

小青龍湯이 Helper T cell의 활성화에 미치는 영향

서영호 · 배현수 · 신민규 · 홍무창*

경희대학교 한의과대학 생리학교실

Effect of Herbal Extract on Helper T Cell activity

Young Ho Seo, Hyun Su Bae, Min Kyu Shin, Moo Chang Hong*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

SCRT (Sochungyong-tang) has been used for immune disease in human. The purpose of this study was effect of Helper T cell, major regulator of immune system. Spleen cell from 8 week BALB/c mice were cultured in SCRT containing medium without activation for 48 h. The MTS assay and flow cytometry revealed that SCRT treated lymphocyte were non-effect in percentage of CD4+ T cell. Subsequently CD4+ T cell were isolated and cultured in SCRT containing medium. SCRT were non-effective on CD4+ T cell without any involvement of APC. In order to evaluate the direct effect of SCRT on Helper T cell, CD4+ T cell isolated after 48 h of culture in SCRT containing medium and activated with and without anti-CD3/anti-CD28 activation for 48 h. A lower level of CD69 was observed in SCRT treated cells in flow cytometry analysis. Subsequently Using RT-PCR analysis the expression of mRNA for IL-2, INF- γ are upregulated and, IL-4 is downregulated in CD4 T cell. The result suggests that SCRT makes Th1 significantly increased and Th2 relatively inhibited. The results suggest that SCRT potentiate Th1 cell and decrease Th2 development at the same time, which is believed to be beneficial for IgE-mediated responses.

Key words : Sochungyong-tang(小青龍湯), CD4+ T cell. TH1 cell. TH2 cell.

서 론

한의학에서의 면역의 개념은 인체를 외부로부터 방어 보호하는 작용이 있다고 보는 衛氣와 인체내에서 일체의 질병에 저항하는 물질로 臟腑經絡 營衛氣血의 정상적인 생리기능을 포괄적으로 지칭하는 精氣의 작용과 기본적으로 일치한다^{1,3)}. 면역계의 중요성은 인체의 감염에 대한 방어, 그리고 비정상적인 면역반응에 의해 야기되는 질병이라는 두 종류의 포괄적인 영역으로 나누어질 수 있다. 면역기능은 외부로부터의 침입하는 질병요인에 대해 방어기능을 가지고 인체에 부적합한 비자기적인 요소를 제거하며 자기적인 것을 보강하여 인체의 항상성을 유지한다고 보고되고 있다⁴⁾. 최근의 한의학적 연구는 인체의 精氣가 왕성하면 외부로부터 邪氣가 침범하지 못한다는 이론³⁾과 精氣를 補하는 扶正의 의미로 한약물이 질병의 예방에 중점을 두고 연구되어 왔다. 즉 한약물이 면역기능의 향상에 우수한 효과를 지닐 것이라는 전제하에 한약 추출물이 면역기능에 미치는 영향을 확인하려는 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다. 비록 병의 원인을 內因, 外因,

不內外因으로 나누고 있으나 질병의 발생은 전후의 차이가 있을 뿐 결국 精氣의 허약으로 발생한다고 설명하고 있는 것이다. 이러한 한의학적 면역의 관점은 서양의학적 면역기능의 저하나 過剩亢進에 모두 관여한다고 볼 수 있을 것이다^{1,2)}. 실제 코로나 스트레스로 인한 체력의 저하가 allergen에 대한 감작을 증가하여 allergy 질환을 악화시킨다는 연구결과는 이러한 이론을 뒷받침하고 있다. 특히 대표적인 한의학적 치료이념인 '扶正祛邪'는 선택적 면역기능의 증진을 의미한다고 볼 수도 있을 것이다²⁾.

면역기능의 증강이 세포성 면역을 담당하는 T cell의 수나 활성을 증가시키는 것만을 의미하는 것으로 보기는 어렵다. Th1 cell의 수적 증가는 면역기능의 증가로 보지만 Th2 cell의 수적 증가나 활성은 이상항진을 의미한다. 따라서 Th1 cell을 활성화하여 전체적인 면역기능을 강화시키면서 Th2 cell을 선택적으로 억제시켜서 면역기능 이상항진을 억제하는 것이 진정한 의미의 면역기능의 증진을 의미한다고 할 수 있을 것이다. 이에 한의학적 면역 개념으로서의 '扶正祛邪'의 의미를 정립 하고자 小青龍湯이 Th1 cell 및 Th2 cell에 미치는 영향을 연구하고자 하였다. 기존의 논문들이 mast cell의 증식반응, histamine의 유리에 미치는 영향, Ig-E생성량, T cell의 cytokine인 IL-4, IL-2 IFN- γ 의 반응효과에 대한 연구는 하였으나 주로 항원인식 역할을 하며

* 교신저자 : 홍무창, 서울 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

E-mail : hongmc@khu.ac.kr Tel : 02-961-0323

· 접수: 2002/05/17 · 수정: 2002/06/25 · 채택 : 2002/07/25

Ig-E을 생성하는 B cell을 활성화하여 mast cell이 분해되는 과정에 관여하는 Helper T cell 자체에 대한 실험연구는 아직 연구보고가 없었다. 또한 기존의 알러지 질환에 사용하는 각종 cytokine 저해제가 질병과 연관된 생물학적 반응을 변화시킬 요소가 될 수 있다고 보고 되었다. 이에 저자는 면역계의 이상항진으로 발현하는 알러지성 질환에 사용빈도가 높고 한의학적 치료법중 사기가 왕성할 때 扶正보다 祛邪의 경향이 강한 小青龍湯으로 선택적 면역이 가능한지를 살펴보고자 하였다. 기존의 cytotoxic T cell의 수적 증가 및 IL-2 및 그 receptor의 증가라는 지표와 가지고 면역능력의 증가를 평가하거나 T cell이나 B cell 등 면역세포의 수의 감소여부를 가지고 allergy 질환의 치료를 연구하는데서 벗어나 면역기능 조절자이며 면역계의 주된 역할을 하는 Helper T cell에 小青龍湯이 미치는 영향을 실험하여 Th1 cell을 선택적으로 활성화 시키면서 Th2 cell을 선택적으로 억제시키기를 확인한 바 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c雌性 마우스이며 평균 상태로 관리되어 온 것을 샘타코(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며 음용수는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료의 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

