

# 加味清鼻飲이 면역반응에 미치는 영향

은재순\* · 이동희 · 전용근 · 권영안<sup>1</sup> · 권진<sup>2</sup>

우석대학교 약학대학, 1:우석대학교 자연과학대학, 2:군장대학 의무행정과

## Effect of *Kamichungbieum* on Immune Reaction

Jae Soon Eun\*, Dong Hee Lee, Yong Keun Jeon, Young An Kwon<sup>1</sup>, Jin Kwon<sup>2</sup>

College of Pharmacy, 1:College of Science and Engeeniring, Woosuk University, 2:Department of Medical Administration

The purpose of this research was to investigate the effects of supercritical fluid extract of *Kamichungbieum* (SFE) on immune reaction. SFE did not affect the subpopulation of murine splenocytes and increased the production of interleukin-2 in serum. Also, SFE inhibited the influx of Ca<sup>2+</sup> into mast cells and the release of histamine from mast cells. Furthermore, SFE decreased the phagocytic activity of murine macrophages. These results indicate that SFE may be useful for the treatment of allergy related disease via inhibition of histamine release from mast cells and decrease of phagocytic activity of murine macrophages.

Key words : Kamichungbieum(加味清鼻飲), supercritical fluid extract, cytokine, phagocytosis, mast cell, histamine, Ca<sup>2+</sup>

### 서론

면역이란 생체가 자기 성분 이외의 이물질, 즉 각종 병원성 미생물, 이종단백질, 다당류, 지질, 수혈이나 동종 조직이식 등이 생체의 항상성을 깨뜨리거나 자기를 위협하는 물질을 배제하기 위해 일어나는 일련의 생체방어반응을 의미한다. 이러한 면역계는 항체의 합성 및 분비에 의한 체액성면역 (humoral immunity) 과 T-lymphocyte에 의해 주도되는 세포성면역 (cell-mediated immunity)으로 분류하며, 또한 T- 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역 (specific immunity)과 macrophage가 관련된 비특이적 면역 (non-specific immunity)으로도 분류한다<sup>1)</sup>.

알러지성 비염은 코 속으로 흡입된 화분, 진드기, 털 등 이물질에 의해 일어나는 일련의 면역반응이라 할 수 있으며, 본 저자들은 가미청비음 초임계유체 추출물이 histamine 수용체를 차단하여 즉시형 및 지연형 알러지에 효과가 있는 처방임을 이미 보고한바 있다<sup>2)</sup>.

초임계유체 추출 (supercritical fluid extraction)은 새로운 분리기술의 하나로써 임계점 이상의 온도와 압력을 가지는 초임계유체를 용매로 사용하여 원하는 물질을 추출하는 기술이다. 초임계유체는 밀도가 충분히 높아서 액체에 가깝고, 낮은 점도와 높은 확산도는 기체에 가까운 성질을 보여줌으로써 한약재와 같은

복잡한 구조에서 원하는 물질의 추출에 매우 적합한 기술이라 할 수 있다. 또한, 초임계유체 추출은 상대적으로 낮은 온도 (이산화탄소의 임계온도는 30.7 °C)에서 공정이 이루어지므로 열에 의해 파괴될 수 있는 성분을 함유하고 있는 한약재를 추출하고자 할 때 유리한 추출법이라 할 수 있다<sup>3,4)</sup>.

한방에서는 알러지성 비염을 치료하는데 항원에 반응하는 숙주의 상태를 변화시키는 방법으로 접근하고 있다. 즉, 숙주의 면역계를 변화시켜 비염을 치료하고자 하는 것이다. 따라서 본 실험에서는 알러지성 비염에 효과가 있는 가미청비음이 면역계에 미치는 영향을 관찰함으로써 가미청비음의 작용기전을 규명하여 보고자 실험하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 C57BL/6계 수컷 20 ± 2 g을, 흰 쥐는 SD계 수컷 250 ± 20 g을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1569  
· 접수 : 2004/06/24 · 수정 : 2004/07/31 · 채택 : 2004/09/24

buffered saline (DPBS-A), compound 48/80, metrizamide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse  $\gamma$ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 가미청비음의 구성은 Table 1과 같으며 사용한 약재들은 하나한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 가미청비음 4접 분량을 초인계유체 추출한 다음 동결건조하여 1.2g을 얻어 실험에 사용하였다 (이하 supercritical fluid extract (SFE)라 칭함).

