

생쥐에서 오가피에 의한 싸이토카인 유도과 면역반응에 관한 효과

林錫麟

Abstract

Effects of *Acanthopanax cortex* Extracts on the Cytokine-inducing and immune response in Mice

Lim Seok-rhin

College of Oriental Medicine, Daejeon University

This experimental study was carried out to evaluate the effects of *Acanthopanax cortex* on Cytokine-inducing and immune response in Mice. In order to investigate the effect of *Acanthopanax cortex*, the following was performed; Cytotoxicity, *in vitro*, the fraction of CD4⁺, CD8⁺, B220⁺ in splenic cell, gene expression of IL-12(p35), IL-12(p40), IFN- γ , and splenic cell proliferation by *Acanthopanax cortex*. Analysis of cytokine gene expression was carried out by RT-PCR amplification. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program.

The results were obtained as follows. *Acanthopanax cortex* showed didn't have cell toxicity under 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group on mouse lung fibroblast cells.

In an *in vitro* model using mouse peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), extract of *Acanthopanax cortex* induced multiple cytokine, including interleukin-12 (p35), interleukin-12 (p40), interferon-gamma (IFN- γ). The extract also enhanced the percentages of the CD4⁺, and CD8⁺ in the untreated control were 22.1 ± 3.3 to 38.4 ± 2.1 , and 5.0 ± 0.4 to 10.7 ± 0.3 %, respectively.

From above findings, it is suggested that *Acanthopanax cortex* is able to anti-cancer and activate immune response system.

I. 緒 論

五加皮의 效能과 特性을 살펴보면, 최초로 《神農

本草經》¹⁾에 “五加皮 味辛溫 主心腹疝氣 腹痛 益氣 療瘰 小兒不能行 疽創 陰蝕 一名豺漆”이라하여 그 效能이 기재되었으며, 成²⁾에 의하면 五加皮는 주로 祛風濕하고 壯筋骨하는 強壯藥으로서, 祛風濕한다는 말은 류마티스성疼痛과 筋肉痛등을 제거

한다는 뜻이며 堅筋骨이란 強壯劑의 役割을하여 神經痛에도 有效하다는 뜻이라 하였다. 이를 살펴 보면 주로 強壯시키는 藥物로 使用되었음을 알 수 있다. 이는 現代醫學에서의 免疫增強 및 抗腫瘍效果와 깊은 關聯性이 있을 것으로 思料된다. 그 예로서 刺五加的 樹皮에 있는 chlorogenic acid는 胃癌에 대하여 억제 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

최근의 임상질환 연구에서 싸이토카인의 생산을 유도하는 생체활성 물질 (biological response modifier; BRM) 연구가 많이 보고되고 있어³⁾, 이에 著者는 오가피의 抽出物에 의한 생쥐 免疫增強 效果를 檢證하기 위해 脾臟細胞에서 IL-12 (p35), IL-12 (p40), INF- γ 遺傳子 發顯을 관찰하였고, cytometer를 이용한 脾臟細胞 (spleenic cell)에서의 CD4⁺, CD8⁺를 分析하여, 오가피가 脾臟免疫細胞 增殖에 미치는 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료 및 동물

1) 약재

본 실험에 사용한 오가피 (*Acanthopanax cortex*) 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 동물

(1) 동물

실험동물은 한국 화학 연구소에서 구입한 자성 Balb/c와 C57BL/6 생쥐 4주령을 구입하여, 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 22±2 °C, 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방8.0%이하, 조섬유5.0%이하, 조회분8.0%이하, 칼슘0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride (MgCl₂)은 Sigma 社 (USA) 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa 社 (Japan) 제품을, 역전사효소 (moleoy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega 社(Madison, USA) 제품을, RNAzol^B는 Tel-Test 社 (USA) 제품을, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Logan, USA)은 Hyclone 社 (Logan, USA) 제품, 그리고 agarose (FMC, USA)등을 사용하였고, 유세포분석에 사용된 CD4, 그리고 CD8는 pharmlingen (USA)사의 제품을, ³H-Thymidine은 Amersham에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

本 研究에 使用된 機器는 bright microscope (Nikon, Japan), inverted microscope (Nikon, Japan), flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A) spectrophotometer (shimadzu, Japan), CO₂ incubator (napco, Germany), imager II photo-system (Bioneer, Korea), 遠心分離器 (centrifuge, sigma), bio-freezer (sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (vision科學) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등의 것을 使用하였다.

