

# 감공탕이 면역기능 저하 마우스의 임파구활성에 미치는 영향

손윤희 · 김호창 · 문지선 · 백태선 · 김철호<sup>1</sup> · 전병훈<sup>2</sup> · 남경수\*

동국대학교 난치병한양방치료연구센터, 의과대학 약리학교실  
1: 동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

## Effects of Gamgung-tang on Lymphocyte Activities in Immunodeficiency Mice

Yun Hee Shon, Ho Chang Kim, Ji Sun Moon, Tae Seon Baek,  
Cheorl Ho Kim<sup>1</sup>, Byung Hun Jeon<sup>2</sup>, Kyung Soo Nam\*

*Department of Pharmacology and Intractable Disease Research Center, College of Medicine, Dongguk University.  
1: Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University.  
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.*

This study was purposed to investigate the effect of Gamgung-tang(GGT) on immune responses induced by glucocorticoid in mice. GGT solution was treated by intraperitoneal injection for 7 days after glucocorticoid treatment(80 mg/kg). And then B and T cell proliferation and cytolytic activity of natural killer(NK) cells were measured. There was 25% inhibition in B cell proliferation with treatment of glucocorticoid. However, B cell proliferation was not influenced by GGT treatment. T cell proliferation was also inhibited by 18.4% with treatment of glucocorticoid. On the other hand, T cell proliferation was increased dose-dependent manner in GGT treated group. Furthermore in purified T cell, the proliferation was furtherly increased than non-purified T cell. At concentration of 18 mg/mouse GGT, purified T cell proliferation was increase to above level of normal group. The cytotoxic activity of NK cell was decreased by 35.3% with treatment of glucocorticoid. In GGT treated group, the cytotoxic activity of NK cell was increased to the normal level. In purified NK cell, the cytolytic activity of NK cell was further increased than non-purified NK cell. These results suggest that GGT may proliferate T cell that is suppressed by glucocorticoid, and activate NK cell activity.

Key words : Gamgung-tang, immune response, lymphocyte proliferation

### 서 론

갑상선기능저하증(autoimmune hypothyroiditis)은 자가면역질환의 일종으로 체내에 갑상선세포를 공격하는 자가항체(autoantibody)가 생성되어 갑상선의 기능을 저하시키는 질환이다<sup>1)</sup>. 한의학에서는 아직 이 질환의 치료에 대한 별다른 처방이 없으며 다만 면역조절기능 약분들을 사용하고 있는 실정이다. 이러한 관점으로 비추어 볼 때 면역 증가약물은 자가항체의 생성도 증가시킬 수 있어 치료약제의 선별시 주의하여야 한다.

감공탕(Gamgungtang, GGT)은 감초, 천궁, 당귀 및 흑두루

구성된 복방으로 이전의 연구결과로는 흰쥐의 thyrocyte인 FRTL 세포에서 cytokine-induced cytotoxicity를 억제하고 MHC class II antigen과 관련된 세포사멸 방지등의 효능을 가지며<sup>2)</sup> 또한 감공탕가미방이 갑상샘 기능장애에 효능이 있음을 보고하였다<sup>3)</sup>. 감공탕과 갑상선기능저하증 및 자가항체와의 상관성에 관한 연구는 지금도 진행중이며<sup>4,5)</sup>, 최근에는 자가면역성 갑상선기능저하증의 실험적 유도(experimental autoimmune thyroiditis)에는 thyroglobulin에서 당을 제거한 non-glycosylated thyroglobulin이 갑상선기능저하증 유발의 핵심임을 밝혔다<sup>6)</sup>. 그러나 이들은 감공탕에 대한 in vitro 실험이 대부분으로서 감공탕 투여와 관련된 흉선(thymus)의 기능활성에 관한 연구와 생체를 이용한 갑상선기능저하증 치료에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 감공탕의 투여가 glucocorticoid투여

\* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

· E-mail : namks@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2421

· 접수 : 2004/05/17 · 수정 : 2004/06/22 · 채택 : 2004/07/29

로 면역결핍 현상이 유도된 마우스에서 T 세포 및 B세포 증식능과 자연사세포 (natural killer cell)의 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