2. 시료의 제조

본 실험에 사용된 小青龍湯의 처방 구성은 東醫寶鑑5)에 근거하였으며 약재는 한국생약협회로부터 구입하여 엄선하고 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 각 약재는 Table 1.에 표기된 비율로 혼합하여 총 800g을 분말한 후 sonicator(Branson, USA)를 이용하여 70% 에탄올로 추출하고 침전물을 다시 80%, 90%, 100% 에탄올에서 같은 방법으로 추출하였다. 수집된 추출액은 60℃에서 감압농축 후 동결건조하여 97.68g(yield: 12.21%)의 분말 시료를 얻었다. 小青龍湯 추출물은 실험 전에 3차 증류수에 녹여 0.22 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

Table 1. Contents of Sochungyong-tang

Herbal Medicine	Amount(g)
Epoedrae Herba (麻 黃)	60
Paeoniae Radix Alba (白芍藥)	60
Schizandrae Fructus (五味子)	60
Pineae Rhizoma (半 夏)	60
Asari Herba Cum Radice (細 辛)	40
Zingiberis Rhizoma (乾 姜)	40
Cinnamomi Ramulus (桂 枝)	40
Glycyrrhizae Radix (甘 草)	40
Total amounts	400

3. 시료의 지표물질 분석

회수된 소청룡탕의 ethanol 건조추출물 약 240mg을 정밀히 달아 test tube에 넣고 methanol(HPLC reagent, J.T. Baker사, USA) 및 정제수(18MΩ이상의 3차 증류수) 4ml를 정확히 넣어 녹인 후 0.45 μm syringe filter(PVDF, Waters)를 통과시켜서 검액으로 사용하였다. 소청룡탕을 구성하고 있는 마황(ephedrine), 백작약(paeoniflorin, Wako Pure Chemical Industries Co. LTD., Japan, 이하 Wako), 오미자(schizandrin, Wako), 반하(homogentistic acid, Fluka Chemie, Switzerland), 세신(α-asarone, Sigma Chemical Co., Germany, 이하 Sigma), 건강(6-gingerol, Wako), 계지(cinnamaldehyde, Merck, Germany), 감초(glycyrrhizic acid, Sigma) 등 중에서 현재 시판하고 있는 것들을 우선 분석하였다.(단, 팔호 안의 지표물질은 보건복지부의 표준화연구에 의한 것임.) 이들 각각은 약 10mg을 정밀히 달아 지표물질의 분석조건에 따라 methanol 및 정제수 5ml에 녹였다. 녹인 표준액은 2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 mg/ml로 일정하게 희석하여 표준 HPLC chromatogram을 얻고 각 peak의 면적을 측정하여 농도와 면적사이의 상관관계를 최소자승법에 의해 구하였다.

본 연구에서 사용된 HPLC는 Waters Breeze System(717+ Autosampler, 2487 dual λ absorbance detector, 1525 binary HPLC Pump, Waters Co., Milford, USA)을 사용하였고, data처리하는 Waters Breeze System(Ver. 3.20, Waters Co., Milford, USA)을 사용하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다.

- Column : Symmetry®C18 5μm(ODS, 4.6×150mm, Waters, USA)
- Mobile phase :
 - α-asarone ; methanol : water = 5 : 95 ⇒ 100 : 0 (v/v)
 - cinnamaldehyde ; methanol : water = 40 : 60 (v/v)
 - 6-gingerol ; methanol : water = 65 : 35 (v/v)
 - glycyrrhizic acid ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 40 : 60 (v/v)
 - homogentistic acid ; methanol : 2% acetic acid aqueous solution = 15 : 85 (v/v)
 - paeoniflorin ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 15 : 85 (v/v)
 - schizandrin ; acetonitrile : water = 50 : 50 (v/v)
- UV Detector : 254nm (cf., 6-gingerol : 210nm)
- Flow rate : 1ml/min
- Sample injection : 10μl(cf., poncirin : 20μl)
- Temperature : Room temperature

이 때, 소청룡탕의 각 구성한약재에 대한 지표물질의 정량은 검액(소청룡탕 alcohol 추출물)의 peak 면적을 표준액의 peak 면적으로 나눈 후, 여기에 표준액(표준 지표물질)의 양(mg)을 곱해서 산출하였으며, (단 이때의 각 시료는 3회 반복 시험 후, 평균값을 취하여 계산하였다.)

4. Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), FITC-conjugated anti-CD69 (clone:H1.2F3),

PE-conjugated anti-CD4 (L3T4, clone:GK1.5) (Pharmingen, BD Biosciences, U.S.A.) magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec, U.S.A.) 등의 antibody가 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined FBS (Hyclone, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies, USA) 10mM HEPES (Gibco BRL, Life Technologies, USA), 11mM sodium bicarbonate (Sigma, USA)가 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA)를 사용하였다.

5. 비장 입과구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (Falcon, BD Biosciences, USA)로 걸러낸다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 3ml PharM Lyse (Pharmingen, BD Biosciences, USA)를 넣고 5분간 반응시킨다. 반응액에 7ml의 media를 첨가한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 부유액을 제거한다. 남은 cell pellet은 1ml의 media로 suspension 한 후 trypan blue로 staining하여 세포수를 측정한다.

