

## 황기의 메탄올 추출물의 용량에 따른 면역생물학적 연구

김정훈\* · 박정숙 · 채병숙 · 강태욱 · 박찬봉 · 안영근

원광대학교 식품약품안전성연구소

(Received December 20, 1995)

### Immunobiological Studies on Doses of Methanol Extract of Astragali Radix

Joung Hoon Kim\*, Joung Suk Park, Byeong Suk Chae, Tae Wook Kang,  
Chan Bong Park and Young Keun Ahn

Center for Food and Drug Safety, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

**Abstract**—Effects of methanol extract of Astragali Radix (AR) on the immune responses were studied using ICR mice. Mice were divided into 4 groups (10 mice/group), and methanol extracts of AR at doses of 0.05, 0.25 and 1.25 g/kg were orally administered to ICR mice once a day for 2 weeks. Mice were immunized and challenged with sheep red blood cells (SRBC). The results of this study were summarized as follows: (1) Methanol extract of AR at 0.05, 0.25 and 1.25 g/kg didn't affect the weight ratios of thymus to body, as compared with those in controls, but significantly increased spleen weight ratio. (2) Methanol extract of AR at 0.05 and 0.25 g/kg significantly increased hemagglutination titer and splenic plaque forming cells corresponding to humoral immunity, as compared with those in controls, but their enhancements were somewhat lowered at a high dose (1.25 g/kg). (3) Methanol extract of AR at 0.05 and 0.25 g/kg significantly increased delayed-type hypersensitivity reaction resulted from cell-mediated immunity, as compared with those in controls, but not so significant increases were observed at a high dose (1.25 g/kg). (4) Methanol extract of AR at 0.05 and 0.25 g/kg significantly increased phagocytic activity and the number of circulating leukocyte compared with those in controls, but their enhancements were lowered at a high dose (1.25 g/kg). These results suggest that methanol extract of Astragali Radix increased humoral and cell-mediated immune responses, phagocytic activity and the number of circulating leukocyte, dependent upon dose, but inhibited their enhancement effects were decreased at a high dose (1.25 g/kg).

**Keywords** □ Methanol extract of Astragali Radix, immune response, mice.

황기는 신농본초경에 상약으로 수록되어 있으며 중요한 약재로 무기력, 빈혈증, 식욕부진, 식은 땀과 같은 면역저하 상태의 환자에게 이용되고, 최근에는 강장제로 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup>

황기의 구성성분을 살펴보면 saponin, flavonoid, polysaccharide, free amino acid, isoflavan glycoside 등이 알려져 있다.<sup>3,6)</sup>

황기의 주요한 약리작용으로는 이뇨작용, 혈압강화작용, 한선억제작용, 보기작용 등에 관한 연구들이 보고되

었으며<sup>7)</sup>, Zhang 등<sup>8)</sup>은 황기의 ethanol extract를 생쥐에 투여시 SGPT치의 감소와 stilbenemidine에 의한 간손상의 보호작용을 보고하였으며, Dennis 등<sup>9)</sup>은 MeWo melanoma cell을 피하에 이식한 athymic nude 생쥐에게 황기 투여시 암세포 전이가 억제됨을 보고하였고, Rui 등<sup>10)</sup>은 Coxsackie B-3 virus에 의한 급성 심근염에 감염된 생쥐에 황기 투여시 항염작용이 있음을 보고하였고, Zhang 등<sup>11)</sup>도 토끼 또는 고양이에게 황기 saponin투여시 carrageenan에 의한 부종을 억제하여 현저한 항염작용을 보고하였다. 또한 Hou 등<sup>12)</sup>은 독감환자에 있어서 interferon 단독 투여시보다 interferon과 황기를 병용 투여시 더 높은 치료 효과가 있

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0653-50-6816 (팩스) 0653-54-7286

