

시호 약침제제가 생쥐의 면역활성에 미치는 영향

문진영, 임종국, 최혜경, 이임태¹, 이항우², 남경수^{1*}

동국대학교 한의과대학 경혈학교실, 의과대학 약리학교실¹,
영남대학교 이과대학 생물학과²

Effect of Bupleuri Radix Aqua-Acupuncture Solution on Immune Response in Mice

Jin Young Moon, Jong Kook Lim, Hey Kyung Choi, Yim Tae Lee¹,
Hang Woo Lee², and Kyung Soo Nam^{1*}

*Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine and
Department of Pharmacology, College of Medicine,
Dongguk University, Kyongju 780-714 and
College of Science, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea*

Abstract - In order to investigate the effects of Bupleuri Radix aqua-acupuncture solution (BRAS) on immuno suppression induced by glucocorticoid, ICR mice were administrated with glucocorticoid (80 mg/kg) for 7 days, and immunized with hapten, methamphetamine-horseradish peroxidase (10 µg/mouse). And then, BRAS (0.2 ml/mouse) injected into CV₄ and BL₂₃, which are the classical acupuncture points in traditional medicine, for 7 days. And then B and T cells proliferation and cytolytic activity of natural killer (NK) cells were measured. Intraperitoneal injection of glucocorticoid decreased lysozyme activity in macrophage and cytolytic activity of NK cell. B and T cell proliferation were significantly increased in aqua-acupuncture group compared to normal group. On the other hand, BRAS significantly increased the lysozyme activity in macrophage, and the cytolytic activity of purified NK cell on K562. These results suggest that BRAS at CV₄ and BL₂₃ may proliferate B and T cells that are suppressed by glucocorticoid and activate NK cell activity.

Key words - Bupleuri Radix aqua-acupuncture: immunomodulator.

생체가 이물질에 노출되었을 경우, 특이적 임파구의 활성화와 증식 및 이물질인 항원에 대하여 특이적인 항체가 만들어지는 면역응답 반응이 일어난다. 이 반응에는 macrophage와 T 세포 및 B 세포가 주된 역할을 담당하고 있으며, 또한 비특이적 생체 내 방어작용에 관여하는 natural killer(NK)세포

*교신저자 : Fax 0561-770-2003

의 활성화도 종양면역응답에서는 중요한 지표가 된다. 이와 같이 세포성 면역기전은 체액성 면역기전과 더불어 생체방어의 중요한 역할을 담당하고 있다.

시호(*Bupleurum falcatum* Linne.)는 미나리과에 속한 다년생초본인 시호의 뿌리 및 전초로서 처방 소시호탕의 주생약이며 우리 신체에서 주로 간에 적용되어져 온 생약으로 알려져 왔다. 한편 약침

Table I. Classification of experimental groups

Groups	Glucocorticoid (mg/kg, i.p.)	MA-HRP (μ g/mouse, i.p.)	BRAS (ml/mouse)	Acupuncture point
Normal	-	10	-	-
Control	80	10	-	-
BRAS-MP	80	10	0.2	CV ₄ & BL ₂₃
BRAS-BL	80	10	0.2	Blank Locus

요법이란 단일제제 혹은 복합제제를 정제하여 경혈 및 아시혈 등의 양성 반응점에 주입함으로써 침자극 효과와 더불어 약물자체의 약리작용에 의해 질병을 예방하고 치료하고자 하는 신침요법으로서 현재 수종의 약침정제법, 유효성 시험 및 독성시험에 대해서도 활발한 연구가 이루어지고 있다.^{1,2)}

본 실험에서는 간보호, 해열 및 소염 등의 목적으로 사용되어지고 있는 시호³⁻⁵⁾를 재료로 약침액을 제조하여 시호약침의 생체 방어 기능 중 특히 면역조절 효과를 알아보고자, mouse에 제조한 시호약침액을 일정기간 전처리한 다음 면역억제제 (glucocorticoid)를 사용하여 실험동물의 면역체계를 저하시킨 후, 항체역가 및 macrophage 활성화 (lysozyme activity), T 및 B 세포의 증식능과 NK세포의 활성도를 측정하였다.

