

보중익기탕(補中益氣湯)의 B세포 분화 유도 효과

신성해¹ · 채수연¹ · 하미혜² · 조성기³ · 김성호⁴ · 변명우³ · 이성태^{1*}

¹순천대학교 생물학과, ²유용천연자원연구소
³원자력연구소 방사선 식품생명공학팀, ⁴전남대학교 수의학과

Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on B Cell Development

Sung-Hae Shin¹, Su-Yeon Chae¹, Mee-Hye Ha², Sung-Kee Jo³,
Sung-Ho Kim⁴, Myung-Woo Byun³ and Sung-Tae Yee^{1*}

¹Dept. of Biology and ²Research Institute of Natural Resources,
Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

³Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

⁴College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

This study was designed to evaluate the effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extracts, a prescription of traditional oriental medicine, on development of the B cells. In the bone marrow cell cultures, progenitors viability, expressions of particular cell-surface proteins and production of immunoglobulins were investigated in the presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extracts. The administration of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction increased the viable cell numbers of the precursor B cells, and elevated expression levels of CD19/CD40 specific for pre-B cells after 10 days culture were demonstrated by flow cytometry analysis. The production of immunoglobulin M in the presence of polysaccharide fraction increased progressively in the culture supernatant, and preferentially induced class switching to IgG1, IgG2a and IgG3. These results indicated that Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang strongly correlated with the development of precursor B cells in the bone marrow cell culture. Therefore the polysaccharide fraction of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang might be a useful radioprotector, especially since it is a relatively non-toxic natural product. Further studies are needed to better characterize the protective nature of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extract.

Key words: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang, polysaccharide fraction, radioprotector, Pre-B cells, immunoglobulin class switching

서 론

방사선과 방사선 동위원소 이용에 따른 부작용 및 피폭사고에 의해 발생하는 생체 손상의 예방과 치료를 위한 방호제 개발의 필요성이 증가하고 있다. 지금까지 방사선 방호제에 대한 연구는 주로 합성물질들을 대상으로 수행되어 왔다(1-6). 그러나 유효용량에 수반되는 강한 독성 때문에 임상적으로 이용되지 못하고 있다. 생약과 같은 천연물들은 각종 질병이나 상해회복에 효과적이며 독성이 적어서 특별한 부작용을 나타내지 않는다. 따라서 방사선 장해를 예방 또는 경감시키는 효과를 가진 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생약제제에 의한 방사선 방호효과는 조혈조직의 보호 및 회복(7-9), 면역증강(10-12), 약재성분 중 미량원소의 흡수(13) 등의 관점에서 연구가 진행되었으며, 주로 조혈장기의 회복 효과에 관한 연구가 이루어지고 있다. 천연 생

약재에 대한 연구에서 인삼(14), 당귀(15), 천궁(16), 영지(17), 가시오가피(8), 만삼(10), 자리궁(11), 황기(18) 및 지황(7) 등의 효과가 보고되었으며, 복합 처방제에 대한 연구는 사물탕 및 사군자탕(19), 보중익기탕, 소시호탕, 십전대보탕(20), 인삼영양탕(21), 귀비탕(12,22) 및 육미지황(13) 등의 효과에 대한 보고가 있다.

보중익기탕(補中益氣湯)은 A.D. 1232년李호(23)의東垣十種醫書에 처음으로 수록된 이래, 많은 학자들(24-26)에 의하여 비장과 위장을 보하는 처방으로 인용, 기록되어 왔으며 주로 飮食勞倦傷症의 치료에 이용되어왔다. 보중익기탕은 향암(27), 향균(28), 진통(29), 조혈증강(30), 남성 생식 기능강화(31), 항스트레스(32) 등의 효과가 있음이 알려져 있다. 특히, 최근에 보중익기탕은 γ -선을 조사한 생쥐에서 소장염의 생존 및 내재성 비장 집락의 형성을 촉진하였으며 소장염 세포에서 apoptosis에 의한 세포사는 감소시켰고 생존율

*Corresponding author. E-mail: sungtae@sunchon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3618, Fax: 82-61-750-3608

은 증가시키는 것으로 나타났다(33). 따라서 보충익기당은 조혈증진 및 방사선 방호 식품으로 적용이 가능한 것으로 생각되기 때문에, 본 실험에서는 보충익기당의 추출물이 방사선 장해에 가장 민감한 조직인 골수에서 전구세포의 증식과 분화에 미치는 효과에 대해 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용된 생쥐(Balb/c)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 번식, 사육한 특정 병원체 부재(Specific Pathogen Free) 생쥐로 생후 8~12주된 암컷을 사용하였고, 고형사료와 1차 증류수를 제한 없이 공급하면서 사육하였다.