음을 보고하였고, Zhou<sup>13)</sup>는 사염화탄소에 의해 만성간염이 유발된 생쥐에 황기 투여시 1~2개월내에 SGPT치의 정상회복과 간에서 glycogen량의 정상회복을 보고하였다. 또한 Sun 등<sup>14)</sup>은 암환자에게 황기의 수침액 엑스를 투여한 후 graft versus host reaction의 증가로 세포성 면역의 회복을 보고하였고, Chu 등<sup>15)</sup>도 황기 추출물이 암환자에서 추출한 mononuclear cell의 xenogeneic graft versus host reaction의 증가로 정상 mononuclear cell에서와 같은 결과를 보였다고 보고하였고, Jing 등<sup>16)</sup>도 *in vitro*에서  $\alpha$ -interferon과 황기를 병용 투여시 natural killer (NK) cytotoxicity의 현저한 증가를 보고하였다. 한편, 황기의 indolizidine alkaloid 성분<sup>17-19)</sup>인 swainsonine에 의한 면역학적 연구로서, Humphries 등<sup>20)</sup>은 생쥐에게 swainsonine 투여시 B16-F10 melanoma cell의 전이억제와 비장의 NK cell의 활성을 증가시켰다고 보고하였고, Newton 등<sup>21)</sup>은 생쥐에게 swainsonine 투여시 B16-BL6 melanoma cell의 전이를 억제하고 interleukin-2생성과 NK cell의 활성을 증가시켰다고 보고하였으며, Oredipe 등<sup>22)</sup>은 생쥐에게 swainsonine의 투여시기와 투여량에 따라 세포독성에 대한 방어작용이 증가함을 보고하였고, Dennis 등<sup>23)</sup>은 *in vitro*와 *in vivo*에서 swainsonine 투여시 human melanoma cell의 전이를 억제시켰다고 보고하였고, Kino 등<sup>24)</sup>은 sarcoma 180으로 이식한 생쥐에게 swainsonine 투여시 면역적혈구에 대한 항체생성의 항진으로 면역성 회복과 폐에 B16 melanoma cell의 전이억제를 보고하였다. 또한, Hino 등<sup>25)</sup>은 *in vitro*에서 concanavalin A에 의해 유발된 혼합 임파구 반응이 swainsonine 투여시 면역조절제로 작용함을 보고하였다.

앞에서 본 바와 같이 황기의 약리작용, 항암작용 및 면역학적인 효과에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나, 황기 메탄올 엑스의 용량에 따른 면역생물학적 반응의 상관성에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 황기 메탄올 엑스의 용량에 따른 면역생물학적 반응에 미치는 영향을 규명하고자, 본 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

### 실험방법

**실험동물** - 생후 5~6주령, 체중 16~18g 암컷 ICR 생쥐를 삼육 실험동물개발 (경기도 오산시)에서

분양받아 시판 사료 (신촌 실험동물사료 제품: 조지방 3.5%이상, 조섬유 7.0%이하, 조단백질 22.5%이상, 조회분 9.0%이하, 인 0.5%이상)로 1주간 금식시켜 적응시킨 후, 10마리를 1군으로 하고 전체를 4군으로 나누어 23±2°C에서 2주간 사육하였다.

**황기 메탄올 엑스의 조제 및 투여** - 황기 (서울 동대문구 한약유통)를 세말로 한 다음 그 50g을 methanol (Sigma Co., M.O U.S.A.)에 넣고 70°C의 수욕상에서 3시간 환류냉각장치하여 추출 여과한 다음 이 여액을 서서히 감압농축시키고 용매를 증발시킨 다음, 이 황기 메탄올 엑스를 phosphate-buffered saline (이하 PBS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 용해시켜 생쥐 체중 kg당 0.05, 0.25 및 1.25 g을 2주간 1일 1회 경구투여하였고, 대조군은 PBS를 위와 같은 방법에 따라 투여하였다.

**체중 및 장기의 중량측정** - 실험동물의 체중은 공식 약물투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 장기의 중량은 최종 약물투여 1일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 비장과 흉선을 각각 적출하여 그 중량을 측정하여 대 체중 백분율을 구하였다.

**항원조제** - 면역적혈구 (Sheep red blood cells: SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 음성 면역의 경동맥으로부터 heparin 처리 주사기로 채혈한 후 동량의 Alserver's액 (pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution (HBSS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다.

**면역** - 원심 세척한 SRBC를 Reed 등<sup>26)</sup>의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10<sup>8</sup> cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml (1×10<sup>7</sup> cells)를 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였고, 지연형 과민반응을 위해 면역 4일 후에 생쥐의 좌측후지족척내에 2×10<sup>9</sup> cells/ml 부유액 0.05 ml (1×10<sup>8</sup> cells)를 주사하였다.

**혈청의 분리 및 불활성화** - 생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 불활성화시킨 후 4°C에서 보존하였다.

**적혈구응집소 (Hemagglutination titer; HA titer)의 측정<sup>27,28)</sup>** - SRBC의 응집소가를 microtitration

trays (Limbro Chemical Co., Inc. New Haven, C.T., U.S.A.)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 불활성화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배씩 연속 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% SRBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집유형을 관찰 판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

**적혈구 2-Mercaptoethanol (2-ME) 내성 응집소가의 측정** - 혈청의 2-ME 내성 응집소가를 판정하기 위하여 0.15 N 2-ME (Sigma, Co., M.O., U.S.A.)로 혈청을 처리하여, 2-ME 내성 항체를 immunoglobulin G (IgG) 항체로 판독하였는데, 판독방법은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 0.15 N 2-ME가 함유된 HBSS로 혈청을 희석하고, 증발하지 않도록 microplate를 밀봉하여, 37°C에서 30분간 방치한 후, SRBC를 가하여 응집소가를 위와 동일한 방법으로 검사하였다.

