

박사학위논문

옷나무추출물의 대식세포
활성 반응 및 항염 효과

지도교수 강 희
 류 재 환

경희대학교 동서의학대학원
동서 의학과

김 보 근

2017 년 2 월

옻나무추출물의 대식세포 활성 반응 및 항염 효과

지도교수 강 희
류 재 환

이 논문을 박사학위논문으로 제출함.

경희대학교 동서의학대학원
동서의학과 한의학전공

김 보 근

2017 년 2 월

김 보 근의 한의학 박사학위논문을 인준함.

주심교수 맹 성 호 (印)

부심교수 최 호 영 (印)

부심교수 류 재 환 (印)

부심교수 양 형 인 (印)

부심교수 강 희 (印)

경희대학교 동서의학대학원

2017 년 2 월

목 차

LIST OF FIGURES -----	iv
초록 -----	v
I. 서론 (INTRODUCTION)-----	1
II. 재료 및 방법 (MATREIALS AND METHODS)-----	4
1) 시료 준비-----	4
2) 동물-----	4
3) 대식세포 분리-----	4
4) LPS 복강투여-----	5
5) 비장세포 분리-----	5
6) 유세포형광분석-----	6
7) 탐식능측정-----	6
8) 세포배양-----	6
9) 사이토카인분석 -----	7
10) 증식능측정-----	7
11) 통계분석-----	8

III. 결과 (RESULTS)-----	9
1. RVS 경구투여 후 마우스 대식세포의 스캐빈저 수용체 발현에 대한 영향-----	9
SRA expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract.-----	11
LOX-1 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract-----	12
CD36 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract-----	13
2. RVS 투여가 복강대식세포의 탐식기능에 미치는 영향-----	14
Effect of oral administration of RVS extract on the functional activity of scavenger receptors-----	15
3. RVS 투여가 복강대식세포의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향-----	16
Effects of oral administration of RVS extract on soluble inflammatory cytokines in macrophages-----	17
4. RVS 투여가 복강대식세포의 costimulatory molecules 및 MHC II 분자 발현에 대한 영향-----	18
Effect of RVS extract on the surface expression of CD86 in activated macrophages-----	19
Effect of RVS extract on the surface expression of CD40 in activated macrophages-----	20
Effect of RVS extract on the surface expression of I-A/I-E in activated macrophages-----	21
5. RVS 투여가 마우스 복강 LPS 자극에 대한 혈액 염증성 사이토카인에 미치는 영향-----	22
Effect of RVS extract on serum inflammatory responses following LPS injection-----	23
6. RVS 투여후 마우스 비장조직의 림프구 변화에 대한 영향-----	24

Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic CD4 and CD8 T cells-----	25
Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic B cells-----	26
7. RVS 투여후 마우스 비장세포의 MHC II 발현에 대한 영향-----	27
Effect of RVS on the surface expression of the MHC II molecules of mouse splenocytes-----	28
8. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 증식능에 대한 영향-----	29
Effects of RVS on the proliferation of splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen-----	30
9. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 CD69 발현에 대한 영향-----	31
Effects of RVS on the activation marker in splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen-	32
10. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 사이토카인 분비에 대한 영향-----	33
Effect of RVS on production of cytokines in activated splenic T cells-----	34
IV. 고찰 (DISCUSSION)-----	35
V. 참고문헌 (REFERENCES)-----	39
VI. Abstract in English-----	43

LIST OF FIGURES

- FIGURE 1. SRA expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract.
- FIGURE 2. LOX-1 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract
- FIGURE 3. CD36 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract
- FIGURE 4. Effect of oral administration of RVS extract on the functional activity of scavenger receptors.
- FIGURE 5. Effects of oral administration of RVS extract on soluble inflammatory cytokines in macrophages.
- FIGURE 6. Effect of RVS extract on the surface expression of CD86 in activated macrophages
- FIGURE 7. Effect of RVS extract on the surface expression of CD40 in activated macrophages
- FIGURE 8. Effect of RVS extract on the surface expression of I-A/I-E in activated macrophages
- FIGURE 9. Effect of RVS extract on serum inflammatory responses following LPS injection
- FIGURE 10. Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic CD4 and CD8 T cells.
- FIGURE 11. Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic B cells.
- FIGURE 12. Effect of RVS on the surface expression of the MHC II molecules of mouse splenocytes.
- FIGURE 13. Effects of RVS on the proliferation of splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen.
- FIGURE 14. Effects of RVS on the activation marker in splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen
- FIGURE 15. Effect of RVS on production of cytokines in activated splenic T cells.

초록(Abstract)

꽃나무(RVS)는 소화를 돕고 어혈을 없애며 체온을 올려 주어 혈액순환을 개선하는 효과가 있는 약재이다. 본 연구에서는 RVS의 경구 투여 후 자연면역계와 적응면역계에 대한 반응을 보고자 한다. RVS를 경구 투여한 다음 대식세포 스캐빈저 수용체와 LPS자극에 대한 대식세포의 염증성 사이토카인, 보조신호인자에 대한 반응과 전신성 염증반응, 비장세포의 T 세포, B 세포의 숫자 변화 및 anti-CD3 antibody에 대한 반응을 측정하였다. RVS를 투여한 쥐에서 SAR의 단백질 발현세포숫자는 증가하였으나, 세포당 발현량은 감소하였고, LOX-1 단백질 발현세포숫자는 감소하였으나, 세포당 발현량은 증가하였으며, CD36은 변화가 없었다. 그러나 농도의존적으로 acetylated-LDL의 탐식능이 증가하였다. LPS자극에 대해 대식세포와 전신혈청면역반응에서 모두 TNF- α 와 IL-6이 감소되었고, CD86는 농도의존적으로 감소했고, CD40의 발현에는 차이가 없었으며, MHC II 분자의 발현은 증가하였다. 또한, RVS의 경구투여군에서 CD4 T 세포의 비율을 증가시켰으나, CD8 T 세포와 B 세포 비율에는 변화가 없었으며, MHC II 의 발현은 감소하였다. Anti-CD3 antibody로 자극했을 때, RVS투여군의 비장 T세포 증식능에 대한 영향은 없었고, CD69의 발현은 감소하였으며, IL-2는 변화가 없었으나, IL-4와 IFN- γ 는 증가하였다.

요컨대, RVS는 대식세포의 탐식능 증가와 항염 효능을 보여주었으며, 비장세포 T 세포의 면역반응에 변화를 주었다. RVS는 자연면역계와 적응면역계에서 모두 면역조절 효과를 보여주었다.

I. 서론

율나무 (*Rhus verniciflua* stokes, RVS)는 율나무과(Anacardiaceae family) ¹ 낙엽 활엽 교목으로 학명은 *Toxicodendron vernicifluum*이며 중국, 티벳, 히말라야 등이 원산지이고 주로 온대지방에 분포한다. 우리나라에는 삼국시대 이전에 전래된 것으로 추정되며 식재, 야생으로 전국에 퍼져서 분포하고 있다. ² RVS는 소화를 돕고 어혈을 없애며 체온을 올려 주어 혈액순환을 개선하는 효과가 있으며, 최근에는 항바이러스, 항류마티스 등의 효과가 기대되고 있다. ³

RVS는 근(根), 근피(根皮) 및 건피(乾皮), 심재(心材), 수지(樹脂), 잎(葉,) 종자 등을 약용으로 사용해왔다.^{4,5} 그 중 RVS의 수지는 생칠(生漆)이라 부른다. 생칠(生漆)의 주성분은 50~80%가 urushiol이며, 이 성분으로 인해 피부염을 유발할 수 있기 때문에 한방에서는 다양한 법제(法製) 방법으로 율의 무독화를 유도하기 위해 노력해 왔다. RVS는 또한 fustin, fisetin, sulferin, butein, garvanzol 등의 flavonoid 외에 다수의 물질이 함유되어 있다. ^{6,7}

RVS는 부위에 따라 효능이 다양하다. 목질부(bark) 의 butein에 의한 antifibrogenic 효과 ⁸, 심재부(heartwood), 가지부(branches)의 garbanzol, sulfuretin, fisetin, protocathechuicacid, fustin 등에 의한 antimutagenic 효과,^{9,10} 가지부(branches), 목질부(bark) 추출물 (extract)의 antioxidant 효과,^{11,12,13,14} 줄기부(stems)의 6-pentadecylsalicylic acid에 의한 antithrombin효과¹⁵, 가지부 에탄올 추출물 (branches ethanol extract)의 세포독성(cytotoxic) 효과⁹, 가지부 에탄올 추출물 (branches ethanol extract)의 항종양(antitumorigenic) 효과^{14,16} 등이 보고되었다.

생물의 면역반응은 외부의 침입에 대해 스스로를 지키기 위한 방어기전으로, 모든 동식물에 존재하는 선천면역(innate immunity)반응과, 척추동물들에 있어 획득된 정보에 의해 후천적으로 반응하게 되는 적응면역(adaptive immunity)이 있다. 선천면역은 병의 원인균,

미생물, 세균 등의 항원에 대한 즉각적인 방어역할을 할 수 있고, 적응면역은 외부 항원 물질에 대해 T세포와 B세포의 메모리 기능을 활용하여 방어할 수 있는 시스템을 구축한다.

대식세포(macrophage)는 선천면역의 최전선에서 면역 반응을 담당한다. 대식세포는 패턴 인지 수용체(pattern recognition receptor, PRR)를 통해 병원균 등을 인지하고 탐식 작용(phagocytosis)을 하는데, 패턴 인지 수용체에는 LPS등의 자극에 의해 IL-6, TNF- α 등 사이토카인과 케모카인 같은 염증매개물질을 분비하거나, CD40, CD86등의 보조신호자극분자(co-stimulatory molecules)에 영향을 주는¹⁷ 톨-유사 수용체(toll-like receptor, TLR)¹⁸ 와 병원균, 박테리아 등을 인식하여 탐식기능을 하는 스캐빈저 수용체(scavenger receptor)가 있으며, 스캐빈저 수용체에는 SRA(scavenger receptor A), LOX-1(lectin-like oxLDL receptor), CD36(cluster of differentiation 36) 등이 있다.¹⁹

적응면역을 구성하는 세포는 골수에서 기원하는 T 세포와 B 세포가 있다. B 세포는 골수에서 성숙되어 항체를 만들어서 체액면역활동을 담당한다. T 세포는 흉선에서 성숙하고 항원 제시를 받은 후 세포를 직접 살해하거나 대식세포를 활성화시키는 사이토카인을 만들어낸다. T 세포는 CD4가 표면에 있는 도움 T세포(helper T cell, Th cell), CD8이 표면에 있는 독성 T세포(cytotoxic T cell, Tc cell)로 나뉜다.

현재까지 RVS의 면역에 대한 연구는 RVS의 일부 플라보노이드 성분²⁰이나, 대식세포에 대한 부분적인 연구²¹에 국한되어 있었다. RVS의 관절염에 대한 효과²², 알레르기 및 접촉성 피부염²³ 등 염증성 질환²⁴에 대한 일부 효과를 확인한 연구가 있지만, RVS 투여 후 자연면역과 적응면역계의 활성화에 미치는 영향 등에 대한 것은 거의 없다.