2. 방법

1) 오가피추출물 제조

오가피 300g에 각각 증류수 3000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 오가피 추출물(45

g)을 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 오가피 검액 제조

오가피는 다양한 농도로 우태아결립 RPMI1640 배양액에 희석하여 사용하였고, 동물실험용 검액 제조는 250 mg/kg 용량으로 경구투여 하였다.

제 1절 세포독성 및 사이토카인 유전자발현 분석

1) 생쥐의 lung fibroblast 세포분리 및 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast 세포 (mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐 (lung)조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube (15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. Tube에 DMEM (containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2 회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양하였다. 1 주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 RPMI1640-5% FBS 배양액에 10⁵ 세포/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포독성실험

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포를 96 well plate에 분주하고 배양기 (37 °C, 5% CO₂)에서 48시간 배양하였다. 오가피는 최종 농도가 각각 20 µg/ml, 18 µg/ml, 14 µg/ml, 12 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml이 되도록 96 well에 분주 2시간 후에 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 각 well에 10% TCA (trichloroacetic acid)를 100µl를 가하고 1hr 동안 4 °C에 방치하였다. 증류수로 3회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB (0.4%/1% acetic acid)

용액을 100 µl/well로 가하고 실온 (RT)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid solution으로 약 4-5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris · HCl 100 µl/well로 용해시킨다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 사이토카인 유전자 발현

(1) 비장 면역세포 (PBMCs)에서 사이토카인 유전자 발현 조절

C57BL/6 생쥐의 비장을 적출하여 비장세포를 각각 분리하여 D-PBS로 3회 수세 후 mesh Screen (Sigma, USA)위에 올려 놓고 가위와 유리봉을 사용하여 비장세포를 분리하고, RBC 용혈용액 (Sigma, USA) 2ml를 넣고 37 °C water bath에서 5분간 방치한 후 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 비장세포를 회수하여 배지로 3회 수세 후 세포 숫자를 1x10⁶ cells 씩 24 well plate에 분주하고 오가피 (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml)을 3시간 동안 동시배양하였다.

(2) RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNAzol^B를 이용하여 생쥐 비장세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNAzol^B를 1/10 양으로 CHCl₃ (chloroform) (40 µl/400 µl RNAzol^B)을 넣은 후 15 초간 vortex로 혼합하고 얼음 (ice)에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기 (4℃)로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어서 주었다. 그리고 고속원심분리기 (4℃)로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거한 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W (0.05%)추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-12 p35 (interleukin-12 p35), IL-12 p40, 그리고 IFN- γ (interferon- γ)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μl)와 antisense primer (20 pmole/ μl)를 혼합하여 1 μl 를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3 μl 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl Taq polymerase (5 U/ μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation ; 95°C, 5분, denaturation ; 95°C, annealing ; 55°C, 1분, elongation ; 72°C, 1분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다;

IL-12(p35)는, sense oligonucleotide, 5'-GTCCTT CAGGAATCTGTTC-3'; antisense oligonucleotide 5'-GGCTCATGTACTTTCATGAG-3'. IL-12(P40)는, sense oligonucleotide, 5'-ATCTGCTGCTCCAC AAGAAG-3'; antisense oligonucleotide 5'-TGAT GAAGAAGCTGGTGCTG-3'. INF- γ 는, sense oligonucleotide, 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATT GTAG-3'; antisense oligonucleotide 5'-GTCACAG TTTTCAGCTGTATAGGG-3'. β -actin는, sense oligonucleotide, 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCAT GAAAC-3'; antisense oligonucleotide 5'-TAAAA CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'.

제 2절 유세포 형광분석기 (flow cytometer)를 이용한 면역 세포 분석 및 세포 증식

1) 생쥐의 PBMC 세포분리 및 배양

C57BL/6 생쥐에 10 일동안 오가피 (250 mg/kg)을 경구투여 한 후 비장을 적출하여 비장세포를 각각 분리한 후 비장세포 현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 4°C에서 10분간 정지한 후 상층액을 취하고 3회 수세하여 조직 절편과 세포 덩어리를 제거하고, Histopaque-1077 (Sigma, USA) 5 ml에 올리고 1900 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 buffy coat를 회수하여 배지로 3회 수세 후 PBMCs 세포 숫자를 1×10^6 cells로 계수하였다.