**족척종창반응의 측정 (Footpad swelling test)** - 지연형과민반응 (delayed-type hypersensitivity reaction: DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등<sup>29)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 면역 4일 후에 SRBC 0.05 ml ( $1 \times 10^8$  cells)를 생쥐의 좌측 후지족척에 피내주사하였다. 주사한 다음 24시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper (Mitutoyo Mfg. Co., Ltd., Japan)로 측정하였으며, 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정한 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등<sup>30)</sup>의 판독기준에 따라, 다음과 같이 족척종창지수로 표시하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{총창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

**비장세포 부유액의 조제<sup>26)</sup>** - 비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium (MEM: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포덩어리를 제거하였으며, 빙냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포수가  $2 \times 10^7$  cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험 때마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하

여 5분 경과 후 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정한 후, 그 백분율을 계산하였다.

**비장세포의 용혈반형성세포수 (Plaque forming cells; PFC)의 측정** - 비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham<sup>31)</sup>의 방법을 이용하여 다음과 같이 행하였다.

1) 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, 400×g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거 후 37°C의 0.83% 염화암모늄용액에 부유시켜 3분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 PBS에 부유시켜 적혈구를 제거한 다음 비장세포수를 혈구계산판에서 검경 관찰하였다.

2) SRBC를 PBS로 4회 세척하고 (400×g, 5분) 마지막 세척 후 PBS에  $4 \times 10^9$  cells/ml의 농도로 부유시킨 후 이 부유액 250 μl에 guinea pig complement (Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.) 500 μl를 혼합하여 ice bath 상에서 30분간 정치 후 사용하였다.

3) 위의 guinea pig complement 와  $4 \times 10^9$  SRBC 혼합액 150 μl, 비장세포 부유액 650 μl를 잘 혼합하여 microchamber (Takahashi Giken Glass 76×26 mm)에 100 μl씩 주입하고 wax-vaseline (1:1)으로 밀봉하여 CO<sub>2</sub> incubator (37°C)에서 1시간 배양 후 형성된 용혈반 (plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다.

4) 백만개의 비장세포 중 용혈반형성세포수 (PFC/10<sup>6</sup> spleen cells) 및 비장세포 전체중의 용혈반형성세포수 (PFC/total spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot Vm \cdot a} \times 10^6$$

$$\text{PFC}/\text{total spleen cells} = \frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cells}} \times C \times Vs$$

$$\text{단, } a = \frac{650}{800} \text{ (배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)}$$

N: The number of plaque observed in microchamber

C: The count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension

Vm: Volume of incubation mixture filled into

**Table I**—Effects of methanol extract of Astragali Radix on body and organ weights in ICR mice

AR MeOH extract (g/kg/day)	Body weight gain (%)	Percentage of body weight	
		spleen	Thymus
0	26.78±2.30	0.44±0.02	0.09±0.02
0.05	24.06±3.44	0.54±0.04**	0.11±0.05
0.25	32.72±2.17	0.47±0.02	0.12±0.00
1.25	22.64±2.01	0.66±0.07**	0.13±0.00

The methanol extracts of Astragali Radix (AR MeOH extract: 0.05, 0.25 and 1.25 g/kg, respectively) were administered orally to ICR mice daily for 14 consecutive days. Mice were immunized, *i.v.* with 10<sup>7</sup> SRBC 4 day prior to each measurement. Each value represents the mean±S.E. of 6 to 7 mice.

<sup>a)</sup> Asterisks denote a significant difference compared with the values in control mice not fed AR MeOH Ex.: \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

a microchamber (ml)

Vs: Total volume of spleen cell suspension (ml)

**대식세포활성도의 측정** - 대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등<sup>32)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물투여 1일 후에 Rotring ink를 1% gelatin 수용액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소 현탁액을 생쥐 체중 g당 0.01 ml씩 꼬리정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부 정맥혈관총 (retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube (20 μl: microhematocrit)로 천자하여 20 μl의 혈액을 10, 20 및 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate용액 2 ml가 든 test tube에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient 와 corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B: Body weight

L: Liver weight

S: Spleen weight

K: Phagocytic coefficient (측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph곡선)

**말초순환백혈구수의 측정** - 생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 Türk액 (1% gentian violet 수용액 1 ml 및 빙초산 1.0 ml를 증류수 100 ml에 녹인용액)으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

**통계학적 분석**<sup>33)</sup> - 모든 자료는 mean±standard error (S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 Student's *t*-test로 행하였다.

### 실험결과

황기의 메탄올 엑스가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 대한 실험결과는 다음과 같다.