본 실험에 사용한 시약으로서 RPMI 1640, lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A(Con A), percoll은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, U.S.A.)로부터, fetal bovine serum(FBS)과 antibiotic-antimycotic는 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)로부터, glucocorticoid는 Upjohn사(Solu-Medrol, Korea)로부터 구입하여 사용하였고, T 및 B 세포의 분리에 사용한 nylon wool은 Wako사(Wako Chem. Co., Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 그 외에 사용한 일반 시약들은 특급제품을 사용하였다. 한편 본 연구에 사용된 실험동물은 7주령의 암컷 balb/c 마우스(체중 20-25g)로서 대한실험동물센터 (충북, 음성)에서 분양받아 1주일 정도 본 실험실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였고, 감공탕의 제작에 사용한 감초, 흑두, 당귀, 천궁은 시장에서 구입한 국산생약을 사용하였으며 그 표본품은 동국대학교 의과대학 약리학교실에 보관되어 있다.

### 2. 감공탕의 제조<sup>7)</sup>

감공탕(감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g, 천궁 15 g) 60 g에 증류수 400 ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 전량을 200 ml가 되도록 감압농축한다. 여기에 ethanol을 가하여 75%, 85%, 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여과하고 여액을 pH 7.4로 조절하여 전량이 200 ml가 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치한 후 membrane filter (0.22  $\mu$ m, 직경 25 mm, Whatman®, Germany)로 여과 멸균하여 시료로 사용하였다. 여액 1 ml당 30mg의 추출물을 얻었다.

### 3. 실험군 분류와 감공탕의 투여

본 연구에서는 복강주사(i.p injection)로 마우스에 감공탕을 투여하였다. 실험군은 Balb/c 마우스 7마리를 한 군으로 하여, 아무런 처치도 하지 않은 군(Normal group), glucocorticoid만 투여한 군(Control group), glucocorticoid를 투여하고 복강으로 감공탕을 주입한 군(Treatment group)으로 나누어서 실험을 시행하였다. Glucocorticoid는 7일 동안 복강으로 투여하였으며(1회 80 mg/kg), 감공탕은 glucocorticoid를 투여한 후 각 농도별로 0.2 ml 씩 7일동안 복강으로 처치하였다. 한편 감공탕의 투여로 인하여 glucocorticoid에 의해 억제된 항체생성능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 glucocorticoid를 투여한 후, 24시간 후에 항원으로서 MA-HRP(methamphetamine- horseradish peroxidase)을 사용<sup>8)</sup>하여 면역한 다음, 감공탕을 투여하였다.(Table 1.)

### 4. 마우스 비장세포의 조제

마우스를 질식시키고 고정시킨 다음 70%의 alcohol로 전신

을 소독하고 멸균 가위를 사용하여 비장을 무균적으로 적출한 다음, 차가운 RPMI 1640배지 10 ml가 들어 있는 사이레로 옮기고 작은 해부 가위로 비장을 몇번 자른 뒤 소독된 끝이 굽은 핀셋으로 주물러 가면서 비장속에 들어 있는 대부분의 세포를 회수한다. 이때 세포중 포함된 적혈구는 lysis buffer (0.16M NH<sub>4</sub>Cl-0.17M Tris, pH 7.2)를 5 ml넣고 천천히 혼합한 다음 1,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 제거하였다. 그 후 1회 세척한 다음 멸균된 nylon mesh(#200)를 사용하여 여과해서 다른 조직의 혼입을 제거하였으며, 10% FBS-RPMI 배지에 현탁하여, 다음 실험에 사용하였다.

Table 1. Classification of experimental groups.