재료 및 방법

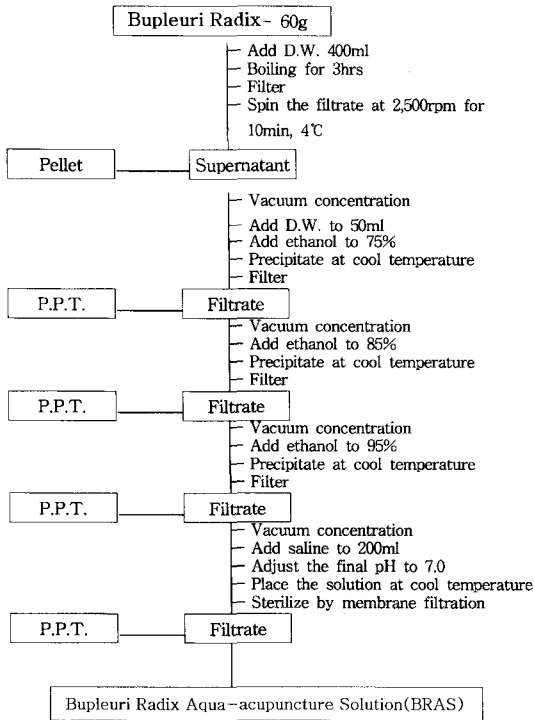
시약 및 기기-본 실험에 사용한 시약중 Tris-HCl, RPMI 1640 및 Percoll은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.), Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.), Nylon wool은 Wako사(Wako Chem. Co., Tokyo, Japan) 그리고 NK 세포의 활성 측정에 사용한 cytotoxicity detection kit는 Boehringer사(Boehringer Mannheim Co., GmbH, Germany)의 제품들을 사용하였다. 그 외에 사용한 일반시약들은 Sigma사 및 Wako사의 특급제품을 사용하였다. 또한 본 실험에서는 ELISA reader(Titertek Multiscan MCC/340, Lab. System. Finland), scintillation counter(United Technologies, Packard) 등의 기기를 사용하였다.

실험동물 및 실험군 분류-실험동물은 효창 Science에서 inbred female mouse인 Balb/c(체중

25 g 내외)를 구입하여 항온 및 항습의 조건(20±2℃, 40~60%)을 갖춘 본교 동물실험실에서 일정성분의 혼합 mouse사료로 유지시킨 뒤 실험동물에 조건을 투입하였다. 실험군은 생쥐 7마리를 한 군으로 하여, 항원인 MA-HRP(methamphetamine-horseradish peroxidase)만 1회 복강주사(10 μ g/mouse)한 정상군(Normal), 면역억제제인 glucocorticoid⁶⁾를 7일 동안 복강주사(80 mg/kg, 1day)한 다음 24시간 후에 MA-HRP를 주사한 대조군[Control], glucocorticoid를 투여한 다음 24시간 후에 MA-HRP를 주사하고, 다시 24시간이 지난 시점으로부터 7일간 시호 약침을 처치(0.2 ml/mouse)한 시호 약침처치군으로 분류하였다. 또한 시호 약침 처치군은 관원(CV₄) 및 신유(BL₂₃)혈에 처치한 경혈군(BRAS-MP)과 임의혈에 주입한 임의군(BRAS-BL)으로 나누어 실험을 시행하였다(Table I). 본 실험에서 실험동물에서의 경혈의 위치는 인체의 관원 및 신유혈과 해부학적으로 상응하는 부위를, 그리고 임의혈은 미추 부위의 경혈이 아닌 부위를 선택하였다.

시호 약침제제의 조제-시호는 동국대학교 경주한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 증거표본은 동국대학교 의과대학 약리학교실에서 보관 중이다. 본 실험에서는 수제(水提)-알콜 침법(沈法)⁷⁾에 의해 다음과 같이 시호약침액을 제조하였다(Scheme 1).

ELISA에 의한 항체의 역가측정-본 연구에서 항체의 역가측정은 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법^{8,9)}으로 행하였다. MA-HRP(methamphetamine-horseradish peroxidase)를 coating buffer를 사용하여 4℃에서 하룻밤 흡착시키고, anti-MA 혈청을 여러 농도로 serial dilution하여 분주하고, biotinylated anti-mouse Igs, alkaline phosphatase conjugated streptavidin, PNPP(*para*-nitrophenylphosphate)



Scheme 1. Preparation of Bupleuri Radix Aqua-acupuncture Solution (BRAS).