**체중의 변화** - 각 군의 체중 변화는 Table I과 같다. 정상대조군의 체중증가율이 26.78±2.30%인데 비해 황기의 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg투여군은 각각 24.06±3.44%, 32.72±2.17%, 22.64±2.01%로 유의성이 없었다.

**비장과 흉선의 중량변화** - 각 군의 비장과 흉선의 중량변화는 Table I과 같다. 흉선의 중량비는 정상대조군이 0.09±0.02%인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg투여군은 각각 0.11±0.05%, 0.12±0.00%, 0.13±0.00%로 용량에 따라 그다지 유의성이 없는 증가를 보였다. 한편, 비장의 중량비는 정상대조군이 0.44±0.02%인데 비해 황기의 메탄올 엑스 0.05 및 1.25 g/kg 투여군은 각각 0.54±0.04% 및 0.66±0.07%로 유의성 있는 증가를 보였다.

**적혈구용집소와의 2-mercaptoethanol(2-ME) 내성 용집소기에 미치는 영향** - 각 군의 적혈구용집소가는 Table II에서와 같이, 정상대조군이 3.33±0.21인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.25 g/kg 투여군에서는 4.20±0.23으로 유의성 있는 증가를 보였지만, 고용량의 황기 메탄올 엑스 1.25 g/kg 투여군에 있어서는 적혈구용집소가의 증가율이 억제되는 경향을 보였다. 한편, 2-ME 내성 용집소가도 정상대조군이 2.00±0.36인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군에서는 3.60±0.35, 3.80±0.33 및 3.50±0.22로 유의성

**Table II** — Effects of methanol extract of Astragali Radix on antibody production in ICR mice

AR MeOH extract	PFC/10 <sup>6</sup> spleen cells	PFC/total spleen ( $\times 10^5$ )	HA titer ( $\log_2$ )	MER-HA titer ( $\log_2$ )
0	1,240 $\pm$ 37	1.42 $\pm$ 0.14	3.33 $\pm$ 0.21	2.00 $\pm$ 0.36
0.05	1,455 $\pm$ 76** <sup>a)</sup>	2.23 $\pm$ 0.37	3.80 $\pm$ 0.17	3.60 $\pm$ 0.35**
0.25	1,550 $\pm$ 19**	2.82 $\pm$ 0.42**	4.20 $\pm$ 0.23** <sup>a)</sup>	3.80 $\pm$ 0.33**
1.25	1,452 $\pm$ 82*	2.32 $\pm$ 0.32*	3.75 $\pm$ 0.19	3.50 $\pm$ 0.22**

Abbreviations: methanol extract of Astragali Radix, AR MeOH: extract plaque forming cells, PFC: hemagglutination, HA: 2-mercaptoethanol resistant hemagglutination, MER-HA. Mice were immunized *i.v.* with 10<sup>7</sup> SRBC 4 days prior to each assay. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 7 mice.

<sup>a)</sup> Asterisks denote a significant difference compared with the values in control mice not fed AR MeOH Ex.: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

**Table III** — Effects of methanol extract of Astragali Radix on delayed type hypersensitivity response in ICR mice

AR MeOH extract (g/kg/day)	Footpad swelling index to SRBC
0	7.82 $\pm$ 1.30
0.05	13.27 $\pm$ 1.32** <sup>a)</sup>
0.25	16.47 $\pm$ 0.98**
1.25	13.09 $\pm$ 2.16

Abbreviations: methanol extract of Astragali Radix, AR MeOH extract. Footpad swelling is measured as the difference between the thickness of the footpads challenged with SRBC and phosphate buffered saline, respectively. Footpad swelling index =  $\frac{(T-T_0)}{T_0} \times 100$ , where T<sub>0</sub> is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T is the left hind footpad swelling 24 hr after challenge. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 7 mice.

<sup>a)</sup> Asterisks denote a significant difference compared with the values in control mice not fed AR MeOH Ex.: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

**Table IV** — Effects of methanol extract of Astragali Radix on phagocytic activity in ICR mice

AR MeOH extract (g/kg/day)	Corrected phagocytic index <sup>a)</sup>
0	3.96 $\pm$ 0.25
0.05	5.07 $\pm$ 0.18*** <sup>b)</sup>
0.25	6.52 $\pm$ 0.35***
1.25	4.94 $\pm$ 0.12**

Abbreviations: methanol extract of Astragali Radix, AR MeOH extract.

<sup>a)</sup> Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weights of the liver and spleen. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 to 6 mice.

<sup>b)</sup> Asterisks denote a significant difference compared with the values in control mice not fed AR MeOH Ex.: \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

있는 증가를 보였는데, 이 경우에도 고용량 투여시는 증가율이 억제되는 경향을 보였다.