2) 면역형광염색 (immunofluorescence staining)

PBMC는 각각 4°C에서 면역형광염색을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD8을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton dickinson, USA)로 면역활성세포를 분석하였다. 비장세포 분석은 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD4⁺, CD8⁺과 B220⁺ (positive cell)의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

3) PBMC세포 증식에 미치는 영향

비장면역세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 첨가하고, 오가피 추출물을

농도별로 처리한 후 세포를 37°C에서 72시간 배양 후 50 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 [methyl- ^3H] Thymidine (Amersham, USA)을 첨가한 후 다시 8시간 배양하였다. 세포 내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기(Cell Harvester)를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman) 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

III. 成 績

1. 오가피추출물의 세포독성 및 사이토카인 유전자 발현

1) 오가피의 세포독성

생쥐의 대식세포에서 대조군의 세포생존율 (O.D. 값)은 100 \pm 3.1 %였고, 1, 10, 14, 20, 100 $\mu\text{g/ml}$ 오가피 처리군 (ACE)은 각각 107.3 \pm 4.7 %, 109.2 \pm 7.1 %, 74 \pm 3.3 % (** p <0.001), 52 \pm 4.1 % (** p <0.001), 36.4 \pm 2.6 % (** p <0.001)로 나타나 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 오가피 처리군에서 현저한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

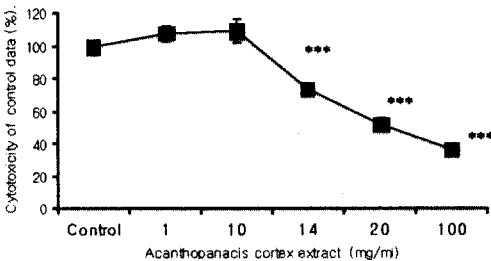


Fig. 1. Cytotoxicity effects of *Acanthopanax cortex* extract on mouse macrophage.

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentration *Acanthopanax Cortex* extract (ACE). Freshly isolated mLFCs (control group), pretreated with ACE (100, 20, 14, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$). The results are expressed the mean \pm S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group by T test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

2) 생쥐의 PBMCs에서 cytokine 유전자 발현 분석
 생쥐 PBMC에서 IL-12 (p35) 유전자 발현은 Fig. 2에서 보는 것 같이 media 대조군 (lane 1)에서 Ht값이 33이었고, 다양한 농도의 오가피 추출물(1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$)을 처리한 결과 27 (lane 2), 49 (lane 3), 58 (lane 4), 14 (lane 5)로 세포독성이 나타난 14 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외하곤 IL-12 (p35) 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 그리고 IL-12(p40) 유전자 발현은 Fig. 2에서 보는 것 같이 media 대조군 (lane 1)에서 Ht값이 30이었고, 다양한 농도의 오가피 추출물(1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$)을 처리한 결과 56 (lane 2), 184 (lane 3), 185 (lane 4), 78 (lane 5)로 세포독성이 나타난 14 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외하곤 IL-12 (p40) 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 IFN- γ 유전자 발현은 Fig. 2에서 보는 것 같이 media 대조군 (lane 1)에서 Ht값이 26이었고, 다양한 농도의 오가피 추출물(1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 14 $\mu\text{g/ml}$)을 처리한 결과 187 (lane 2), 188 (lane 3), 92 (lane 4), 88 (lane 5)로 고농도 보다는 저농도 (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$)에서 현저한 IFN- γ 유전자 발현이 증가하였다 (Table 1).

Table 1. Effects of ACE on cytokines mRNA expression level in mouse PBMCs.

Group	Cytokines m-RNA expression (Ht)			
	β -actin	IL-12(p35)	IL-12(p40)	IFN- γ
Media control	235	33	30	26
14	238	14	78	88
ACE (12 $\mu\text{g/ml}$)	239	58	185	92
10	237	49	184	188
1	238	27	56	187

Mouse PBMCs were pretreated with various concentration ACE for 3h and isolation in mice. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis (Ht) was used to 1D-density program. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The gene expression were observed IL12 (p35), IL12 (p40), IFN- γ mRNA expression and internal control (β -actin).