를 일정한 방식으로 가한 다음, EDTA 용액으로 반응을 중단시킨 후, ELISA reader로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Macrophage에서 lysozyme 활성 측정¹⁰⁾ - 각 군의 mouse를 질식시키고 복부의 피부를 절개하여 벗긴 다음 PBS 7 ml을 주사한 후, 배 언저리를 약 2분간 동일한 조건으로 가볍게 마사지 하고 주사기로 복강의 PBS를 회수한다. 이를 샤아레에 넣어 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 다음 부착하지 않은 세포는 제거하고 macrophage를 모은다. 10초간 4회 sonication하여 세포막을 완전히 파괴한 다음 9,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하기 위하여 4℃에 보관했으며, lysozyme 활성도는 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma사)의 용해율로 측정하였다.

비장세포의 조제 - 시호 약침 처치가 완료된 시점으로부터 24시간 후에 생쥐를 질식시키고 고정시킨 다음, 70%의 alcohol로 전신을 소독하고 생쥐의 비장을 무균적으로 적출하여 냉장보관한 RPMI 1640 배지 10 ml이 들어 있는 샤아레로 옮기고, 작은 해

부 가위로 비장을 잘게 자른 뒤, 끝이 굽은 멸균 핀셋으로 주물러 가면서 비장속에 들어 있는 대부분의 세포를 유출시켰다. 이 세포 부유액 중의 적혈구는 lysis buffer(0.16M NH₄Cl-0.17M Tris, pH 7.2) 5 ml을 천천히 가한 다음, 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. 그 후 1회 세척한 다음 멸균된 nylon mesh(#200)를 사용하여 여과해서 다른 조직의 혼입을 제거하였으며, 10% FBS-RPMI 배지에 현탁하여, 다음 실험에 사용하였다.

Nylon wool column의 제작¹¹⁾ - Nylon wool (Wako사)을 아주 섬세하게 푼 다음 0.8 g을 달아 10 ml의 주사기에 넣고 멸균시킨다. 여기에 RPMI 1640배지 10 ml를 가하여 기포를 제거시키고 column을 충분히 activation시킨다. 이때 주사바늘은 25 gage를 사용하며 mouse 1마리 당 column을 1개씩 만들어 실험에 사용하였다.

T 세포 및 B 세포의 분리 - 위에서 조제한 비장세포 부유액을 1×10⁸ cells/ml로 조제한 다음 미리 준비한 nylon wool column에 천천히 주입한다. 다시 10% FBS-RPMI 1640 배지를 3 ml 더 첨가한 다음 column을 작동시키고 적당한 때에 작동을 중지, 37℃에서 1시간 배양시킨다. 그 후 37℃로 예온시켜 놓은 10% FBS-RPMI 1640 배지 7 ml를 사용하여 column을 elution한다. 이때 유출되어 나오는 세포는 대부분 T 세포(natural killer 세포 포함)이며, nylon wool column에 부착되어 있는 세포는 B 세포로 사용하였다. Nylon column에 부착되어 있는 B 세포의 분리는 멸균된 cold-PBS (4℃ 이하)를 사용하여 분리하고 10% FBS-RPMI 1640배지로 세척하여 사용하였다.

B 세포의 증식에 미치는 영향^{12, 13)} - B세포를 10% FBS-RPMI 1640배지로 세척하고 2.5×10⁶ cells/ml로 조제 한 다음, 한 well당 200 μl씩 microtiter plate에 균등하게 넣고, lipopolysaccharide를 각 well당 5 μg씩 가한 다음, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양을 시작하였다. 배양 종료 6시간 전에 ³H-thymidine을 10 μCi(0.5 μCi/ml) 가한 다음, 남은 배양시간을 완료한 후, cell harvester로 세포를 흡입하고 glass filter (Whatman GF/C)위에 세포를 모은다. 그 후, 증류수를 사용하여 glass filter 위에 있는 세포를 동일한 조건으로 3번 세척한 다음 glass filter를 실온

에서 30분 정도 건조시키고 filter를 scintillation vial에 넣고, toluene계 cocktail용액 5 ml를 넣은 다음, 각 시료의 cpm값을 scintillation counter를 사용하여 측정하였다.