6. CD4+ T cell 분리

비장입과구 1×10⁷cells/90μl 농도당 10μl의 magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads를 첨가하여 15분간 4℃에서 반응한다. 1,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 5 ml의 media로 washing한다. 남은 cell pellet에 1×10⁸/500μl의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension한다. Ls separation column (Miltenyi Biotec, U.S.A.)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 장치한 후 3ml의 기포가 없는 buffer (PBS with 2mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 헹구어 내고 세포부유액을 column안으로 주입한다. Media가 column을 통하여 빠져나가면 다시 3ml의 buffer로 column을 3번 헹구어 낸다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5ml의 buffer를 넣고 plunger를 서서히 눌러서 CD4+ T cell을 elution한다.

7. 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극받지 않은 비장 입과구의 생존률을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM Aqueous One solution cell proliferation assay (Promega, U.S.A.)의 protocol을 이용하되 2 × 10⁵ cells/200μl의 농도로 flat bottomed 96-well plate에 seeding한다. Spleen total cell에서는 小靑龍湯 추출물을 0, 10, 20, 40, 80, 100μg/ml 농도로 첨가하고 10μg/ml ConA (concanavaninA, Sigma, USA)로 stimulation한다. CD4+ T cell에서는 小靑龍湯 추출물을 0, 1, 2, 5, 10, 20μg/ml 농도로 첨가하고 10μg/ml anti-CD3e가 coating된 plate에서 2μg/ml anti-CD28로 costimulation한다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37℃, 5% CO₂ incubator (Nuair, USA)에서 배양한다.

8. CD4+ T cell의 CD69 발현 측정

24-well plates에 1 × 10⁶cells/ml의 농도로 세포를 seeding하

고 48시간동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. Mitogen에 의한 세포자극은 생존율 및 증식능 측정에서와 같은 방법을 사용하고 첨가된 補上補下湯 추출물은 spleen total cell에서는 0, 10, 40μg/ml, CD4+ T cell에서는 0, 1, 10μg/ml의 농도로 첨가한다. 세포를 harvest하기 위하여 1,000rpm에서 3분간 원심분리한 후 cell pellet을 cold wash buffer (PBS/0.1% Na₃/1% FBS)에 resuspension한다. 여기에 FITC-conjugated anti-CD69 antibody와 PE-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가한 후 4℃에서 40분 동안 incubation하였다. Cold wash buffer로 2번 washing한 후 FACScan (Becton Dickinson, BD biosciences, USA)으로 분석한다.

9. RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

Flow cytometry에서와 같은 조건으로 72시간동안 배양한 CD4+ T cell의 상층액을 제거한 후 PBS로 washing하고 Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)을 이용하여 total RNA를 분리하되 제조회사의 방법에 준한다. Total RNA는 spectrophotometry (DU-520, Beckmann, USA)를 이용하여 정량한다. M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)와 oligo-dT (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)를 이용하여 2μg의 total RNA로 ss cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA를 template로 사용하여 IL-2, IL-2R α, IL-4, INF-γ 유전자를 quantitative PCR한다. 이때 linear range를 확인하기 위하여 cDNA는 1/2 희석한 것을 같이 사용하고 housekeeping gene인 GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 internal control로 사용한다. PCR에 사용된 primer (Genotech co. Korea)의 sequence와 증폭된 amplicon의 길이는 Table 2와 같다. PCR 반응액의 조성은 2μl 10× PCR reaction buffer, 각각 0.2μl sense primer, antisense primer, 0.5μl 10mM dNTPs, 0.4μl 5U/μl Ampligold Taq polymerase (PE Biosystems, USA), 적정농도로 희석된 1μl template cDNA에 3차 증류수로 최종 volume이 20μl가 되도록 하였다. Gene에 따른 PCR 조건은 Table 3과 같다. 각 PCR product는 8μl씩 2% agarose gel(PMC, USA)에서 130V조건에서 20분간 전기영동하고 ethidium bromide stain한 후 Gel-Doc system (Photodoc system, Bio-Rad, USA)으로 scan하였으며 band intensity는 Quantity one (Bio-Rad, USA) software를 이용하여 측정하였다.

Table 2. Sequences of primer Used for Quantative RT-PCR

gene	oligonucleotide sequence	amplicon length (bp)
GAPDH	RV: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3' FW: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	236
IL-2	RV: 5' GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' FW: 5' GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'	501
IL-4	RV: 5'-TCT TTC TCG AAT GTA CCA GG-3' FW: 5'-CAT GGT GGC TCA GTA CTA CG-3'	401
IFN-γ	RV: 5'-CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3' FW: 5' GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'	308
IL-2RA	RV: 5'-GGG GCA GGA AGT CTC ACT CTC GGG A-3' FW: 5' GAA CTC CTG GAG CAG CAA CTG-3'	427

Table 3. Conditions of PCR amplification.

genes	denaturation	Loop			extension	cycles
		denaturation	annealing temperature	extension		
GAPDH	95°C/10min	94°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	24
IL-2	95°C/10min	94°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	30
IL-4	95°C/10min	94°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	24
IFN- γ	95°C/10min	94°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	30
IL-2R α	95°C/10min	94°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	24

결 과

1. 지표물질 분석

소청룡탕 각 구성한약재의 지표물질인 α -asarone, cinnamaldehyde, 6-gingerol, glycyrrhizic acid, homogentistic acid, paeoniflorin, schizandrin 을 HPLC 분석하여 선형회귀분석을 실시한 결과, R2값이 0.9963 이상을 갖는 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다. 각 지표물질의 회귀직선 방정식과 R2 값, 그리고 standard calibration curve는 생략하였다.

한편, 소청룡탕 중에 포함되어 있는 각각의 한약재 중 백작약(paeoniflorin), 오미자(schizandrin), 반하(homogentistic acid), 세신(α -asarone), 건강(6-gingerol), 계지(cinnamaldehyde), 감초(glycyrrhizic acid)에 대한 지표물질 분석결과는 Table 4. 와 같다.

