

보중익기탕(補中益氣湯)의 T세포 증식 유도 효과

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

¹순천대학교 생물학과, ²유용천연자원연구소
³원자력연구소 방사선식품생명공학팀, ⁴전남대 수의학과

Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on Proliferation of T Cells

Su-Yeon Chae¹, Sung-Hae Shin¹, 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

Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extracts is a traditional oriental medicine in a mixture type exhibiting strong anti-bacterial, analgesic, and chemopreventive activities. In this study, we have evaluated effects of the total and polysaccharide fraction of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extracts on the T cell proliferation, cytokine production, and induction of IL-2 receptor and MHC class II. For this experiment, we established CD4⁺ CD8⁻ T cell line producing IL-2 and IFN- γ when stimulated with ovalbumin antigen in the presence of antigen presenting cells. The significant effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on antigen-induced T cell proliferation in the presence of antigen presenting cells was observed. The proliferation and IFN- γ production of T cells was increased in a dose dependent manner, and expression of IL-2 receptor on T cells and MHC class II molecule on antigen presenting cells was also induced in the presence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction. It was demonstrated that polysaccharide fraction of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang stimulates the antigen-induced T cell proliferation and the production of IFN- γ possibly through the increase of IL-2 receptor and MHC class II expression. Therefore Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang can be regarded as a natural and useful immunomodulator having a relatively nonotoxic property. Further studies are needed to better characterize the nature of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang extract.

Key words: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang, polysaccharide fraction, IL-2 receptor, IFN- γ , MHC class II

서 론

면역반응에서 병원체 감염에 대해 중요한 역할을 하는 보조 T세포는 두 가지 종류로 구분할 수 있다. 일부 박테리아는 항체나 보체의 공격을 피하기 위해 대식세포의 세포 내에서 자라는데, Type 1 보조 T세포(Th1)는 대식세포를 활성화시켜 많은 각종 단백질 분해효소와 항박테리아성 물질들이 들어있는 리소좀이 박테리아가 살고 있는 소포와 융합하도록 유도하여 이러한 감염을 통제한다(1). 그리고 Type 2 보조 T세포(Th2)는 세포 외 병원체를 파괴하는데 필요한 항체를 생산하는 B세포의 증식과 분화를 유도하는 역할을 한다(2). Th1세포와 Th2세포는 형태학적으로는 구분할 수 없으나 각자의 고유 기능을 수행하는데 필요한 사이토카인의 종류로 구분할 수 있다. 즉 항원제시세포에 의해 특정항원으로 자극

을 받아 활성화되면 Th1세포는 IL-2, IFN- γ 등을 생산하고, Th2세포는 IL-4, 5, 6 등을 생산한다(3).

보중익기탕(補中益氣湯)은 A.D. 1232년 李호의 東垣十種醫書에 처음으로 수록된 이래, 비장과 위장을 보하는 처방으로 인용 기록되어 왔으며 한방에서 보기(補氣)를 위하여 식품수준에서 일반적으로 사용되는데 황기, 인삼, 진피, 백출, 감초, 당귀, 시호, 승마 8가지 생약으로 구성되어 있다(4). 보중익기탕은 주로 飮食勞倦傷症의 치료에 이용되었고(5-7), 향암(8), 향균(9), 진통(10), 조혈증강(11), 남성 생식 기능강화(12), 향스트레스(13) 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 보중익기탕은 γ -선을 조사한 생쥐에서 소장암의 생존 및 내재성 비장 집락의 형성을 촉진하였으며 소장암 세포에서 apoptosis에 의한 세포사는 감소시키고 생존율은 증가시키는 것으로 나타났다(14). 또한 저자들은 보중익기탕

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

의 polysaccharide 분획이 골수의 비부착성 전구세포의 증식과 분화를 유도하는 효과가 있으며, 전구세포는 CD19와 CD40을 동시에 발현하는 pre-B세포로 분화 증식하여 IgM, IgG1, IgG2a, IgG3 등의 항체를 분비한다는 것을 보고하였다(15).