T 세포의 증식에 미치는 영향¹⁴⁾ - T 세포를 10% FBS-RPMI 1640배지를 사용하여 2.5×10^6 cells/ml로 조제한 다음, 96 well plate에 200 μ l씩 균등하게 넣는다. 다음에는 T 세포 mitogen으로 알려진 concanavalin A 1 μ g을 넣고 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양한다. 배양 종료 6시간 전에 ³H-thymidine(0.5 μ Ci/ml)을 10 μ l씩 넣은 다음, 다시 8시간 더 배양하였다. 반응 종료 후 cell harvester로 세포를 흡입하고 이하 실험은 B 세포에서와 같이 동일한 조건에서 행하여 세포내로 uptake된 thymidine의 양을 scintillation counter에서 측정하였다.

T 세포 분획에서 NK세포의 정제¹⁵⁾ - Percoll 불연속밀도구배 원심법에 의해 NK 세포의 농축 및 정제를 시행하였다. 그리고 NK세포의 분리는 제조한 4.5% 불연속구배에 위의 실험에서 nylon wool column에 부착되지 않고 통과된 세포(T 세포분획) 1 ml를 천천히 넣고, 1,600 rpm에서 45분간 실온에서 원심분리를 행한다. 이때 속도는 반드시 5분간에 걸쳐서 천천히 증가되도록 하여야 한다. 원심분리가 끝나면 각각의 중간층을 순서대로 천천히 회수한다. 본 실험에서는 첫번째 중간층을 NK세포로 회수하여 10% FBS-RPMI 1640배지로 2번 세척하여 NK세포 활성 측정에 사용하였다.

NK 세포의 활성측정¹⁶⁾ - NK 세포의 활성을 측정하기 위하여 cytotoxicity detection kit를 사용하였다. 먼저 분리한 NK세포를 밀이 등근 96 well plate에 1×10^6 cells/well이 되게 100 μ l씩 분주하였다. 한편 표적세포로서는 배양한 K562 세포를 1,000 rpm으로 3분간 원심분리 하여 세척하고, assay medium(10% FBS-RPMI 1640)으로 현탁시킨 후, 1×10^4 cells/well이 되도록 100 μ l를 가하였다. Assay medium 200 μ l내에 함유되어 있는 NK 세포 및 K562 표적세포를 가볍게 혼합한 다음, 37°C 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양시켰다. 배양 후, plate를 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 100 μ l를 취한 다음, 다른 plate에 옮기고, 여기에 100 μ l의 반응 혼합액을 각 well에

분주한 다음, 실온에서 약 30분간 차광하여 반응시킨 후, 생성되는 붉은색의 formazan salt의 흡광도를 492 nm에서 측정하였다. 본 측정에서 background control로는 assay medium 200 μ l를 넣었으며, positive control로서는 100 μ l의 표적세포(1×10^4 cells)에 2% Triton X-100-assay medium을 100 μ l를 첨가하였다. Negative control로는 100 μ l의 표적세포에 assay medium 100 μ l를 첨가하였다.

통계학적 처리 - 본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, p값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

결 과

항체 생성능에 미치는 영향 - 항체 생성능력의 측정은 실험동물에 항원을 주사하여 유도된 면역반응을 주사한 항원에 대한 혈청내 면역 글로블린의 역가로 나타내었다. 시호 약침제제가 hapten인 MA-HRP에 의해 유도되는 면역원성을 측정하기 위해, 시호 약침처치가 완료된 생쥐의 혈청을 50배, 100배, 200배, 400배, 800배, 1600배, 3200로 희석하여 ELISA reader로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같이 혈청을 50배에서 3200배까지 희석하여 흡광도를 측정한 결과, 정상군에서는 혈청 희석배수가 증가할수록 흡광도는 점점 감소되어 나타났으며, 한편 대조군의 흡광도는 정상군에 비해 현저하게 감소된 것으로 나타났다. 특히 대조군에서 혈청을 800배이상 희석할 경우 항체역가가 관찰되지 않았으므로, 면역 억제제의 투여로 인하여 생쥐의 항체 생성능이 크게 감소되었음을 알 수 있었다. 반면 면역 억제제 투여후, 시호약침을 경혈로 투여한 실험군의 흡광도는 대조군에 비해 현저하게 증가하였으며, 시호 약침을 임의혈에 투여한 실험군에서는 역시 대조군에 비해 항체 생성능이 강하게 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 1).

