNF- $\alpha$ 와 IL-6활성에 영향을 줌으로써 면역반응을 활성화시킴을 확인할 수 있었다.

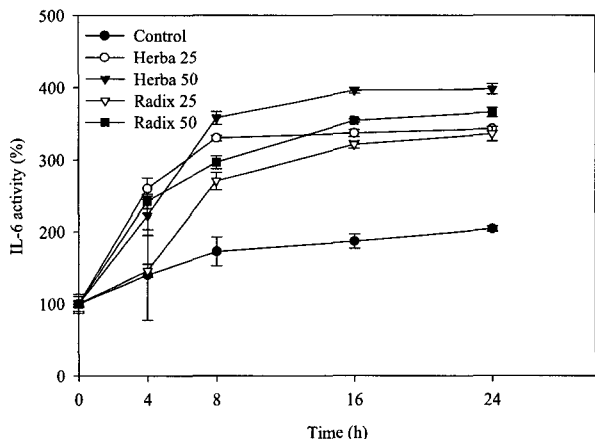


Fig. 2. Effects of Korean *Oldenlandia diffusa* on IL-6 activity in the spleen of Balb/C mice immunized with sheep red blood cells. All data are presented Mean  $\pm$  SE.

## 결론

국내산 백화사설초의 활성을 평가하여 향후 국산 백화사설초의 활용도를 증대하기 위한 일호나으로 국산 백화사설초 전초와 뿌리 메타놀층이 면역적혈구로 면역시킨 Balb/C mice에서 나타나는 면역반응에 미치는 효과를 평가하였다. 국내산 전초, 국내산 뿌리 모두 유의적으로 마우스의 비장에서 세포를 분리하여 rosette 형성과 용혈반(Plaque forming cell) 형성을 증가시켰다. 이는 국산 백화사설초가 세포성 및 체액성 면역 조절 효과가 있음을 시사한다. 또한 면역세포 유형분석에서도 국내산 전초, 국내산 뿌리가 모두 T림프구인 CD3, B림프구인 CD19, helper T림프구인 CD4, cytotoxic T림프구 CD8이 증가하는 것으로도 확인할 수 있었다. 또한 마크로파지의 활성 증가로 면역활성 조절 물질인 TNF- $\alpha$ 가 국내산 전초와 뿌리 모두 어느 농도에서나 8시간에서 가장 높은 TNF- $\alpha$  activity를 보였으며, IL-6 국내산 전초와 뿌리는 400 % 가까이 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 국내산 백화사설초의 전초와 뿌리 모두 외부침입에 의한 방어기작으로 면역반응을 조절하는 효능을 가짐을 시사하는 내용이며, 특히 백화사설초의 뿌리도 전초와 같이 유사한 효능을 보인 점이 특이하다. 그러나 국산 백화사설초의 면역조절 물질을 전초와 뿌리에서 분리하여 작용기전 연구의 필요성이 제기된다.

## 감사의 글

이 논문은 농림기술관리센터의 생명공학분야 연구지원에 의해 수행되었는 바 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 신민교, 원색임상본초학, p.688, 영림사, 서울, 1968.
2. 이창복, 대한식물도감, p.693, 향문사, 서울, 1982.
3. 신문풍출판공사, 중약대사전, p.654, 신문풍출판공사, 대북, 1971.
4. 이상인의 5인, 한약임상응용, p.133, 성보사, 서울, 1986.
5. 신재용, 녹차와 약차, p.323, 동화문화사, 서울, 1991
6. 구명, 서홍화, 이연분, 낙화생, 향종루본초도보, p.20, 상무, 인서관, 1990.
7. 김성훈. 백화사설초로부터 분리된 항암성물질에 관한 연구, 대전대학교 한의학연구소, 한의학논문집, 273-297, 1996.
8. 김영희, 백화사설초의 성분에 관한 연구, 한국약용작물학회, 한국약물작물학회지, 31(2) : 91-95, 1995.
9. 조규형, 묘약기방, p.53, 법진문화사, 서울, 1984.
10. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. p.3, p.468, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.
11. Sherman, A.R., Hallquist, N.A. 임상 영양 특집호 : 면역. 한국영양학회지 25(4), 287-306, 1992.
12. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. p.19, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.
13. Biozzi, G et al, Akinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes, Immunology, 14 : 7-20, 1968.
14. Miller, TE, et al, Immunopotential with BCG II, modulation of the response to sheep red blood cells, J. Nat. Cancer Inst., 51 : 1669, 1973.
15. Mitsuoka, A. et al, Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes: evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction, Immunology, 34 : 363-370, 1978.
16. Bach, JF et al, Antigen recognition by T-lymphocytes I, thymus and marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in the mouse cellular. Immunology, 3:1-10, 1972.
17. Bacon, L. D., Heizerling, R. H. Hemolytic-Plaque techniques and antigen-binding lymphocyte assay in method in immunodiagnosis, Rose, N. R. and Bigazzi. P.E. eds, John Willey and Sons, N. Y., pp.45-48, 1980.
18. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. p.115, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.
19. 김병각, 최응철, 정경수, 김혜령, 박희주, 조필형. 한약제제의 면역학적 연구(제1보). 생약학회지, 14(3) : 125-129, 1983.
20. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. pp.500-502, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.

21. Lichtenstein. M., Zimran, A., Horowitz, M. Cytokine mRNA in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 23(3) : 395-401, 1997.
22. Cavaillon, J. M., Catherine, F., Haeffner-Cavaillon, N. Recombination C5a enhance interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.* 20 : 253-25, 1999.
23. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. pp.243-247, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 2000.
24. Suzuki, Y., Rani, S., Liesenfeld, O., Kojima, T., Lim, S., Nguyen, T. A., Dalrymple, S. A., Murray, R., Rernington, J.S. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *J. Infection and Immunity.* 65(6) : 2339-2345, 1997.