본 연구에서는 RVS를 경구 투여함으로써 대식세포를 분리하여 RVS가 스캐빈저 수용체의 발현과 탐식기능에 미치는 영향을 알아보았다. 이와 더불어 LPS에 의한 염증모델을 이용하여 대식세포에서의 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6) 등과 CD40, CD86 등의 보조신호자극분자, 구조적 적합 항원 유전자 복합체 II (major

histocompatibility complex II, MHC II) 등의 단백질의 발현을 측정하였다. 이러한 자연면역뿐만 아니라 적응면역 반응에 대한 실험에서 또한 CD4, CD8, T 세포, B 세포, MHC II 등의 발현에 대해 유의한 결과를 얻어 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1) 시료 준비

본 실험에 사용된 RVS는 충청북도 진천에서 10년이상 된 것으로 구입한 것이다. 약재의 일부는 경희대학교 국제캠퍼스 한방면역학 실험실에 보관하였다 (vouch number:2015-RV). Choi et al의 논문에 따라 urushiol을 제거하였다.²⁵ 100g의 말린 시료를 1 L의 증류수에 충분히 잠기도록 하고 2 시간 끓인 후에 여과지로 여과하였다. 진공농축기를 이용하여 여과액을 농축한 후 동결건조 하였으며 수율은 2.25%였다.

2) 동물

동물실험은 경희대학교 동물심의위원회의 승인을 받았으며 (승인번호: KHUASP(SE)-15-012) 사육방법은 US National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (1996)의 지침서를 준수하였다. 본 연구에 사용한 실험용 쥐는 생후 7주령의 BALB/c 수컷 마우스(샘타코, 오산)를 사용하였으며 항온항습 및 specific pathogen free상태에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 이용하였다. 동물은 대조군과 RVS 투여군으로 무작위하게 나누었으며 10일간 200 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도로 1일 1회 경구투여하였다. 대조군은 동량의 물을 공급하였다. 동물실험은 세 종류로 구성되었으며 대식세포 분리용, 복강 lipopolysaccharide (LPS) 투여, 비장세포 분리용으로 나누어 수행하였다.

3) 대식세포 분리

실험 종료 3일 전에 대조군과 RVS 투여군의 마우스 복강에 2 ml의 3.5% thioglycollate

medium (BD, Sparks, MD, USA)를 주사하고 종료일에 마우스를 경추탈골하였다. 복강에서 8 ml의 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Welgene, South Korea)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone)을 주사하여 세포를 수집하였다. 원심분리 후 세포를 배지에 재부유한 후 TC20 Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 세포수를 측정한 후 실험에 사용하였다. 세포배양에 사용되는 실험은 세포를 하룻밤 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에 배양하여 부착되지 않은 세포를 제거한 후 사용하였다.

4) LPS 복강투여

RVS를 투여시작한 지 10일 되는 날에 혈액내 염증성 사이토카인의 변화를 측정하기 위해 1.3 mg/kg의 LPS (serotype 055:B5, Sigma)를 복강에 투여하였다. 1시간 후에 에테르로 마취 후 심장채혈하여 혈액을 분리하였다. 13,000 g, 20분간 원심분리하여 얻은 혈청은 -20°C에 보관한 후 사이토카인 측정에 사용하였다.

5) 비장세포 분리

RVS를 투여시작한 지 10일 되는 날에 마우스 비장을 적출하여 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin가 함유된 RPMI 1640 (Hyclone) 배지로 세척한 후 glass slide의 거친 면을 이용하여 조직을 분쇄하였다. 0.70 µm cell strainer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)로 여과한 세포를 원심분리한 후에 BD PharmLyse lysing buffer (BD Biosciences)를 이용하여 적혈구를 제거하였다. 최종적으로 배지에 세포를 재부유한 후 TC20 Cell Counter를 이용하여 세포수를 측정한 후 실험에 사용하였다.

6) 유세포형광분석

세포 표면의 단백질 발현을 분석하기 위해 1×10^6 개의 세포를 세척버퍼 (0.1% NaN_3 와 1% FBS가 함유된 phosphate buffered saline)로 세척한 후 anti-mouse CD16/CD32 (BD Biosciences)로 4°C에서 5분간 incubation하였다. 이후 형광이 부착된 항체를 4°C에서 30분간 incubation하였다. 사용된 항체는 fluorescein-conjugated anti-mouse SR-AI, PE-conjugated anti-mouse LOX1 (R&D Systems), PE-conjugated CD36, FITC-conjugated anti-mouse CD11b, PE-conjugated anti-mouse CD11b, FITC-conjugated anti-mouse CD40, PE-conjugated anti-mouse CD86, FITC-conjugated anti-mouse CD4, PE-conjugated anti-mouse CD8a, FITC-conjugated anti-mouse CD19, FITC-conjugated anti-mouse IA/IE, PE-conjugated anti-mouse CD69(BD Bioscience)이며 모든 항체에 대해 isotype-matched antibody을 사용하였다. 세포를 2회 세척버퍼로 세척한 후 Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 10,000개 당 염색된 세포를 읽고 Kaluza software로 데이터를 분석하였다.

7) 탐식능 측정

1×10^6 개의 대식세포를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Alexa488-acetylated low density lipoprotein (Molecular Probe, Eugene, OR, USA)으로 4시간 배양한 후 세포를 회수하였다. 유세포형광분석용 세척버퍼로 세척한 후 Navios flow cytometer를 이용하여 10,000개 당 염색된 세포를 읽고 Kaluza software로 데이터를 분석하였다.

8) 세포배양

염증성 사이토카인과 보조신호인자를 측정하기 위한 대식세포 배양에는 3×10^6 개의 세포를 사용하였으며 100 ng/ml LPS로 24시간 배양하였다. 비장에서 분리한 세포는 2×10^6 개의 세포를 사용하였으며 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3 antibody (BD Biosciences)를 24 시간 또는 48

시간 배양하였다.

9) 사이토카인 분석

상등액이나 혈액내 TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IFN- γ 는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 분석하였으며 OptEIA set (BD Biosciences)를 구입하였다. 먼저 96 well immunoplate에 capture antibody를 PBS에 희석하여 coating하고 ELISA용 세척버퍼 (0.05% Tween이 함유된 PBS)로 세척후 ELISA용 블로킹버퍼 (10% FBS가 함유된 PBS)로 상온에서 1시간 블로킹을 하였다. 세척후 시료를 블로킹버퍼에 희석하여 2시간 상온에서 반응하게 하였다. 다시 세척후 detection antibody와 streptavidin horseradish peroxidase와 함께 상온에서 1시간 반응하게 하였다. 세척후 TMB (BD Biosciences)를 넣고 상온에서 최대 30분 반응하게 한 후 1 N H₂SO₄를 넣고 반응을 정지하였다. 발색의 변화는 microplate reader (iMark, Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 농도는 제조사에서 제공한 표준 사이토카인의 농도와 흡광도에 기초하여 계산하였다.

10) 증식능 측정

비장세포의 증식능을 측정하기 위해 96-well plate를 사용하여 각 well 당 4×10^5 개의 세포를 분주한후에 2 μ g/ml anti-CD3 antibody를 넣고 48 시간 배양하였다. Celltiter 96 aqueous one solution reagent (Promega, Madison, WI, USA)을 well 당 0.02 ml 넣고 microplate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 군의 증식능은 anti-CD3 antibody를 넣은 대조군과 비교하여 백분율로 환산하였다.

11) 통계분석

실험결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표시하였으며 통계적 유의성 검증은 IBM SPSS 22 software를 이용하여 Student t-test나 ANOVA 방법으로 결정하였다. ANOVA 수행후 통계적으로 유의한 차이가 있으면 LSD 분석으로 사후검증을 수행하였다. P -value는 0.05미만인 경우에만 인정하였다.

III. 실험결과

1. RVS 경구투여 후 마우스 대식세포의 스캐빈저 수용체 발현에 대한 영향

RVS를 10일간 경구투여한 마우스에서 복강대식세포를 분리하여 스캐빈저 수용체 단백질의 세포막 발현을 유세포형광방법으로 측정하였다. 대식세포 마커로는 CD11b를 사용하였고 분석하고자 한 스캐빈저 수용체는 SRA, LOX-1, CD36이었다. 먼저 FITC conjugated anti-SRA antibody와 PE conjugated anti-CD11b로 세포를 double staining을 하였을 때 SRA(+)CD11b(+) cell population은 대조군에서 78.87 ± 2.03 %였으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 84.37 ± 1.18 % ($P=0.047$), 82.31 ± 1.43 % ($P=0.350$)로 증가하였다. 세포당 SRA 발현에 대한 평균 형광 강도 (mean fluorescence intensity)를 분석한 결과 대조군에서는 12.50 ± 0.42 이었으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 11.5 ± 0.34 ($P=0.109$), 10.2 ± 0.39 ($P=0.003$)로 감소하였다.

두번째로 FITC conjugated CD11b antibody와 PE conjugated LOX-1 antibody를 세포에 double staining하여 분석하였다. LOX-1(+)CD11b(+) cell population은 대조군에서 22.88 ± 1.87 %였으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 20.17 ± 0.72 % ($P=0.460$), 15.28 ± 1.02 % ($P=0.025$)로 감소하였다. LOX-1 발현에 대한 평균형광강도는 대조군에서 9.08 ± 0.21 이었으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 10.37 ± 0.23 ($P=0.002$), 10.99 ± 0.70 ($P=0.013$)로 증가하였다.

세번째로 FITC conjugated CD11b antibody와 PE conjugated CD36 antibody를 세포에 double staining하여 분석하였다. CD36(+)CD11b(+) cell population은 대조군에서 75.53 ± 2.18 %였으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 77.49 ± 1.79 % ($P=0.522$), 79.94 ± 1.52 % ($P=0.140$)로 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다. CD36 발현에 대한 평균형광강도는 대조군에

서 93.15 ± 4.20 이었으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 88.04 ± 4.96 ($P=0.615$), 85.95 ± 4.07 ($P=0.382$)였으며 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

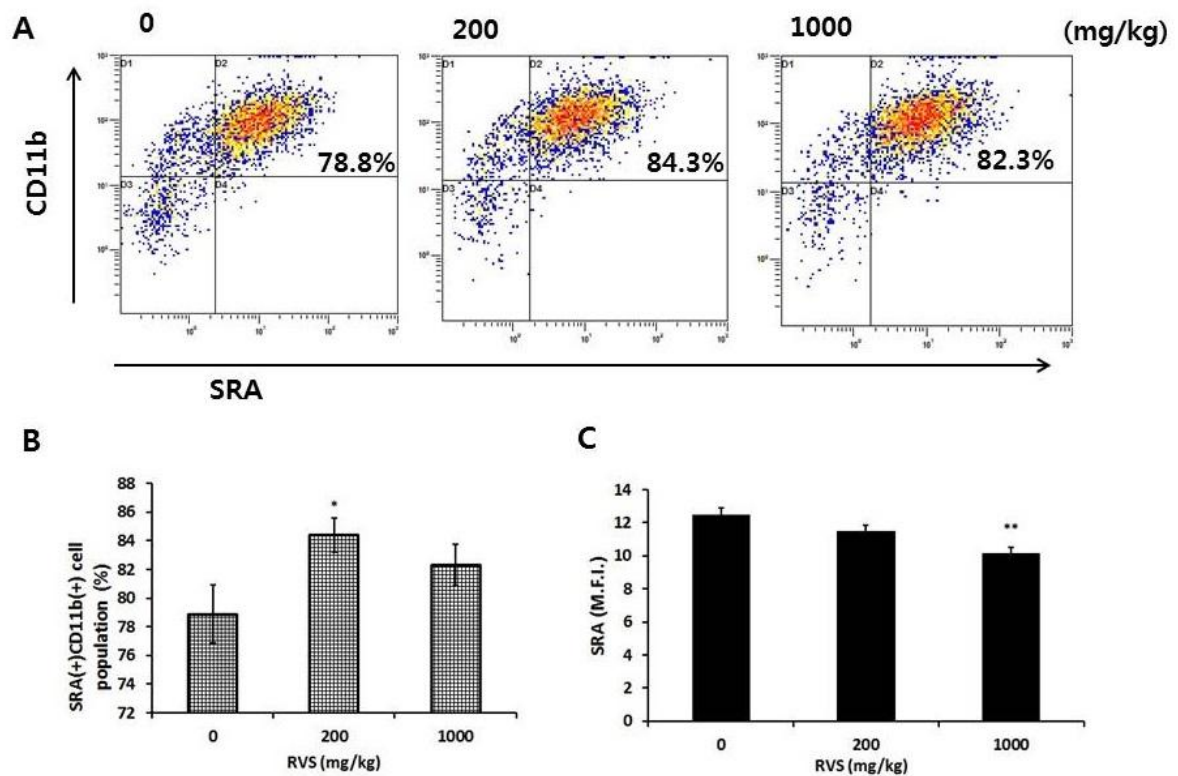


Figure 1. SRA expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract. Peritoneal macrophages were isolated after 10 days of oral administration of RVS extract (200 or 1,000 mg/kg). The cells were stained for FITC-conjugated SRA antibody and PE-conjugated CD11b. A: Representative dot plots were shown. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of the percentage of the SRA(+)CD11b(+) cell population (n=6). C: Bars represent mean $\pm$ SEM of the mean fluorescence intensity (M.F.I.) of SRA (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control (0 mg/kg).