Macrophage의 활성에 미치는 영향 - 시호약침제제가 macrophage의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 본 연구에서는 시호약침 처리가 완료된 생쥐의 복강에서 macrophage를 회수하여 그 수 및 lysozyme 효소의 활성을 측정하였다. 먼저 각

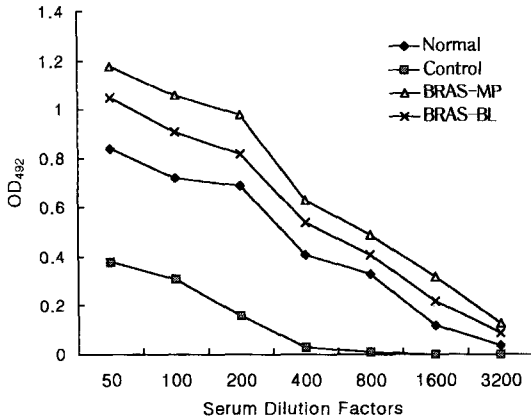


Fig. 1. Effect of BRAS on MA-HRP induced antibody production. BRAS: Bupleuri Radix aquacupuncture solution, Normal: untreated group, Control: injected with glucocorticoid (80 mg/kg) into the peritoneum for 7 days, Normal: untreated group, BRAS-MP: BRAS treated into CV₄ and BL₂₃ for 7 days after injection with glucocorticoid, BRAS-BL: BRAS treated into blank locus for 7 days after injection with glucocorticoid, MA-HRP: methamphetamine-horseradish peroxidase, a): O.D value at 492 nm.

실험군별로 macrophage의 수를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 감소된 반면, 시호 약침을 경혈로 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 macrophage 수가 3.1배 증가하였고, 임의혈로 투여한 실험군에서도 대조군에 비교하였을 때 보다 2.3배 증가한 것으로 나타났다(data not shown). 한편 항원의 절편화에 관련된 효소인 macrophage내의 lysozyme 효소활성을 관찰한 결과, 대조군이 정상군에 비해 30% 감소하였으며, 반면 시호 약침을 경혈로 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 1.6배로 유의성있는 증가를 보였다. 그러나 본 실험의 결과 시호 약침을 임의혈로 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

B 세포의 증식에 미치는 영향 - 시호 약침이 면역억제제의 투여로 억제된 B세포의 증식에 미치는 영향을 ³H-thymidine을 사용하여 배양시간 중에 B세포내로 incorporation된 정도를 측정함으로써 알아보았다. B 세포의 증식능 그 결과, 대조군은 정상군에 비해 B 세포의 증식이 31% 억제됨을 보였으며, 반면 시호 약침을 경혈로 투여한 실험군은 대조군에 비해 60%증가하였고, 임의혈로 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 48%증가됨을 보였다 (Fig. 3).

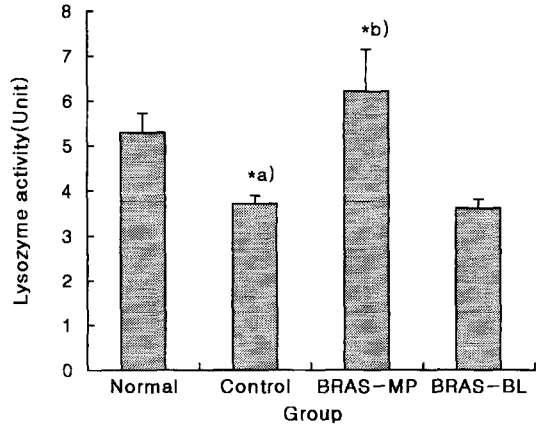


Fig. 2. Effect of BRAS on the lysozyme activity in macrophage. The lysozyme and *Micrococcus lysodeikticus* were incubated at 37°C for 4hrs. The lysozyme activity was measured by absorbance at 450 nm after incubation. The detail assay procedure was described in the material and method. Normal: untreated group, Control: injected with glucocorticoid (80 mg/kg) into the peritoneum for 7 days, BRAS-MP: BRAS treated into CV₄ and BL₂₃ for 7 days after injection with glucocorticoid, BRAS-BL: BRAS treated into blank locus for 7 days after injection with glucocorticoid. Each values represents the mean S. E.(n=7). a): Values statistically significant as compared with normal group. b): Values statistically significant as compared with control data of each group (*p<0.05).