Table 1. Prescription of *Kamichungbium*

韓名	生藥名	重量 (g)
魚腥草	Houttuyniae herba	20
桑 葉	Morus folium	12
苧 苧 子	Vitis fructus	12
山 梔 子	Vagnoliae flos	8
荷 貝 子	Xanthi fructus	8
薄 荷	Verbae herba	6
黃 芩	Scutellariae radix	6
Total		72

4. Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 측정

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki<sup>5)</sup> 및 Mizel<sup>6)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5마리당 1군으로 하여 SFE를 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포 부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다. 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>7)</sup>.

5. Cytokines 측정

Serum 중 cytokines의 측정은 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SFE를 1일 1회씩 7 일간 경구투여한 다음 8 일째 생쥐로부터 serum을 분리하여, serum 50  $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines의 양을 측정하였다. 즉 serum 50  $\mu$ l에 assay diluent 50  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100  $\mu$ l를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100  $\mu$ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

6. Ca<sup>2+</sup> uptake 측정

Kanemoto 등의 방법<sup>8)</sup>에 준하여 흰쥐 복강 mast cells을 분리하였다. 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 실온에서 PMC buffer (PBS 100 ml + FBS 10 ml + Heparin 10,000 unit 1 ml + 3차 증류수 = 1,000 ml, pH 7.0) 30 ml를 복강에 주입하고 90 초간 복벽을 가볍게 마사지한 다음 복강액을 채취하여 원심분리 (1,500 rpm, 5 분) 하였다. 15 ml tube에 22.5% metrizamide (4 °C) 2 ml를 넣고 Yurt 등의 방법<sup>9)</sup>에 따라 그 위에 DME 배지로 희석한 세포부유액을 서서히 가하고 1,300 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 세포를 DME 배지로 세척한 후 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 조제하여 실험에 사용하였다. Ca<sup>2+</sup>양의 측정은 Kawabe 등의 방법<sup>10)</sup>을 수정하여 측정하였다. 비만세포를 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 세포 수를 조절한 후 다시 원심하여 상층액을 버리고 1  $\mu$ Ci <sup>45</sup>Ca/ml를 포함하는 HEPES-Tyrode 완충용액에 재부유시켰다. 정상 비만세포에서의 칼슘유입을 측정하기 위하여 비만세포 부유액에 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25  $\mu$ l를, compound 48/80에 의한 비만세포내로의 칼슘유입을 알아보기 위하여는 비만세포 부유액 200  $\mu$ l에 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25  $\mu$ l를 첨가한 10분 후 compound 48/80 용액 (1  $\mu$ g/ml) 25  $\mu$ l를 첨가하였다. SFE가 비만세포의 칼슘유입에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이들의 수용액 25  $\mu$ l와 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 25  $\mu$ l를 비만세포 부유액에 첨가하였다. 또한 compound 48/80에 의한 칼슘유입에 대한 SFE의 작용을 보기 위하여, 비만세포 부유액에 SFE 10 mg/ml의 농도를 25  $\mu$ l씩 10분간 전처리한 다음 compound 48/80 용액 (1  $\mu$ g/ml) 25  $\mu$ l를 첨가하였다. 반응 후 100×g로 10분간 원심 후 상층액을 버리고 칼슘이 없는 HEPES-Tyrode 완충용액 3ml로 세척한 다음, 1 mM 염화란탄륨 (LaCl<sub>3</sub>) 3 ml로 3번 세척한 다음 세포에 10% TritonX100을 800  $\mu$ l 넣어 비만세포를 파괴시킨 후 3 ml cocktail 용액으로 scintillation 시킨 다음  $\beta$ -counter (Liquid scintillation Analyzer, A canberra company, Australia)를 사용하여 CPM (count per minute) 값을 측정 후 칼슘 표준곡선에 준하여 칼슘 양을 산출하였다.