본 실험은 적응 면역반응에서 병원체의 세포 내 감염 등을 통제하는 대식세포를 활성화시키는 역할을 하는 Th1세포가 항원자극에 의해 활성화될 때 보중익기탕의 추출물이 Th1세포의 증식과 사이토카인 분비 등에 미치는 효과에 대해 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용된 생쥐(C57BL/6)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 번식, 사육한 특정 병원체 부재(Specific Pathogen Free) 생쥐로 생후 8~12주된 암컷을 사용하였다. 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50%로 조절하였고, 조명은 12시간 간격의 light-and-dark cycle로 유지하였으며, 고형사료와 1차 증류수를 제한 없이 공급하면서 사육하였다.

사용 시약

세포 배양에 필요한 RPMI 1640, antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, FCS(Fetal Calf Serum)은 Hyclon 제품을, 2ME(2-mecaptoethanol), sodium bicarbonate(NaHCO_3), ovalbumin은 Sigma(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 세포 표면 단백질에 대한 특이적 항체인 anti-CD4, CD8, IL-2 receptor, MHC class II(I-A^d) mAb와 사이토카인에 대한 항체 anti-IL-2, IFN- γ mAb는 Pharmingen 제품을 사용하였다.

보중익기탕의 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°C 에서 약 0.25 L로 될 때까지 열수 추출하여 여과한 후, 동결 건조하여 total 분획을 조제하였다. 여기에 에탄올을 약 80%정도 첨가하여 4°C 에서 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.

T세포주 수립

특정 항원에 대해 특이적으로 반응하여 분열 증식하는 T세포주를 다음과 같은 방법으로 수립하였다. 먼저 생쥐를 ovalbumin과 complete Freund's adjuvant를 동량으로 섞어 충분히 유화시킨 다음에 앞발과 뒷발의 footpad에 적당량 주

사하여 면역시킨다. 처음 면역 후 2주 간격으로 ovalbumin과 incomplete Freund's adjuvant를 동량으로 섞어 충분히 유화시킨 것으로 2주 간격으로 두번 더 면역시킨다. 3차 면역 10일 후에 비장을 분리하여 단세포 부유액을 만들고 배양접시에서 항원인 ovalbumin을 첨가하여 항원에 대해 특이적으로 증식 반응하는 세포를 분리하여 T세포주(HS-1)를 수립하였다. 수립된 HS-1 T세포주는 CD4^+ , CD8^- 이며 항원 자극에 대해 IL-2와 IFN- γ 를 분비하는 Type I 보조 T세포인 것으로 확인되었다.

항원제시세포

T세포에 항원을 전달해주는 항원제시세포로서 T세포주를 수립한 동종계열인 C57BL/6 생쥐의 비장세포를 사용하였다. 즉 C57BL/6 생쥐의 비장을 분리하여 단일 세포 부유액으로 만든 다음에 mytomycin C를 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하여 37°C 에서 25분간 처리한 다음에 비장세포 부유액을 washing 용액으로 4°C , 1,200 rpm에서 3번 세척하고 혈구계산반으로 세포수를 계산하여 사용하였다.

세포 증식 측정

세포 증식 측정은 Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell proliferation Assay(Promega, USA)를 사용하였으며, 배양액 100 μL 에 Cell titer 용액을 15 μL 씩 첨가하여 4~8시간 동안 배양한 다음 Microplate reader(OPTImax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 O.D. 값을 측정하였다.

IL-2와 IFN- γ 측정

OVA항원 단독 또는 보중익기탕의 polysaccharides 분획을 첨가하여 24시간 배양한 상층액에 포함된 IL-2와 IFN- γ 양을 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)방법을 이용해 측정하였다. 즉, 일차 항체 anti-IL-2, IFN- γ mAb를 coating buffer(0.1 M NaHCO_3)에 희석하여 plate에 적정량을 넣고 4°C 에서 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-IL-2, IFN- γ mAb를 첨가하였다. 1시간 후에 washing 용액으로 세척한 다음, avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2, 2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H_2O_2)을 넣어 발색시켜서 Microplate reader를 이용해 405 nm에서 O.D. 값을 측정하고 표준곡선을 이용하여 환산하였다. 이때 각 사이토카인의 측정 한계치는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

IL-2 수용체와 MHC class II 발현 측정

T세포주에 항원제시세포로 mitomycin C를 처리한 비장세포와 ovalbumin 단독 또는 보중익기탕의 polysaccharide 분획을 첨가하여 1일 또는 2일간 배양한 후에 T세포주 또는 항원제시세포만을 분리하여 각각 단일클론항체로 염색하여 유세포분석기(Epics XL, COULTER, USA)로 세포 표면의