Groups	Glucocorticoid (mg/kg, i.p.)	MA-HRP ( $\mu$ l/mouse, i.p.)	GGT treatment (mg/mouse, i.p.)
Normal	-	10	-
Control	80	10	-
Treatment	80	10	3
	80	10	6
	80	10	18

### 5. Nylon wool column의 제작과 B 세포 및 T 세포의 분리<sup>9)</sup>

Nylon wool을 아주 섬세하게 썬 다음 0.8 g을 달아 10 ml의 주사기에 넣고 멸균시킨다. 여기에 RPMI 1640배지 10ml를 가하여 기포를 제거시키고 column을 충분히 활성화시킨다. 이때 주사 바늘은 25 gauge를 사용하며 mouse 1마리당 column을 1개씩 만들어 실험에 사용하였다. 또한 T 세포 및 B 세포를 분리하기 위하여 위에서 조제한 비장세포 부유액을  $1 \times 10^8$  cells/ml로 조제한 다음, 미리 준비한 nylon wool column에 천천히 주입한다. 다시 10% FBS-RPMI 배지를 3 ml 더 첨가한 다음 column을 작동시키고 적당한 때에 작동을 중지, 37°C에서 1시간 배양시킨다. 그 후 37°C로 예온시켜 놓은 10% FBS-RPMI 1640배지 7ml를 사용하여 column을 유출시킨다. 이때 유출되어 나오는 세포는 대부분 T 세포(NK 세포 포함)이며, nylon wool column에 부착되어 있는 세포를 B 세포로 사용하였다. Nylon column에 부착되어 있는 B 세포의 분리는 멸균된 cold-PBS(4°C 이하)를 사용하여 충분히 분리하고 10% FBS-RPMI 1640배지로 세척하여 사용하였다.

### 6. Percoll 농도구배를 이용한 자연사 세포의 정제

Percoll 불연속밀도구배원심법에 의해 NK 세포를 분리하였다. Percoll 농도구배의 조제를 위해 먼저 100% percoll(비중 1.090) 100 ml, RPMI 1640배지를 50 ml를 가하고 여기에 15 ml의 FBS를 넣어 60.6% percoll-RPMI 용액을 만든다. 그 다음 60.6% percoll액을 10% FBS-RPMI에 희석해서 각각 56.6, 52.1, 47.6, 43.1 및 38.6%의 percoll액을 만든다. 15 ml의 바닥이 둥근 tube에 각 농도의 percoll액을 2 ml씩 천천히 넣어, 4.5%의 불연속 농도구배를 만든다. 그리고 NK 세포의 분리를 위해 제조한 4.5% 불연속구배에 위의 실험에서 nylon wool column에 부착되지 않고 통과된 세포(T 세포) 1 ml를 조용히 넣고, 1,600 rpm에서 45분간 실온에서 원심분리를 행한다. 이때 속도는 반드시 5분간에 걸쳐서 천천히 증가되도록 한다. 원심분리가 끝나면 각각의 중간층을 순서대로 천천히 회수한다. 본 실험에서는 첫번째 중간층을

NK 세포로 회수하여 10% FBS-RPMI 1640배지로 2번 세척하여 NK세포의 활성측정에 사용하였다. 또한 다른 층의 세포들은 모두 회수하여 T 세포로 하여 실험에 사용하였다.

7. Natural killer 세포에 대한 활성측정<sup>10)</sup>

본 실험에서는 cytotoxicity detection kit (Boehringer Mannheim사, Germany)를 사용하였다. 먼저 분리한 NK 세포를 밀이 등근 96 plate에  $1 \times 10^6$  cells/well되게 100  $\mu$ l씩 분주한다. 여기에 표적세포로 배양한 K562 세포를 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 세척하고 assay medium(1% FBS-RPMI 1640)으로 현탁시킨 후,  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 100  $\mu$ l를 다시 넣는다. 200  $\mu$ l의 혼합액을 가볍게 흔든 뒤 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양시킨다. 배양 후, 이 plate를 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 100  $\mu$ l를 취한 다음 다른 plate에 옮기고 100  $\mu$ l의 반응혼합액을 각 well에다 넣은 다음 실온에서 약 30분간 차광하여 반응시킨 후, 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 back ground control로는 assay medium 200  $\mu$ l를 넣었으며, 양성대조군으로는 100  $\mu$ l의 표적세포( $1 \times 10^4$  cells)에다 2% Triton X-100-assay medium을 100  $\mu$ l를 첨가하였다. 음성대조군으로는 100  $\mu$ l의 표적세포에다 assay medium 100  $\mu$ l만을 첨가해서 사용하였다.