칼슘유입 억제율(%) = 1 - (SFE 전처리 후 compound 48/80에 의한 비만세포내로 칼슘유입량 / compound 48/80에 의한

비관세포내로 칼슘유입량] × 100

7. Histamine양 측정

분리한 mast cell을 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 조제하여 eppendorf tube에 1 ml씩 넣고, CO<sub>2</sub>-incubator에서 10분간 배양한 후 PMC buffer로 희석한 SFE를 최종농도가 0.05, 0.25, 0.5, 2.5 및 5 mg/ml로 되도록 각각 첨가하였다. 첨가 후 37 °C에서 10분간 배양한 다음 compound 48/80 5 µg/ml를 가하여 10분간 배양하였다. 배양액을 1,500 rpm으로 10분간 (4 °C) 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 세포배양액 중의 histamine의 정량은 Harvima 등의 방법을 수정하여 측정하였다<sup>11)</sup>. 원심후 상층액 10 µl와 S-adenosyl (methyl-<sup>14</sup>C) methionine (2 µci/ml) 1.5 µl, 300 mM Tris-glycine buffer (pH 8.3) 40 µl, histamine N-methyl transferase 5 µl를 첨가하여 37 °C 항온조에서 90분간 반응시킨 후 3N-perchloric acid 20 µl를 가하여 반응을 중지시켰다. Perchloric acid를 중화시키기 위해 10N-NaOH 20 µl를 가하고, toluene-isoamyl alcohol 1 ml로 추출한 후 상층액 700 µl를 얻어 cocktail 용액으로 scintillation 시킨 다음, β-counter를 사용하여 CPM (counter per minute) 값을 측정한 후 histamine 표준곡선에 의해 양을 측정하였다. Histamine양은 histamine 총량에 대한 백분율로 표시하였으며, 총 histamine양은 mast cell수가 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml인 250 µl를 100 °C로 10분간 가열한 다음 원심하여 얻은 상층액으로부터 측정된 histamine양을 100으로 정하였다.

$$\text{Histamine유리율}(\%) = \frac{\text{실험군 histamine유리량}}{\text{총 histamine유리량}} \times 100$$

8. 복강 macrophages의 phagocytic activity 측정

복강 macrophage의 분리는 SFE 100 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 배지는 RPMI 1640를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 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. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다<sup>12,13)</sup>. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 µl와 lucigenin 용액 50 µl 및 zymosan 용액 30 µl를 첨가하여 최종 volume이 200 µl가 되도록한 후 넣고 37 °C에서 15분간 전처리한 후 5분 간격으로 30분 동안

lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. SFE가 splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220 positive 세포 (B220<sup>+</sup>)는 32.7 ± 1.1% 이었으며, Thy1 positive 세포(Thy1<sup>+</sup>) 세포는 20.0 ± 1.5% 이었다. SFE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는 32.0 ± 1.3%로 Thy1<sup>+</sup> 세포는 18.0 ± 1.6%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 18.7 ± 1.4%, CD8<sup>+</sup> 세포는 10.3 ± 1.2% 이었으나, SFE를 투여하고 분리한 생쥐 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는 20.7 ± 1.8%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 10.6 ± 0.8%로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 2).

Table 2. Effect of SFE on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	B220	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	32.7 ± 1.1	20.0 ± 1.5	18.7 ± 1.4	10.3 ± 1.2
SFE	32.0 ± 1.3	18.0 ± 1.6	20.7 ± 1.8	10.6 ± 0.8

SFE (100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice.

2. SFE가 serum 중 cytokines 분비에 미치는 효과

대조군의 serum 중 γ-interferon 및 interleukin-2의 양은 각각 39.5 ± 3.4 및 52.8 ± 3.9 pg/ml 이었으나, SFE를 투여한 군은 45.4 ± 3.8 및 72.1 ± 4.7 pg/ml로 대조군에 비해 interleukin-2의 양이 증가하였다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 48.4 ± 2.7 pg/ml 이었으며, SFE를 투여한 군은 52.8 ± 3.1 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 3).

Table 3. Effect of SFE on the production of cytokines in serum

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ-Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	39.5 ± 3.4	52.8 ± 3.9	48.4 ± 2.7
SIT	45.4 ± 3.8	72.1 ± 4.7	52.8 ± 3.1

SFE (100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the production of cytokines was determined in separated serum with ELISA kit. The data represents the mean ± SE of 5 mice. , Significantly different from control group (p<0.05).