Table 4. The Quantitative analysis of Standard materials of SCRT(Sochungyongtang) (단위 : mg/소청룡탕 ex. 1g)

한약재	지표물질	함량(mg)
백작약	paeoniflorin	34.42±1.367(3.44%)
오미자	schizandrin	2.39±0.010(0.24%)
반하	homogentistic acid	17.07±0.318(1.71%)
세신	α -asarone	0.18±0.029(0.018%)
건강	6-gingerol	2.11±0.251(0.21%)
계지	cinnamaldehyde	1.84±0.438 (0.18%)
감초	glycyrrhizic acid	15.39±0.283(1.54%)

소청룡탕을 구성하고 있는 각 구성한약재별 HPLC chromatogram은 생략하였다.

2. 小青龍湯 추출물이 농도별로 비장 임파구의 생존에 미치는 영향

小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하는 지 확인하기 위해 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48시간 동안 배양하고 MTS assay를 한 결과 (Fig.1.) T cell specific mitogen인 ConA로 activation하지 않은 경우 농도별 세포생존율은 小青龍湯 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 별다른 변화를 보이지 않음으로써 小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지는 않는 것이 확인되었다. Con A로 activation한 경우에는 小青龍湯 추출물이 저농도 (10 μ g/ml)에서는 T cell 증식을 다소 상승시키고 고농도 (40 μ g/ml 이상)에서는 저하시키는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

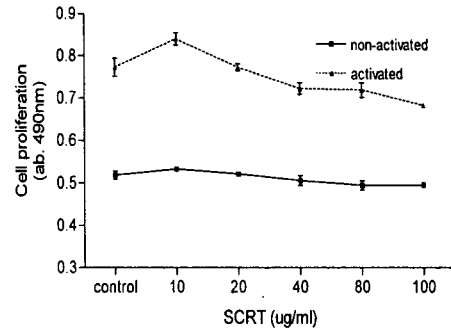


Fig.1. Proliferation of spleen lymphocytes in medium containing various concentration of SCRT extract after 48hr. incubation. Mouse spleen lymphocytes were treated with ConA to activate T cell, or not. Control was cultured in medium without SCRT. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

3. 小青龍湯 추출물이 비장 임파구중 CD4+ T cell의 구성에 미치는 영향

小青龍湯 추출물이 전체 비장 임파구중 CD4+ T cell의 구성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 TCR(T cell antigen receptor) specific activator인 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation한 후 early T cell activation surface marker인 CD69의 표면표식을 flow cytometry로 확인한 한 결과(Fig.2) 小青龍湯 추출물 농도별 투여로 T cell 활성의 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

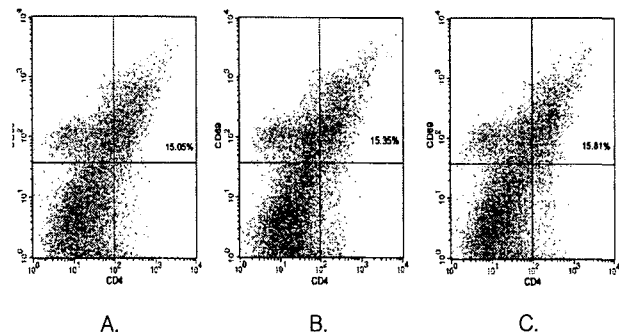


Fig.2. Analysis of unsorted CD4+ T cells in medium containing various concentration of SCRT extract after 48hr. incubation. Spleen lymphocytes were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48hr. to activate CD4+ T cell. Cells were stained with FITC-conjugated anti-CD69 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A: Cells were incubated in medium without SCRT extract as control. B: Cells were incubated in medium containing 10 μ g/ml SCRT extract. C: Cells were incubated in medium containing 40 μ g/ml SCRT extract.

4. 小青龍湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

小青龍湯 추출물이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하여 위해 CD4+ T cell을 분리한 후 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 동안 배양한 결과(Fig.3) mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 저농도 (1 μ g/ml)에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하다가 고농도 (5 μ g/ml 이상)에서는 저하되는 것으로 나타났으나 유의성은 없었다.

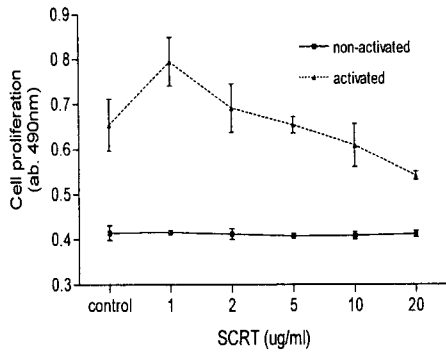


Fig. 3. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of SCRT extract after 48hr. incubation. Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

5. 小青龍湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 CD69 발현에 미치는 영향

CD4+ T cell을 분리하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation하면서 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 CD69의 표면표식을 flow cytometry로 확인한 결과 (Fig.4) 小青龍湯 추출물 1 μ g/ml 투여하였을 때 T cell 활성이 5% 감소하고 10 μ g/ml 일 때는 12% 감소한 것으로 확인되었다.