보충익기탕 제조

황기(5.62 g), 인삼(3.75 g), 백출(3.75 g), 감초(3.75 g), 당귀(1.87 g), 진피(1.87 g), 승마(1.12 g), 시호(1.12 g)의 재료에 0.5 L의 물을 넣고 80°C에서 약 0.25 L로 될 때까지 열수 추출하여 여과한 후, 동결 건조하여 total 분획을 조제하였다. 여기에 에탄올을 약 80%정도 첨가하여 4°C에서 24시간 방치하여 다당체를 침전시킨 후, 4,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전된 다당체를 완전히 분리하였다. 얻은 다당체를 다시 물에 녹여 투석막을 이용하여 분자량 12,000 이하의 조다당체를 제거한 후 분자량 12,000 이상의 다당체를 동결 건조하여 polysaccharides 분획을 얻었다. 분리한 total 및 polysaccharide 분획을 생리식염수에 녹여 건조중량을 계산하여 실험에 사용하였다.

시약 및 재료

세포 배양에 필요한 RPMI1640, antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, FCS(Fetal Calf Serum)은 Hyclon 제품을, 2ME(2-mecaptoethanol), sodium bicarbonate(NaHCO₃)는 Sigma(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 세포 표면 단백질에 대한 특이적 항체(anti-CD19, CD34, CD117, CD123, CD127 mAb)와 면역글로불린 G에 대한 항체(anti-IgM, IgG1, G2a, G2b, G3 mAb)는 Pharmingen 제품을 사용하였다.

골수세포 분리 및 배양

생쥐(Balb/c)를 경추탈골법으로 희생시킨 후 1 mL 주사기를 이용해 대퇴골(femur)과 경골(tibia) 안에 있는 골수를 분리하여 단일 세포로 만들었다. 단일 세포 부유액을 washing 용액으로 1,200 rpm에서 10분간 3회 원심 분리하여 충분히 세척한 다음, 혈구계산판을 이용하여 세포 수를 계산하였다. 골수세포를 6 well 배양접시에 분주하여 37°C, CO₂ incubator에서 5일 또는 10일간 배양한 후에 배양접시에 부착하지 않은 세포만을 수거하여 실험에 사용하였다. 골수세포를 배양할 때, 실험군은 보충익기탕의 total 또는 polysaccharide 분획을 100 µg/mL 농도로 첨가하여 배양하였다.

세포표면 단백질 분석

골수에서 분리한 세포에 보충익기탕의 total 또는 polysaccharide 분획을 첨가하여 5일 또는 10일간 배양한 후에 비부착성 전구세포만을 분리하여 각각 단일클론항체로 염색하여 유세포분석기(Epics XL, COULTER, USA)로 세포표면 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. 즉, 비부착성 세포를 washing 용액(PBS, 1% FCS, 0.1% NaN₃)으로 세 번 세척한 다음, 먼저 비특이적 염색을 막기 위해 세포 1×10⁶개를 anti-FcγRⅡ/Ⅲ-specific mAb(2.4G2)로 4°C에서 30분간 blocking한 다음, 바로 FITC-conjugated CD19, 117, PE-conjugated CD40, biotin-conjugated CD34, 123, 127 mAb로 4°C에서 30분간 염색하였다. 염색 후 washing 용액으로 세척하고 biotin-conjugated CD34, 123, 127 mAb는 다시 streptavidin-PE로 4°C에서 30분간 염색한 다음 washing 용액으로 세척한 후 유세포분석기로 분석하였다.

세포 수 측정

Trypan blue 시약을 이용하여 혈구계산판에서 생세포 수를 측정하였다. 즉, trypan blue 시약과 세포 부유액을 1:1로 희석하여 혈구계산판으로 관찰하면서 trypan blue 시약에 염색되지 않은 생세포를 다음과 같은 계산식으로 측정하였다.

$$\text{생세포수/mL} = \text{측정한 세포 수} / 2 \times \text{세포 부유액 희석배수} \times 10^4$$

면역글로불린 농도 측정

골수에서 분리한 세포를 보충익기탕 total 또는 polysaccharide 분획을 첨가하여 5일 또는 10일간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 IgM, IgG1, G2a, G2b, G3 양을 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)를 이용해 측정하였다. 즉, 일차 항체 anti-IgM, IgG mAb를 coating buffer(0.1 M NaHCO₃)에 희석하여 plate에 적정 양을 넣고 4°C에서 하룻밤 둔 다음 washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 10% FCS를 첨가한 PBS로 2시간 동안 blocking하였다. 그리고, 배양 상층액을 적절하게 희석하여 넣은 다음, 4시간 후에 washing 용액으로 세척하고 이차 항체 biotin-conjugated anti-IgM, IgG mAb를 첨가하였다. 2시간 후에 avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2, 2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H₂O₂)을 넣어 발색시켜서 Microplate reader(OPTImax, Molecular Devices, USA)를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 이용하여 환산하였다. 이때 각 면역글로불린의 측정 한계치는 10 pg/mL이었다.