3. SFE가 mast cell내로 Ca<sup>2+</sup> uptake에 미치는 효과

Normal군에서 mast cell에 유입되는 Ca<sup>2+</sup>양은 2 × 10<sup>5</sup> cells 당 1.1 ± 0.3 pmole 이었으나, compound 48/80을 처리한 control군은 63.5 ± 3.8 pmole로 normal군에 비해 현저히 증가하였다. SFE를 처리하고 compound 48/80을 처리한 군은 41.3 ±

3.5 pmole로, disodium cromoglycate (DSCG)를 처리한군은 31.4 ± 4.2 pmole로 control군에 비해 감소하였으며, SFE와 DSCG를 병용처리한 군은 15.7 ± 4.5 pmole로 DSCG만 처리한 군에 비해 감소하였다 (Table 4).

Table 4. The combined effect of SFE and disodium cromoglycate on Ca<sup>2+</sup> uptake induced by compound 48/80 from rat peritoneal mast cells *in vitro*.

Samples	Compound 48/80	Ca <sup>2+</sup> uptake (pmole/2 × 10 <sup>5</sup> cells)
Normal	-	1.1 ± 0.3
Control	+	63.5 ± 3.8
SFE	+	41.3 ± 3.5*
DSCG	+	31.4 ± 4.2**
SFE + DSCG	+	15.7 ± 4.5#

SFE (10 mg/ml) and disodium cromoglycate (DSCG, 10 mg/ml) were added into the rat peritoneal mast cells 10 min. before compound 48/80 (1.0 μg/ml) treated. The data represents the mean±SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group (p<0.01). \*\*: p<0.001. #: Significantly different from DSCG treated group (p<0.001).

#### 4. SFE가 Compound 48/80에 의한 복강 mast cell로부터 histamine 유리에 미치는 효과

Mast cell로부터 histamine 방출에 미치는 SFE와 DSCG의 병용효과를 측정된 결과, histamine 방출물이 compound 48/80을 처리하지 않은 normal군은 1.5 ± 0.2% 이었으나, compound 48/80을 처리한 control군은 86.8 ± 4.5%로 normal군에 비해 현저히 증가하였다. SFE를 처리하고 compound 48/80을 처리한 군은 41.5 ± 2.8%로, disodium cromoglycate (DSCG)를 처리한 군은 7.8 ± 1.2%로 control군에 비해 감소하였으며, SFE와 DSCG를 병용처리한 군은 1.7 ± 0.5%로 DSCG만 처리한 군에 비해 감소하였다 (Table 5).

Table 5. The combined effect of SFE and disodium cromoglycate on histamine release induced by compound 48/80 from rat peritoneal mast cells *in vitro*.

Samples	Compound 48/80	Histamine release (%)
Normal	-	1.5 ± 0.2
Control	+	86.8 ± 4.5
SFE	+	41.5 ± 2.8*
DSCG	+	7.8 ± 1.2**
SFE + DSCG	+	1.7 ± 0.5#

SFE (10 mg/ml) and disodium cromoglycate (DSCG, 10 mg/ml) were added into the rat peritoneal mast cells 10 min. before compound 48/80 (1.0 μg/ml) treated. The data represents the mean±SE. \*: Significantly different from control group (p<0.001).

#### 5. SFE가 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

대조군의 macrophages로부터 생성되는 chemiluminescence (CL)의 양 보다 SFE를 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL 양이 현저히 감소하였다. 이는 SFE가 macrophage의 phagocytic activity를 억제하고 있음을 시사하는 것이다 (Fig. 1).

### 고찰

본 연구에서는 알러지성 비염을 치료하는데 사용하고 있는

가미청비음 초임계유체 추출물의 작용기전을 규명하고자 각종 면역반응에 대한 실험을 실시하였다. 초임계유체 추출법은 이산화탄소를 용매로 하여 임계점 이상의 온도와 압력에서 추출을 행하는 기술로서, 압력이 높아질수록 추출수율이 증가하며, 온도에 불안정한 물질이 함유되었을 때 사용할 수 있는 추출 방법이라 할 수 있다.