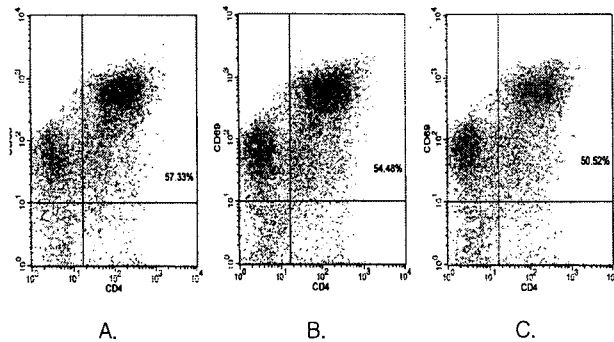
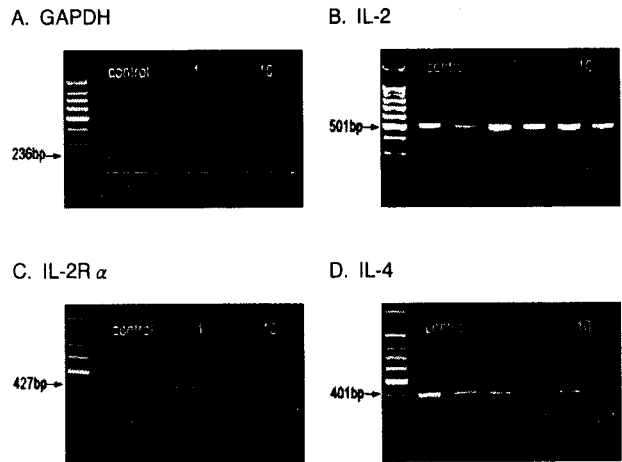


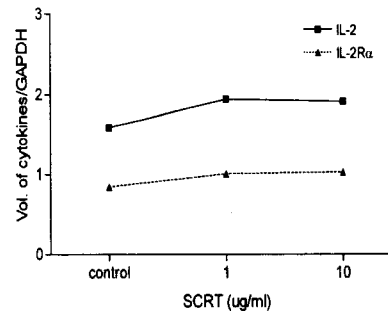
Fig. 4. Analysis of activated CD4+ T cells in medium containing various concentration of SCRT extract after 48hr. incubation. Sorted CD4+ T cells were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate CD4+ T cell for 48hr. Cells were stained with FITC-conjugated anti-CD69 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A: Cells were incubated in medium without SCRT extract as control. B: Cells were incubated in medium containing 1 μ g/ml SCRT extract. C: Cells were incubated in medium containing 10 μ g/ml SCRT extract.

6. 小青龍湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 IL-2, IL-2R α , IL-4, INF- γ mRNA 발현에 미치는 영향

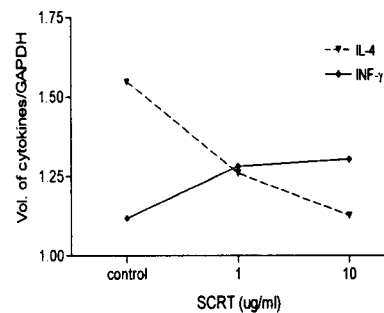
CD4+ T cell을 분리하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation하면서 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양하였다. 배양된 CD4+ T cell에서 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 각 cytokine별로 RT-PCR하고 2% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig.5와 같다. GAPDH를 control로 사용하여 각 cytokine mRNA 발현량을 小青龍湯 추출물 투여 농도별로 비교하여 본 결과 IL-2, IL-2R α , INF- γ 는 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며, IL-4는 감소하는 경향을 보였다. (Fig.5-F,G)



E. INF- γ



F. Expression level of IL-2 and IL-2R α



G. Expression level of IL-4 and INF- γ

Fig. 5. Expression of mRNA for cytokines in CD4+ T cell cultured in medium various concentration of SCRT extract for 72hr. cDNAs were synthesized from mouse CD4+ T cell. A-E: Each volume of template cDNAs used in PCR amplification were serially diluted (1, 1/2) to check linear range. Each PCR products were fractionated by electrophoresis on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. 1st lane of images are 100bp DNA ladder(MBI Permentas, Lithuania). GAPDH was used as a internal control. Numbers contained Each images mean concentration(μ g/ml) of SCRT. F,G: Expression levels of each cytokine were normalized with GAPDH. Volume of PCR amplicon was quantified by Quantity One software.

고찰

免疫에 대한 동서양 의학적 개념을 살펴보면 동양의학에서는 면역에 대한 개념을 『素問·上古天真論』의 “眞氣從之 精神內守 病安從來”와 『素問·刺法論』의 “精氣存內 邪不可干” 『素問·評熱病論』의 “邪之所湊 其氣必虛”라 하였다⁶⁻⁸⁾. 眞氣는 正氣를 말하는 것이며 正氣는 邪氣의 反對되는 개념으로 外邪의 작용에 대한 방어적 역할을 하고 體內陰陽의 平衡을 조절하여 인체의 생명활동 유지를 위한기능 즉 정상생리상태로 유지시키는 작용을 한다⁹⁾. 邪氣는 六淫 뿐 만 아니라 인체의 陰陽失調로 惹起된 病理變化 및 飮食 勞倦 痰飲 등의 모든 發病要因을 말하는 것이다. 결국 인체의 眞氣에 해당하는 精氣가 消耗되거나 인체를 외부로부터 防禦, 保護하고 세균에 대한 항체 형성작용과 식균작용이 있는 것으로 보는 衛氣가 약해지거나 손상이 되면 邪氣가 침입해 정상생리의 失調가 일어난다는 것을 의미한다. 그러므로 精氣가 면역계의 바탕이 된다. 서양의학의 면역개념은 인체가自己和非自己를 감별하는 기구이며 외부로부터 침입한 미생물, 다른 개체세포의 조직이나 체내 불필요한 생성물 등을 비자기인 항원으로 인식 배제함으로써 개체의 항상성을 유지하는 현상을 의미한다는 것이다. 이는 한의학의 精氣와 衛氣의 작용과 일치하는 것을 알 수 있다 인체의 陰陽平衡의 太過, 不足은 면역계의 면역기능저하나 과민반응 상태가 되어 인체가 항원을 기억하였다가 인체가 재접촉시 인체에 유해한 반응을 발생하는 알레르기과 연관 지어볼 수 있다.