8. B 세포의 증식에 미치는 영향<sup>11,12)</sup>

위에서 용출시킨 B 세포를 10% FBS-RPMI 1640 배지로 세척하고  $2.5 \times 10^6$  /ml로 조제 한 다음, 한 well당 200  $\mu$ l씩 microtiter plate에 균등하게 넣는다. 이때 한 시료당 3 well씩 triplicate로 실험을 행하였다. 여기에서 B 세포 mitogen인 lipopolysaccharide를 각 well 당 5  $\mu$ g씩 가한 다음, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양을 시작하였다. 배양 종료 6시간 전에 3H-thymidine을 10  $\mu$ l씩(0.5  $\mu$ Ci/ml) 가한 다음, 남은 배양시간을 완료한 후, cell harvester로 세포를 흡입하고 glass filter (Whatman GF/C)위에 세포를 모았다. 그리고 증류수를 사용하여 glass filter 위에 있는 세포를 동일한 조건으로 3번 세척한 다음 glass filter를 실온에서 30분 정도 건조시키고 filter를 scintillation vial에 넣고, toluene계 cocktail용액 5 ml를 넣은 다음, 각 시료의 cpm값을 scintillation counter(Baekmann, Packard)를 사용하여 측정하였다.

9. T 세포의 증식에 미치는 영향<sup>13)</sup>

본 실험에 사용한 T 세포는 nylon wool column을 통과한 T 세포(NK세포 포함)와 percoll 농도구배를 사용하여 NK 세포를 제거시킨 뒤, percoll 농도구배층에 남은 T 세포를 이용하여 각각의 T 세포를 실험에 사용하였다. 각각의 T 세포를 10% FBS-RPMI 1640배지를 사용하여  $2.5 \times 10^6$  cells/ml로 조제한 다음, 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 균등하게 넣는다. 다음에는 T 세포 mitogen으로 알려진 concanavalin A 1  $\mu$ g을 넣고 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양하였다. 배양 종료 6시간 전에 3H-thymidine(0.5  $\mu$ Ci/ml)을 10 $\mu$ l씩 넣은 다음, 다시 8시간 더 배

양하였다. 반응 종료 후 cell harvester로 세포를 흡입하고 이하 실험은 B 세포에서와 같이 동일한 조건에서 행하여 세포내로 uptake된 thymidine의 양을 scintillation counter에서 측정하였다.

10. 통계학적 처리

대조군과 감공탕처리군의 실험결과에 대하여 student's t-test를 행하여 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

실험결과

1. B 세포의 증식에 미치는 영향

감공탕이 glucocorticoid 투여로 억제된 B 세포의 증식에 미치는 영향을 3H-thymidine을 사용하여 B 세포 증식능을 측정하였다(Fig. 1). 대조군에서는 정상군에 비하여 유의성있게 B 세포의 증식이 약 25% 감소함을 알 수 있었다. 한편 감공탕을 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 각 농도에서 별다른 증가 현상을 관찰 할 수 없었다. 이 결과는 감공탕의 투여는 glucocorticoid로 억제된 B 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않음을 나타낸다.