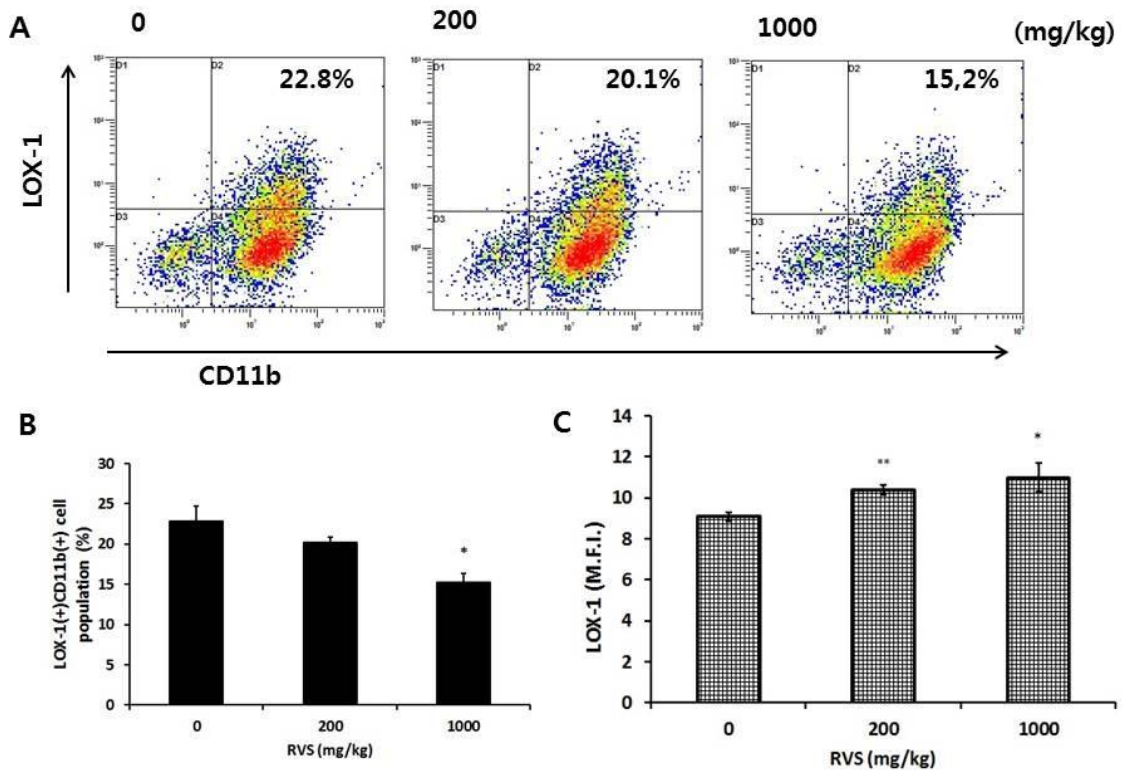


Figure 2. LOX-1 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract. Peritoneal macrophages were isolated after 10 days of oral administration of RVS extract (200 or 1,000 mg/kg). The cells were stained for FITC-conjugated CD11b antibody and PE-conjugated LOX-1. A: Representative dot plots were shown. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of the percentage of the LOX-1(+)CD11b(+) cell population (n=6). C: Bars represent mean $\pm$ SEM of the M.F.I. of LOX-1 (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control (0 mg/kg).

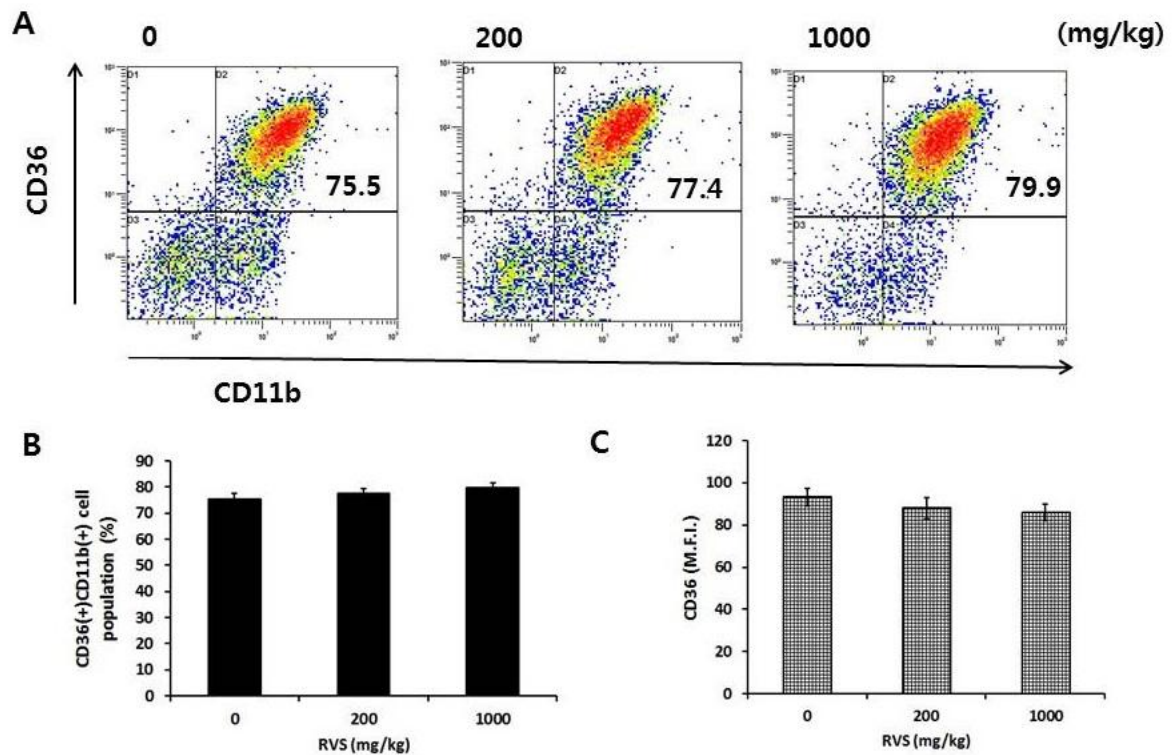


Figure 3. CD36 expressed by peritoneal macrophages after oral administration of RVS extract. Peritoneal macrophages were isolated after 10 days of oral administration of RVS extract (200 or 1,000 mg/kg). The cells were stained for FITC-conjugated CD11b antibody and PE-conjugated CD36. A: Representative dot plots were shown. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of the percentage of the CD36(+)CD11b(+) cell population (n=6). C: Bars represent mean $\pm$ SEM of the M.F.I. of CD36 (n=6).

2. RVS 투여가 복강대식세포의 탐식기능에 미치는 영향

RVS을 투여한 마우스 복강대식세포의 탐식능을 측정하기 위해 alexa488형광이 부착된 acetylated low density lipoprotein (LDL)을 세포에 넣고 4시간 배양하였다. 세포가 탐식한 alexa488의 평균 형광강도를 분석한 결과 대조군은 32.91 ± 0.97 이었으며 RVS 200 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군에서는 37.43 ± 1.26 ($P=0.018$), 43.71 ± 2.73 ($P=0.003$)으로 증가하였다.

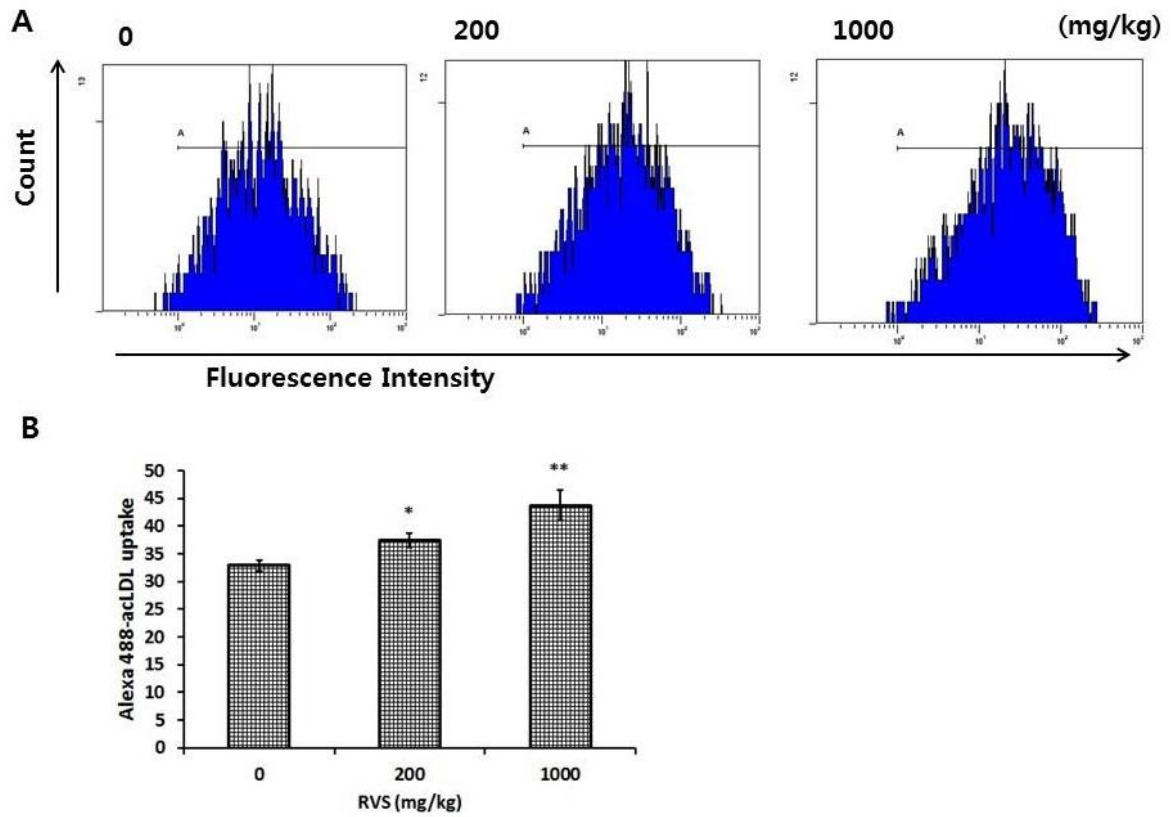


Figure 4. Effect of oral administration of RVS extract on the functional activity of scavenger receptors. Peritoneal macrophages from each group were incubated with alexa⁴⁸⁸-acetylated low density lipoprotein (LDL) for 4 h and analyzed for the uptake of alexa⁴⁸⁸-acetylated LDL by flow cytometry. A: Representative histograms are shown. B: Bars represent mean $\pm$ SEM (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control (0 mg/kg).