한의학에서 알려지고 관련된 내용으로는 『素問·六元正紀大論』⁷⁾에서는 陽明所至爲飢噦 라고 하여 알려지 질환이 陽明燥金 또는 陽明胃와 관계가 있음을 말하였고, 『素問·臟氣法施論』³⁾에 “肺病者 喘咳逆氣”라 하여 천식과 유사한 증상이 기재되어 있으며 張¹⁰⁾은 哮喘을 遇寒即發..... 亦名哮喘 이라 하였고 천식, 비염 등 알레르기와 관련된 질환을 치료한 기록을 찾아볼 수 있다. 면역체계는 세포성면역과 체액성면역으로 분류하며 흉선, 비장, 골수는 중요한 면역기관으로써 골수의 간세포는 흉선으로 이동 분화와 발육과정을 거치면서 Tcell로 성숙하게 되고 말초혈액 림프를 통해 인체의 세포성면역을 담당하게 된다. 말초혈액의 T cell 亞群 중 Helper T Cell은 CD4+라는 표면단백질을 발현하고 세포용해성 T cell, 억제 T cell은 CD8+이라는 다른 표면 단백질을 발현한다. 한번도 감염되지 않은 Naive CD4+ T cell 이 항원에 자극을 받으면 다양한 cytokine을 분비활성화 시키는데 관여 하므로 Helper T cell이라고 부른다. 활성화 된 림프구가 생성 방출하는 물질로서 다른 세포를 작용하게 하는 활성화 물질을 cytokine이라고 총칭한다. Naive CD4+ T cell은 APC (Antigen presenting cell)의 MHC I 혹은 II와 결합하여 Th1, Th2림프구로 분화하며 Th1, Th2 따라서 cytokine 분비양상도 다르다. Th1 림프구는 주로 IL-2, INF- γ 를 분비 Ig-G 항체합성을 돕고 세포용해성 T림프구의 CD8+ T cell 림프구 분화에 관여하며 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. 그리고 세포면역을 주로 하므로 암에 관한 면역기능에 연관이 있을 것으로 추정하고 있다. Th1 림프구는 면역반응후 수일안에 시작되

는 지연성 과민반응. 결핵균, 바이러스 작용에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 분비한다. IL-4는 B림프구에 작용하여 Ig-E와 같이 비만세포와 결합하는 항체 생산을 도우며 IL-3, IL-9는 비만세포 증식에 관여한다. 그리고 면역반응후 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 알러지성 질환. 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여하여 알려지에 관여한다. Th1과 Th2에서 분비하는 각종 cytokine은 서로 길항작용을 하여 서로 억제한다. 즉 Th1이 활성화하면 Th2를 억제하고 알려지에 관련된 Th2가 활성화되면 Th1이 억제된다 Th세포는 가장 중추적인 면역 구성세포로 알려져 있다. 제1형 과민반응을 Ig-E 매개 과민면역반응이라고 한다. Ig-E는 T cell 림프구의 항체전환에 의해 생성된다. 즉 항원에 의한 Ig-E 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2림프구는 naive CD4+ T cell이 IL-4 영향으로 알려젠과 반응시 분화되고 이때 Ig-E 생성을 방해하는 INF- γ 를 분비하는 Th1 림프구는 그 발달이 저해된다. 앞서 설명처럼 Th1과 Th2는 서로 길항적 관계라는 것이다. 즉 Th1 cell의 수적 감소 및 활성화 저하는 전신의 면역체계를 저하시켜 감염질환을 일으킬 수 있는 한편 Th2 cell의 과잉항진은 allergy 질환을 유발할 수 있는 것이다¹¹⁻¹⁴⁾. Th2가 분비한 IL-4의 작용으로 B cell 이 활성화되어 Ig-E를 생성하고 Ig-E는 항체와 결합하여 mast cell의 탈과립 현상이 발생 histamine, sertotonin 등의 화학물질이 유리되어 평활근수축 점액부종 혈관확장을 일으켜 기관지천식, 알레르기성 비염 등의 질환을 일으키는 원인이 된다¹⁵⁻¹⁷⁾. 면역기능 항진을 위해 精氣의 근원인 腎氣의 측면에서 연구가 활발하였다. 腎氣와는 상호 협조적인 관계이며 氣를 주관하는 肺와 관련하여 肺가 外部寒邪에 의해 機能的失調시 去風寒 溫肺化飲의 기능과 함께 邪氣를 쫓아내고 正氣를 도우는 扶正去邪의 기능으로 항상성을 유지하고 한성 알려지, 알려지성 비염, 천식에 多用되어 치료효과를 나타내는 小靑龍湯¹⁰⁾으로 면역계의 조절기능을 가지는지 검토할 필요성이 있다고 본다. 小靑龍湯은 漢代 張¹⁰⁾이 처음 기재한 처방으로 傷寒太陽病에 表邪가 不解한데 心下水氣하고 乾嘔發熱而咳하며 或渴 或刺 或吃 或小便不利小腹滿 或喘者에 사용하였다. 解表散寒하고 溫肺化飲하는 효능이 있어 惡寒發熱하나 渴症이 나지 않고 無汗하여 浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳嗽喘息등에 쓰이며 만성기관지염, 기관지천식, 알레르기성비염 및 기관지염 급성발작에서 外感風寒하고 水飲整滯로 인한 경우에 응용할 수 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 藥이 비록 8가지이나 정밀하게 처방되어 解表散寒, 溫肺化飲한다²¹⁻²⁴⁾. 傷寒兼裡水飲症에 散寒解表하고 化飲平喘하는 방제가 되므로 喘息의 급성기, 風寒性 알레르기鼻炎에 응용하기에 적당하다. 이에 대한 기존의 小靑龍湯에 대한 연구를 살펴보면 실험적 연구로 金²⁵⁾이 진통 항경련효과를 安²⁶⁾ 등은 기관지 평활근수축반응 진해 거담 작용 등을 趙²⁷⁾ 등은 알려지천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을 보고하였고, 李²⁸⁾ 등은 알려지천식모델 흰쥐의 BASF내 면역세포에 미치는 영향을 보고하였다. 車²⁹⁾ 등은 小靑龍湯이 asthma model 내의 cytokine IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α 에 미치는 영향에 대해 보고하여 분자생물학적 기법에 의한 小靑龍湯이 각종 cytokine에 대한 연구가 주를 이루고