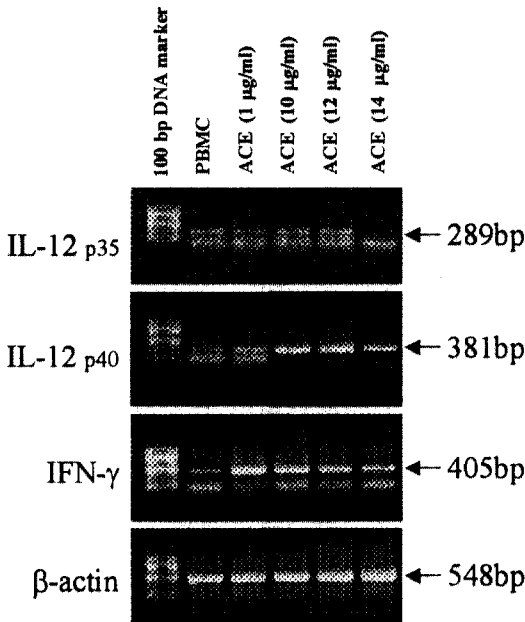


Fig 2. Effects of ACE on cytokines gene expression in mouse PBMCs.

C57BL/6 mouse PBMCs were cultured with ACE for 3 h. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA maker; lane 1, RPMI-1640 media control; lane 2, ACE (1 µg/ml); lane 3, ACE (10 µg/ml); lane 4, ACE (12 µg/ml), lane 5, ACE (14 µg/ml) and internal control (β -actin).

3) 생쥐의 면역 T 세포활성 분석

CD4⁺와 CD8⁺ 세포수의 변화는 Fig.3에서 보는바 같이 생쥐의 PBMCs 세포중 CD3e⁺/CD4⁺의 활성화유세포(% positive cell to)수는 대조군 (Red upper)이 22.1±3.3이고 오가피 추출물 경구 투여군 (Red lower)은 38.4±2.1으로 대조군에 비하여 유의한 오가피 투여군이 73%증가를 나타내었고, CD3⁺/CD8⁺ 세포수의 변화는 활성화유세포(% positive cell to)수는 대조군 (Blue upper)이 5.0±0.4이고 오가피 추출물 경구 투여군 (Blue lower)은 10.7±0.3으로 대조군에 비하여 유의한 오가피 투여군이 100%증가를 나타내었다.

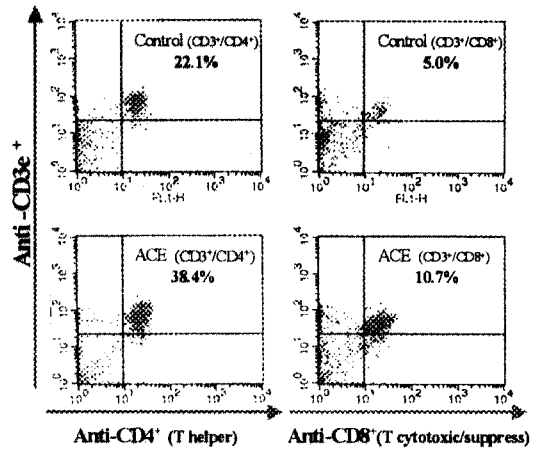


Fig 3. Effects of ACE on the percentage of CD3e⁺/CD4⁺ and CD3e⁺/CD8⁺ cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in Mice.

The PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (left upper) were backscattered onto a dot-plot of SSC versus FSC. Control (upper), ACE treatment group (lower) were stained with CD3e-PE/CD4-FITC and CD3e-PE/CD8-FITC. Each point represents the mean±SE of 4 mice. Statistically significant value compared with control data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4) 생쥐 PBMC세포 증식 효과

오가피를 경구투여한 생쥐에서 분리한 PBMC 세포에 다시 오가피 추출물 (ACE)과 양성대조군 Con-A (10 µg/ml)을 처리하고 72시간 배양하여 [³H]-thymidine uptake assay를 수행하였다. Fig. 4에서 보는바와 같이 처리된 모든 오가피추출물에 의해서 대조군에 비하여 세포증식을 관찰할 수 있었다. 세포증식은 대조군이 2483±431 cpm이고 Con-A 처리군이 16789±2019 cpm이었다. 오가피 추출물 (1 µg/ml)처리군이 4532±2304이 보였고, 10 µg/ml과 12 µg/ml 처리군이 각각 ,10345±2010과 12037±1048으로 유의한 증가를 나타내었다 (p<0.001). 그러나 오가피 추출물 (14 µg/ml)처리군에서는 1089±423으로 세포독성이 나타났다.