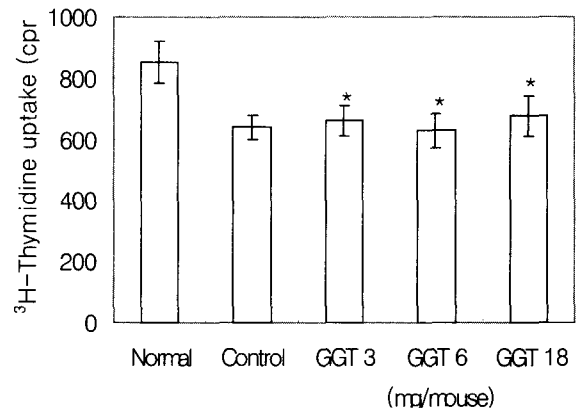


Fig. 1. The effects of Gamgung-tang on B cell proliferation by 3H-thymidine incorporation. The murine B cells( $5 \times 10^5$  cells/well) and lipopolysaccharide(5  $\mu$ g/well) were incubated at 37°C for 66 hrs. And then 3H-thymidine(10  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ Ci/ml) was added. After incubation, B cell proliferation was measured by 3H-thymidine incorporation. Normal : untreated group, Control : injected with glucocorticoid(80mg/kg) into the peritoneum for 7 days, GGT treated into i.p route for 7 days after injection with glucocorticoid. \* p<0.01; compared with the control group.

2. T 세포의 증식에 미치는 영향

감공탕이 glucocorticoid 투여로 억제된 T 세포의 증식에 미치는 영향은 NK 세포를 포함한 T 세포(정제 전, Fig. 2) 및 percoll gradient를 이용해서 NK 세포를 제거한 뒤의 T 세포(정제 후, Fig. 3)를 대상으로 3H-thymidine을 사용하여 T 세포증식능을 측정하였다. Fig. 2 에 나타난 바와 같이 대조군에서는 정상군에 비하여 T 세포의 증식이 유의성있게 감소되었으며(18.4%) 감공탕 투여군은 대조군보다 3 mg/mouse에서는 8.2%, 6 mg/mouse에서는 18.3% 그리고 18 mg/mouse에서는 27.1%의 현저한 증가를 보였다. 또한 비흡착 T 세포에서 NK 세포를 제거하고 남은 순수 T 세포층을 모아서 실행한 실험에서는 각각의 군에서 더욱 활성이 증가함을 알 수 있었다. 이들 각각의 활성증가를 살

퍼보면 대조군에서는 정상군에 비해 28.9%의 T 세포증식이 감소되었으며, 감공탕의 투여로 감소되었던 대조군보다 3 mg/mouse에서는 21.6%, 6 mg/mouse에서는 29.8% 그리고 18 mg/mouse에서는 55.2%로 T 세포의 증식이 유의성있게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 한편 B 세포의 경우에는 달리 T 세포에서는 상당한 증식효과를 관찰할 수 있었다.

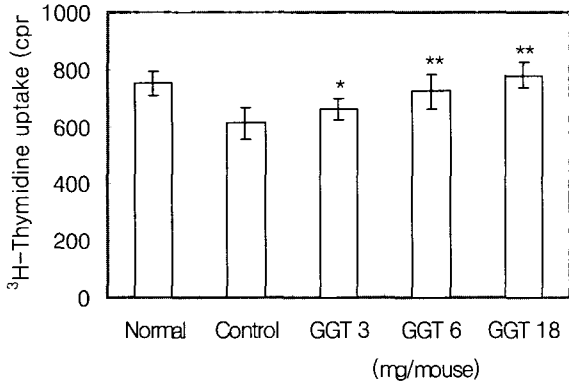


Fig. 2. The effects of Gangung-tang on T cell proliferation by 3H-thymidine incorporation. The murine T cells( $5 \times 10^5$  cells/well) and concanavalin A( $1 \mu\text{g}/\text{well}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 66 hrs. And then 3H-thymidine( $10 \mu\text{l}$ ,  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) was added. After incubation, T cell proliferation was measured by 3H-thymidine incorporation. Other legends are the same as Fig. 1. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared with the control group.