#### 용혈반 형성세포수에 미치는 영향 - 비장세포의 용

**Table V** — Effects of methanol extract of Astragali Radix on the number of circulating leukocyte in ICR mice

AR MeOH extract (g/kg/day)	Number of circulating leukocyte (/mm <sup>3</sup> )
0	6,166 $\pm$ 207
0.05	7,667 $\pm$ 257*** <sup>a)</sup>
0.25	7,990 $\pm$ 410**
1.25	7,555 $\pm$ 697

Abbreviations: methanol extract of Astragali Radix, AR MeOH extract. Blood samples for measuring leukocytes in mice were collected from the retro-orbital plexus immediately before assay. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 7 mice.

<sup>a)</sup> Asterisks denote a significant difference compared with the values in control mice not fed AR MeOH Ex.: \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

혈반 형성세포수에 대한 실험결과는 Table II에서 보는 바와 같이, 백만개의 비장세포중 용혈반 형성세포수는 정상대조군이 1,240 $\pm$ 37인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군은 각각 1,455 $\pm$ 76, 1,550 $\pm$ 79 및 1,452 $\pm$ 82로 유의성 있는 증가를 보였는데, 이 때에도 고용량 투여시 증가율이 억제되는 경향을 보였다. 또한 비장세포중의 용혈반 형성세포수 역시 정상대조군이 1.42 $\pm$ 0.14( $\times 10^5$  PFC/ml)인데 비하여 황기 메탄올 엑스 0.25 및 1.25 g/kg 투여군은 2.82 $\pm$ 0.42( $\times 10^5$  PFC/ml), 2.32 $\pm$ 0.32( $\times 10^5$  PFC/ml)로 유의한 증가를 보였는데, 고용량 투여시는 증가율이 억제되는 경향을 보였다.

**지연형 과민반응에 미치는 영향** - 지연형 과민반응(DTH)의 결과는 Table III에서 보는 바와 같이, 정상대조군의 DTH가 7.82 $\pm$ 1.30%인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군에서는 각각 13.27 $\pm$ 1.32% 및 16.47 $\pm$ 0.98%로 유의성 있는 증가를 보였지만, 고용량의 황기 메탄올 엑스 1.25 g/kg 투여군은 13.09 $\pm$ 2.16%으로 유의성 없는 증가를 보였다.

**대식세포의 활성화에 미치는 영향** - 대식세포의 탐식능을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table IV에서 보는 바와 같이, 정상대조군의 대식세포 활성이  $3.96 \pm 0.25$ 인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군에서는 각각  $5.07 \pm 0.18$ ,  $6.52 \pm 0.35$  및  $4.94 \pm 0.12$ 로 유의한 증가를 보였는데, 고용량 투여시는 증가율이 억제되는 경향을 보였다.

**말초순환백혈구수에 미치는 영향** - 말초순환백혈구수에 대한 결과는 Table V에서 보는 바와 같이, 정상대조군의 백혈구수가  $6,166 \pm 207$  WBC/mm<sup>3</sup>인데 비해 황기 메탄올 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군에서는 각각  $7,667 \pm 257$  WBC/mm<sup>3</sup> 및  $7,990 \pm 410$  WBC/mm<sup>3</sup>으로 유의성 있는 증가를 보였는데, 고용량의 황기 메탄올 엑스 1.25 g/kg 투여시는 증가율이 억제되는 경향을 보였다.

## 고 찰

황기의 메탄올 엑스 투여량이 생쥐의 면역반응에 상이한 영향을 미칠 것으로 기대되어 실시한 본 실험결과에 대한 고찰은 다음과 같다.

본 실험에서 황기의 메탄올 엑스 투여시 실험동물의 체중증가율과 흉선의 중량비에는 영향을 주지 않았으나(Table I), 비장의 중량변화는 정상대조군에 비해 황기의 메탄올 엑스 저용량인 0.05 g/kg과 고용량인 1.25 g/kg 투여군에서는 유의성 있는 증가를 보였다(Table I). 이는 황기의 메탄올 엑스 투여시 비장의 중량이 증가했다는 Wang 등<sup>34)</sup>의 보고와 유사한 점으로 미루어, 황기의 메탄올 엑스의 용량에 따라 체액성 면역반응에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

체액성 면역반응인 적혈구응집소가 및 2-ME 내성 응집소가 반응은 면양 적혈구에 대한 항체와 항원과의 반응으로서 T-dependent antigen에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데, 본 실험결과 적혈구응집소가는 정상대조군에 비해 황기 메탄올 엑스 0.25 g/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였고, 2-ME 내성 응집소가는 정상대조군에 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였는데, 특히 고용량 투여시는 그 증가율이 다소 낮아지는 경향을 보였다(Table II). 이는 황기추출물이 suppressor T cell 기능을 억제하거나 helper T cell 기능을 항진한다

는 Chu 등<sup>15)</sup>의 보고와 생쥐에게 황기 투여시 helper T cell의 증식을 증가시켰다는 Fang 등<sup>35)</sup>의 보고로 미루어, 황기 메탄올 엑스가 helper T cell을 항진시켜 항체생성이 증가된 것으로 사료되나, 황기 메탄올 엑스의 고용량 투여시는 항체생성의 증가율이 낮아지는 것으로 생각된다.

