

팔물탕이 복강 마크로파지의 탐식능에 미치는 영향

은재순*, 전 훈, 김대근

우석대학교 약학대학

Effect of Palmultang on the Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophage

Jae-Soon Eun*, Hoon Jeon and Dae-Keun Kim

College of Pharmacy, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

Abstract – Palmultang(PMT) consists of Ginseng Radix Alba, Atractylodis Rhizoma Alba, Hoelen, Glycyrrhizae Radix, Rehmanniae Radix Preparata, Paeoniae Radix, Cnidii Rhizoma and Angelicae Gigantis Radix. PMT enhanced the lucigenin chemiluminescence and the engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles and inhibited the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophage. PMT enhanced the production of γ -interferon, interleukin-2 and the cell viability in murine thymocyte, but did not affect the production of interleukin-4. These results indicate that PMT enhances the phagocytosis of macrophage *via* the stimulation of γ -interferon production in T_H1 cells and the reduction of nitric oxide production in peritoneal macrophage.

Key words – Palmultang; thymocyte; macrophage; γ -interferon; interleukin-2; interleukin-4; phagocytosis; cell viability; nitric oxide.

팔물탕은 보기제인 사군자탕에 보혈제인 사물탕을 합방한 기혈쌍보제이다. 사군자탕은 氣를 키우고 脾를 補하여 신진대사의 기능을 촉진하고, 면역기능을 증강시키며, 증혈작용과 소화 흡수의 기능을 개선시켜 일반적인 氣虛의 증상과 脾胃氣虛에 의한 증상을 제거시키고, 사물탕은 보혈작용과 養肝하는 작용에 의하여 일반적인 血虛의 증상과 營血의 부족 등을 개선하는데 사용하고 있기 때문에, 팔물탕은 補血, 補氣의 작용이 있어 心肺를 보강시킴으로써, 血脈을 도와 정신활동의 물질적 기초를 만들고, 각부 조직을 영양하며, 健忘, 失眠, 多夢, 貧血 등을 다스리는데 사용되고 있다.^{1,2)}

본 연구자들은 사군자탕 및 사물탕이 면역세포에 대한 활성화 작용이 있음을 이미 보고한 바 있다.^{3,4)} 따라서 본 실험에서는 氣血兩虛에 사용되고 있는 팔물탕이 생체의 면역능에 미치는 영향을 관찰하고자, 생쥐의 복강 macrophage 탐식능을 측정하였으며, 이의 기전을 규명하고자 복강 macrophage에서 분비되는 nitric oxide 및 thymocyte에서 분비되는 γ -interferon, interleukin-2 및 interleukin-4의 양을 측정하였다.

*교신저자 : Fax-0652-290-1567

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 팔물탕의 구성(人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草, 熟地黃, 白芍藥, 川芎, 當歸, 各 4.5 g)은 방약합편²⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 시중 건재상에서 구입하여 엄선하여 사용하였다. 팔물탕 1점을 증류수로 3시간씩 2회 가열 추출한 다음 감압농축한 후 동결건조하여 분말(12.3 g, 이하 PMT 라함)을 얻어 실험에 사용하였다.

실험동물 – 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 18±2 g의 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 22±2°C, 습도 55±5%, light/dark 12시간의 사육 조건에서 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고형 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약 및 기구 – 실험에 사용한 시약은 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS, 026:B6), zymosan, γ -interferon(γ -IFN, Hur-IFN), sulfanilamide, lucigenin, N-Naphthylethylenediamine 2HCl, concanavalin A(Con A), 3-[4-5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS),

trypsin은 Gibco Co., mouse interferon- γ immunoassay kit, mouse interleukin-2 immunoassay kit, mouse interleukin-4 immunoassay kit는 R&D Co., FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles는 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용 기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96-well, 24-well, Costar), 96-well plate(white, Berthold), microplate reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision Scientific Co.), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.), freeze dry apparatus(Ilsin Co.), luminometer(Berthold Co.) 등을 사용하였다.

세포 분리 - 생쥐 5마리를 1군으로 하여 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 PMT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후, 8일째 생쥐를 경추탈골하여 치사시켜 흉선을 적출하였다. 실험군에 투여한 PMT의 용량은 사람이 팔물당을 1일 2-3첩(엑스로 24.6-36.9 g/60 kg)을 복용하기 때문에 이를 기준으로 500 mg/kg으로 정하였다. 세포 분리는 Wysocki⁵⁾ 및 Mizel⁶⁾의 방법을 이용하였다. 즉 적출한 흉선을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유 시켜 3회 반복 세척한 후, 분리한 thymocyte의 생존율 및 총세포수를 trypan blue exclusion법으로 측정하였다. 복강 macrophage의 분리는 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2ml를 주입하고, 3일 후에 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 1640 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 복강 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 세포배양시 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

Phagocytic activity 측정 - 분리한 macrophage를 2 \times 10⁶ cells/ml가 되도록 DME(without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유 시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution).

Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Zymosan은 1 \times 10⁷ particles/ml가 되도록 DPBS-A로 희석하여 zymosan이 opsonize 되도록 serum을 혼합하여 30분 동안 37°C에서 pre-incubation 하여 사용하였다. CL 측정은 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다.^{7,8)} 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 세포부유액 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l를 넣고 37°C에서 15분간 전 처리한 후, opsonized zymosan을 첨가하여 5분 간격으로 30분 동안 chemiluminescence (CL)을 측정하였다.

Phagocytosis에 의한 engulfment 측정 - FITC-conjugated *E. coli* particles를 HBSS에 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250 μ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다.⁹⁾ 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 5 \times 10⁵ cells/ml되도록 조정 한 후, 100 μ l를 96 well에 분주하고 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, sample 10 μ g/ml 및 *E. coli* 현탁액 25 μ l 가하여 1시간 동안 배양한 다음, 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.¹⁰⁾

Nitric oxide 측정 - 분리한 macrophages를 24 well plate에 well당 1 \times 10⁶ cells을 분주한 후, 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 10 units/ml를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군으로 분류하여 37°C CO₂-incubator에서 24 시간 배양한 후, 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess 시약으로 측정하였다. 즉 배지 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide+0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl+2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 nitric oxide 양을 측정하였다.¹¹⁾

Cytokine 측정 - 분리한 thymocyte를 2 \times 10⁷ cells/ml로 조제하여, 96 well plate에 200 μ l씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500 rpm, 5 분, 4°C)한 다음, 상등액 50 μ l를 취하여 thymocyte에서 분리되는 γ -interferon(γ -IFN), interleukin-2(IL-2) 및 interleukin-4 (IL-4)의 양을 각각의 mouse immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 상등액 50 μ l에 assay diluent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 배양한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokine conjugate

concentrate 100 μ l를 가하여 실온에서 2 시간 배양한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokine의 양을 환산하였다.

Cell viability 측정 - Thymocyte의 세포생존을 측정하는 Mosmann¹²⁾이 개발하여 Kotnik 등¹³⁾이 변형시킨 MTT법으로 측정하였다. 분리한 thymocyte를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포부유액 100 μ l(2×10^5 cells/ml)를 분주하고 concanavalin A 2 μ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37°C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

통계처리 - 모든 실험 결과들은 Mean \pm SE로 나타내었고 통계 처리는 student's *t*-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

Phagocytic activity에 미치는 효과 - 본 실험에서 phagocytic activity는 opsonic activity의 반응을 증가시키는 lucigenin을 이용하여 phagocyte chemiluminescence(CL)를 측정하였다.¹⁴⁾ CL은 luminol 또는 lucigenin 등에 의해 증가되는데, luminol-dependent CL은 myeloperoxidase-H₂O₂ system과 관련되어 있으며,¹⁵⁾ lucigenin-dependent CL은 phagocyte에 의해 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ PMT를 투여한 복강 macrophage에서 대조군에 비해 lucigenin chemiluminescence가 증가하였다는 것은 PMT가 복강 macrophage의 phagocytic activity를 증가시킴을 의미하는 것이다(Fig.1). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles을 이용하여 현미경으로 복강 macrophage에 uptake되는 particle을 관찰한 결과, PMT를 투여한 생쥐의 복강 macrophage에서 현저히 증가됨을 확인하였다(Fig.2).

Nitric oxide 생성에 미치는 효과 - Mammalian neutrophil과 macrophage는 pseudopodia formation을 하는 동안 phagocytosing molecule의 cytoskeleton이

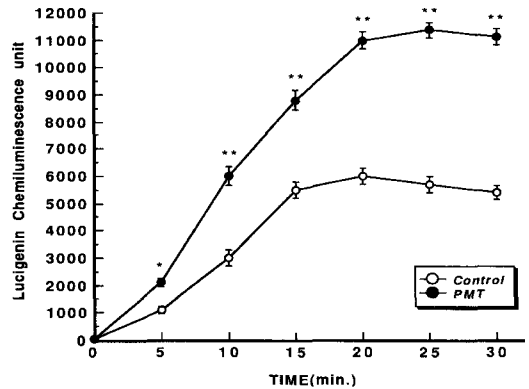


Fig. 1. Effect of Palmultang(PMT) on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophage. PMT(500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI 1640 media mixed with opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was measured for 30 min. with luminometer. Other procedures were described as detailed materials and method section. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. *, Significantly different from control group(*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