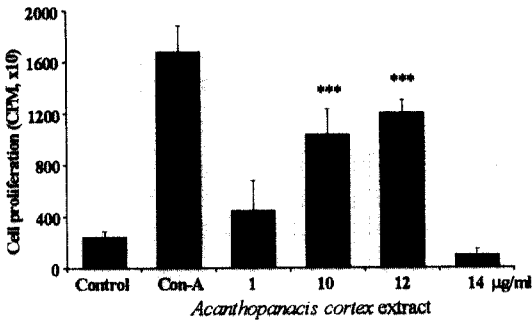


Fig. 4. Effects of ACE on cell proliferation in mouse PBMC.

PBMCs (2×10^6 cells/ml) were cultured with 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 12 μ g/ml, 14 μ g/ml ACE, and concanavalin-A (10 μ g/ml). After 3 days, cell proliferation was measured using ³H-thymidine incorporation. Data is represented by the mean \pm SEM. * Statistically significant value compared with control data by T test (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001)

IV. 考 察

最近 韓醫學界에서도 韓醫學 古書에서 提示한 各種 藥物 그리고 鍼灸療法을 根據로 많은 臨床 및 實驗 研究들이 進行되고 있으며, 그 중 藥鍼을 이용한 研究에 사용된 藥物은 蜂毒, 附子, 草烏, 牛膝, 赤芍藥, 紅花, 紅花油, 續斷, 榆白皮, 桂枝, 木通, 黃柏, 澤蘭, 金銀花, 薏苡仁, 天授根, 梔子, 威靈仙, 丁公藤, 骨騰草, 斑猫 등이 있고, 대부분 關節炎 治療에 應用된 藥物들은 清熱, 活血祛瘀, 祛風濕시키는 藥物이었으며, 일부 溫裏藥인 附子和 補養藥인 續斷이 사용되었으나 아직 免疫力를 增強시키는 補養藥에 대한 研究는 不足한 점에 着眼하여 祛風濕 補肝腎 強筋骨하며 風濕痺痛, 四肢拘攣, 腰膝軟弱, 小兒行遲, 脚氣 등의 效能을 가진 五加皮를 본 捐軀의 藥材로 選定하였다⁴⁻⁸⁾.

五加皮에 대한 기존의 研究에서 정⁹⁾은 마우스에 五加皮 水鍼 Extract를 經口投與하여 疲勞抑制에, Kim¹⁰⁾은 BuOH로 抽出한 有效成分중 diterpenoid가 消炎作用에, 成¹¹⁾은 五加皮 抽出液이 마우스의 抗腫瘍 및 免疫反應에, 김¹²⁾ 등은 LPS로 자극한 單核球에서 IL-8의 生産量 감소에, 이¹³⁾ 등은 大食細胞의 生體防禦作用의 하나인 食食作用 후, 病原體를 죽이는데 필요한 일산화질소 生産에 각각