IL-2 수용체와 MHC class II 발현 정도를 관찰하였다. 즉, 분리한 세포를 washing 용액(PBS, 1% FCS, 0.1% NaN₃)으로 세 번 세척한 다음, 먼저 비특이적 염색을 막기 위해 세포 1×10⁶개를 anti-Fc γ R II/III-specific mAb(2.4G2)로 4°C에서 30분간 blocking한 다음, 바로 FITC-conjugated IL-2 receptor, MHC class II(I-A^d) mAb로 4°C에서 30분간 염색하였다. 염색 후 washing 용액으로 세척하고 유세포분석기로 단백질의 발현양을 분석하였다.

통계처리

실험결과는 평균값±SD로 나타내었고 student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

세포수와 항원농도에 대한 증식반응

보중익기탕 추출물에 의한 T세포의 증식 반응을 측정하기 전에 적절한 T세포수와 항원(ovalbumin) 농도를 결정하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 즉 세포배양 well에 T세포수를 1×10⁴, 3×10⁴, 5×10⁴개로 하고 항원 농도를 10, 30, 100, 300, 1,000 µg/mL로 변화시키며 배양 3일 후에 증식반응을 측정하였다. 이때 T세포에 항원을 전달해주는 항원제시세포(antigen presenting cells)로 C57BL/6 생쥐의 비장세포를 mytomycin C로 처리하여 동일하게 5×10⁶개 첨가하였다. 그 결과 T세포수가 증가할수록 증식반응의 크기는 증가하였고, 항원 농도 100 µg/mL에서 최대 증식반응을 나타내었다(Table 1). 즉 세포수가 1×10⁴개일 때 O.D.값이 0.821±0.005, 3×10⁴개일 때 1.465±0.076, 그리고 5×10⁴개일 때 1.923±

0.012로 측정되었다. 항원 농도가 고농도인 300 µg/mL와 1,000 µg/mL에서는 100 µg/mL에서 나타난 최대 증식반응과 비슷한 증식반응이 나타났으며 농도 증가에 따른 증식반응의 증가는 관찰되지 않았다. 따라서 보중익기탕 추출물을 첨가하였을 경우에 증가 또는 감소하는 증식반응을 관찰하기 위하여 항원농도 10~1,000 µg/mL에서 T세포수를 3×10⁴개로 결정하였다.

보중익기탕 추출물에 대한 T세포 증식반응

T세포의 증식반응은 항원을 제시해주는 항원제시세포의 MHC 분자와 결합한 펩티드(peptide)를 T세포 항원 수용체(T cell receptor)가 인식해야만 일어난다(16). 즉 T세포의 증식 반응을 유도하기 위해서는 항원제시세포에 의해 항원이 분해되어 펩티드로 분해되는 단계, 펩티드가 MHC 분자와 결합하는 단계, MHC 분자에 결합한 펩티드를 T세포 항원 수용체가 인식하는 단계, 활성화된 T세포가 IL-2, IFN-γ와 같은 사이토카인을 분비하는 단계, 활성화된 T세포가 IL-2 수용체를 발현하여 자신이 분비한 IL-2와 결합하는 단계 등이 연속적으로 일어나야 한다(17,18). 따라서 보중익기탕의 추출물이 type 1 보조 T세포가 항원을 인식하여 분열 증식할 때, 증식 반응을 유도하는 효과가 있는지, 유도한다면 어느 단계에 관여하는지를 밝히기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.