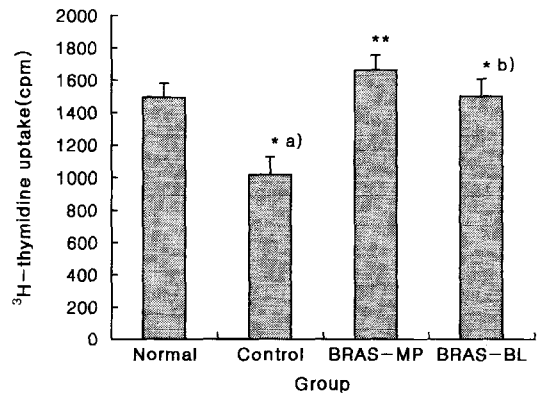


Fig. 3. Effect of BRAS on the B cell proliferation by ³H-thymidine incorporation. The B cell(5×10⁵ cells/well) and lipopolysaccharide (5 µg/well) were incubated at 37°C for 66 hrs. And then ³H-thymidine (10 µl, 0.5 µCi/ml) was added. After incubation, each cell proliferation was measured by ³H-thymidine incorporation. a): Values statistically significant as compared with normal group. b): Values statistically significant as compared with control data of each group (*p<0.05, **p<0.01).

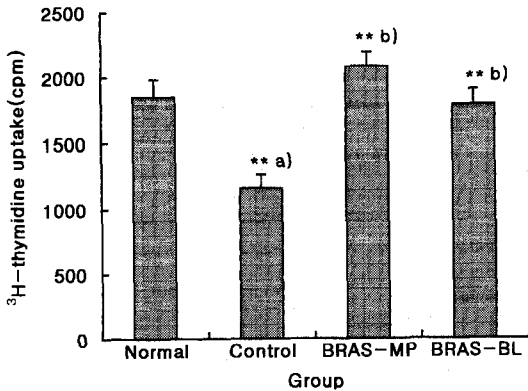


Fig. 4. Effect of BRAS on the T cell proliferation by ^3H -thymidine incorporation. The T cell (5×10^5 cells/well) and concanavalin A ($1 \mu\text{g}/\text{well}$) were incubated at 37°C for 66 hrs. And then ^3H -thymidine ($10 \mu\text{l}$, $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) was added. After incubation, each cell proliferation was measured by ^3H -thymidine incorporation. a): Values statistically significant as compared with normal group. b): Values statistically significant as compared with control data of each group (** $p < 0.01$).

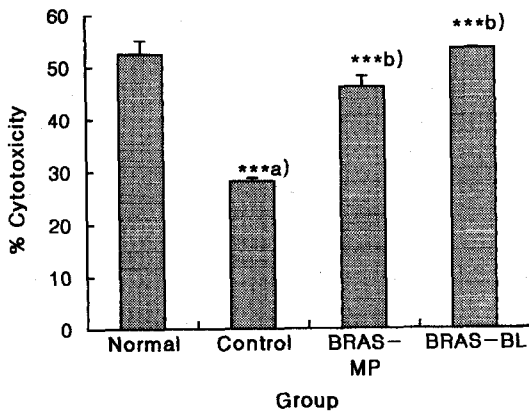


Fig. 5. Effect of BRAS on the cytolytic activity of natural killer cell. NK(natural killer) cells were purified by percoll gradients. The purified NK cell (1×10^6 /well) was incubated with K562 cell (1×10^4 /well) at 37°C for 4 hrs in 96 well tissue culture plate, respectively. Cytolytic activity in the culture supernatant was measured by LDH assay. Each values represents the mean S.E.($n = 7$). a): Values statistically significant as compared with normal group. b): Values statistically significant as compared with control data of each group (** $p < 0.001$).

T 세포의 증식에 미치는 영향—시호 약침이 면역억제제의 투여로 억제된 T 세포의 증식에 미치는 영

향은 NK 세포를 포함한 T 세포 및 percoll gradient를 이용해서 NK 세포를 제거한 뒤의 정제 T 세포를 대상으로 각각 ^3H -thymidine을 사용한 T 세포내로의 incorporation 방법으로 측정하였다. 정제된 T세포의 증식능을 측정한 결과, 대조군에서는 정상군에 비해 T 세포의 증식이 37% 억제됨을 보였고, 반면 시호 약침을 경혈로 투여한 실험군은 대조군에 비해 1.8배 증가함을 나타냈으며, 임의혈로 투여한 실험군은 대조군에 비해 1.5배 증가함을 보였다 (Fig. 4).