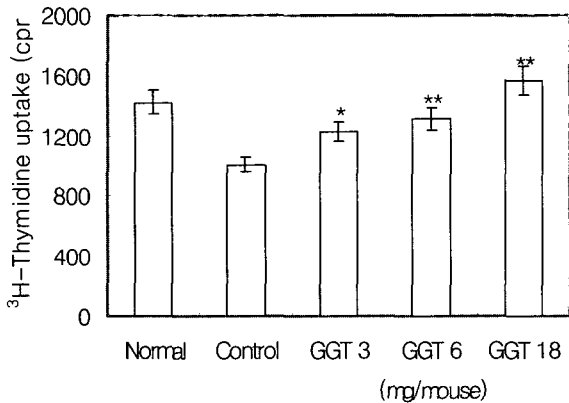


Fig. 3. The effects of Gangung-tang on purified T cell proliferation by 3H-thymidine incorporation. T cell was purified by percoll gradients using 38.6-56.6% percoll-RPMI solution. The purified T cells( $5 \times 10^5$  cells/well) and concanavalin A( $1 \mu\text{g}/\text{well}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 66 hrs. And then 3H-thymidine( $10 \mu\text{l}$ ,  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) was added. After incubation, T cell proliferation was measured by 3H-thymidine incorporation. Each values represents the mean  $\pm$  S.D.(n=7). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared with the control group.

### 3. Natural killer 세포의 활성에 미치는 영향

NK 세포는 비합식, 비흡착 세포로 분리 정제의 과정에서 T 세포에 포함된다. 본 실험에서는 nylon wool column으로 비흡착 T 세포를 분리하여 T 세포포함 NK 세포 활성 및 percoll gradients를 이용하여 T 세포를 제거한 뒤, 정제 NK 세포를 이용하여 각각의 표적 세포(K562)에 대한 cytotoxicity를 측정하였다. Fig. 4에서 대조군에서의 NK 세포의 활성은 정상군보다 35.3% 저하됨을 알 수 있었다. 그런데 감공탕의 투여로 glucocorticoid에 의하여 억제되었던 NK 세포의 활성이 증가하여 6 mg/mouse에서는 거의 정상군의 수준으로 회복되었다. 한편 Percoll gradients를 이용하여 T 세포에서 NK 세포를 정제하여 실험을

행한 결과(Fig. 5), 대조군에서는 정상군에 비해 41.8% 활성이 감소하였으며, 감공탕을 투여로 3 mg/mouse에서는 28.3%, 6 mg/mouse에서는 62.5% 그리고 18 mg/mouse에서는 2배 가까이(93.8%) NK 세포의 활성이 증가되었다.

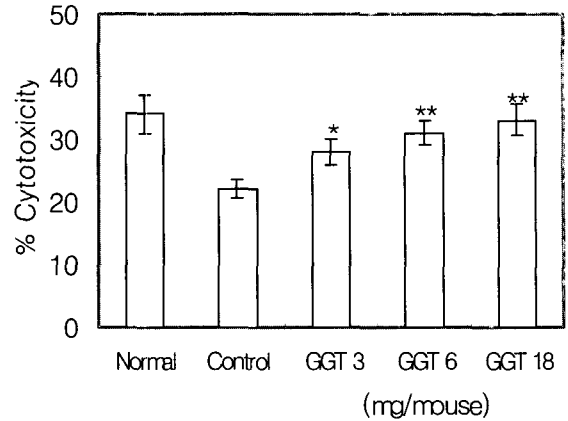


Fig. 4. Determination of the cytolytic activities of non-adherent T cells. In 96 well tissue culture plate, T cells( $1 \times 10^6/\text{well}$ ) and K562 cells( $1 \times 10^4/\text{well}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 4 hrs. Cytolytic activity in the culture supernatant was measured by LDH assay. Other legends are the same as Fig. 1. Each values represents the mean  $\pm$  S.D.(n=7). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared with the control group.

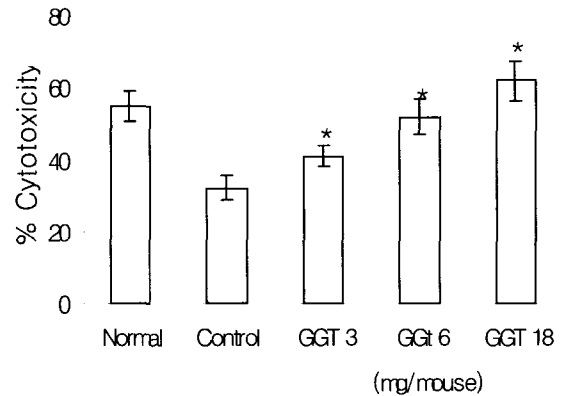


Fig. 5. Determination of the cytolytic activities of purified NK cells. NK cells were purified by percoll gradients, NK cells( $1 \times 10^6/\text{well}$ ) and K562 cells( $1 \times 10^4/\text{well}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 4 hrs. Cytolytic activity in the culture supernatant was measured by LDH assay. Other legends are the same as Fig. 1. Each values represents the mean  $\pm$  S.D.(n=7). \*  $p < 0.01$ ; compared with the control group.