먼저 보중익기탕의 total 분획을 첨가하여 T세포 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. Total 분획 1, 10, 100 µg/mL을 첨가하였을 경우에 대조군과 같이 항원 농도가 증가할수록 증식반응도 증가하였고 항원농도 100 또는 300 µg/mL에서 최대 증식반응이 나타났다(Table 2). 그리고 고농도인 1,000 µg/mL에서는 T세포의 증식반응이 최대 증식반응보다 약간

Table 1. Effect of cell numbers and ovalbumin concentrations on the proliferation of Th1 cell line

Cell numbers	OVA concentration, µg/mL					
	0	10	30	100	300	1000
1×10 ⁴	0.463±0.015	0.630±0.006*	0.702±0.089*	0.821±0.005*	0.800±0.023*	0.822±0.030*
3×10 ⁴	0.538±0.021	0.962±0.015*	1.144±0.032*	1.465±0.076*	1.509±0.022*	1.597±0.091*
5×10 ⁴	0.609±0.012	1.147±0.043*	1.448±0.086*	1.923±0.012*	1.827±0.026*	1.863±0.139*

CD4⁺ Th1 cells were stimulated with OVA antigen for 3 days and the proliferations were assayed by Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent. Results are presented as mean±SD of triplicate assays.

*p<0.05; significant difference between untreated control and OVA-treated groups.

Table 2. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang total fraction and OVA concentrations on the proliferation of Th1 cell line

Total (µg/mL)	OVA concentration, µg/mL					
	0	10	30	100	300	1000
0	0.536±0.032	1.398±0.014	1.546±0.040	1.613±0.009	1.685±0.035	1.386±0.057
1	0.517±0.013	1.480±0.029	1.634±0.021	1.679±0.028	1.705±0.029	1.433±0.038
10	0.519±0.010	1.451±0.004	1.644±0.008	1.642±0.083	1.789±0.025	1.464±0.051
100	0.470±0.008	1.429±0.020	1.574±0.012	1.640±0.036	1.629±0.005	1.377±0.002
1000	0.452±0.006*	0.938±0.021*	1.105±0.042*	1.158±0.093*	1.167±0.064*	0.968±0.028*

CD4⁺ Th1 cells were stimulated with OVA antigen for 3 days in the presence or absence of total fraction and proliferations were assayed by Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent. Results are presented as mean±SD of triplicate assays.

*p<0.05; significant difference between untreated control and total fraction-treated groups.

억제되었다. 그러나 total 분획을 첨가하여도 항원 농도에 의해 증가하는 대조군의 T세포 증식반응보다 유의하게 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 그리고 total 분획 1,000 µg/mL를 첨가하였을 때는 항원농도가 증가함에 따라 증식반응이 증가하였으며 100 또는 300 µg/mL에서 최대 증식반응이 나타났고 1,000 µg/mL에서는 T세포의 증식반응이 최대 증식반응보다 약간 억제되었다. 그러나 모든 항원농도에서 증식반응은 오히려 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. 즉 항원과 total 분획을 첨가하지 않은 대조군(0.536±0.032)보다 1,000 µg/mL의 total 분획을 첨가한 경우(0.452±0.006)에도 증식반응이 억제되었다. 따라서 total 분획 1,000 µg/mL를 첨가하였을 때 항원에 대한 T세포의 증식반응이 억제되는 것은 고농도에 의한 세포독성 때문으로 생각된다. 즉 total 분획을 첨가하였을 경우 농도에 관계없이 T세포의 항원에 대한 증식반응을 증가시키지 못하는 것으로 관찰되었고 고농도에서는 세포독성 효과가 있는 것으로 생각된다.

다음에 보충익기탕의 polysaccharide 분획을 첨가하여 T세포 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. Polysaccharide 분획을 농도별로 첨가하여 증식반응의 변화를 관찰하였는데 항원 농도가 증가할수록 증식반응도 증가하였고 항원농도 100 µg/mL에서 최대 증식반응(1.678±0.019)이 나타났다(Table 3). 그리고 고농도인 1,000 µg/mL에서 T세포 증식반응이 최대 증식반응보다 약간 억제되었다(1.455±0.006). 고농도의 항원 존재하에서 T세포의 증식반응이 억제되는 것은 증식반응이 과도하게 일어나 배양액에 포함된 영양분의 고갈로 인한 것으로 생각된다. 또한 항원 농도에 의해 증가하는 대조군의 T세포 증식반응보다 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때 유의하게 증가하는 것으로 나타났으며 100 µg/mL를 첨가하였을 때 가장 높은 증식반응이 나타났다. 즉 polysac-

charide 분획은 항원에 대해 특이적으로 증식하는 T세포의 증식반응을 증가시키는 효과가 있는 것으로 생각된다. 따라서 다음 실험부터 최대 증식반응을 유도하는 polysaccharide 분획 100 µg/mL를 사용하였다. 그러나 가장 높은 1,000 µg/mL를 첨가하였을 때는 대조군과 비슷한 정도의 증식반응을 유도하였다. 즉 total 분획 1,000 µg/mL를 첨가하였을 때 대조군보다 오히려 낮은 증식반응이 나타난 것과는 차이가 있었다. 이런 결과는 total 분획보다 polysaccharide 분획의 세포독성이 적기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 다음 실험부터는 증식반응을 지지하는 polysaccharide 분획을 사용하였다