유효함을 입증하였다. 刺五加(Acanthopanax senticosus (Rupr. et Maxim.)Harms)의 根과 根莖 益氣健脾하며 補腎安神시키므로써, 脾腎陽虛, 腰膝酸軟, 體虛乏力, 失眠, 多夢, 食慾不振등에 使用하는 것으로 나타났다. 藥理作用의 側面에서는 Eleutheroside(β -Sitosterol glucoside), Syringine 등을 함유하여, 中樞神經系統興奮作用, 抗疲勞作用, 抗炎作用, 升白血球作用, 抗腫瘤作用이 있으며, 또한 機體에 대한 유해 자극을 저항하는 힘을 증강시키는 효과도 있다.¹⁴⁾ 한편, 中樞神經系統에 作用하여 鎮靜시키는 효과가 있으며, 非特異的 刺激反應에 대하여 機體를 조절한다. 이에 抗疲勞作用, 산소결핍증과 고온에 인내를 갖게 하는 效能, 抗輻射作用(急性 혹은 慢性 輻射損傷에 대한 保護作用), 解毒作用, 抗應激作用(機體의 應激反應의 病理變化를 改變시키는 作用), 內分泌機能의 紊亂에 대한 調節作用이 해당된다. 한편, 免疫機能에 대한 作用에 있어서는 網狀內皮細胞系統에 대한 吞噬能力을 향상시키는 能力, 抗體를 生成시키는 能力등을 포함한다. 그밖에 抗腫瘤作用, 抗炎作用, 心血管系統的作用(腦血管 擴張, 大腦에 대한 血液供給量 改善等), 代謝作用과 組織再生的 影響(性腺 호르몬의 促進作用), 慢性氣管支炎證性作用(止咳作用, 去痰作用, 抗菌作用)이 있는 것으로 밝히고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾ Acanthopanax gracilistylus W.W.Smith (南五加)의 根皮 藥性은 緩和하다, 또한 祛風濕, 壯筋骨시키는 힘이 비교적 우수하며 주로 腿軟脚弱에 使用하는 것으로 되어 있다. 또한 北五加皮와는 달리 無毒한 것이 特徵이다.¹⁹⁻²⁰⁾ 藥理作用에 있어서 子宮頸部癌에 대하여 抑制作用이 있으며 그 抑制率은 90%에 해당한다고 하였다. 또한 疾病에 대한 抵抗力을 增強시키고 血壓에 대하여 일정한 調節作用이 있는 것으로 되어 있다.²¹⁾ 또한 抗炎作用, 免疫作用, 抗疲勞作用, 血糖下降作用, 抗腫瘍作用 등과 같은 藥理作用으로²²⁻²⁸⁾, 現代에는 陽痿, 白血球減少症, 關節 류마티스, 老年의 慢性氣管支炎, 急性 高山病등의 疾患에 主藥 또는 加味藥으로 活用되고 있다³⁰⁾. 五加皮에 대한 實驗的 研究로는 劉³¹⁾가 五加皮에 非特異性 免疫의 功效가 있는 多糖部分이 있음을 報告하였고, 劉³⁰⁾는 小

鼠 細胞凝集效果에 있어 小鼠 血清抗體濃度가 對照群에 比하여 높게 나타남을 報告한 바가 있다. 韓醫學에서의 腫瘍에 대한 認識은 이러한 免疫機能의 低下, 곧 正氣가 不足하고 邪氣가 停滯함으로써 氣滯血瘀하고 痰飲獨聚하여 서로 絞結하고 蘊鬱하여 마침내 腫塊가 形成되는 것으로 理解해 왔으며, '正'은 正氣로서 人體가 邪氣의 侵犯에 抵抗하고 生命活動을 維持하게 되는 能力을 말하며 '邪'는 邪氣로서 外感六淫, 七情·飲食·勞倦·痰飲 및 瘀血等 發病要因을 나타낸다 할 수 있다³²⁻³⁷. 黃帝內經에서의 "正氣存內 邪不可干", "邪氣所湊 其氣必虛", "邪之所在 皆爲不足"이란 文句는 이러한 여러 가지 原因으로 因하여 正氣가 虛弱해지면 外邪가 쉽게 虛弱한 곳으로 侵入하여 各種疾患을 惹起시킴을 나타낸다 할 수 있다³⁸. 現代에서의 免疫의 概念은 非己를 識別하여 非己를 排斥하고 自己를 保存하는 것이며, 基本的으로 韓醫學에서의 正氣의 概念과 一致한다 할 수 있다³⁹.

한편 위에 言及한 免疫療法으로 즉 生物學的 反應 調節物質(BRM)로서 BCG나 擔子菌類의 抗腫瘍 蛋白多糖體 등이 關心이 高조되고 있으며 이러한 生藥 抽出物의 하나인 擔子菌類에서 起源하는 多糖體는 人體의 細胞免疫을 強化하여 抗癌作用을 나타내는 것으로 알려져 있다⁴⁰. 擔子菌類는 15,000餘種 以上이 記錄되어 있는 高等菌類로서 지금까지 많은 種類의 抗生物質이 抽出되었고 이중 진정 擔子菌類는 대부분 抗腫瘍 物質을 生成하며, 이외에도 擔子菌類에서 抽出된 抗生物質은 免疫調節 作用 및 血壓降下 作用도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 植物에서 抽出한 多糖體들은 大食細胞의 活性化를 통한 T-淋巴球의 機能 亢進 및 IL-1 등의 媒介 物質을 放出함으로써 宿主의 免疫機能을 活性化시키는 것으로 알려져 있다⁴¹⁻⁴². 一般的으로 擔子菌類의 抗腫瘍 蛋白 多糖體는 抗癌 化學 療法製劑와는 달리 正常細胞에 毒作用을 나타내지 않을 뿐만 아니라 오히려 宿主의 免疫機能을 強化시킴으로써 抗癌 效果를 나타내기 때문에 抗癌 化學 療法 製劑와 併用할 경우 그 治療效果를 向上시킬 수 있다. 따라서 擔子菌類에서 抽出된 多糖體는 一種의 生物學的 反應 調節物質