결과 및 고찰

골수세포 배양

보충익기탕 추출액이 골수세포 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 먼저 대조군과 보충익기탕 total 또는 polysac-

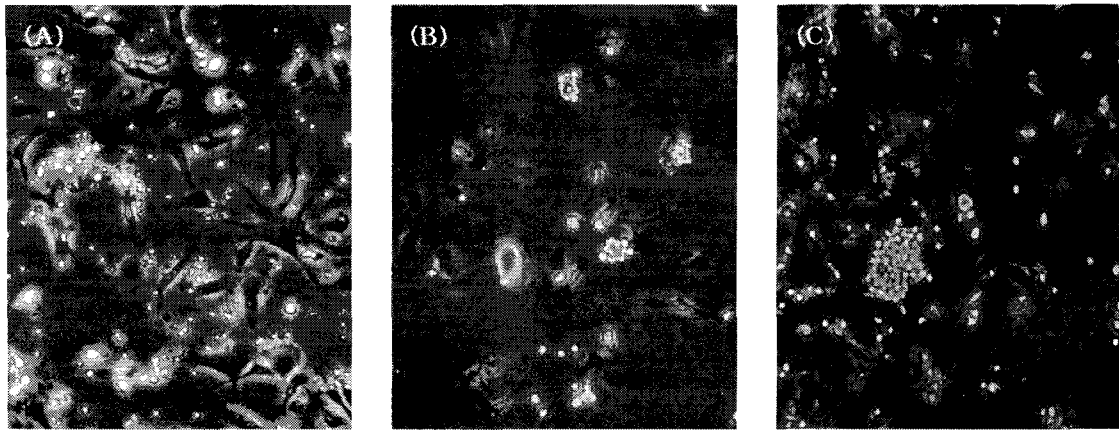


Fig. 1. Morphology of stromal cells and progenitors derived from bone marrow cells. Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 10 days in the absence (A) or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang total (B) or polysaccharide fraction (C). ↓: adherent stromal cell. *: non-adherent progenitor.

charide 분획을 첨가하여 10일간 배양하였다. 그 결과, Fig. 1(A)에서 보는 것과 같이 추출물을 첨가하지 않은 대조군은 배양접시에 강하게 부착하는 지지세포(stromal cells)만이 증식하였고, 비부착성 전구세포는 일부 관찰되지만 증식하여 콜로니를 형성하는 세포는 보이지 않았다. 즉 골수세포를 10일간 배양하였을 때는 증식하는 세포가 관찰되지 않았다. 그러나 보중익기탕의 total 또는 polysaccharide 분획을 첨가하였을 경우에는 부착성 지지세포와 비부착성 전구세포 모두 관찰되었다. 그리고 전구세포는 증식하여 세포가 여러 개 모여있는 콜로니를 형성하는 것이 관찰되었다(Fig. 1B, C). 특히 total 분획을 첨가한 실험군 보다 polysaccharide 분획을 첨가한 실험군에서 많은 수의 지지세포와 전구세포가 관찰되었다(Fig. 1C). 그리고 전구세포가 분열하여 생긴 콜로니 내의 세포 수도 유의하게 증가하였다.

전구세포의 증식과 분화과정에는 골수의 지지세포가 필요하다(34). 골수의 지지세포는 SCF(stem cell factor)와 같은 세포부착분자를 발현하거나, 분화와 성장을 유도하는 IL-7과 같은 성장인자를 제공한다(35). 따라서 전구세포의 분화와 증식에 필요한 지지세포가 polysaccharide 분획을 첨가한 실험군에서 많이 관찰된 것과 전구세포 수가 증가한 것은 서로 상관관계가 있는 것으로 생각된다. 따라서 polysaccharide 분획이 지지세포에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

전구세포 증식

위 실험에서 보중익기탕 추출물을 첨가하였을 때, 전구세포가 증식한다는 것이 확인되었기 때문에 이번에는 증식한 전구세포의 수를 정량적으로 관찰하였다. 즉 골수세포를 배양접시에 3×10^6 개씩 넣고 보중익기탕의 total 또는 polysaccharide 분획을 첨가하여 5일 또는 10일간 배양한 후에 비부착성 전구세포만을 회수하여 세포 수를 계산하였다. 배양 5일 후에 추출물을 첨가하지 않은 대조군(1×10^6 개)과 total 분획(1.13×10^6 개) 또는 polysaccharide 분획(1.33×10^6 개)을 첨가