T세포의 IL-2와 IFN-γ 생산 유도효과

본 실험에 사용한 HS-1 세포주는 type 1 보조 T세포이기 때문에 T세포 증식반응을 유도하는 polysaccharide 분획이 IL-2와 IFN-γ 분비량에 미치는 효과를 관찰하였다. 항원 자극에 대해 T세포는 IL-2를 생산하여 분비한다. 분비한 IL-2는 T세포가 가진 IL-2 수용체와 결합하여 T세포의 증식반응을 유도한다. 즉 T세포는 자신이 생산 분비하는 IL-2를 자신의 IL-2 수용체와 결합하여 사용하는 방식으로 증식한다(18). 따라서 T세포 증식반응을 증가시키는 polysaccharide 분획이 항원 자극에 대해 생산하는 IL-2의 분비를 증가시켜 T세포의 증식반응을 증가시키는 가능성에 대해 검토하였다. 먼저 T세포는 항원 농도가 증가함에 따라 IL-2 분비량이 증가하였다(Table 4). 즉 항원 자극이 없는 대조군(150.3±0.0 pg/mL)에 비해 최대 항원농도인 1,000 µg/mL인 경우(8,478.0±47.8 pg/mL)에 약 56배까지 증가하였다. 그리고 polysaccharide 분획을 첨가하였을 경우에도 항원농도 증가에 대한 IL-2 분비량의 증가는 비슷하게 증가하였다. 그러나 동일한 항원농도에서 polysaccharide 분획을 첨가하여도 IL-2 분비

Table 3. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction and OVA concentrations on the proliferation of Th1 cell line

Poly (µg/mL)	OVA concentration, µg/mL					
	0	10	30	100	300	1000
0	0.533±0.110	1.320±0.030	1.459±0.037	1.582±0.025	1.479±0.126	1.266±0.009
1	0.420±0.023	1.389±0.008	1.470±0.032	1.627±0.068*	1.609±0.009*	1.340±0.005*
10	0.396±0.010	1.290±0.018	1.503±0.049	1.634±0.017*	1.635±0.009*	1.389±0.045*
100	0.375±0.004	1.237±0.025	1.489±0.008	1.678±0.019*	1.619±0.004*	1.455±0.006*
1000	0.444±0.014	1.084±0.011	1.292±0.012	1.466±0.138	1.453±0.021	1.213±0.064

CD4⁺ Th1 cells were stimulated with OVA antigen for 3 days in the presence or absence of polysaccharide fraction and proliferations were assayed by Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent. Results are presented as mean±SD of triplicate assays.

*p<0.05; significant difference between untreated control and polysaccharide fraction-treated groups.

Table 4. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction and OVA concentrations on IL-2 production of Th1 cell line

Condition (µg/mL)	OVA concentration, pg/mL					
	0	10	30	100	300	1000
Control	150.3±0.0	1512.4±2.7	2134.5±10.6	3388.5±31.9	4890.4±262.5	8478.0±47.8
Poly (100)	52.1±0.9*	688.9±2.7*	1116.4±13.3*	2100.08±53.0*	3945.4±23.9*	6847.9±71.6*

Th1 cells (3×10⁴ cells/well) were stimulated with OVA antigen in the presence or absence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction. After cultivation for 24 hours the culture supernatant were assayed for IL-2 by ELISA.

*p<0.05; significant difference between untreated control and polysaccharide fraction-treated groups.