3. RVS 투여가 복강대식세포의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향

RVS를 투여한 마우스에서 분리한 대식세포를 LPS로 24시간 자극한 후 세포가 분비한 TNF- α 와 IL-6의 양을 ELISA 방법으로 분석하였다. LPS를 넣지 않은 세포에서는 TNF- α 나 IL-6가 검출되지 않았으며 LPS를 넣은 세포에서는 각각 43.82 ± 2.08 ng/ml, 116.62 ± 2.90 ng/ml로 검출되었다. RVS 투여군에서는 TNF- α 의 경우 200mg/kg, 1000 mg/kg군에서 35.10 ± 1.61 ng/ml ($P=0.008$), 42.10 ± 0.89 ng/ml ($P=0.462$)로 200 mg/kg군에서 유의하게 감소하였다. IL-6의 양은 200mg/kg, 1000 mg/kg군에서 99.21 ± 4.53 ng/ml ($P=0.008$), 86.89 ± 1.61 ng/ml ($P=0.001$)이었으며 농도의존적으로 감소하였다.

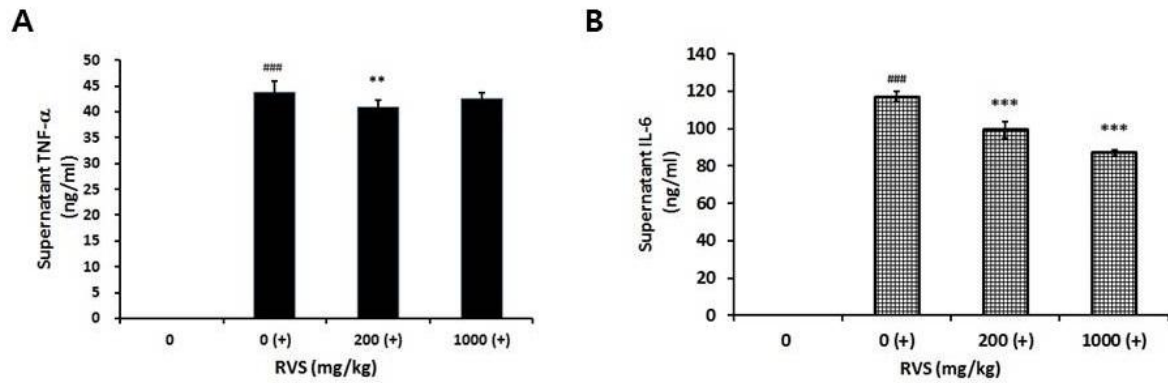


Figure 5. Effects of oral administration of RVS extract on tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 produced by LPS-stimulated macrophages. Macrophages isolated from experimental groups were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) were determined by ELISA. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6). (+) indicates LPS stimulation. ### $P < 0.001$ versus control (0 mg/kg), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus LPS-stimulated control group (0 mg/kg).

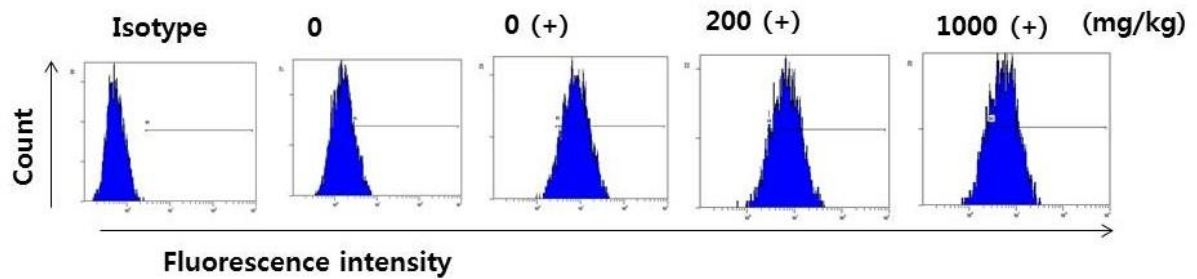
4. RVS 투여가 복강대식세포의 costimulatory molecules 및 MHC II 분자 발현에 대한 영향

췌나무추출물을 투여한 마우스에서 분리한 대식세포를 LPS로 24시간 자극한 후 세포막의 보조자극분자인 CD86과 CD40의 발현과 항원제시에 필요한 MHC II 발현에 대해 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 모든 형광항체에서 매칭되는 isotype antibody를 사용하여 비특이적 결합이 일어나지 않음을 확인하였다 (Figures 6A, 7A, 8A). 먼저 CD86의 경우 LPS를 넣지 않은 대조군 세포의 평균형광강도는 4.67 ± 0.09 이었으며 LPS로 자극했을 때 10.87 ± 0.35 로 증가하였다 (Figure 6). RVS 투여군에서는 LPS로 자극한 경우 200mg/kg, 1000 mg/kg에서 10.87 ± 0.35 ($P=0.994$), 9.44 ± 0.28 ($P=0.005$)의 평균형광강도를 보여주어 고농도군에서 유의하게 감소하였다.

두번째로 CD40 발현을 분석한 결과 자극을 하지 않은 대조군의 세포는 1.21 ± 0.01 의 평균형광강도를 보여주었으며 LPS를 넣은 세포에서는 3.84 ± 0.16 으로 증가하였다 (Figure 7). RVS 투여군의 경우 LPS를 처리했을 때 200mg/kg, 1000 mg/kg에서 3.43 ± 0.25 ($P=0.209$), 3.46 ± 0.21 ($P=0.196$)의 형광강도를 보여주어 대조군과 차이가 없었다.

세번째로 대식세포의 항원제시와 관련된 마우스 MHC II분자인 I-A/I-E의 발현을 분석하였다. 자극을 하지 않은 대조군 세포에서는 0.66 ± 0.06 의 평균형광강도를 보여주었으며 LPS를 넣은 세포에서는 8.79 ± 0.42 로 증가하였다 (Figure 8). RVS 투여군의 경우 LPS를 처리했을 때 200mg/kg, 1000 mg/kg에서 8.91 ± 0.25 ($P=0.419$), 10.92 ± 0.06 ($P=0.010$)의 형광강도를 보여주어 고농도군에서 유의하게 증가하였다.

A



B

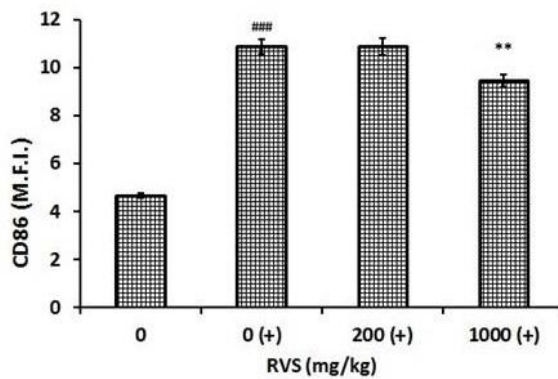


Figure 6. Effect of RVS extract on the surface expression of CD86 in activated macrophages

Cells isolated from the control and RVS groups were stimulated with LPS for 24 h. The cells were stained for PE-conjugated CD86 antibody or PE-conjugated matched-isotype. A: Representative histograms are shown. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of data (n=6). (+) indicates LPS stimulation. ### $P < 0.001$ versus control (0 mg/kg), ** $P < 0.01$ versus LPS-stimulated control (0 mg/kg).

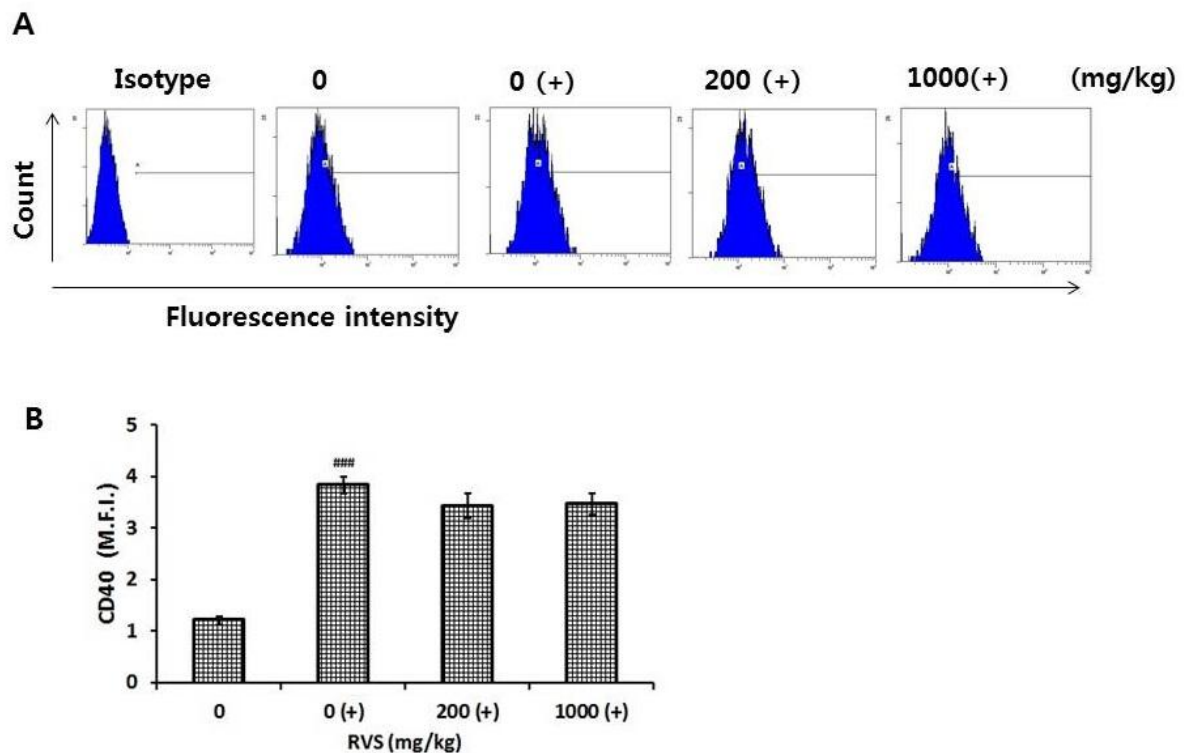


Figure 7. Effect of RVS extract on the surface expression of CD40 in activated macrophages

Cells isolated from the control and RVS groups were stimulated with LPS for 24 h. The cells were stained for FITC-conjugated CD40 antibody or FITC-conjugated matched-isotype. A: Representative histograms are shown. (-) indicates cells without LPS. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of data (n=6). (+) indicates LPS stimulation. ^{###} $P < 0.001$ versus control (0 mg/kg).