(BRM)이라고 할 수 있다⁴³.

본 연구에서 C57bl/6 생쥐의 PBMCs에 오가피추출물로 자극한 후 싸이토카인 m-RNA 유전자 발현을 분석한 결과 대조군에 비하여 IL-12 (p35), IL-12 (p40), IFN- γ 의 유전자 발현이 증가되었다. 이는 T helper를 활성화시켜 면역증진을 시키는 것으로 추측할 수 있다. 그래서 T helper 림프구 (CD4)세포와 T cytotoxic/suppression 림프구 (CD8)의 표면분자 발현에 대한 면역형광염색을 실시한 결과에서는 T helper와 T cytotoxic/suppression 림프구 세포에서 무자극한 대조군에 비하여 오가피추출물을 처리한 CD3e⁺/CD4⁺와 CD3e⁺/CD8⁺의 빈도는 73%과 100%이었고, 양성대조군인 Con-A와 동시배양한 세포의 빈도는 62.4%와 18.3%의 현저한 증가로 T 세포활성화를 시킬것으로 사료된다. 또한 ³H-thymidine uptake 에서도 현저한 세포증식을 관찰할 수 있었다. 그러나 오가피추출물의 14 μ g/ml 이상에서 세포독성을 나타내어 제한적인 농도로 사용되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과 오가피의 추출액(ACE)이 생쥐의 T 면역세포에서 면역 증진 효과를 나타냄으로써 각종 질환인 암, 자가면역결핍, 당뇨, 그 외 면역질환의 치료제 개발에 앞으로 지속적인 연구 및 임상 활용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

오가피 추출물(ACE)의 면역조절을 통한 생쥐 PBMCs에서의 면역세포분석 및 cytokine유전자 발현, PBMC세포 증식능 등의 관찰을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오가피 추출물은 생쥐 lung fibroblast 세포에서 14 μ g/ml 이상에서 세포독성은 나타났다.
2. 오가피 추출물은 IL-12 (p35), IL-12 (p40), INF- γ 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다.
3. 오가피 추출물은 CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺ 활성화 세포수를 대조군에 비하여 유의성있게 증가

시켰다.

4. 오가피 추출물은 PBMCs의 세포증식을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 실험결과로 오가피 추출물은 생쥐 T 세포를 활성화 시켜 면역 증강효과가 있는 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 孫星衍·孫馮翼輯：神農本草經，五州出版社，臺北，pp.40~41, 1985.
2. 成載煥：五加皮 抽出液이 마우스의 抗腫瘍 免疫反應에 미치는 影響，圓光大學校 大學院，裡里，1994.
3. Takahiko FUJIKAWA, Akihiko YAMAGUCHI, Isao MORITA, Hidekatsu TAKEDA, and Sansei NISHIBE：Biol. Pharm. Bull. 19(9) pp.1227~1230, 1996.
4. 趙允亨 외：關節炎에 대하여 보고된 韓醫學 論文에 관한 考察，한방재활의학과학회지, 11(1):177, 184, 2001.
5. 류호상：關節炎에 관한 韓醫學 碩·博論文 73編에 대한 分析，大田大學校 大學院，2001.
6. 新文豐出版公司：新編中藥大辭典，서울，一中社影印，pp.279~81, 中華民國 74.
7. 진국한의과대학본초학교실：본초학，서울，영림사，p.284, 1998.
8. 김호철：한약약리학，서울，집문당，pp.204~205, 2001.
9. 정기화：오가피 수침 Extract의 약리작용，덕성여대논문집 11:259~265, 1982.
10. Kim Ho Young: Diterpene Glycoside from *Acanthopanax koreanum*, Kor. J. Pharmacogn., 21(1):49~51, 1990.
11. 성재환：五加皮 抽出液이 마우스의 抗腫瘍 및 免疫反應에 미치는 영향，원광대 대학원，1994.
12. 김호철 외：Human Monocyte의 IL-8생산 억제에 미치는 류마티드 關節炎 치료제로서의 오가피의 효과，대한본초학회지, 10(1):49~58, 1995.