한 실험군에서 모두 세포 수가 약 1/3 정도로 감소하였다(Fig. 2). 즉 2/3 정도의 골수세포가 죽거나 또는 부착성 지지세포로 배양접시에 부착하여 회수되지 않은 것으로 생각된다. 배양 10일 후에 대조군은 9.7×10^4 개로 배양 전보다 약 1/30 정도 감소하였다. 그리고 total 분획을 첨가한 경우 24×10^4 개로 약 1/12 정도, polysaccharide 분획을 첨가한 경우 108×10^4 개로 약 1/3 정도 감소하였다. 즉 대조군은 배양 5일 후 세포수가 1/3 정도, 10일 후 1/30 정도로 지속적으로 많이 감소하였다. 그리고 total 분획을 첨가한 경우에도 역시 약 1/2.6, 1/12로 세포수가 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 polysaccharide 분획을 첨가한 경우에는 배양 5일 후에 약 1/2.2 정도, 10일 후에 약 1/2.7 정도로 감소하였다. 즉 배양 5일 후 회수한 세포 수(1.13×10^6 개)와 10일 후 회수한 세포 수(1.08×10^6 개)가 비슷하게 나타나 배양 5일 이후에는 감소하지 않고 계속 유지되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보중익기탕의 pol-

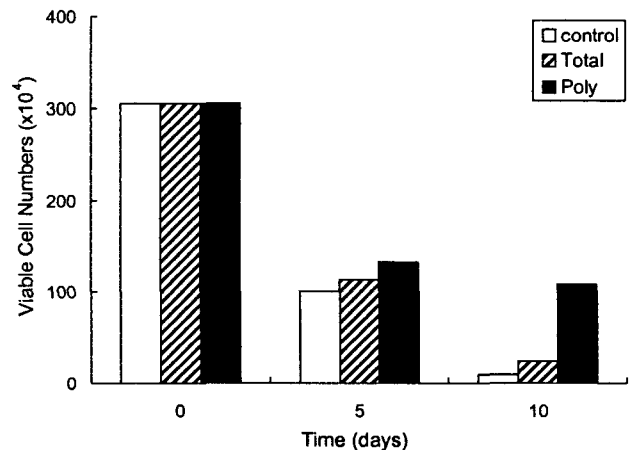


Fig. 2. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on the viability of bone marrow cells. Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang total and polysaccharide fraction. Representative result of the three experiments is shown.

ysaccharide 분획을 첨가하여 골수세포를 배양하면 많은 세포가 죽지만 일부 전구세포는 살아남아 증식하는 것으로 생각된다. 즉 보충익기탕의 polysaccharide 분획에 전구세포의 증식을 유도하는 성분이 포함되어 있는 것으로 생각된다.

골수세포 분화

골수는 1차 면역기관으로 각종 면역세포를 만드는 전구세포가 존재하는 곳이다. 면역세포는 분화되는 각 단계에서 발현되는 세포표면 단백질의 발현 양상이 달라진다(36). 즉, 전구세포 단계에서 CD34와 CD117, 그리고 CD123이 발현되고, 골수계 전구세포로 분화하면 CD117, CD123이, 그리고 림프계 전구세포로 분화하면 CD117과 CD127이 발현된다. 림프계 전구세포에서 더 분화하여 Pro-B세포 단계에서 CD19와 CD127이 발현되고, 다음 분화 단계인 Pre-B세포 단계에서 CD19와 CD40이 발현된다(Fig. 3). 따라서 보충익기탕 추출물을 첨가한 실험군에서 분열 증식한 세포가 어떤 종류의 세포인지를 구분하기 위하여 세포 표면 단백질의 발현양을 각 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 단클론 항체로 염색하여 유세포분석기(flowcytometry)로 분석하였다.

먼저 전구세포의 비율을 알아보기 위하여 CD34와 CD117 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 단클론 항체로 염색하였다. 그 결과 배양 5일 후 CD34와 CD117 단백질 모두를 발현하는 비율은 대조군 0.4%에 비해 total 분획을 첨가한 경우 0.7%, polysaccharide 분획을 첨가한 경우 0.4%로 유의한 차이가 없었다. 그리고 배양 10일 후에 대조군은 세포가 거의 죽어버려서 측정할 수가 없었고 total 분획을 첨가한 경우 0.0%, polysaccharide 분획을 첨가한 경우 0.6%로 나타났다. 즉 배양 전 골수에서 분리하였을 때 0.6%에 비해 유의한 증가는 나타나지 않았다(Table 1). 골수계 전구세포로 분화하

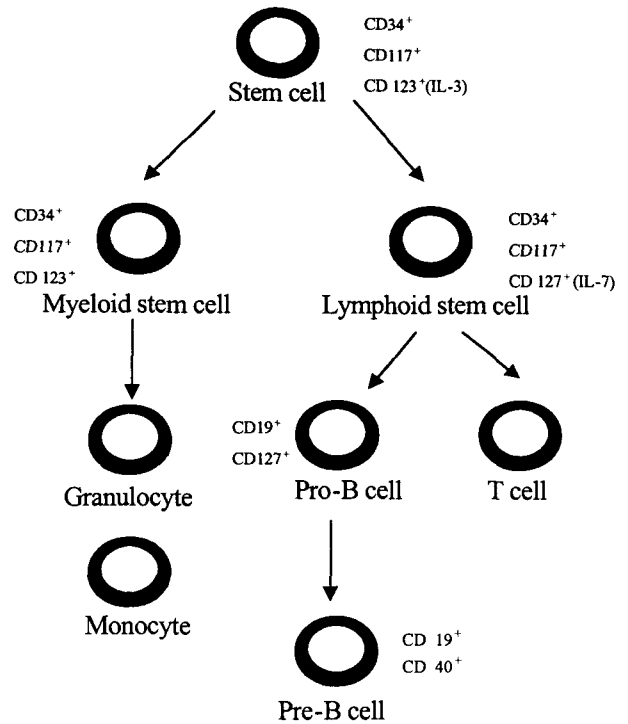


Fig. 3. The development of B-lineage cell proceeds through several stages marked by the expression of cell surface proteins.