비장세포의 용혈반 형성세포수(PFC)는 정상대조군에 비해 황기 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였는데, 특히 고용량 투여시는 그 증가율이 낮아지는 경향을 보였다(Table II). 이는 황기의 부탄올 분획을 생쥐에 투여시 plaque forming cell이 현저히 증가된 우리 실험실의 예비연구(data not shown)와 위의 적혈구응집소가, 2-ME 내성 응집소가 및 PFC의 결과를 종합하여 살펴보면, 황기의 메탄올 엑스가 lymphocyte의 활성화와 immunoglobulin 합성을 증진시켜 체액성 면역을 증가시킨 것으로 사료되나, 고용량 투여시는 체액성 면역의 증가율이 낮아지는 것으로 생각된다.

세포성 면역반응인 족척중창반응에 의해 측정된 DTH 반응은 감작임파구에 의한 lymphokine의 화학적 전달인자의 유리에 의해서 성립되며, 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 정상대조군에 비해 황기의 메탄올 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다(Table III). 이는 myocarditis에 걸린 생쥐에게 황기 투여시 항염작용이 있었다는 Yang<sup>36)</sup>의 보고와 바이러스에 감염된 생쥐에게 황기 투여시 항체생성과 interferon 형성을 증가시켰다는 Hou<sup>37)</sup>의 보고로 미루어, 황기의 메탄올 엑스 투여시 lymphokine의 생성과 macrophage의 활성을 촉진시킴으로서 세포성 면역을 증가시킨 것으로 사료되나, 황기 메탄올 엑스의 고용량 투여시는 세포성 면역에 영향이 없음이 사료된다.

대식세포의 활성화는 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukine의 분비에 중요한 역할을 하며, 그 탐식능이 망상조직내피체에 얼마나 영향을 끼쳤는가를 알기 위한 지표로 이용되는 것으로, 본 실험에서 황기의 메탄올 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군에서는 정상대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였지만, 고용량 투여시는 그 증가율이 낮아지는 경향을 보였다(Table IV). 이는 황기의 swainsonine을 생쥐에 투여시 B16-F10 melanoma cell의 전이를 억제하고 natural killer(NK) cell의 활성을 증가시켰다는 Humphries 등<sup>20)</sup>의

보고와 황기의 부탄을 분획이 대식세포 활성을 현저히 증가시켰다는 우리 실험실의 예비연구 (data not shown)로 미루어, 황기의 메탄을 엑스가 T cell 또는 NK cell의 증식과 lymphokine 등의 분비를 촉진함으로써 macrophage의 활성을 증가시킨 것으로 사료되며, 또한 황기의 항종양작용에 대한 Sun 등<sup>14)</sup>과 Kino 등<sup>24)</sup>의 보고로 미루어 볼 때, 황기 메탄을 엑스가 T cell과 NK cell의 활성에 미치는 영향보다는 대식세포 활성에 미치는 영향에 크게 의존할 것으로 추정되지만, 고용량 투여시 대식세포 활성의 증가율을 억제시키는 것으로 보아, 이에 대한 정확한 기전을 구명하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

말초순환백혈구수는 정상대조군에 비해 황기의 메탄을 엑스 0.05, 및 0.25 g/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다 (Table V). 이는 이상의 전반적인 체액성 및 세포성 면역반응의 결과 등과 종합해 볼때, 황기의 메탄을 엑스가 임파구 활성에 영향을 미쳐 백혈구의 생산을 촉진하여 백혈구수가 증가한 것으로 사료되나, 황기 메탄을 엑스의 양의 초과는 백혈구수에 영향을 없는 것으로 사료된다.

따라서 황기 메탄을 엑스를 면역증진 목적으로 투여시 상용량 투여가 바람직하다고 생각되며, 또한 고용량의 황기 메탄을 엑스 투여시 면역증진 억제는 황기 자체의 독작용이라기 보다는 포화로 생각되나, 이에 대한 정확한 기전을 구명하기 위해서는 황기의 각 분획 연구와 함께 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

황기 메탄을 엑스(0.05~1.25 g/kg, 경구투여)가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실험한 결론은 다음과 같다.