량은 대조군에 비해 증가하지 않았다. 즉 최대 항원농도 1,000 µg/mL에서 IL-2 분비량이 대조군(8478.0±47.8 pg/mL)에 비해 polysaccharide 분획 100 µg/mL을 첨가한 실험군(6847.9±71.6 pg/mL)은 증가한 것이 아니라 오히려 적은 것으로 나타났다. 따라서 polysaccharide 분획이 T세포의 증식반응을 증가시키는 것은 항원자극에 대해 T세포가 분비하는 IL-2의 분비량을 증가시키기 때문이 아니라는 것으로 나타났다. 또 다른 T세포가 생산하는 사이토카인인 IFN-γ 분비량은 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때 대조군에 비해 항원농도에 따라 약간 증가하는 것으로 나타났다(Table 5). 그러나 IFN-γ는 T세포 증식과 직접적인 상관관계는 없기 때문에 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때 나타나는 증식반응의 증가를 설명할 수는 없는 것으로 생각된다.

T세포의 IL-2 수용체 유도효과

항원자극으로 분비되는 IL-2는 T세포 표면에 발현되어 있는 IL-2 수용체와 결합하여 T세포의 증식반응을 유도한다(19). 즉 항원자극에 의해 분비되는 IL-2의 양이 동일하여도 IL-2 수용체의 발현양이 증가하면 IL-2와 결합하는 IL-2 수용체의 양이 증가하고 T세포의 증식반응도 증가한다. 따라서 T세포 증식반응을 증가시키는 polysaccharide 분획이 T세포 표면의 IL-2 수용체의 발현양을 증가시켜서 T세포의

증식반응을 증가시킬 가능성에 대해 검토하였다. 즉 T세포 배양접시에 항원(100 µg/mL)과 항원제시세포(5×10⁶ cells)를 첨가하여 반응시킨 대조군과 동일한 조건에 polysaccharide 분획(100 µg/mL)을 첨가한 실험군을 48시간 배양한 다음 NycoPrep™ 1.077A(NYCOMEM PHARMA AS, Oslo, Norway)를 이용하여 T세포만을 분리하였다. 분리한 T세포에 IL-2 수용체에 대해 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 첨가하여 유세포분석기로 IL-2 수용체 단백질의 발현양을 비교 분석하였다. 그 결과 항원 단독으로 자극한 대조군(84.8%)보다 polysaccharide 분획을 첨가한 실험군(91.2%)에서 IL-2 수용체의 발현양이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 즉 보중익기탕의 polysaccharide 분획은 항원 자극에 대해 증식하는 T세포의 IL-2 수용체의 발현을 증가시켜 T세포가 분비한 IL-2와 결합하여 증식반응이 증가하는 것으로 생각된다.

항원제시세포의 MHC class II 유도효과

T세포의 증식반응은 항원제시세포가 분해한 항원 펩티드와 MHC class II분자와 결합한 복합체가 T세포 항원수용체를 자극하였을 때 일어난다(20-22). 이때 항원제시세포 표면에 발현하는 MHC class II 단백질의 발현양이 증가하여 보다 많은 T세포 항원수용체를 자극하면 증식반응이 증가한

Table 5. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction and OVA concentrations on IFN-γ production of Th1 cell line

Condition (µg/mL)	OVA concentration, ng/mL					
	0	10	30	100	300	1000
Control	0.5±0.0	16.4±0.8	19.1±0.7	26.7±0.4	33.3±0.6	49.6±0.4
Poly (100)	1.2±0.0	18.2±0.2	21.9±0.7	37.3±2.9*	39.8±1.3*	61.0±0.4*

Th1 cells (3×10⁴ cells/culture) were stimulated with OVA antigen in the presence or absence of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction. After cultivation for 24 hours the culture supernatant were assayed for IFN-γ by ELISA. *p<0.05; significant difference between untreated control and polysaccharide fraction-treated groups.