면 CD117과 CD123 단백질 모두를 발현하기 때문에 각각에 대한 발현양을 조사하였다(Table 2). 배양 전 CD117과 CD123 단백질 모두를 발현하는 비율 1.9%에 비해, 배양 5일 또는 10일 후 그리고 추출물을 첨가하지 않은 대조군과 첨가한 실험군 모든 경우에 유의한 증가는 확인되지 않았다. 또한 림프계 전구세포로 분화하면 나타나는 CD117과 CD127 단백

Table 1. Expression levels (%) of CD34 and CD117 surface proteins after 5 and 10 days culture

Conditions	5 days			10 days		
	CD34 ⁺	CD117 ⁺	CD34 ⁺ /117 ⁺	CD34 ⁺	CD117 ⁺	CD34 ⁺ /117 ⁺
Control	4.3	3.3	0.4	ND ¹⁾	ND	ND
Total	6.8	3.7	0.7	0.8	0.2	0.0
Polysaccharide	3.7	7.5	0.4	6.0	4.5	0.6

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

Representative result of the three experiments is shown.

¹⁾ND: not done.

Table 2. Expression levels (%) of CD117 and CD123 surface proteins after 5 and 10 days culture

Conditions	5 days			10 days		
	CD117 ⁺	CD123 ⁺	CD117 ⁺ /123 ⁺	CD117 ⁺	CD123 ⁺	CD117 ⁺ /123 ⁺
Control	3.5	0.6	0.1	ND ¹⁾	ND	ND
Total	4.1	11.5	2.0	0.2	0.7	0.0
Polysaccharide	8.8	1.5	0.3	4.5	5.3	0.9

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

Representative result of the three experiments is shown.

¹⁾ND: not done.

질 발현의 결과도 동일하게 유의한 증가가 관찰되지 않았다 (Table 3). 림프계 전구세포에서 더 분화된 Pro-B세포는 CD19와 CD127 단백질을 발현하는데, total 분획을 첨가하였을 경우에 두 가지 단백질 모두를 발현하는 비율이 0.1%(5일 배양)에서 0.7%(10일 배양)로 약간 증가하였고, polysaccharide 분획을 첨가한 경우에도 1.7%(5일 배양)에서 2.6%(10일 배양)로 약간 증가하였다(Table 4). 그러나 CD19 단백질만을 발현하는 세포의 비율은 total 분획을 첨가하면 3.6%(5일 배양)에서 22.4%(10일 배양)로 약 6.2배 증가하였고, polysaccharide 분획을 첨가하면 11.4%(5일 배양)에서 66.5%(10일 배양)로 약 5.8배 증가하였다. 마지막 분화 단계인 Pre-B세포는 CD19와 CD40 단백질을 발현하는데 total 분획을 첨가하였을 경우 양쪽 단백질 모두를 발현하는 비율이 배양 10일 후 18%, polysaccharide 분획을 첨가하였을 경우 배양 10일 후에 59.1%로 나타났다(Table 5). 즉 CD19 단백질을 발현하는 대부분의 세포들이 CD40 단백질을 함께 발현하는 Pre-B세포인 것으로 생각된다. 즉 골수세포를 보중익기탕 total 분획으로 10일간 배양하였을 때 분화 증식하는 세포의 18%와 polysaccharide 분획으로 배양하였을 때 분화 증식하는 세포의 59.1%는 CD19와 CD40을 동시에 발현하는 Pre-

B세포인 것이 확인되었다.

면역글로블린 M 생산

B세포는 골수 내에서 분화가 끝나면 세포표면에 IgM을 항원 수용체로서 발현하고 혈액으로 IgM을 분비한다. IgM은 면역글로블린 중에서 가장 큰 분자로서 혈청 면역글로블린의 약 10%를 차지하며 일차 면역반응 초기에 주로 생성되는 항체이다. IgM은 가장 강한 응집능력을 가지며 보체와 잘 결합한다(37). 따라서 보중익기탕의 추출물을 첨가하여 CD19와 CD40을 발현하는 Pre-B세포로 분화된 세포가 IgM을 분비하는 성숙한 B세포로 분화되었는지를 배양액 내 IgM 농도를 측정하여 알아보았다.