## 고찰

면역기전의 최대 역할은 자기(self)와 바자기(nonsel)를 인식해서 바자기의 성분을 효율 좋게 제거하는 점이다. 자가면역질환에 있어서는 자가성분에 대한 면역반응이 일어나서 자가성분을 인식하는 B 세포의 산생 및 T 세포의 유도가 일어나며 병리학적으로 전신적 혹은 장기 특이적으로 백혈구 침윤을 동반하는 염증이 생긴다. 갑상선염은 바제도우씨병과 함께 자가면역질환이며 이 질환의 진단에는 세포성 및 체액성면역계가 관여하고 있으며 또한 실제 임상에는 스테로이드 호르몬을 포함한 면역억제제에 의한 치료는 행해지지 않고 있다<sup>14)</sup>.

감공탕이 갑상선염의 치료효과에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 먼저 항원제시세포(antigen presenting cell)의 활성화 및 항원제시능력, B 세포에 있어서는 항체생성능력과 증식능 그

리고 T 세포에 있어서는 증식 및 lymphokine 분비 측정 등 일련의 세포성 면역계에 미치는 요소들의 측정이 선행되어야 하며, 또한 비특이적 생체내 방어작용에 관여하는 natural killer(NK) 세포의 활성측정도 종양 면역응답에 중요한 지표가 된다. 이전의 연구에서 감공탕의 면역조절 효능을 검토하기 위한 일환으로 glucocorticoid로 면역기능을 인위적으로 억제시킨 마우스를 대상으로 감공탕을 투여한 다음, 이로 인하여 야기되는 면역응답 (immune response)을 관찰한 바, 감공탕이 항체역가 및 대식세포의 lysozyme활성 등의 체액성 면역반응을 유의성있게 증가시키심을 확인하였다(data not shown).

면역응답이란 항원 자극에 의해서 유도되는 임파구가 항체 생산세포로 증식 분화해 가는 반응이라 할 수 있다. 면역기능을 담당하는 세포로는 기본적으로 B 세포, T 세포 및 항원제시기능을 가진 대식세포(macrophage)의 3종류의 세포로 구성되어 있다. 이들 세포들은 대부분 조혈간세포에서 분화 성숙 하는데 T 세포는 흉선에서, B 세포는 태아 간 혹은 성인 골수에서 분화해서 성숙 각각 T 임파구 및 B 임파구로 변한다. 이 성숙 과정에 T 임파구는 T 세포항원 수용체(T cell antigen receptor), B 세포에서는 면역글로블린 유전자의 재구성이 일어나며 각각의 분자의 항원 결합부위에 다양성이 나타나게 된다. 외부에서 침입한 항원은 대식세포에 의해 처리되어 B 세포 및 T 세포에 제시되며 B 세포는 제시된 항원에 대해 항체를 만들어 체액성 면역을 증가시키며, T 세포는 B 세포가 항체를 만드는 형질세포로 분화하는데 도와주는 액성인자를 분비하기도 하며 또는 직접 항원에 감염된 세포들을 파괴하는 기능을 가지기도 한다. 이들 면역세포들간의 이와 같은 상호작용에 의해 면역응답이 형성되어 생체는 항상성을 유지하게 된다.<sup>15)</sup>