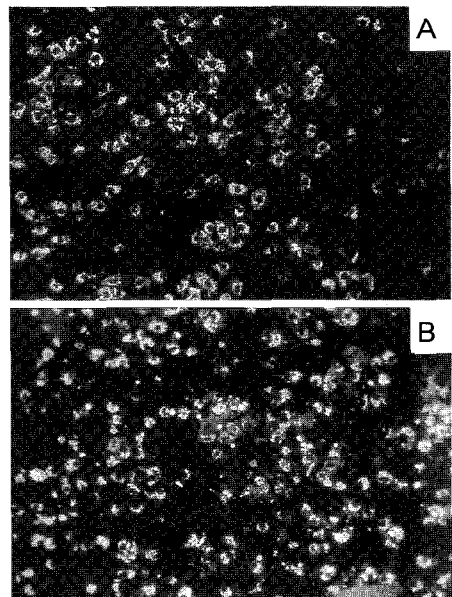


Fig. 2. Photomicrographs of the engulfment of fluorescein-conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages administered with PMT(500 mg/kg). Photographs (taken at 200 \times magnification) showing the uptake of fluorescein-conjugated *E. coli* particles in control (A) and the macrophages administered with PMT (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope

cytosolic G-actin monomers로부터 F-actin polymerization으로 변화한다.^{17,18)} Nitric oxide는 human neutrophils의 F-actin 양을 감소시키며, phagosome에서 oxygen metabolites의 생성을 억제하여,¹⁹⁾ murine macrophage의 pseudopodia formation과 phagocytic activity를 억제하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 복강 macrophages로부터 분비되는 nitric oxide의 양을 측정할 결과, LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때는 nitric oxide가 거의 분비되지 않았으나, LPS와 γ -IFN를 처리하였을 때는 PMT 투여군에서 nitric oxide의 분비가 대조군에 비해 억제되었다(Table I). Nitric oxide의 억제에 의해 phagocytosis가 일부 촉진된 것이 아닌가 추정되나, 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

Cytokine 생성에 미치는 효과 - T 임파구 중 T_H 임파구는 T_H1 과 T_H2 의 2개의 아군으로 구분되며, T_H1 임파구는 γ -IFN 및 IL-2를 분비하고, T_H2 임파구는 IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 및 IL-13 등을 분비한다. IL-2는 T cell growth factor(TCGF)로 알려져 있으며, 주로 $CD4^+$ 세포에서 분비되고 γ -IFN는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포에서 분비된다. 또한 분비된 IL-2는 NK cell을 활성화하며, γ -IFN는 macrophage의 phagocytic activity를 촉진하고, IL-4는 IgE antibody의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 한편, 생체에 감염이 발생되면 $CD4^+$ T 세포가 감염된 질병의 종류에 따라 T_H1 또는 T_H2 세포 중 어느 한쪽으로 분화하게 되어, T_H1/T_H2 의 비율이 변화함으로써 각종 분비되는 cytokine의 종류에 차이가 생기게 된다.²¹⁾ Thymocyte에서 생성되는 γ -IFN, IL-2 및 IL-4의 양을 측정할 결과, PMT 투여군에서 대조군에 비해 γ -IFN 및 IL-2는 증가하였으나, IL-4는 별 차이가 없었

다는 것은, PMT가 T_H 임파구 중 주로 T_H1 임파구를 활성화시키고 있음을 의미하는 것이며, T_H1 임파구에서 분비된 γ -IFN이 복강 macrophage의 phagocytic activity를 증가시키는데 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다(Table II).

Cell viability에 미치는 효과 - Thymocyte의 세포 생존율은 concanavalin A(Con A)를 처리한 대조군을 100%로 하였을 때, 처리하지 않은 대조군은 $67.1 \pm 1.5\%$ 로 감소되었으며, PMT 투여군은 Con A를 처리하였을 때나 처리하지 않았을 때 모두 대조군에 비해 증가하였다(Table III). 이는 PMT가 thymocyte에서 γ -IFN 및 IL-2의 분비를 촉진할 뿐 아니라, cell viability도 증가시켜 thymocyte 활성화 작용이 있음을 시사하는 것이다. 사물탕 투여시 thymocyte의 증식이 촉진되었으나, 사군자탕 투여시에는 thymocyte의 증식이 촉진되지 않았다는 전보³⁾의 결과와 비교할 때, PMT 투여시 thymocyte 증식 촉진작용은 주로 사물탕에 기인된 것이 아닌가 추정된다.