NK세포의 활성화에 미치는 영향—정제 NK 세포가 표적세포인 K562 세포에 대한 독성을 관찰한 결과, 대조군에서는 28%로 정상군의 52%에 비해 현저한 유의성이 인정되는 감소를 보였다 (Fig. 5). 한편 시호 약침을 관원 및 신유혈로 처치한 실험군에서는 46%, 임의혈로 처치한 실험군에서는 53%로 각각 대조군에 비해 현저한 증가를 보였다.

고 찰

약침요법은 혈위주사요법(穴位注射療法) 혹은 중초약주사요법(中草藥注射療法)¹⁷⁾으로도 명명되고 있으며, 단방 혹은 복방의 한약을 정제하여 이를 유관한 혈위, 압통점 혹은 체표의 축진으로 얻어진 양성 반응점에 주입함으로써 침자극 효과와 약물의 삼투에 의한 자극효과 및 약물 자체의 약리작용이 상승효과를 나타내어 생체의 기능을 조절하고 질병을 치료하는 신침요법이다. 특히 본 요법은 약물이 경구적으로 투여되는 경우와는 달리, 소화관에서 대사과정을 거치지 않으므로 약물고유의 성분이 표적부위에서 신속하게 효과를 발휘할 수 있다는 장점이 있으므로 한방 치료의 새로운 영역으로 많은 관심이 집중되고 있다.

최근 암의 면역요법과 관련하여 암세포가 증식할수록 T 및 NK세포등과 관련한 생체내의 면역력은 저하된다는 점에 착안하여 T 및 NK세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 탐색에 많은 관심이 집중되고 있으며, 본 연구실에서도 이와 관련하여 연구를 계속하고 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 본 실험에서는 면역억제제인 glucocorticoid를 생쥐에 투여한 다음, MA-HRP를 항원으로 사용하여 면역하고 시호 약침액을 신유 및 관원혈에 처치함으로써 면역기능에 어떠한 영향

을 미치는가를 관찰하였다. 일반적으로 항체역가 실험은 항원성이 큰 단백질을 항원으로 주사하여 사용하지는 않으며, hapten(immunoreactivity는 있으나 immunogenicity는 낮은 저분자량의 화합물)에 carrier protein을 결합시킨 물질을 반드시 사용하여야 한다. 또한 세포성 면역을 중심으로 한 in vivo 실험은 생쥐 비장에서 분리정제한 T세포, B세포 및 NK 세포와 복강에서 분리한 대식세포(macrophage)를 중심으로 이루어졌다.

생쥐의 복강 macrophage로부터 lysozyme 효소원을 조제하여 *Micrococcus lysodeikticus* 균 현탁액과 반응시키고, lysozyme이 균의 세포벽 구성성분인 N-acetylmuramyl-(1-4)- β -linkages peptidoglycan을 분해시킴으로써 변화하는 반응 용액의 흡광도를 이용하여 효소 활성도를 계산하였다. 그 결과, lysozyme 활성도는 정상군에 비해 대조군에서 감소한 반면, 신유 및 관원혈에 시호 약침액을 처치한 실험군에서는 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 한편 시호 약침액을 임의혈에 처치한 실험군에서는 대조군보다 낮은 활성도를 보였다. 또한 종양세포인 K562세포에 대한 NK세포의 활성을 측정할 결과, 정상군에 비해 대조군에서 감소하였으며, 시호 약침 처치군에서는 모두 대조군에 비해 현저한 증가를 보였다. 이상의 결과에서 선혈된 신유 및 관원혈을 통한 시호 약침 자극은 glucocorticoid에 의해 저하된 생쥐의 면역반응을 조절하며, 특히 lysozyme 활성을 증가시켜 macrophage가 침입한 항원을 처리하여 표면에 잘 제시하게 할 뿐만 아니라, NK세포로 하여금 종양세포에 대한 살해능을 증가시킴을 알 수 있었다. 특히 lysozyme 효소의 활성은 관원 및 신유혈에 대한 시호 약침처치가 비경혈에 대한 효능보다도 훨씬 더 강함을 알 수 있었으므로 치료혈의 선택은 생체의 면역기능 회복과 밀접한 관련이 있는 것으로 보여지나, 다만 혈위별 비교 및 독성 연구가 더욱 다양하게 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