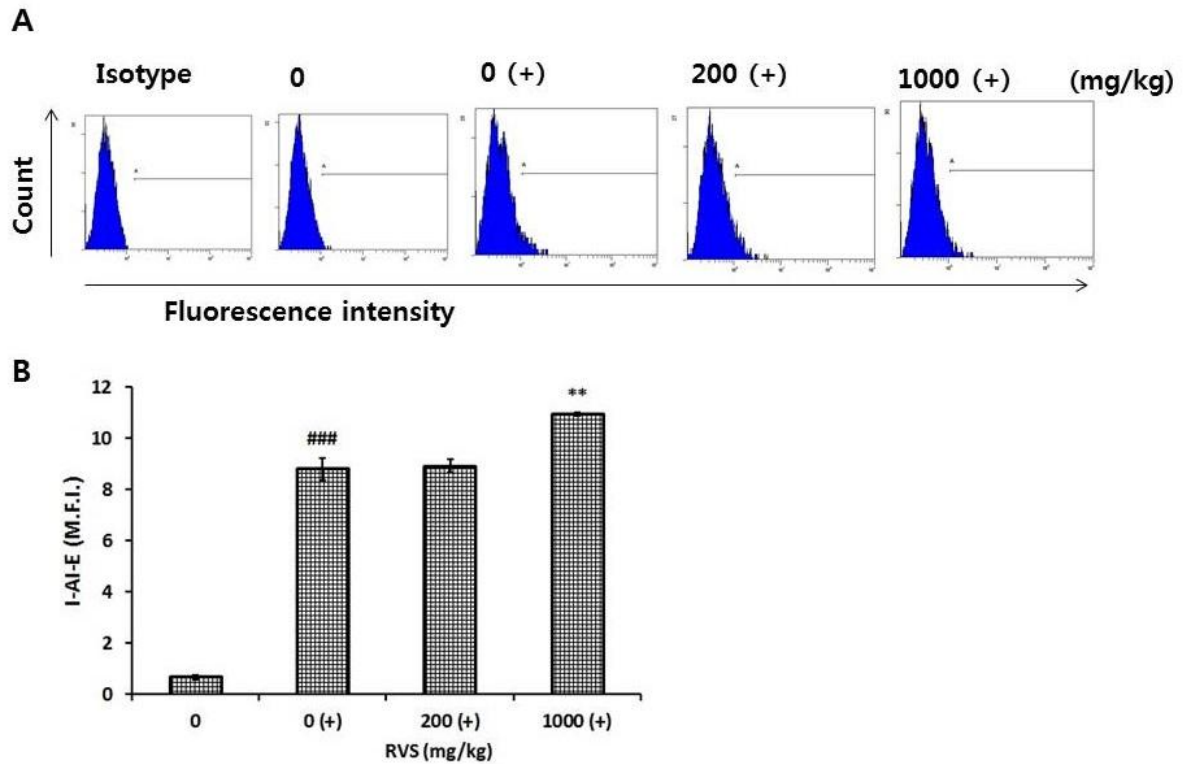


Figure 8. Effect of RVS extract on the surface expression of I-A/I-E in activated macrophages

Cells isolated from the control and RVS groups were stimulated with LPS for 24 h. The cells were stained for FITC-conjugated I-A/I-E antibody or FITC-conjugated matched-isotype. A: Representative histograms are shown. (-) indicates cells without LPS. B: Bars represent mean $\pm$ SEM of data (n=6). (+) indicates LPS stimulation. ### $P < 0.001$ versus control (0 mg/kg), ** $P < 0.01$ versus LPS stimulated control (0 mg/kg).

5. RVS 투여가 마우스 복강 LPS 자극에 대한 혈액 염증성 사이토카인에 미치는 영향

RVS 투여후 마우스에서 분리한 대식세포의 염증 반응과 전신성 염증 반응이 같은지 알기 위해 10일간 RVS (1000 mg/kg)을 경구투여후 LPS를 복강에 자극하고 나서 1시간 후에 혈액을 채취하였다. LPS를 자극하지 않은 동물의 혈액에서는 TNF- α 와 IL-6가 검출되지 않았으나 LPS로 자극을 한 대조군의 TNF- α 의 농도는 6.82 ± 0.48 ng/ml였고 IL-6의 농도는 10.26 ± 0.80 ng/ml로 검출되었다. RVS 투여군에서는 TNF- α 농도가 2.56 ± 0.44 ng/ml ($P=0.000$)이었고 IL-6 농도는 5.71 ± 0.38 ng/ml($P=0.000$)로 유의하게 감소하였다.

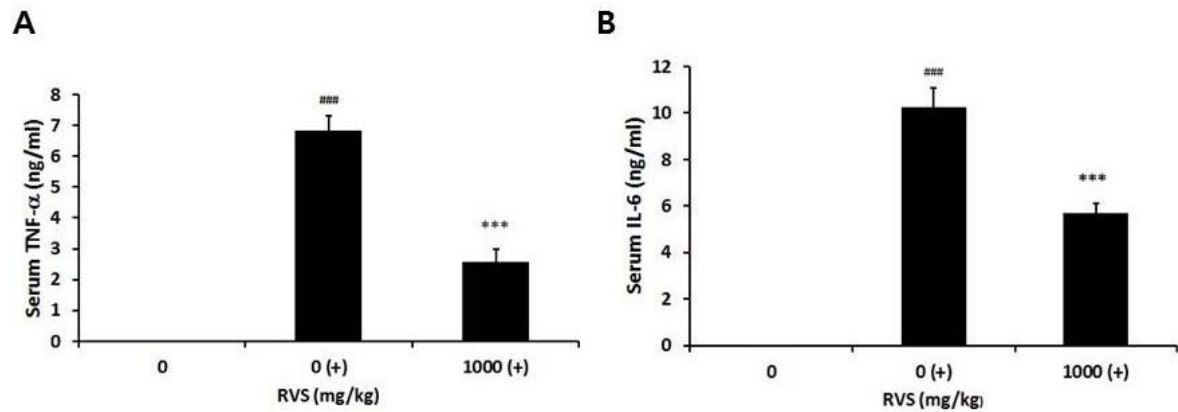


Figure 9. Effect of RVS extract on serum inflammatory responses following LPS injection.

Mice were orally given RVS extract for 10 days. Serum was obtained 1 h after intraperitoneal injection of LPS (1.3 mg/kg). The serum levels of TNF- α and IL-6 were determined by ELISA. Data represent mean $\pm$ SEM (n=12).) ### $P < 0.001$ versus control (0 mg/kg), *** $P < 0.001$ versus LPS injected control (0 mg/kg).

6. RVS 투여후 마우스 비장조직의 림프구 변화에 대한 영향

RVS (1000 mg/kg)을 10일 투여한 마우스 비장조직의 T cell 비율의 변화를 보기 위해 유세포형광분석 방법으로 CD4 T cell과 CD8 T cell을 분석하였다. 비장세포를 FITC conjugated CD4 antibody와 PE conjugated CD8a antibody를 이용하여 double staining을 하였다. 실험 결과 대조군의 CD4 T cell의 비율은 $23.41 \pm 0.45\%$ 였으며 RVS투여군은 $26.00 \pm 0.48\%$ ($P=0.000$)로 유의하게 증가하였다 (Figure 10). CD8 T cell 비율은 대조군과 RVS 투여군 각각 $11.72 \pm 0.46\%$, $11.67 \pm 0.45\%$ ($P=0.937$)로 차이가 없었다. B cell의 비율을 알기 위해 FITC conjugated CD19 antibody로 세포를 염색하였다. 대조군은 $54.98 \pm 1.22\%$ 였으며 RVS 투여군은 $54.42 \pm 0.82\%$ ($P=0.715$)였으며 차이가 없었다 (Figure 11).

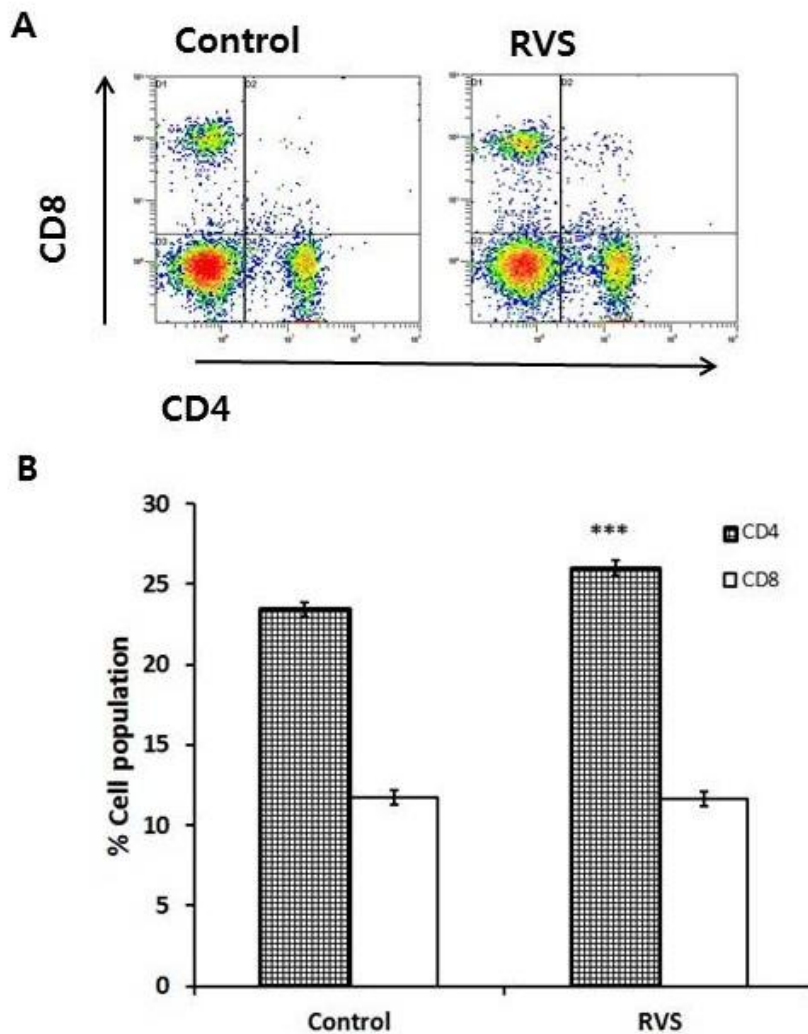


Figure 10. Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic CD4 and CD8 T cells.

Splenocytes were isolated from male Balb/c mice after 10 days of oral gavage with RVS (0 or 1000 mg/kg). Cells were double-stained with FITC-conjugated CD4 antibody and PE-conjugated CD8a antibody and evaluated using flow cytometry. A: Representative dot blots are shown. B: Bars represent the mean percentage of the cell population $\pm$ SEM (n=6). *** $P < 0.001$ versus control.