대조군의 경우에 Pre-B세포가 1.0%(5일 배양) 또는 0.6%(10일 배양) 정도(Table 5)이기 때문에 IgM 농도는 3.8 ± 0.7 ng/mL(5일 배양)과 9.3 ± 0.8 ng/mL(10일 배양)로 낮게 나타났다(Fig. 4). 그리고 total 분획을 첨가한 경우에 Pre-B세포가 2.0%(5일 배양) 또는 18.0%(10일 배양) 정도로 IgM 농도는 4.3 ± 1.2 ng/mL(5일 배양)과 13.6 ± 0.6 ng/mL(10일 배양)로 낮게 나타났다. 그러나 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때는 Pre-B세포가 1.5%(5일 배양) 또는 59.1%(10일 배양)

Table 3. Expression levels (%) of CD117 and CD127 surface proteins after 5 and 10 days culture

Conditions	5 days			10 days		
	CD117	CD127	CD117/127	CD117	CD127	CD117/127
Control	2.8	0.0	0.0	ND ¹⁾	ND	ND
Total	3.9	0.5	0.2	0.2	0.3	0.0
Polysaccharide	9.1	0.8	0.5	4.0	2.4	0.3

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

Representative result of the three experiments is shown.

¹⁾ND: not done.

Table 4. Expression levels (%) of CD19 and CD127 surface proteins after 5 and 10 days culture

Conditions	5 days			10 days		
	CD19	CD127	CD19/127	CD19	CD127	CD19/127
Control	1.2	0.2	0.1	ND ¹⁾	ND	ND
Total	3.6	0.7	0.1	22.4	1.1	0.7
Polysaccharide	11.4	9.9	1.7	66.5	2.8	2.6

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

Representative result of the three experiments is shown.

¹⁾ND: not done.

Table 5. Expression levels (%) of CD19 and CD40 surface proteins after 5 and 10 days culture

Conditions	5 days			10 days		
	CD19	CD40	CD19/40	CD19	CD40	CD19/40
Control	1.6	5.2	1.0	ND ¹⁾	ND	ND
Total	2.5	9.5	2.0	22.0	21.3	18.0
Polysaccharide	9.5	4.9	1.5	60.2	70.1	59.1

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang.

Representative result of the three experiments is shown.

¹⁾ND: not done.

Table 6. Effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang total and polysaccharide fraction on the secretion of Ig G subclass

Conditions		Immunoglobulin G subclass, ng/mL			
		G1	G2a	G2b	G3
5 days	Control	66.3±2.2	3.5±0.4	<1.0	<1.0
	Total	60.1±3.7	3.1±0.2	<1.0	<1.0
	Poly	78.6±6.1	4.2±0.7	<1.0	<1.0
10 days	Control	36.8±3.4	3.4±0.5	<1.0	<1.0
	Total	32.9±2.8	3.8±0.5	<1.0	<1.0
	Poly	157.0±5.0	11.0±0.6	<1.0	32.0±2.0

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang. Immunoglobulin G1, G2a, G2b, G3 level were determined by ELISA.

Data are presented as mean ± standard deviations for triplicates.

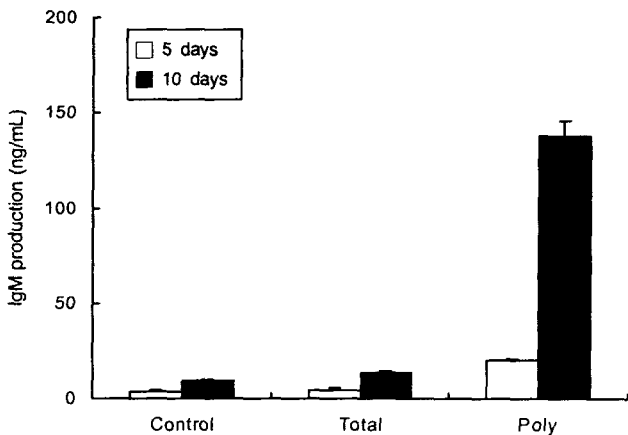


Fig. 4. Immunoglobulin M levels in the culture supernatant were determined by ELISA.

Bone marrow cells isolated from a Balb/c mouse were cultured for 5 and 10 days in the absence or presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang. Data are presented as mean ± standard deviations for triplicates.

정도로 IgM 농도는 20.0 ± 1.0 ng/mL(5일 배양)과 137.6 ± 8.2 ng/mL(10일 배양)로 높게 나타났다. 즉 보중익기탕의 polysaccharide 분획을 첨가하여 골수세포를 배양하였을 때 약 60%의 세포가 CD19와 CD40을 동시에 발현하는 Pre-B세포로 분화하였고 계속해서 이들 세포는 IgM을 분비하는 성숙한 B세포로 분화하는 것을 확인하였다.