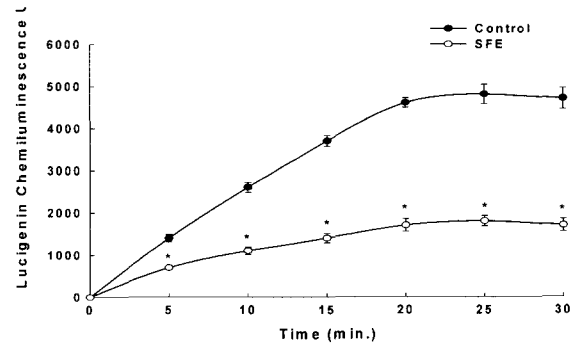


Fig. 1. Effect of SFE on phagocytic activity in murine peritoneal macrophages. SFE (100 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean ± SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (p<0.001).

저자들은 전보<sup>2)</sup>에서 SFE가 즉시형 및 지연형 알레르기 모두에 효과가 있음을 보고하였다. 특히, 제 IV 형 allergy 반응은 생체의 면역계와 긴밀한 관계가 있으며, 생체의 면역계는 흉선에서 분화되는 T 임파구와 골수에서 유래하는 B 임파구 및 macrophage 등이 중요한 역할을 담당하고 있다. 흉선세포는 thymus의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (CD4<sup>+</sup>) 및 cytotoxic T lymphocyte (CD8<sup>+</sup>)로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는 γ-IFN 및 IL-2가, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 T, B 임파구 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 한편 B 임파구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. SFE 투여시 비장세포 중 B220<sup>+</sup> 및 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population과 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포에 대한 population을 측정된 결과, SFE 투여시 비장세포 중 B 및 T 임파구의 population은 대조군과 별 차이가 없었으며, 비장세포 중 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population도 대조군과 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 SFE가 비장세포의 T 및 B 임파구의 population과 splenic helper T cell 및 cytotoxic T cell의 population에 영향을 주지 않음을 의미하는 것이다.

SFE가 혈청 중 γ-IFN, IL-2 및 IL-4의 양에 미치는 영향을 측정하였다. SFE를 투여하고 분리한 혈청 중에 Th1 세포에서 분비되는 γ-IFN 양은 대조군과 별 차이가 없었으나, IL-2의 양은 대조군에 비해 증가하였다. Th2 세포에서 분비되는 IL-4의 양은 대조군과 별 차이가 없었다. SFE 투여시 splenic T 임파구 중 Th1 세포에서 분비되는 IL-2의 양은 증가되고, Th2 세포에서 분비되는

는 IL-4의 양은 대조군과 별 차이가 없다는 것은 SFE가 Th2 세포를 활성화하여 B 세포로부터 항체 생산을 촉진하고 있지 않음을 의미하는 것이다. 전보<sup>2)</sup>에서 실험한 DTH 반응은 Th1 세포가 동일한 항원으로 재차 자극되어  $\gamma$ -IFN을 생성하여 macrophage를 활성화함으로써 나타나는 염증성 조직상해이다. 본 실험결과 SFE 투여시 IL-2의 양이 증가하였다는 것은 SFE가 DTH 반응시 비장세포의 Th1 세포로부터 IL-2의 생성을 촉진하여 제 VI 형 allergy 반응을 조절하고 있음을 시사하는 것이다.

PCA반응은 즉시형 과민반응에 세포친화성 항체가 관여하고 있는 것을 관찰하는 실험으로 1차 항원 (anti-DNP-IgE)을 마우스 피하에 주사한 후, 2차 항원 (DNP-HSA)을 evans blue와 함께 혼합하여 정맥주사 하면 mast cell의 고친화성 IgE 수용체 (Fc $\epsilon$ RI)를 경유하여 mast cell의 활성화가 일어난다. Mast cell이 활성화되면 세포질 내의 Ca<sup>2+</sup> 농도가 상승하여 탈과립이 일어나 histamine 등의 mediator가 유리되어 모세혈관 투과성이 증가하여 evans blue에 의한 청색반점으로 나타난다<sup>11)</sup>. 전보<sup>2)</sup>에서 SFE를 투여하였을 때 PCA 반응을 억제하였다. 이 결과는 SFE가 mast cell의 활성화를 억제하고 있음을 의미하는 것이다.