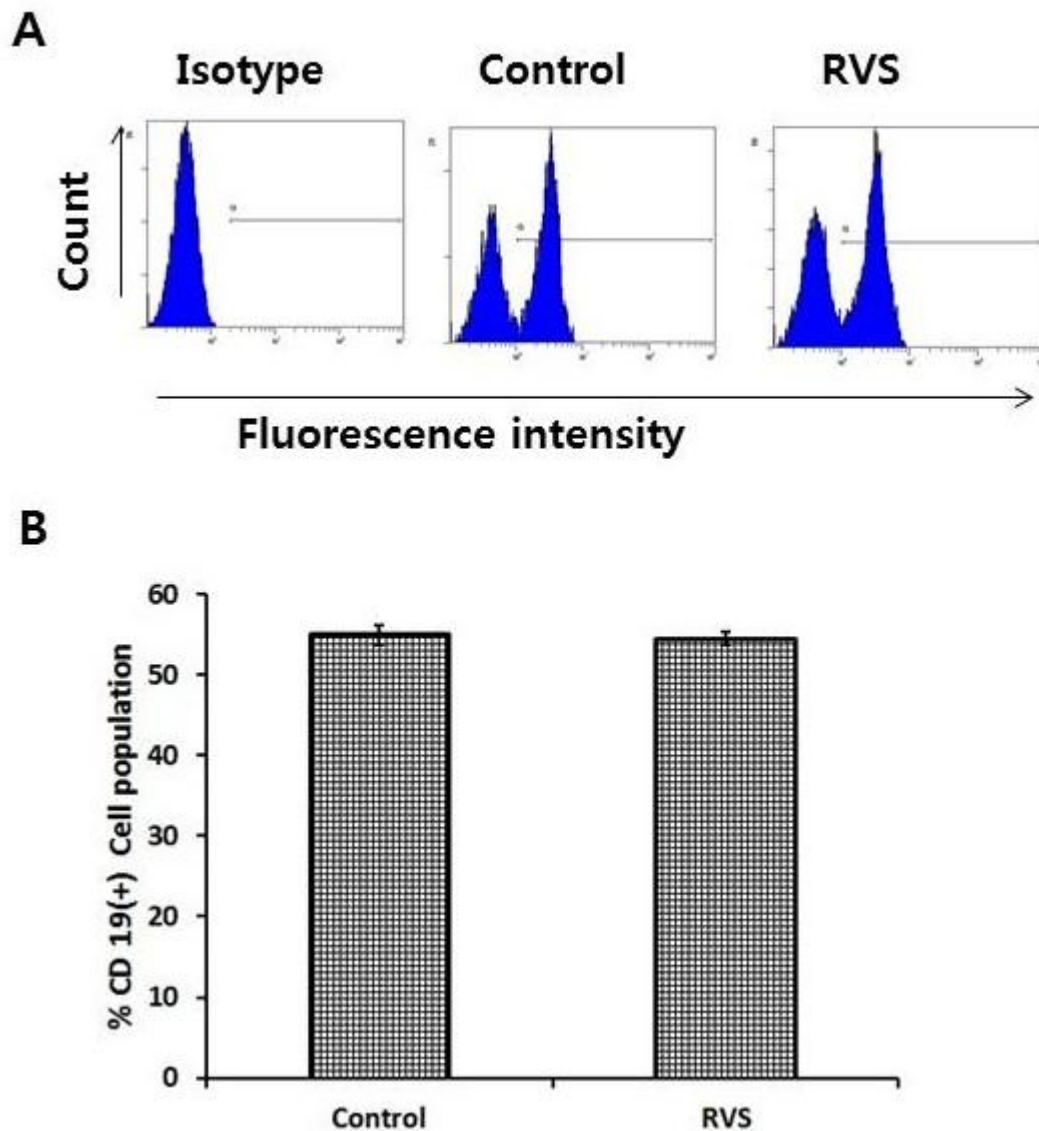


Figure 11. Effect of RVS extract on the composition of mouse splenic B cells.

Splenocytes were isolated from male Balb/c mice after 10 days of oral gavage with RVS (0 or 1000 mg/kg). Cells were stained with FITC-conjugated CD19 antibody or FITC-conjugated matched isotype and evaluated using flow cytometry. A: Representative histograms are shown. B: Bars represent the mean percentage of the cell population $\pm$ SEM (n=6).

7. RVS 투여후 마우스 비장세포의 MHC II 발현에 대한 영향

RVS을 10일간 투여한 마우스의 비장세포에서 MHC II 발현에 변화가 있는지를 알기 위해 비장세포를 FITC-conjugated I-A/I-E antibody로 염색한 후 유세포형광분석을 수행하였다. 대조군의 I-A/I-E 평균형광강도는 65.33 ± 1.96 이었고 RVS 투여군은 55.53 ± 2.24 으로 유의하게 감소하였다.

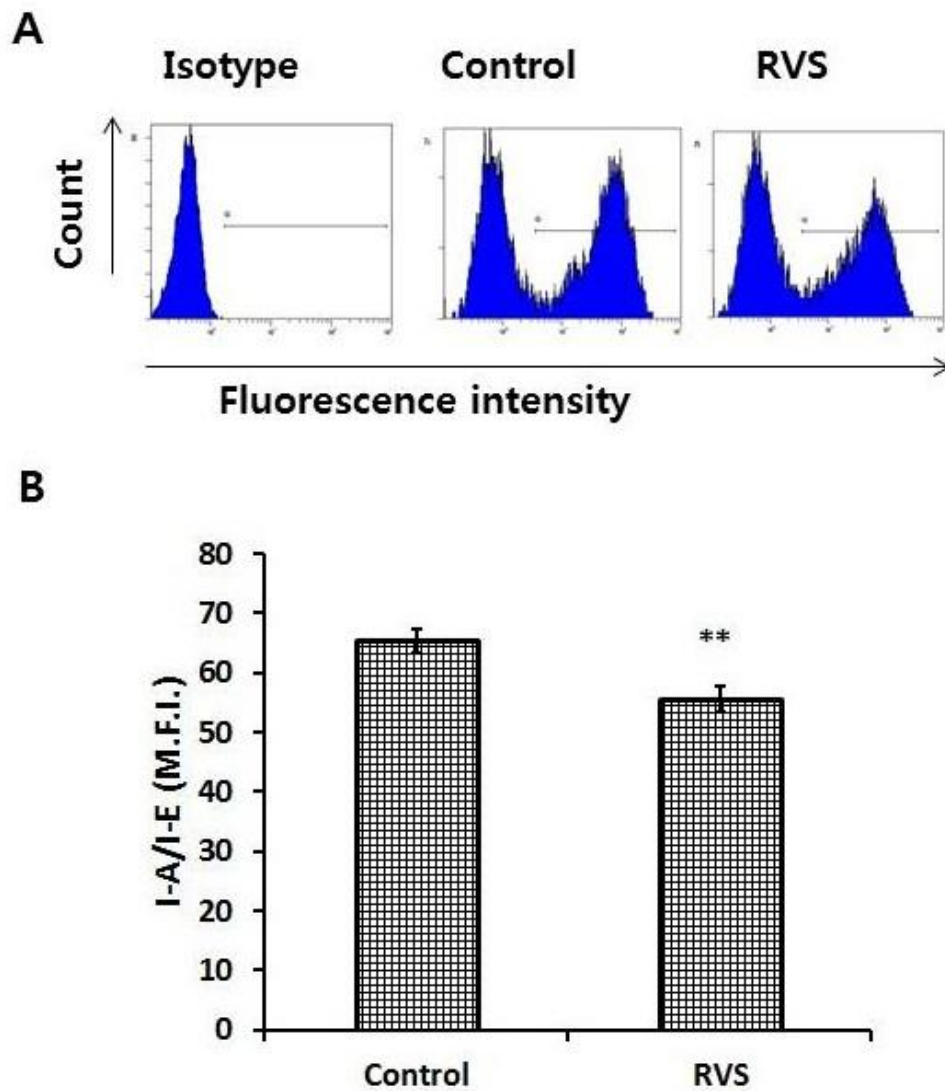


Figure 12. Effect of RVS on the surface expression of the MHC II molecules of mouse splenocytes.

Splenocytes were isolated from male Balb/c mice after 10 days of oral gavage with RVS (0 or 1000 mg/kg). Cells were stained with FITC-conjugated I-A/I-E antibody or FITC-conjugated matched isotype and evaluated using flow cytometry. A: Representative histograms are shown. B: Bars represent the mean percentage of the cell population $\pm$ SEM (n=6). ** $P < 0.01$ versus control.

8. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 증식능에 대한 영향

RVS 10일간 투여한 마우스의 비장 T 세포의 증식능에 대한 변화를 알기 위해 polyclonal anti-CD3 antibody를 사용하여 세포의 증식을 유도하였다. MTS 방법을 사용하여 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 세포증식능을 확인한 결과 자극을 하지 않은 대조군에 비해 anti-CD3 antibody로 자극한 대조군의 흡광도가 2.6 배 증가하였다 ($P=0.002$) (Figure 13). anti-CD3 antibody로 자극한 대조군과 RVS 투여군의 증식능에는 차이가 없었다 ($P=0.801$).

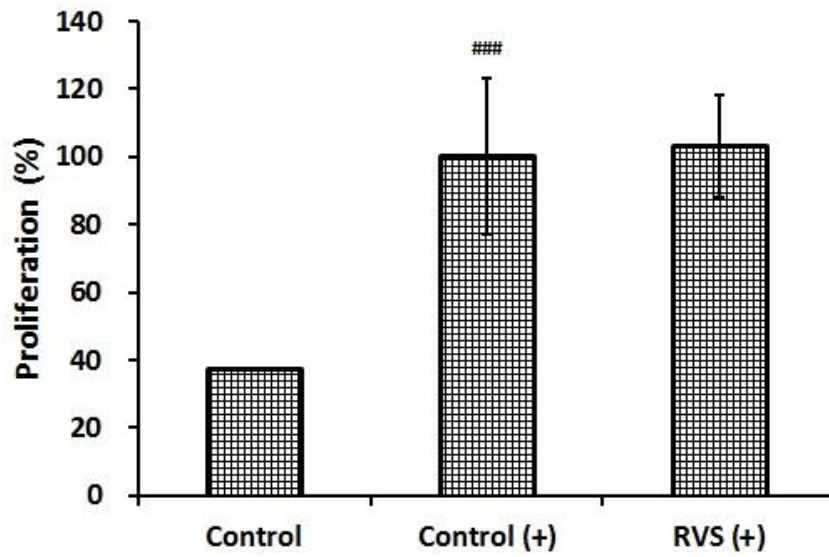


Figure 13. Effects of RVS on the proliferation of splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen. Splenocytes isolated from control and RVS groups were cultured and stimulated with anti-CD3 antibody (2 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h. The proliferative response of splenocytes was determined using the MTS assay. Bars represent the mean $\pm$ SEM. (+) indicates anti-CD3 antibody stimulation. ^{###} $P < 0.001$ versus untreated control (n=6).

9. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 CD69 발현에 대한 영향

RVS을 10일간 투여한 후 마우스의 비장 T 세포의 활성 상태를 측정하기 위해 CD69 발현을 분석하였다. anti-CD3 antibody를 이용하여 24시간 배양한 후에 세포 표면의 CD69 발현을 분석한 결과 anti-CD3 antibody를 넣지 않은 대조군의 평균형광강도는 9.9 ± 0.57 였으나 자극을 한 대조군은 38.43 ± 1.02 로 증가하였다 (Figure 14). RVS 투여군의 CD69 발현은 30.98 ± 1.34 ($P=0.001$)로 유의하게 감소하였다.