Table I. Effect of Palmultang(PMT) on the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophage

Samples	Nitric oxide(μ M)	
	Non-treated γ -IFN and LPS	Treated γ -IFN and LPS
Control	1.3 ± 0.2	12.3 ± 1.2
PMT	0.8 ± 0.2	$4.6 \pm 0.8^*$

PMT(500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured for 24 hours in CO_2 -incubator. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group($p < 0.01$).

Table II. Effect of Palmultang(PMT) on the production of cytokines in murine thymocytes

Samples	γ -Interferon (pg/mL)	Interleukin-2 (pg/mL)	Interleukin-4 (pg/mL)
Control	78.7 ± 2.3	74.4 ± 4.6	43.8 ± 3.2
PMT	$279.3 \pm 4.0^*$	$204.5 \pm 7.5^*$	56.7 ± 3.5

PMT(500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and thymus was separated. Thymocytes(2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 hours in CO_2 -incubator. The cytokine were determined at 450 nm with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group($p < 0.001$).

Table III. Effect of Palmultang(PMT) on the cell viability of murine thymocytes

Samples	Cell viability(%)	
	Treated Concanavalin A	Non-treated Concanavalin A
Control	100.0 ± 1.1	67.1 ± 1.5
PMT	$117.3 \pm 0.8^*$	$81.0 \pm 1.8^*$

PMT(500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and thymus was separated. Thymocytes(2×10^5 cells/ml) were cultured for 48 hours in CO_2 -incubator. The cell viability was determined by MTT method. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group($p < 0.01$).

결 론

팔물탕은 thymocyte 중 T_H1 임파구를 활성화하여 γ -IFN의 생성을 촉진하고 macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 억제함으로써 복강 macrophage의 phagocytic activity를 증가시킨다고 사료된다.

사 사

이 논문은 1999년도 우석대학교 학술연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 한국약학연구회편(1997) 임상상용방제해설, 262. 도서출판 정담, 서울.
2. 申載鏞 (1988) 方藥合編解說, 40. 成輔社, 서울.
3. Han, J. H., Kang, S. Y., Jung, H. W., Oh, C. H., Kwon, J. and Eun, J. S. (1997) Effect of several kinds of tonifying prescriptions on the regulation and apoptosis in immune cells. *J. Herbology* 12(1): 85-94.
4. Eun, J. S., Yu, D.H., Kwon, J. and Oh, C.H. (1998) Effects of Samultang on immunocytes of L1210 cells-transplanted or antitumor drugs-administered mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(2): 110-119.
5. Wysocki, L. J. and Sato, V. L. (1978) Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2844-2848.
6. Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L. (1979) Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 120: 1497-1503.
7. Blair, A. L., Cree, I. A., Beck, J. S. and Hating, M. J. G. (1988) Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods* 112: 163-168.
8. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. (1994) Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* 174: 259-268.
9. Sahlin, S., Hed, J. and Rundquist, I. (1983) Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J. Immunol. Methods* 60: 115-121.
10. Chok, P. W., Choon, S. P. and Benjamin, H. S. (1993) A rapid and simple micro-fluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods* 162: 1-7.
11. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity* 59(9): 3280-3285.
12. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
13. Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. (1990) A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. Methods* 129: 23-30.
14. Holt, M. E., Ryall, M. E. T. and Campbell, A. K. (1984) Albumin inhibits human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence: evidence for oxygen radical scavenging. *Br. J. Exp. Pathol.* 65: 231-235.
15. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. (1984) Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 45: 1-3
16. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr., R. B. (1987) Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leukocyte Biol.* 41: 450-455.
17. Sheterline, P. and Rickard, J. E. (1989) The cortical actin filament network of neutrophil leukocytes during phagocytosis and chemotaxis. 141-165. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.
18. Jaconi, M. E. E., Lew, D. P., Carpentier, J. L., Magnusson, K. E., Sjogren, M. and Stendahl, O. (1990) Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 110(5): 1555-1564.
19. Forslund, T. and Sundqvist, T. (1997) Nitric oxide-releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. Biophysical Research Communications* 233: 492-495.
20. Jun, C. D., Park, S. K., Kim, J. M., Kim, J. D. and Chung, H. T. (1996) Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Korean J. Immunol.* 18: 635-644.
21. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. (1994) Cellular and molecular immunology. 243-257. 2 ed. Saunders. USA.

(1999년 9월 1일 접수)