1. 황기 메탄을 엑스 0.05, 0.25 및 1.25 g/kg 투여군은 정상대조군에 비해 체중 증가율과 흉선의 중량비에는 영향을 주지 않았으나, 비장의 중량비를 유의성 있게 증가시켰다.

2. 황기 메탄을 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군은 정상대조군에 비해 체액성 면역과 관계되는 적혈구 응집소와 용혈반 형성세포수에 대해 유의성 있는 증가를 보였는데, 특히 고용량의 황기 메탄을 엑스 1.25 g/kg 투여군에 있어서는 그 증가율이 낮아졌다.

3. 황기 메탄을 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군은 정

상대조군에 비해 세포성 면역와 관계되는 지연형 과민 반응을 유의성 있게 증가시켰는데, 고용량의 황기 메탄을 엑스 1.25 g/kg 투여군에 있어서는 유의성 없는 증가를 보였다.

4. 황기 메탄을 엑스 0.05 및 0.25 g/kg 투여군은 정상대조군에 비해 대식세포의 활성과 말초순환 백혈구수에 대해 유의성 있는 증가를 보였는데, 특히 고용량의 황기 메탄을 엑스 1.25 g/kg 투여군에 있어서는 그 증가율이 낮아졌다.

이상의 결과로 보아 황기 메탄을 엑스 투여는 용량의 존적으로 체액성 및 세포성 면역, 대식세포의 활성 및 말초순환 백혈구수의 증가를 보였으나, 특히 고용량의 황기 메탄을 엑스 1.25 g/kg 투여시는 그 증가율이 낮아졌다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1994년 원광대학교 부설연구소 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Sun, T., Chang, Y. H. and Uy, G. Q. : Effect of Fu-Zheng therapy in the management of diseases. *Chin. Med. J.* **61**, 97 (1981).
- 2) Tu, G. S. : *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. People's Medical Publishing House, Beijing, China. 1988, p. 109.
- 3) He, Z. Q. and Findlay, J. A. : Constituents of *Astragalus membranaceus*. *J. Nat. Prod.* **54**, 810 (1991).
- 4) Huang, Q. S., Lu, G. B., Li, Y. C., Guo, J. H. and Wang, R. X. : Studies on the polysaccharides of Huang Qi. *Acta Pharm. Sin.* **17**, 200 (1982).
- 5) Ionkova, I., Budzikiewicz, H. and Alfermann, A. W. : Cycloartane-derived saponin from transformed root cultures of *Astragalus mongholicus*. *Planta Med.* **59**, 660 (1993).
- 6) Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M. and Yoshikawa, M. : Saponin and sapogenol. XXXIV. Chemical constituents of Astragali Radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (1). *Cy-*