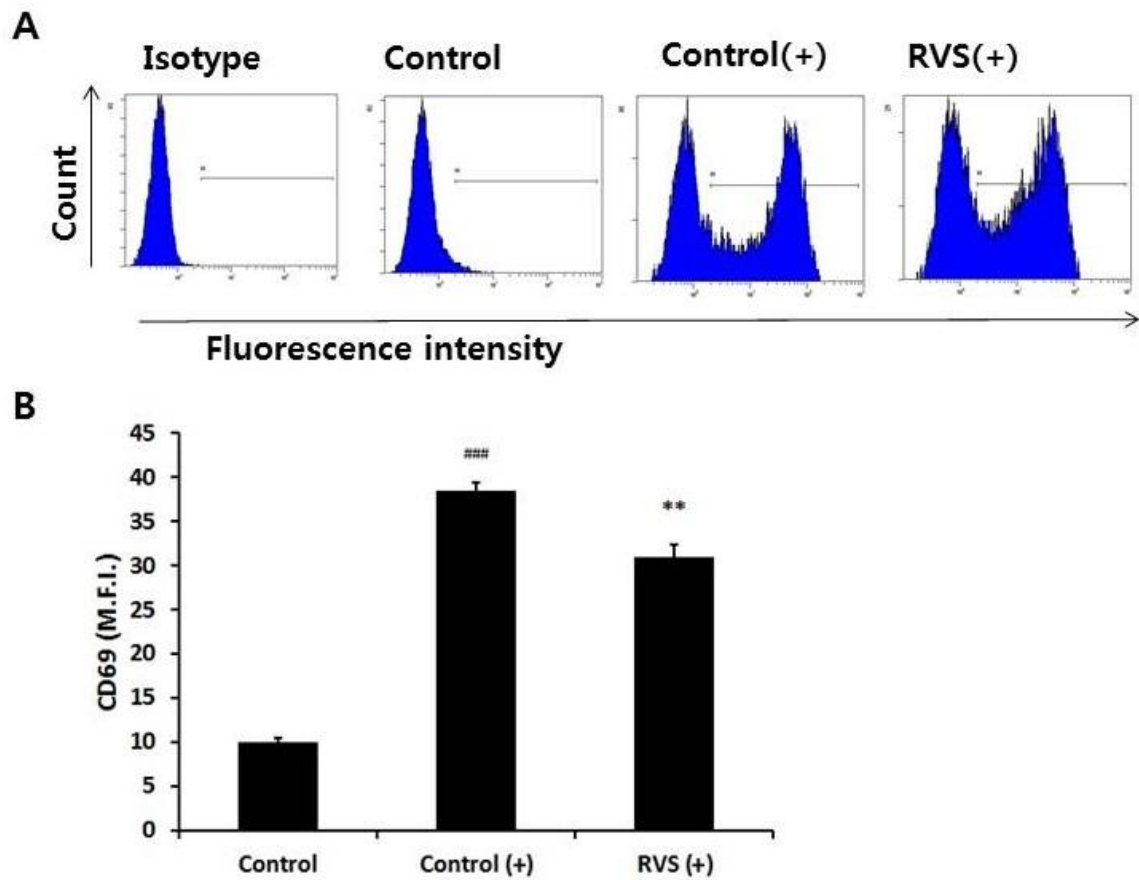


Figure 14. Effects of RVS on the activation marker in splenic T cells stimulated with polyclonal mitogen. Splenocytes isolated from control and RVE groups were cultured and stimulated with anti-CD3 antibody (2 μ g/ml) for 24 h. Cells were stained for PE-conjugated isotype-matched antibody or PE-conjugated CD69 antibody. A: Representative dot plots are shown. (+) indicates anti-CD3 antibody treatment. B: Bars represent the mean $\pm$ SEM.

10. RVS 투여후 마우스 비장 T세포의 사이토카인 분비에 대한 영향

RVS을 10일간 투여한 후 마우스의 비장 T 세포의 IFN- γ , IL-4, IL-2 분비에 대한 변화를 측정하기 위해 anti-CD3 antibody를 이용하여 48시간 배양한 후 상등액을 취하여 ELISA를 수행하였다. 대조군과 RVS 투여군에서 IFN- γ 의 농도는 각각 1710 ± 380 pg/ml, 2704 ± 209 pg/ml ($P=0.031$)로 RVS 군에서 유의하게 증가하였다. IL-4의 농도는 대조군이 1160 ± 194 pg/ml, RVS군이 1563 ± 195 pg/ml ($P=0.124$)여서 통계적으로 유의한 차이는 없었다. IL-2의 농도는 대조군이 1712 ± 356 pg/ml, RVS군이 893 ± 55 pg/ml ($P=0.035$)이어서 유의하게 감소하였다.

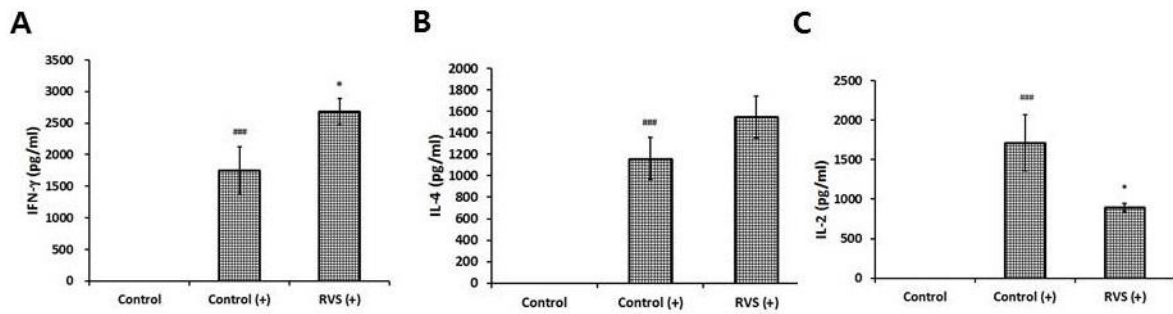


Figure 15. Effect of RVS on production of cytokines in activated splenic T cells.

Splenocytes isolated from control and RVS groups were cultured and stimulated with anti-CD3 antibody (2 μ g/ml) for 48 h. Supernatants were harvested, and the levels of IFN- γ , IL-4, and IL-2 were determined by ELISA. Data represent mean $\pm$ SEM (n=6). (+) indicates anti-CD3 antibody treatment. ### $P < 0.001$ versus untreated control, * $P < 0.05$ versus anti-CD3 antibody treated control.

IV. 고찰

면역은 모든 감염에 대한 숙주 생명체의 방어 기전이다. 면역은 외부의 원인균에 대해 대식세포가 감지하고 염증반응을 일으켜 사이토카인을 분비하거나, 탐식기능을 한다. T 세포는 세포 표면에 발현하는 항원 CD4 및 CD8 분자에 의해서 구분되고, T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)에 의해 항원을 인식하는데, 항원분자 그 자체를 인식하는 것이 아니고 단백질 항원으로 인해 발현된 구조적 적합 항원 유전자 복합체 클래스 I 또는 클래스 II 분자 상의 구에 들어가는 단백질 일부와 MHC 분자 일부를 인식한다. MHC 분자에 의해 발현된 항원을 T 세포가 인식하고, 이러한 신호자극을 통해 B 세포를 생성하도록 하거나 대식세포를 활성화한다.²⁶ 본 연구에서는 RVS를 경구투여한 후 대식세포의 스캐빈저 수용체와 상호자극전달분자 발현 및 사이토카인의 발현, 비장세포의 변화와 반응을 통해 항염증 효과 및 면역반응의 변화를 확인하였다.

대식세포는 SRA, LOX-1, CD36과 같은 스캐빈저 수용체로 박테리아나 염증유발물질을 감지하여 탐식작용을 한다.¹⁹ RVS 경구투여군은 복강 대식세포의 SRA와 LOX-1의 발현증가를 유도하여 식세포작용이 활발해졌음을 알 수 있는데 이것은 acetylated-LDL 탐식능을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 1-4).

사이토카인은 세포에서 방출되는 당단백의 일종으로, 선천면역과 적응면역의 신호전달에 있어 중요한 역할을 한다. 항원 제시 자극을 받은 도움 T 세포 (Th cell)는 사이토카인을 분비하고, 이를 통해 B 세포나 대식세포가 활성화한다.²⁶ TNF- α 는 활성화된 대식세포, NK 세포, 일부 T 세포에서 생산되고 분비되어, 면역세포를 조절하는데, 체내 발열원으로서 열이 나게 유도하거나, 세포자살을 유도하거나, IL-1과 IL-6의 생산을 통해 패혈증을 유발하거나, 악액질을 유도하거나 감염을 유발하며, 종양 생성과 바이러스

복제를 억제하기도 하는 활성 사이토카인이다. 인터루킨(IL)은 세포간(inter-) 기능하는 백혈구(leukocyte)에서 활동하는 단백질이라는 뜻으로 표적세포 표면의 특이 수용체와 결합하여, 면역조절에 관여한다. 그 중 IL-6 은 대식세포, T 세포와 B 세포에서 모두 분비되며, IFN- β_2 와 동일 분자로, 면역 응답, 조혈계와 신경계 세포 증식, 분화, 급성 반응 등에 관여하며, 특히 염증반응의 초기단계에서 생성된다. IL-6 의 과잉생산은 면역이상증, 림프계 종양과도 관련이 있다. LPS 자극에 대해, RVS 경구투여군에서 농도의존적으로 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 이 감소되어 대식세포에 의한 염증억제작용에도 효과가 있음을 알 수 있다 (Fig. 5).

상호자극전달분자는 세포 표면에서 발현하는 단백질로, T 세포에 자극신호를 전달하는 것이다. CD80/CD86은 T세포의 CD28과 결합하면서, 대식세포의 활성화에 대한 마커로 사용된다. 대식세포가 활성화되면, 상호자극전달분자를 통해 세포 간에 서로 접촉되어 있는 환경에서 도움 T 세포(Th cell)를 활성화시킨다. CD40은 대식세포나 수지상세포의 표현에서 자극받지 않은(naïve) T cell에 신호를 전달해준다. CD40의 신호전달(signaling)이 차단되면, 염증반응과 자가면역반응이 억제되기도 한다.²⁸ LPS 자극에 대해 RVS를 경구투여했을 때, CD86는 농도의존적으로 유의하게 감소했고, CD40의 발현에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 6,7). MHC 단백질 분자는 피부나 장기이식을 할 때, 그 이상 반응에 영향을 주는 세포표면물질로 알려졌는데, 그 중 MHC 클래스 II 분자는 B세포, 대식세포, DC같은 전문적 항원제시세포(antigen presenting cell)에 주로 존재한다. 대식세포는 침입한 항원을 식작용(phagocytosis) 한 후, 그 과정에서 단백질 잔여물이 MHC II 분자를 통해 세포 표면에 나타나게 되며, 이를 도움 T 세포(T helper cell)등이 인식하게 하여 적응면역을 활성화한다.²⁷ I-A/I-E 항체 (MHC II 분자)는 RVS경구투여에 대해 농도의존적으로 증가했다 (Fig. 8). RVS의 LPS 자극에 대한 이러한 결과는 염증성 단백질 반응에 대해 RVS 가 각각 다른 경로로 작용하는 것을 생각해 볼 수 있으며 이에 대해서는 향후 더 연구가 필요할

것으로 보인다. 또한, 혈액 염증성 사이토카인을 자극시킨 전신면역반응에서 TNF- α 와 IL-6이 감소하였는데, RVS가 국소적으로뿐만 아니라 (Fig. 5) 전신적인 염증억제를 통한 면역반응에 작용함을 알 수 있다 (Fig. 9).

비장조직은 2차 림프조직의 하나로서 성숙한 T 세포와 B 세포가 모여있으며, 항원을 만나는 조직이다. T 세포는 MHC를 통해 부착된 단백질 항원을 인식하여 사이토카인을 분비하고, 이는 B림프구, 대식세포, T 세포를 증식시키고 분화시켜, 염증반응과 특이면역을 연결시키는 면역반응의 중요한 역할을 한다.

도움 T 세포는 CD4를 이용하여 항원제시세포의 MHC II 를 인식하고 활성화, 분화된다. 세포 독성 T 세포는 CD8을 가지고 있어 이를 이용해 MHC I 을 인지하는데, MHC I 은 대부분의 세포가 가지고 있는 단백질로, 세포 독성 T 세포는 보조수용체인 CD8을 이용하여 감염된 세포를 인식하고 활성화된다. RVS의 경구투여군에서 RVS는 비장세포의 도움 T 세포의 비율을 증가시켜, 면역 조절 기능을 향상시켰다 ³⁰ (Fig. 10). 한편, RVS투여군의 B 세포의 비율과 CD8 T 세포의 비율에는 변화가 없었다 (Fig. 11).