13. 이성태 외：일부 한약재의 생쥐 대식세포 일산화질소와 TNF- α 생산 유도，한국식품영양과학회지, 29(2):342~348, 2000.
14. 中國醫學科學院藥物研究所等編：中藥志(第一冊)，人民衛生出版社，北京，pp.459~463, 1988.
15. 王本祥主編：現代中藥藥理學，天津科學技術出版社，天津，pp.423~424, 1997.
16. 王浴生主編：中藥藥理與應用，人民衛生出版社，北京，pp.626~637, 1983.
17. 陰健郭力弓主編：中藥現代研究與臨床應用，學苑出版社，北京，pp.411~420, 1994.
18. 中藥大辭典編纂委員會編：中藥大辭典(券上)，新文豐出版公司，臺北，pp.279~282, 1979.
19. 王浴生主編：中藥藥理與應用，人民衛生出版社，北京，pp.626~637, 1983.
20. 王本祥主編：現代中藥藥理學，天津科學技術出版社，天津，pp.423~424, 1997.
21. 啓業書局：抗癌中草藥，啓業書局有限公司，臺北市，pp.299~301, 1987.
22. 江蘇新醫學院編：中藥大辭典，第一版，上冊，上海人民衛生出版社，1977:380.
23. 水新薇等：南五加扶正固本作用的研究，中藥研究 1983(9):43.
24. 水新薇等：南五加扶正固本作用的研究：抗排斥作用及抗炎作用，中藥研究 1984(10):22.
25. 張實華等：南五加對 DNA, RNA 合成的影響，湖南中醫學院學報 1985:5(3):52.
26. 宋光華：細柱五加根皮化學成分的研究，中國藥科大學學報 1987:18(3):203.
27. 袁文軍等：細柱五加的藥理作用研究，沈陽藥學院學報 1988:5(3):192.
28. 張守仁：南五加terpenes酸對大鼠實驗性潰瘍的作用 中國醫學科學院學報 1990:12(3):198.
29. 漢藥臨床應用：李尙仁等：서울，成輔社，1990:185.
30. 劉禮意等：南五加“扶正固本”作用的實驗研究，中草藥 1987:18(3):27.
31. 劉愛靜等：南五加總皂(配糖體)藥理作用的研究，中成藥研究 1985(4).
32. 김상용：메시마엑스의 함암효과에 대한 연구，

- 대한암학회지; 23 pp.210-217, 1991.
33. 하대유외: 免疫學, 서울, 고문사, pp.7-23, 1994.
34. 정태호: 免疫學講義, 大邱, 慶北大學校 出版部, pp.294-303, 1993.
35. 金昌種: 病態生理學, 서울, 癸丑文化社, pp.72-74, 1988.
36. 文濬典외: 東醫病理學, 서울, 古文社, pp.78-90, 1990.
37. 劉正才: 中醫免疫, 北京, 重慶出版社, pp.8-13, 1983.
38. 王 冰: 黃帝內經, 서울, 古文社, 素問, p.91, 166, 229, 326. 靈樞, p76,88, 1977.
39. 安德均譯: 免疫과 韓方, 서울, 열린책들, pp.45-48, 1992.
40. Ikekawa T, Nakashi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F, Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*, GANN; 59, p.155-157, 1968.
41. Nomoto K, Yoshikum: C, Matsunaga K, Fuji T, Takeya K.: Restoration of antibody forming capacities by Polysaccharide-K in tumor bearing mice, GANN; 66, p.365, 1975.
42. Nakanhara W, Fuoka F, Maeda Y, Aoki K: The host mediated antitumor effect of some plant Polysaccharides, GANN; 55, pp.283-288, 1964.
43. 김상용: 메시마엑스의 항암효과에 대한 연구, 대한암학회지; 23 pp.210-217, 1991.