생쥐에 면역억제제(glucocorticoid)를 사용하여 인위적으로 면역억제 현상을 일으키고 시호약침제가 면역활성에 미치는 영향을 생체내 면역관련 주

요세포인 macrophage, T 세포 및 B 세포를 중심으로 lysozyme활성측정 및 항체생성 역가측정을 중심으로 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 시호 약침처치는 생쥐의 항체생성능을 증가시켰고, macrophage증식능과 lysozyme활성을 강하게 증가시켰다. 또한 본 약침액의 처치로 인해 B세포 및 T세포의 증식능이 증가하였으며 NK세포의 활성을 강하게 증가시킴을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 1997년 한국한의학연구원에서 지원한 한의학발전연구지원사업(7-02-2-52-10)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 郭同經 (1975) 穴位注射療法, 商務印書館, 9-32, 香港.
2. 楊甲三 (1989) 鍼灸學, 人民衛生出版社, 252-293, 北京.
3. Yano, H., Mizoguchi, A., Fukuda, K., Haramaki, M., Ogasawara, S. and Kojiro, M. (1994) The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G₀/G₁ phase. *Cancer Res.* 54: 448-454.
4. 溝口晴續 (1990) 小柴胡湯の免疫賦活, -Hormone と抗炎症作用, 消化器科 12: 143-151.
5. 丁宗鐵 (1994) 小柴胡湯, 韓方醫學 18: 34-38.
6. 木下牧子, 橫張龍一 (1988) 全身性自家免疫病-強皮症多發筋炎. 日本臨牀 46: 137-142.
7. 錢百炎 (1981) 中草藥注射劑, 上海科學技術出版社, 71-132, 上海.
8. Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K. S. and Inoue, K. (1989) Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: stereospecific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 143: 2273-2279.
9. Nam, K. S., Igarashi, K., Umeda, M. and Inoue, K. (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies that specifically bind to phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1046: 89-96.
10. Smolelis, A. N. and Hartsell, S. E. (1949) The determination of lysozyme. *J. Microbiol.* 58: 731-738.
11. Donovan, J. and Brown, P. (1991) Handling

- and restraint. In Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. (eds.), Current protocols in immunology, 1.3.1-1.3.5. Wiley interscience, New York, NY.
12. 矢田純一, 藤原道夫: 新 lympho球機能檢索法, 中外醫學社, 352-369, 東京.
 13. Minami, M., Shreffler, D. C. and Cowing, C (1980) Characterization of the stiumulator cells in the murine primary mixed leukocyte response. *J. Immunol.* 124: 1314-1320.
 14. Yoshizawa, K. and Yano, A. (1984) Mouse T lymphocytes proliferative responses specific for human MHC products in mouse anti-human xenogeneic MLR. *J. Immunol.* 132: 2820-2829.
 15. 이은홍, 문진영, 최미정, 남경수, 김두희, 임종국 (1997) 인삼약침요법이 glucocorticoid 투여 마우스의 임파구 활성화에 미치는 영향. *대한면역학회지* 19: 355-362.
 16. 大澤利昭, 永井克孝 (1989) 免疫生化學研究法, 續生化學實驗講座 5: 東京化學同人 165-191, 東京.
 17. 泗聯中心衛生院 (1978) 中草藥製劑方法, 商務印書館, 120, 香港.
 18. 김용우, 문진영, 박원환, 박선동, 남경수, 임종국 (1997) Glucocorticoid로 유도한 면역저하 mouse의 임파구 활성화에 미치는 녹용약침의 영향. *대한침구학회지* 14: 245-252.
 19. 김용우, 문진영, 임종국, 남경수 (1997) 녹용약침이 glucocorticoid 투여 mouse의 항체역가 및 lysozyme활성에 미치는 영향. *대한침구학회지* 14: 409-419.
 20. Koh, W. S., Yoon, S. Y., Kwon, B. M., Jeong, T. C., Nam, K. S. and Han, M. Y. (1998) Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T-cell differentiation. *International Journal of Immunopharmacology* 20: 643-660.

(1999년 1월 29일 접수)