있음을 알 수 있다. Allergy 질환에 대한 한의학계의 연구는 다양하여 문헌적인 연구로 鄭³⁰⁾ 등은 哮喘症의 원인과 처방, 吉³¹⁾ 등은 allergy성 喘息의 동서의학적 비교 고찰, 鄭³²⁾은 allergy 질환의 한방요법에 관하여 정리하였으며, 임상연구는 姜³³⁾이 加味 小青龍湯을 이용한 임상치험례 金³⁴⁾ 등이 알레르기 비염환자에 대한 임상적 고찰을 보고하였다. 이처럼 각종 cytokine이 면역반응에 관여하는 세포의 활성화 조절에 중요한 역할을 하므로 그 생리적 효과와 신호전달 과정을 규명하는 것이 매우 중요하다, 그러나 최근에는 각종 cytokine을 억제하여 또 다른 cytokine의 대량생산으로 질병의 조직상태에 영향을 미치는 방법이 적절하지 못하다고 인식되면서 cytokine 저해제가 질병과 연관된 생물학적 반응을 변화시킬 잠재적 접근방법이 될 수 있으므로 알레르기 치료를 cytokine억제보다 조절자인 T cell에 대한 연구가 주목받고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 면역계의 이상항진으로 발현하는 알러지성 질환에 사용빈도가 높고 한의학적 치료법 중 邪氣가 旺盛할 때 扶正보다 去邪의 경향이 강한 小青龍湯으로 병리적 현상을 항상 정상생리화하려고 하는 면역세포의 유지와 활성화에 미치는 영향을 실험하여 小青龍湯이 단순한 cytokine 분비에 미치는 영향에 대한 실험이 아닌 조절자이며 면역기능의 주된 역할을 하는 Helper T cell에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. Th1 cell을 선택적으로 활성화시키면서 Th2 cell을 선택적으로 억제시키는가를 확인하여 진정한 의미의 면역 조절 기능이 있는지 살펴보고자 하였다.

본 연구를 수행하기 전에 小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하는지 확인하고자 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 MTS assay를 한 결과(Fig.1) 농도별 세포생존율은 小青龍湯 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이후 실험결과에 의의를 갖게 하는 것이다. 한편 T cell specific mitogen인 Con A로 activation했을 때는 小青龍湯 추출물이 저농도에서는 T cell 증식을 다소 상승시키고 고농도에서는 저하시키는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. CD4+ T cell을 분리하여 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 early T cell activation surface marker인 CD 69의 표면표식을 flow cytometry로 확인한 결과 (Fig.4) 小青龍湯 추출물 1 μ g/ml 투여하였을 때 T cell 활성이 5% 감소하고 10 μ g/ml 일 때는 12% 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 Th cell specific하게 antigen에 의한 면역을 저하시키는 것을 의미하는 것으로 결국 allergy response를 저하시키는 것으로 생각할 수 있을 것이다. CD4+ T cell을 분리하여 anti-CD3/anti-CD28 antibody로 activation하면서 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양하여 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 각 cytokine별로 RT-PCR하고 GAPDH를 control로 사용하여 각 cytokine mRNA 발현량을 小青龍湯추출물 투여 농도별로 비교하여 본 결과 Fig5 와 같이 IL-2, IL-2R α , INF- γ 는 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며 IL-4는 감소하는 경향을 보였다. 이는 즉 Th1 림프구의cytokine인 IL-2,IL-2R α ,INF- γ 이 증가하였다는 것은 Th1에 선택적으로 작용하여

Th1 response는 증강하였다는 의미이고 Th2 림프구의cytokine인 IL-4는 감소하는 경향을 보였다는 것은 Th2에 선택적으로 작용하여 Th2 response는 억제하였다는 것을 의미한다.

본 연구로 小青龍湯이 Th1 response의 증강은 CD4+ T cell의 면역기능을 증가시키며 Th2 response는 억제에 의한 효과가 있음을 확인하므로써 Th1 cell을 선택적으로 활성화하여 전체적인 면역기능을 강화시키면서 Th2 cell을 선택적으로 억제시켜서 면역기능 이상항진으로 나타나는 allergy질환에 면역세포의 활성화저하를 유발하지 않고 사용할수 있다고 본다. 결론적으로 小青龍湯이 진정한 의미의 면역기능의 증진을 의미한다고 할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 생리적 항상성 유지에 病因에 따른 개체의 면역기능을 측정하는 작업도 필요하다고 본다

결론

小青龍湯이 면역기능의 주된 역할을 하는 Helper T cell에 미치는 영향을 알아보려고 CD4+ T cell의 생존률과 cytokine mRNA 발현량을 RT-PCR을 통하여 실험한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