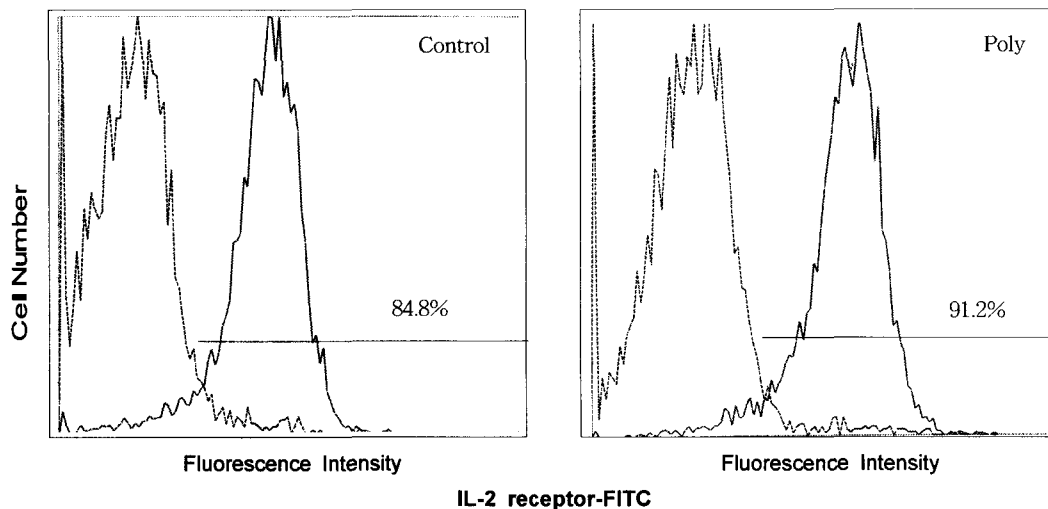


Fig. 1. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction on the expression of IL-2 receptor. CD4⁺ Th1 cells were incubated with OVA antigen in the presence or absence of polysaccharide fraction for 2 days. Th1 cells were then stained with FITC-conjugated anti-mouse IL-2 Receptor mAb (solid lines). Dotted lines indicate the unstained controls. Representative result of the three experiments is shown.

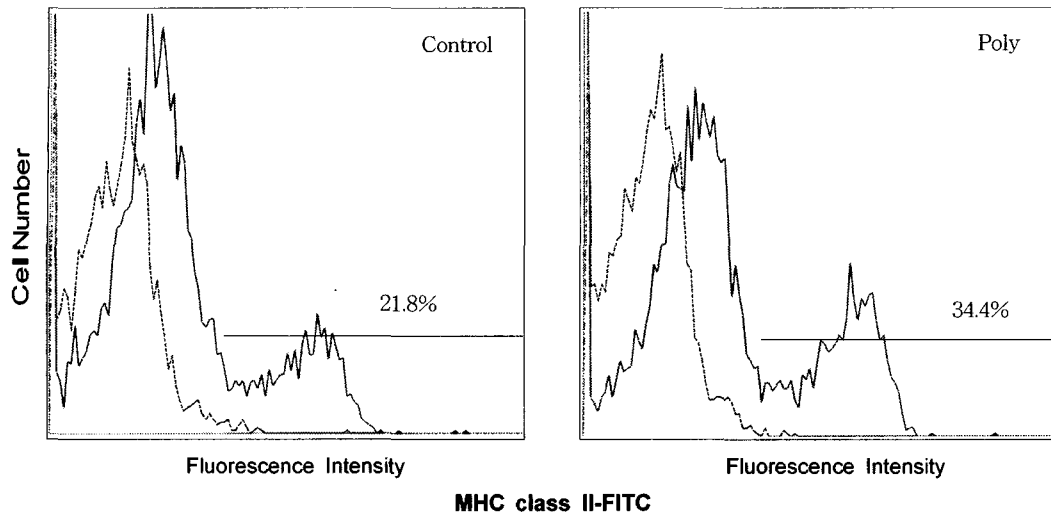


Fig. 2. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang polysaccharide fraction on the expression of MHC class II. FITC-conjugated anti-mouse I-A^d (solid lines). Dotted lines indicate the unstained controls. Representative result of the three experiments is shown.

다. 따라서 polysaccharide 분획이 T세포가 아닌 항원제시세포의 MHC class II 단백질의 발현양을 증가시켜서 T세포의 증식반응을 증가시키는 가능성을 검토하였다. 즉 세포 배양접시에 mitomycin C로 처리한 항원제시세포(5×10^6 개)를 배양한 대조군과 동일한 조건에 polysaccharide 분획(100 μ g/mL)을 첨가한 실험군을 24시간 배양한 다음 항원제시세포를 회수하였다. 분리한 항원제시세포에 MHC class II 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 첨가하여 유세포 분석기로 MHC class II 단백질의 발현양을 비교 분석하였다. 그 결과 대조군(21.8%)보다 polysaccharide 분획을 첨가한 실험군(34.4%)에서 MHC class II 단백질의 발현양이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 즉 보중익기탕의 polysaccharide 분획은 항원을 받아들여 펩티드로 분해하는 항원제시세포의 MHC class II 단백질의 발현을 증가시켜 보다 많은 T세포의 항원수용체와 결합하여 증식반응을 증가시키는 것으로 생각된다.