Mast cell의 활성 억제작용에 대한 기전을 규명하고자 mast cell로 유입되는 Ca<sup>2+</sup>양을 측정하였다. Compound 48/80을 처리하였을 때 (control군) compound 48/80을 처리하지 않은 normal군에 비해 Ca<sup>2+</sup>양이 현저히 증가하였으며, SFE 및 disodium cromoglycate (DSCG)를 투여하고 compound 48/80을 처리하였을 때는 control에 비해 감소하였고, SFE와 DSCG를 병용하여 처리하였을 때는 DSCG만을 처리한 군에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 SFE가 mast cell 내로 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제하여 mast cell을 안정화시키고 있음을 의미하는 것이다.

SFE에 의해 억제된 mast cell 내로 Ca<sup>2+</sup> 유입이 histamine 유리에 미치는 영향을 관찰하였다. Mast cell로부터 유리되는 histamine양은 compound 48/80을 처리하였을 때 (control군) compound 48/80을 처리하지 않은 normal군에 비해 현저히 증가하였으며, SFE 및 disodium cromoglycate (DSCG)를 투여하고 compound 48/80을 처리하였을 때는 control에 비해 감소하였고, SFE와 DSCG를 병용하여 처리하였을 때는 DSCG만을 처리한 군에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 SFE가 mast cell 내로 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제하여 histamine 유리를 억제함으로써 mast cell을 안정화시킴을 강력히 시사하는 것이다.

한편, 제 IV 형 allergy반응은 지연형과민반응 (DTH)으로서 특히 DTH 반응은 감작된 T 림파구와 macrophage에 의해 매개되는 세포매개성반응이 특징이다. Peritoneal macrophages에 의한 phagocytic activity를 측정할 결과 SFE를 투여시 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 SFE가 macrophages이 활성을 억제하여 allergy 반응을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

## 결 론

가미청비음 초임계유체 추출물 (SFE)의 면역반응에 대한 결과는 다음과 같다. SFE는 splenocytes의 subpopulation에 영향을

주지 않았으며, serum 중  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-4의 양에는 변화를 주지 않았으나, interleukin-2의 양은 대조군에 비해 증가시켰다. 또한, SFE는 mast cell 내로 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제하여 histamine 유리를 억제하였다. 한편, SFE는 peritoneal macrophages의 phagocytic activity를 감소시켰다. 이상의 실험결과 SFE는 mast cell 내로 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제하여 histamine 유리를 억제함으로써 mast cell을 안정화시키고, macrophages의 phagocytic activity를 감소시켜 allergy에 효과가 있는 탕제라 사료된다.

## 참고문헌

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S.: Cellular and Molecular Immunology. 2ed. p.5, Saunders, 1994.
2. Kim, K.S., Lee, D.H., Kwon, Y.A., Choi, S.Y. and Eun, J.S.: Effect of Kamichungbium on allergy reaction. Kor. J. Oriental Physiology & Pathology. 18(2), in printed, 2004.
3. Brogle, H.: CO<sub>2</sub> as a solvent: Its properties and applications. Chem. and Ind. 19, 385-390, 1982.
4. Leiner, S.: Dense Gases for Extraction and Refining. (Stahl, E., Quirin, K.W., and Gerald, D., Eds), pp.101-105. Springer-Verlag, New York, NY, USA, 1986.
5. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2844, 1978.
6. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol. 120, 1497, 1979.
7. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994.
8. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T.K., Kimura, M., Nishimura, M. and Kitamura, Y.: Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. Int. Arch. Allergy Immunol., 100, 99, 1993.
9. Yurt, R.W., Leid, R.W. and Austen, K.F.: Native heparin from rat peritoneal mast cells. J. Biol. Chem. 252, 518, 1977.
10. Kawabe, H., Hayashi, H. and Hayaishi, O.: Differential calcium effects on prostaglandin D2 generation and histamine release from isolated rat peritoneal mast cells. Biochemi. Biophys. Res. Communi., 143(2), 467, 1987.
11. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H.: A method for fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther., 127, 182, 1959.
12. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.: Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259, 1994.

13. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 112, 163, 1988.
14. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59, 1993.