비장 임파구에 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 세포생존율을 확인한 결과 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않음으로써 小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지는 않는 것이 확인되었다. 전체 비장 임파구중 小青龍湯 추출물이 CD4+ T cell의 비율에 영향을 주는지 확인하기 위해 CD 69의 표면표식을 확인한 한 결과 小青龍湯 추출물 농도별 투여로 T cell 활성화의 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 小青龍湯 추출물이 주변의 APC가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지를 확인한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었으며 다만 TCR specific activation을 유도하기 위하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activatin시켰을 때에는 저농도에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하다가 고농도에서는 저하되는 것으로 나타났다. CD4+ T cell을 분리하여 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 CD 69의 표면표식을 확인한 한 결과 小青龍湯 추출물 1 μ g/ml 투여하였을 때 T cell 활성이 5% 감소하고 10 μ g/ml 일 때는 12% 감소하여 小青龍湯 추출물이 Th cell specific하게 antigen에 의한 면역반응을 저하시킴이 확인되었다. CD4+ T cell을 분리하여 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양한 후 cytokine mRNA 발현량을 RT-PCR을 통하여 확인하여 본 결과 IL-2, IL-2R α , INF- γ 는 대조군에 비하여 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며, IL-4는 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 小青龍湯 추출물이 Th1 response는 증강은 CD4+ T cell의 면역기능을 증가시키며 Th2 response는 억제에 의한 효과가 있음을 확인하였다. Th1 cell을 선택적으로 활성화하여 전체적인 면역기능을 강화시키면서 Th2 cell을 선택적으로 억제시켜서 면역기능 이상항진으로 나타나는 allergy질환에 면역세포의 활성화저하를 유발하지 않고 사용할 수 있다고 본다.

그러므로 만성적 알러지성 비염, 천식 예방 및 치료에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (00-PJ9-PG1-CO02-0003).

참고문헌

- 鄭奎萬, 알레르기과 韓方, pp15-26,60-61, 圖書出版第一路, 서울, 1990.
- 정우열, 한방병리학, pp15-17,94-95, 삼진사, 전주, 1988.
- 嚴鐘政, 正邪論新釋 新中醫 6:5, 1984
- 세포분자면역학, p324, 325, 367, 정문각, 서울, 1998.
- 許浚, 東醫寶鑑, p368, 南山堂, 서울, 1986.
- 張介賓, 類經, p28, 34(상), 418(하), 大成文化社, 서울, 1986.
- 王琦, 黃帝內經素問今釋, p8,125,146,412, 成輔社, 서울, 1985.
- 張隱庵, 馬元臺註, 黃帝內經素問, p25,269, 臺聯國風出版社, 臺北.
- 趙鍾寬, 免疫에 관한 동양의학적 고찰, 동양의학 12(1):19, 1986.
- 張機, 仲景全書, p460-461, 杏林出版社影印, 서울, 1977.
- Lothar Hultner, Stephan Kolsch, Michael Stassen, Uwe Kaspers, Jean-Pierre Kremer, Reinhard Mailhammer, Jochen Moeller, Hannelore Broszeit, and Edgar Schmitt, In activated mast cells, IL1 Up-regulates the production of several Th2 related Th2 cytokines including IL9, J Immunol 164(11):5556-5563, 2000.
- Abbas A.K, Lichtman A.H, Pober J.S, Cellular and molecular immunolog, pp.250-277, Phildeipia, Saunders, 1997.
- Hogan S.P, Koskinen A, Matthaei K.I, Young I.G, Foster P.S, Interukin-5-producing CD+ T cells play a pivtal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice, Am J Respir Crit Care Med. 157(1):210-8, 1998.
- Umetsu DT, Derkruyff RH, Th1 and Th2 CD4+ Cells in pathogenesis of allergic diseases, Proc. soc. Exp. Biol. Med, 215(1):11-20, 1997.
- Beellanti JA, Cytokine and allergic diseases; clinical aspect, allergy Asthma Proc 19(6)337-341, 1988.
- 하대유, 이미애, 정승원, 사이토카인이 Th1세포의 Mitogens에 대한 증식반응에 미치는 영향. 대한면역학회지 19:73-81, 1997.
- Carlos A.G, Carlos M.L, Conceisao S.M, Alcinda M, Cytokines and asthma, J. of Investigational Allergology and Clinical Immunology 7(5):270-273, 1997.
- 李珩九, 鄭昇杞, 東醫肺系內科學, pp162-202, 아트동방, 서울, 1999.
- 許俊, 東醫寶鑑, p145, p693, 南山堂, 서울, 1989.
- 盧宏民, 中藥大辭典, p61,93,98,322,335, 五洲出版社, 臺北, 1994.
- 李尙仁, 方劑學, p50, 永林社, 서울, 1995.
- 裴秉哲, 標準臨床方劑學, p51-53, 成輔社, 서울, 1995.
- 葉天士, 臨證指南醫按, pp.299-300, 成輔社, 서울, 1982.
- 汪詒菴, 本草備要, p.2,12,19,28,30,39, 文光圖書有限公司, 臺北, 1982.
- 金基昌, 李珩九, 小青龍湯의 鎮痛, 抗痙攣 및 氣喘의 肺損傷에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 8(1):129-138, 1985.
- 安徽, 小青龍湯의 效能에 관한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원, 1986.
- 趙英敏, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九, 小青龍湯이 알레르기 喘息의 呼吸양상과 기관조직에 미치는 영향, 慶熙醫學 15(1):78-89, 1999.
- 李俊雨, 小青龍湯이 알레르기천식모델 氣喘의 BASF내 면역 세포에 미치는 영향, 경희대한의대논문집, 2001.
- 車恩秀, 정희재, 鄭昇杞, 李珩九, 小青龍湯이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향, 경희한의대 논문집 23(1):71-888, 2000.
- 鄭昇杞, 李珩九, 哮喘의 原因과 治法에 관한 연구, 대한한의학회지 7(1):60-67. 1986.
- 吉永星, 황의옥, 鄭昇杞, 李珩九, 알레르기 천식에 관한 문헌적 고찰(동서의학적 비교고찰), 大韓韓醫學會誌 11(1):39-70 1990.
- 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九, 化痰止咳平喘藥의 效能에 관한 東西醫學的 考察, 대한한방내과학회지 15(2):281-289, 1995.
- 姜錫均, 기관지천식에 사용되는 加味小青龍湯의 임상적 考察, 大韓韓醫學會誌 10(1): 138-144, 1989.
- 김남권, 황충연, 알레르기비염 환자에 대한 임상적 고찰, 한의학학술대회논문집 19권, 1997.