RVS투여군에서는 CD4 T 세포가 증가하였으나, 이들 세포에게 항원을 제시하는 MHC II (I-A, I-E) 발현은 감소하였다. 앞의 LPS의 자극에 대한 MHC II 분자를 농도의존적으로 증가시킨 실험결과와 비교할 때, (Fig. 8) 혈액으로 연결된 비장조직에는 항원 제시 기능이 적어졌음을 알 수 있다. 다시 말해, 보다 말초적인 면역반응에 민감하게 혹은 효과적으로 반응하고, 적응면역의 기전에는 항원의 침입이 적어져 보다 덜 민감하게 반응한다고 해석해 볼 수 있다 (Fig. 12).

CD3는 모든 T 세포의 표면 단백질이다. T세포를 활성화하여 분열증식(mitosis)을 유도하기 위해, 다중클론성 anti-CD3 antibody을 사용하여, RVS를 경구투여군과 대조군의 비장세포의 증식을 유도한 결과 유의한 차이가 없었으며, 따라서 RVS의 비장 T세포 증식능에 대한 영향은 없는 것으로 보인다 (Fig. 13).

IL-2는 T 세포 성장인자 (T cell growth factor)라고도 불리우는데, T 세포 및 B 세포의 세

포분열을 촉진시키기도 하고, IgM, IgG 등의 면역글로불린 활동에 영향을 미친다. IL-2는 주로 T세포(CD4⁺, CD8⁺)와 NK세포에서 생성되는데, 마우스에서는 세포성 면역에 관여하는 T 세포(Th 1)에서 생성된다. IL-4 는 IFN- γ 와 길항작용을 하는데, B 세포를 활성화하여 IgG1과 IgE 분비를 유도하고 기생충 제거에 필요한 사이토카인이지만, 역작용으로 알레르기성 염증반응을 증진시키기도 한다. IFN- γ 는 항바이러스 작용을 하는 사이토카인으로, T 세포에서 생성되는 IFN- γ 는 대식세포를 강하게 활성화하고, MHC II를 유도하여 항원제시기능을 높여준다.

T 세포가 활성화 될 때, 분열되는 T 세포의 표면에 CD69가 발현되기 때문에 CD69는 T cell의 초기 마커로서 작용한다. RVS 경구투여군에서 대조군에 비해 CD69이 발현이 유의하게 감소하였다. 실험의 결과 시점인 24hr보다 더 일찍 비활성화상태로 돌아왔을 것으로 여겨진다 ³¹ (Fig. 14).

RVS를 투여하였을 경우, B 세포를 돕고 대식세포를 활성화시키고 상호 길항작용을 하는 IL-4와 IFN- γ 가 증가하는 결과를 보임으로 면역균형 및 유지효과를 보였으나, IL-4는 통계적인 유의성은 없었고, IL-2는 농도의존적으로 유의한 감소를 보였다. B 세포의 자극에는 영향을 주지만, T 세포 성장인자인 IL-2는 오히려 감소시키는 결과를 보여주었다. (Fig. 15)

RVS는 대식세포 반응과 전신성 염증반응에 대한 실험에서 IL-6, TNF- α 가 감소하여, 항염 효과를 보여주었다. RVS 경구투여군에서 스캐빈저 수용체의 활성화는 증가하였고, MHC II 분자의 발현도 증가하였다. 다른 한편으로 적응면역 반응에서, RVS는 비장세포의 도움 T 세포 비율은 증가시켰지만, CD69, CD86, MHC II를 낮춰주었다. 따라서 RVS는 염증 반응을 억제하면서 면역조절 효능이 있으므로, 면역의 과활성화를 억제할 수 있는 가능성을 보여주었으며, 이를 통해 면역관련 질환 등에 응용될 수 있을 것으로 여겨진다.

IV. 참고문헌

1. "*Rhus verniciflua* stokes" information from Korea National Arboretum (국가생물종 지식정보시스템,Nature) <http://www.nature.go.kr/>
2. 정재민, 韓國産 𣎵나무科의 地理的 天然分布와 種의 特徵, 동양자원식물학회지 제8권 제2호, 1995.8 :165-173
3. Kim T. J., "Korea Resource Plants," Vol. II, Seoul University Press, Seoul, 1996: 292-297
4. 엄석기, 김경석, 𣎵의 주치(主治).효능(效能).수치법(修治法)에 관(關) 소고(小考);11종 한 약서를 중심으로,, 대한한의학원전학회지, 21(2),2008: 29-37
5. Namba T, "Coloured illustrations of Wakan-Yaku", Hoikusha Publishing Co,1980 : 215
6. Yoo K, Seo H, Han K, Jeong Y, Kim K, Hong K. Changes of Volatile Organic Compounds of *Rhus verniciflua* S. Bark by Fermentation. Korean journal of food preservation. 2007;14(3). : 308-314
7. 김중배, 𣎵나무 껍질에서 분리한 향산화물질의 성분, 한국식품영양학회지 권16,2003 : 60-65.
8. Lee SH, Nan JX, Zhao YZ, Woo SW, Park EJ, Kang TH, Seo GS, Kim YC, Sohn DH, The chalconebutein from *Rhus verniciflua* shows antifibrogenicactivity.Planta Med, (2003) 69: 990–994
9. Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi J, Choi MY, Kim GT, Jung HJ, Park HJ ,Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. J Ethnopharmacol, (2004) 90: 73–79

10. Oshima R, Kumanotani J, Structural studies of plant gum from sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*. Carb Res, (1984), 127: 43–57
11. Lee JC, Kim J, Lim KT, Yang MS, Jang YS, Ethanol eluted extract of *Rhus verniciflua* Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. J Biochem Mol Biol, (2001), 34: 250–258
12. Lee JC, Lim KT, Jang YS, Identification of *Rhus verniciflua* Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti apoptotic properties. BiochemBiophysActa, (2001), 1570: 181–191
13. Kitts DD, Lim KT ,Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS). J Toxicol Environ Health, Part A, (2001), 64: 357–371.
14. Park YS, Kim YS, Shin DH, Antioxidative effects of ethanol extracts from *Rhus vernicifera* Stoke on yukwa (oil popped rice snack) base during storage. J Food Sci, (2002), 67: 2474–2479.
15. Kuo SC, Teng CM, Lee LG, Chiu TH, Wu TS, Huang SC, Wu JB, Shieh TY, Chang RJ, Chou TC , 6-Pentadecylsalicylic acid: An antithrombin component isolated from the stem of *Rhus semialata* var. roxburghii. Planta Med, (2002), 57: 247–249.
16. Lee JC, Lee KY, Kim J, Na CS, Jung NC, Chung GH, Jang YS, Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. Food ChemToxicol (2004), 42:1383–1388.

17. Janeway's Immunobiology. Kenneth Murphy&Casey weaver. 9th edition: 87-96
18. Kurt Lucas, Michael Maes. Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical Cycle in Chronic Inflammation: Possible Treatments Targeting the TLR4 Pathway. Molecular Neurobiology Volume 48, Number 1 190-204 0893-7648 SCI(E). 2013
19. Wüst Sophia J.A, Spielmann Patrick, Lüscher Thomas F, Wenger Roland H, Matter Christian M, Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages: Role of the scavenger receptors Lox1, SRA, and CD36)Crucet Margot, Atherosclerosis Vol. 229 No. 1 pp.110-117 0021-9150 SCI(E) 2013.
20. Im WK¹, Park HJ², Lee KS¹, Lee JH¹, Kim YD¹, Kim KH³, Park SJ³, Hong S², Jeon SH¹.
Fisetin-Rich Extracts of *Rhus verniciflua* Stokes Improve Blood Flow Rates in Mice Fed Both Normal and High-Fat Diets. J Med Food. 2016 Feb;19(2): 120-126.
21. Jung CH¹, Jun CY, Lee S, Park CH, Cho K, Ko SG. *Rhus verniciflua* stokes extract: radical scavenging activities and protective effects on H2O2-induced cytotoxicity in macrophage RAW 264.7 cell lines. Biol Pharm Bull. 2006 Aug;29(8):1603-1607.
22. Lee YR¹, Hwang JK, Koh HW, Jang KY, Lee JH, Park JW, Park BH. Sulfuretin, a major flavonoid isolated from *Rhus verniciflua*, ameliorates experimental arthritis in mice. Life Sci. 2012 May 22;90(19-20): 799-807.
23. Park DK¹, Lee YG, Park HJ. Extract of *Rhus verniciflua* Bark Suppresses 2,4-Dinitrofluorobenzene-Induced Allergic Contact Dermatitis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Vol. 2013 : 879696
24. Kim JH¹, Shin YC¹, Ko SG¹. Integrating traditional medicine into modern inflammatory diseases care: multitargeting by *Rhus verniciflua* Stokes. Mediators Inflamm. 2014:154561.

25. Choi, Woncheol, et al. *Rhus verniciflua* stokes against advanced cancer: a perspective from the Korean Integrative Cancer Center. BioMed Research International 2012 (2011).
26. Janeway's Immunobiology. Kenneth Murphy&Casey weaver. 9th edition :1~35
27. 해부 병태생리로 이해하는 SIM 통합내과학, 도서출판 정담, 2013.
28. Jill Suttles, Robert D. Stout, Macrophage CD40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis, Seminars in Immunology 21 (2009) : 257–264
29. Janeway's Immunobiology. Kenneth Murphy&Casey weaver. 9th edition.
30. D C. Sun, Michael J. Bevan., Effective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection without CD4 T Cell HelpJoseph, Science Vol. 300 No. 5617 pp.339-342 0036-8075 SCI(E). 2003
31. Patricia E. Simms and Thomas M. Ellis, Utility of Flow Cytometric Detection of CD69 Expression as a Rapid Method for Determining Poly- and Oligoclonal Lymphocyte Activation, CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, May 1996 : 301–304

Abstract in English

Rhus verniciflua stokes enhances macrophage activity and has anti-inflammatory effects in mice

Department of East-West Medicine
Graduate School of East-West Medical Science
Kyung Hee University
Kim, Bogeun

RVS is a herbal medicine that helps improve blood circulation by stimulating digestion, removing extravasated blood, and raising body temperature. The purpose of this research is to study innate and adaptive immune responses toward administrations of RVS extract. After orally administering RVS extract to mice, subsequent changes observed regarding macrophage scavenger receptors, inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophage, co-stimulating molecule induced response, systemic inflammatory response, T-cell and B-cell population in their spleens, and anti-CD3 antibody induced response were recorded. RVS administered Mice showed an increase in the SRA protein expressing cell population, although the SRA protein expression per cell lowered. In contrast, their LOX-1 protein-expressing cell population decreased, while LOX-1 protein expression per cell increased. As for CD36, no significant changes were observed. The results from the experimental

group also showed a rise in the phagocytic activity of acetylated-LDL in an RVS concentration-dependent manner. In response to LPS stimulation, both TNF- α and IL-6 decreased on macrophage and serum levels, CD86 decreased in an RVS concentration-dependent manner, CD40 remained the same, and the expression of MHC II molecules increased. Also, the mice from the experimental group showed a rise in their CD4 T-cell population, while the population of their CD8 T-cells and B-cells remained the same, and the expression of MHC II molecules decreased. The anti-CD3 antibody stimulation did not have any significant effect on the proliferation of splenic T-cells. However, the expression of CD69 decreased, while those of IL-4 and IFN- γ increased, and that of L-2 remained constant. In short, the data indicate that the intake of RVS increases phagocytic activity of macrophages and exerts anti-inflammatory effects, while generating changes in the immune response of splenic T-cells. The results show that RVS can stimulate and activate both innate and adaptive immune systems.