면역글로블린 G 생산

성숙한 B세포는 항원과 만나면 처음에는 항원수용체인 IgM을 분비하지만, 항원의 종류와 미세환경의 변화에 의해 IgM과 다른 isotype인 IgG를 분비한다(38). 생쥐의 IgG는 G1, G2a, G2b, G3 등 4가지 종류의 subclass가 있는데, 이 과정을 개별형 전환(class switch)이라고 하며 다양한 종류의 사이토카인들이 각각 다른 개별형으로 전환하는 것을 유도한다. 생쥐의 경우에 IL-4는 주로 IgG1과 IgE로 전환되는 것을 유도하고, TGF-β는 IgG2b와 IgA로 전환을 유도한다. 그리고 IFN-γ는 IgG2a와 IgG3로 개별형 전환을 유도하는 것으로 알려져 있다(38). 따라서 보중익기탕 추출물을 첨가해 배양하여 분화된 Pre-B세포가 IgM 이외의 IgG subclass를 분비하는지 확인하였다.

그 결과 대조군에서 IgG1(5일 배양: 66.3 ± 2.2 ng/mL, 10일 배양: 36.8 ± 3.4 ng/mL)과 G2a(5일 배양: 3.5 ± 0.4 ng/mL, 10일 배양: 3.4 ± 0.5 ng/mL)가 소량 측정되었지만, IgG2b와 IgG3는 측정할 수 없었다(Table 6). 그리고 total 분획을 첨가하여 배양한 경우에는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 그러나 polysaccharide 분획을 첨가하여 5일간 배양한 경우에 IgG1이 78.6 ± 6.1 ng/mL, 10일간 배양한 경우에 157.0 ± 5.0 ng/mL으로 유의하게 증가하였다. 그리고 IgG2a는 11.0 ± 0.6 ng/mL, IgG3는 32.0 ± 2.0 ng/mL로 역시 유의하게 증가하였다. 즉 보중익기탕의 polysaccharide 분획에 의해 분화된 Pre-B세포는 IgM을 분비하는 성숙한 세포로 분화한 다음에 IgG1, G2a, G3를 분비하는 것으로 확인되었으며 특히 IgG1을 가장 많이 분비하는 것으로 나타났다. 따라서 개별형 전환에 IL-4와 IFN-γ가 관여한 것으로 생각된다.

요 약

최근에 방사선 조사에 대해 방호효과를 가지는 것으로 알려진 보중익기탕의 골수세포 분화 유도 효과에 대해 관찰하였다. 시험관에서 골수세포를 배양했을 때, 배양시간(5일, 10일)에 따라 대조군의 세포 수는 현저히 감소하였고, 보중익기탕의 total 분획을 첨가하였을 때도 비슷한 결과를 얻었다. 그러나 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때는 감소하는 세포수가 일정한 수준에서 유지되며 더 이상 감소하지 않았다. 그리고 이들 세포가 어떤 종류의 세포인지를 유세포분석기로 분석한 결과, Pre-B세포의 특징적인 세포 표면 단백질인 CD19와 CD40을 동시에 발현한 세포인 것이 확인되었다. 또한, 이들 세포는 분화과정이 끝난 B세포가 분비하는 IgM 뿐만 아니라 IgG1, G2a, G3를 분비하였다. 이상의 결과 보중익기탕의 polysaccharide 분획에 골수세포가 B세포로 분화 증식하는 것을 유도하는 성분이 포함되어 있어 방사선 조사로 상해를 입은 조혈계에 대한 방호 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 사업의 일환으