요 약

먼저 OVA항원에 대해 특이적으로 증식반응을 나타내는 T세포주를 수립하였고, 수립된 세포주는 세포 표면 단백질이 CD4⁺ CD8⁻이며 IL-2와 IFN- γ 를 분비하는 Type I에 속하는 보조 T세포(Th1)인 것을 확인하였다. 보중익기탕의 total 분획은 OVA항원에 대해 특이적으로 반응하는 Th1세포의 증식반응을 증가시키는 효과를 나타내지 않았으며 고농도에서 오히려 증식반응을 억제하였다. 그러나, 보중익기탕의 polysaccharide 분획은 전반적인 농도에서 T세포의 증식반응을 유의하게 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 보중익기탕의 polysaccharide 분획을 첨가하였을 때 T세포의 IL-2 분비량은 대조군보다 약간 적었지만, IFN- γ 분비량

은 대조군보다 증가하였다. 그리고, 분비된 IL-2와 결합하는 T세포의 IL-2 수용체 발현양도 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 항원제시세포의 MHC class II의 발현양도 증가시켰다. 이상의 결과로 보중익기탕의 polysaccharide 분획은 T세포의 IL-2 수용체 발현양을 증가시키고, 항원제시세포의 MHC class II의 발현양을 증가시켜서 T세포의 증식반응을 증가시키는 것으로 생각된다. 그리고 보중익기탕이 생체 면역반응에 미치는 보다 정확한 효과를 평가하기 위해서는 직접 살아있는 실험동물에 투여하는 *in vivo* 실험이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발 사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Stout R, Bottomly K. 1989. Antigen-specific activation of effector macrophages by interferon- γ producing (T_H1) T-cell clones: failure of IL-4 producing (T_H2) T-cell clones to activate effector functions in macrophages. *J Immunol* 142: 760-765.
2. Hunter CA, Reiner SL. 2000. Cytokines and T cells in host defense. *Curr Opin Immunol* 12: 413-418.
3. Romagnani S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5: 285-294.
4. 可得道. 1978. 中國醫學史略. 山西人民出版社, 山西城. p 92-97, p 186.
5. 黃甫中. 1992. 名醫指. 人民衛生出版社, 北京. p 88-90.
6. 朱辰亨. 1992. 丹溪心法附餘. 大星文化社, 서울. p 189-190.
7. 李京華. 1974. 廣濟秘級. 癸丑文化社, 서울. p 47.
8. Ito H, Shimura K. 1985. Studies on the antitumor activity of traditional Chinese medicine. *Gan To Kagaku Ryoho* 12: 2145-2148.
9. Li XY, Takimoto H, Miura S, Yoshikai Y, Matsuzaki G,

- Nomoto K. 1992. Effect of the traditional 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Murakami Y. 1998. Clinical effect of hotyuekkito (buzhong-yiqitang) on symptoms due to renal ptosis and stress incontinence. *Hinyokika Kyo* 34: 1841-1843.
 14. Kim SH, Lee SE, Oh H, Kim SR. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang. A prescription of traditional Chinese medicine. *Am J Chinese Med* 30: 127-137.
 15. Shin SH, Chae SY, Ha MH, Jo SK, Kim SH, Byun MW, Yee ST. 2004. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on B cell development. *J Korean Soc Nutr* 33: 271-277.
 16. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T-lymphocyte clones. *J Exp Med* 163: 903-921.
 17. Jain J, Loh C, Rao A. 1995. Transcription regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7: 333-342.
 18. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11: 245-267.
 19. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D. 1995. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol* 146: 164-168.
 20. Chapman HA. 1998. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol* 10: 93-102.
 21. Nakagawa TY, Rudensky AY. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172: 121-129.
 22. Pieters J. 2000. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol* 75: 159-208.

(2004년 4월 12일 접수; 2004년 6월 29일 채택)