- cloastragenol, the 9, 19-cyclo lanostane-type aglycone of astragalosides, and artifact aglycone astragenol. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 689 (1983).
- 7) Xie, Z. P. and Huang, X. K. : *Common of traditional Chinese medicine in English*. Beijing Medical College, Beijing, 1980, p. 243.
  - 8) Zhang, Z. L., Wen, Q. Z. and Liu, C. X. : Hepatoprotective effects of *Astragalus* root. *J. Ethnopharmacol.* **30**, 145 (1990).
  - 9) Dennis, J. W., Koch, K., Yousefi, S. and Elst, I. V. : Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. *Cancer Res.* **50**, 1867 (1990).
  - 10) Rui, T., Yang, Y., Zhou, T., Zang, J., Yang, X. and Chen, H. : Effect of *Astragalus membranaceus* on electrophysiological activities of acute experimental Coxsackie B-3 viral myocarditis in mice. *Chin. Med. Sci. J.* **8**, 203 (1993).
  - 11) Zhang, Y. D., Wang, Y. L., Shen, J. P. and Li, D. X. : Effects on blood pressure and inflammation of *Astragalus* saponin. I. A principle isolated from *Astragalus membranaceus*. *Acta. Pharm.* **19**, 333 (1984).
  - 12) Hou, Y., Ma, G., Wu, S., Li, Y. and Li, H. : Effect of Radix Astragali seu Hedysari on the interferon's system. *Chin. Med. J.* **94**, 35 (1981).
  - 13) Zhou, Q. J. : Chinese medicinal herbs in the treatment of viral hepatitis. In: Chang, H. M., Yeung, H. W., Tso, W. W. and Koo, A. (eds) *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. World Scientific, Singapore, 1985, p. 215.
  - 14) Sun, Y., Hersh, E. M., Talpaz, M., Lee, S. L., Wong, W., Loo, T. L. and Mavligit, G. M. : Immune restoration and/or augmentation of local graft versus host reaction by traditional Chinese medicinal herb. *Cancer* **52**, 70 (1983).
  - 15) Chu, D. T., Wong, W. L. and Mavligit, G. M. : Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. I. Immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractionated *Astragalus membranaceus* in vitro. *J. Clin. Lab. Immunol.* **25**, 119 (1988).
  - 16) Jing, J. P. and Lin, W. F. : Preliminary study on effects of mechanism of human umbilical cord blood derived interferon- $\alpha$  and of *Astragalus membranaceus* on natural killer toxicity. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* **3**, 293 (1983).
  - 17) Nagahashi, G., Tu, S. I., Fleet, G. and Namgoong, S. K. : Inhibition of cell wall-associated enzymes in vitro and in vivo with sugar analogs. *Plant Physiol.* **92**, 413 (1990).
  - 18) Elbein, A. D. : Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 497 (1987).
  - 19) Olden, K., Breton, P., Grzegorzewski, K., Yasuda, Y., Gause, B. L., Oredipe, O. A., Newton, S. A. and White, S. L. : The potential importance of swainsonine in therapy for cancer and immunology. *Pharm. Ther.* **50**, 285 (1991).
  - 20) Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L., Molyneux, R. J. and Olden, K. : Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. *Cancer Res.* **48**, 1410 (1988).
  - 21) Newton, S. A., White, S. L., Humphries, M. J. and Olden, K. : Swainsonine inhibition of spontaneous metastasis. *J. Natn. Cancer Inst.* **81**, 1024 (1989).
  - 22) Oredipe, O. A., White, S. L., Grzegorzewski, K., Gause, B. L., Cha, J. K., Miles, V. A. and Olden, K. : Protective effects of swainsonine on murine survival and bone marrow proliferation during cytotoxic chemotherapy. *J. Natn. Cancer Inst.* **83**, 1149 (1991).
  - 23) Dennis, J. W., Laferté, S., Fukuda, M., Dell, A. and Carver, J. P. : Asn-linked oligosaccharides in lectin resistant tumor cell mutant with varying metastatic potential. *Eur. J. Biochem.* **161**, 359 (1986).
  - 24) Kino, T., Inamura, N., Nakahara, K., Kiyoto, S., Goto, T., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. : Studies on an immunomodulator, swainsonine. II. Effects of swainsonine on mouse immunodeficient system and experimental murine tumor. *J. Antibiot. Tokyo* **38**, 936 (1985).
  - 25) Hino, M., Nakayama, O., Tsurumi, Y., Adachi, K., Shibata, T., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki,



- H. and Imanaka, H. : Studies of an immunomodulator, swainsonine. I. Enhancement of immune response by swainsonine *in vitro*. *J. Antibiot.* **38**, 926 (1985).
- 26) Reed, N. D., Crowie, P. K., Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationship in immunodeficient animals. *B. Scand. J. Dermatol.* **1884** p. 1884.
- 27) Coombs, R. R. A. and Fiset, M. I. : Detection of complete antibodies to egg albumin by means of sheep red cell egg albumin antigen unit. *Brit. J. Exp. Path.* **35**, 472 (1954).
- 28) Stavitsky, A. B. : Micromethods for the study of protein and antibiotics. *J. Immunol.* **72**, 360 (1954).
- 29) Yoshikai, Y., Maie, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on delayed-footpad reaction to SRBC in mice. *Immunology* **38**, 577 (1979).
- 30) Sugimoto, M., Kojima, A. M., Yaginuma, K. and Gashira, Y. E. : Cell-mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **28**, 32 (1975).
- 31) Cunningham, A. : Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* **17**, 5 (1973).
- 32) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B. N. : Etude quantitative de l'activité granulopexique du système réticuloendothélial chez la souris. *C. R. Soc. Biol. Paris* **148**, 43 (1954).
- 33) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. : *Statistical methods*, 6th., Iowa State University Press, Iowa, 1967, p. 1.
- 34) Wang, D. Y., Yang, W. Y., Zhai, S. K. and Shen, M. L. : Effect of *Astragalus* polysaccharide on ribonucleic acid metabolism. *Acta Biochem. Biophys. Sin.* **12**, 343 (1980).
- 35) Fang, S. D., Chen, Y., Xu, X. Y., Ye, C. Q., Zhai, S. K. and Shen, M. L. : Studies of the active principles of *Astragalus mongholicus* Bunge. I. Isolation, characterization and biological effect of its polysaccharides. *Org. Chem.*, 1982, p. 26.
- 36) Yang, Y. Z. : Treatment of experimental Coxsackie B-3 viral myocarditis with *Astragalus membranaceus* in mice. *Chin. Med. J.* **103**, 14 (1990).
- 37) Hou, Y. D. : Interferon induction and lymphocyte transformation stimulated by *Astragalus membranaceus* in mice spleen cells. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* **1**, 137 (1981).