로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Patt H, Tyee M, Straube RL. 1949. Cystein protects against x-irradiation. *Science* 110: 213-214.
- Milas L, Hunter M, Reid BO, Thames Jr HD. 1982. Protective effects of S-2 (3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid against radiation damage of normal tissues and a fibrosarcoma in mice. *Cancer Res* 42: 1888-1987.
- Milas L, Murray D, Brock WA, Meyn RE. 1988. Radioprotectors in tumor radiotherapy: Factors and settings determining therapeutic ratio. *Pharmacol Ther* 39: 179-189.
- Kligerman MM, Shaw MT, Slavid M, Yudas JM. 1980. Phase I clinical studies with WR2721. *Cancer Clin Trials* 3: 217-221.
- Washburn LC, Carlton JE, Hayes RL. 1974. Distribution of WR-2721 in normal and malignant tissue of mice and rats bearing solid tumors: dependence on tumor type, drug dose and species. *Radiat Res* 59: 483-575.
- Cairnie AB. 1983. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat Res* 94: 221-226.
- Yuan Y, Hou S, Lian T, Han Y. 1992. Studies of *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* as a blood tonic. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* 17: 366-368.
- Miyanomae T, Frindel E. 1988. Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation. *Exp Hematol* 16: 801-806.
- Wang Y, Zhu B. 1996. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cell. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 76: 363-366.
- Zneg XL, Li XA, Zhang BY. 1992. Immunological and hematopoietic effect of *Codonopsis pilosula* on cancer patients during radiotherapy. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 12: 607-608.
- Wang HB, Zheng QY, Ju DW, Fang J. 1993. Effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides II on lymphocyte proliferation and colony stimulating factor production from mice splenocytes *in vitro*. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 28: 490-493.
- Hsu HY, Hau DM, Lin CC. 1993. Effects of kuei-pi-tang on cellular immunocompetence of gamma irradiated mice. *Am J Chin Med* 21: 151-158.
- Lu G, Yang M, Shen Y, Meng J. 1991. The absorption of Fe, Zn, Cu in siwu, sijunzi, and Liuwei dihuang decoction by small intestine in rats. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* 16: 297-298.
- Kim SH, Cho CK, Yoo SY, Koh KH, Yun HG, Kim TH. 1993. *In vivo* radioprotective activity of *Panax ginseng* and diethyldithiocarbamate. *IN VIVO* 7: 467-470.
- Mei QB, Tao TY, Cui B. 1991. Advances in the pharmacological studies of *radix Angelica sinensis* (Oliv) Diels (Chinese Danggui). *Chin Med J Engl* 104: 776-781.
- Ohta S, Sakurai N, Sato Y, Inoue T, Shinoda M. 1990. Studies on chemical protectors against radiation. XXX. Radioprotective substances of *cnidii rhizoma*. *Yakugaku Zassh* 110: 746-754.
- Hsu HY, Lian SL, Lin CC. 1990. Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am J Chin Med* 18: 61-69.
- Li NQ. 1992. Clinical and experimental study on shen-qi injection with chemotherapy in the treatment of malignant tumor of digestive tract. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 12: 588-592.
- Lee SE, Oh H, Yang JA, Jo SK, Gyun MW, Yee ST, Kim SH. 1996. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions. Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am J Chin Med* 27: 387-396.
- Hosokawa Y. 1986. Radioprotective effect of Chinese medicinal prescriptoins in mice. *J Med Pharm Soc Wakan-Yaku* 3: 164-169.
- Hsu HY, Ho YH, Lian SL, Lin CC. 1993. Preliminary study on the anti-radiation effect of jen-sheng-yang-yang-tang. *Am J Chin Med* 21: 187-195.
- Hsu HY, Ho YH, Lian SL, Lin CC. 1991. Preliminary study on antiradiation effect of kuei-pi-tang. *Am J Chin Med* 19: 275-284.
- 可得道. 1978. 中國醫學史略. 山西人民出版社, 山西城. p 92-97, 186.
- 黃甫中. 1992. 名醫指. 人民衛生出版社, 北京. p 88-90.
- 주진형. 1992. 丹溪心法附餘. 대성문화사, 서울. p 189-190.
- 이경화. 1974. 廣濟秘級. 계축문화사, 서울. p 47.
- Ito H, Shimura K. 1985. Studies on the antitumor activity of traditional Chinese medicine. *Gan To Kagaku Ryoho* 12: 2145-2148.
- Li XY, Takimoto H, Miura S, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Nomoto K. 1992. Effect of the tradiational Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to) on the protection against *Listeria monocytogens* infection in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 14: 383-402.
- Koshikawa N, Imal T, Takahashi I, Yamauchi M, Sawada S, Kansaku A. 1998. Effect of Hochu-ekki-to, Yoku-kansan and Saiko-ka-ryukotsuborei-to on behavioral despair and acetic acid-induced writhing in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20: 47-51.
- Ikeda S, Kaneko M, Kumazawa Y, Nishimura C. 1990. Protective activities of a Chinese medicine, Hochu-ekki-to, to impairment of hematopoietic organs and to microbial infection. *Yakugaku Zasshi* 110: 682-687.
- Ishikawa H, Manabe F, Zhongtao H, Yoshii S, Koiso K. 1992. The hormonal response to HCG stimulation on patients with male infertility before and after treatment with hochuekkito. *Am J Chin Med* 20: 157-165.
- Murakami Y. 1998. Clinical effect of hotyuekkito (buzhong-yiqitang) on symptoms due to renal ptosis and stress incontinence. *Hinyokika Kyo* 34: 1841-1843.
- Kim SH, Lee SE, Oh H, Kim SR. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang. A prescription of traditional Chinese medicine. *Amer J Chinese Med* 30: 127-137.
- Funk PE, Kincade PW, Witte PL. 1994. Native associations of early hematopoietic stem-cells and stromal cells isolated in bone-marrow cell aggregates. *Blood* 83: 361-369.
- Resenberg N, Kincade PW. 1994. B-lineage differentiation in normal and transformed-cells and the microenvironment that supports it. *Curr Opin Immunol* 6: 203-211.
- Spangrude GJ. 1994. Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Med* 45: 93-104.
- Kee BL, Paige CJ. 1995. Murine B-cell development-commitment and progression from multipotential progenitors mature B-lymphocytes. *Intl Rev Cytol* 157: 129-179.
- Stavnezer J. 1996. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8: 199-205.

(2003년 10월 1일 접수; 2004년 1월 28일 채택)