본 실험에서는 glucocorticoid를 7일간 투여(80 mg/kg) 후 감공탕을 7일 간 투여하고 투여 마우스의 비장에서 B 세포 및 T 세포를 분리 정제하여 각각의 증식효과를 관찰하였다. 세포분열의 빈도측정은 세포분열과 동반하는 DNA의 합성 속도를 측정하는 것이 편리하며, 3H-thymidine의 세포내로의 incorporation을 측정하는 것이 가장 일반적인 방법이다. 이는 incorporation된 thymidine이 DNA합성의 원료로 사용되어지기 때문이다. 감공탕을 투여함으로써 인해 glucocorticoid의 투여로 억제되었던 B 세포의 증식에는 별다른 영향을 보이지 않았으나 T 세포는 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다. 이는 감공탕이 자가항체의 생성과 관련된 B세포의 증식에는 별다른 영향을 미치지 않지만 자가항체에 의해 손상된 갑상선(thymus)에 영향을 미쳐 T 임파구의 회복 및 갑상선에서 T세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이전의 실험에서 감공탕은 흰쥐 thymocyte인 FRTL세포에서 interferon- $\gamma$  와 tumor necrosis factor- $\alpha$ 에 의해 유도되는 세포사(cytotoxicity)를 유의성 있게 억제시키는 것으로 나타났으며 항원제시세포의 일종인 FRTL의 MHC class II antigen 표현도 억제시키는 것으로 나타났다<sup>2)</sup>. 이러한 사실은 감공탕이 자가항체에 의해 혹은 독성물질에 의해 파손된 thymocyte의 손상을 보호하는 효과를 가짐을 알 수 있다.

한편 NK 세포는 특별히 항원의 자극을 받지 않아도 종양세

포 및 바이러스 감염세포에 대해서 세포손상 작용을 가지는 림파계 세포로 생체의 면역감시(immune surveillance)기전의 주역을 담당한다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 실제로 생체내에서 암세포가 발생하면 NK 세포는 자기의 종양세포의 암 항원(tumor antigen)을 인식하여 세포간의 상호작용에 의하여 NK 세포로부터의 막융해 단백질인 perforin에 의하여 암세포를 파괴한다고 알려져 있다.<sup>17,18)</sup> 그러나 실제로 암환자에는 NK 세포의 활성이 저하되어 있어 면역부활제 등의 투여로 NK 세포의 활성을 증가시키려는 시도가 행하여지고 있다.<sup>19,20)</sup> 본 실험의 결과, 감공탕의 투여가 glucocorticoid의 투여로 저하되었던 NK 세포의 활성을 증가시켜 종양세포인 K562 세포를 파괴하는 능력이 증가함을 알 수 있었다.

현재 감공탕이 T 세포에서 분비되는 cytokine에 미치는 영향등을 검토중이며, 이후 감공탕이 갑상선기능저하증 환자의 임상치료에 응용될 수 있도록 더욱 다각적인 in vivo 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

감공탕이 glucocorticoid로 유도된 면역기능저하 마우스의 림파구에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 성적을 얻었다. B 세포의 증식능은 정상군에 비하여 glucocorticoid를 투여한 대조군에서 감소하였다. 한편 glucocorticoid를 복강주사한 후, 감공탕을 투여한 군에서는 대조군과 별다른 차이가 나타나지 않았다. 한편 T 세포에서는 감공탕의 투여로 정제한 T 세포에서는 정제 전에 비하여 높은 증식능을 보였으며, 증가의 경향은 정제 전과 유사하였다. NK 세포의 활성도 glucocorticoid투여로 정상군보다 현저하게 저하하였다. 반면 감공탕 투여군에서는 glucocorticoid 투여로 억제되었던 NK 세포의 활성이 정상군의 수준으로 회복되는 경향을 보였다. 이러한 결과로 감공탕은 glucocorticoid에 의해 억제되었던 세포성 면역체계중 T 세포의 증식 및 NK 세포의 활성도 증가시키심을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발 사업의 지원(01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Mukaida, N. and Matsushima, K. Molecular biology of inflammatory cytokines and autoimmune disease. *Experimental Med.* 10, 142-148, 1992.
2. Shon, Y.H., Lee, H.S., Lim, J.K., Kim, C.H., Jeon, B.H. and Nam, K.S. Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and MHC class II antigen expression in rat thyroid cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 371-374, 2004.
3. 최호승, 김영목, 임종국, 손윤희, 남경수, 김철호, 전병훈. 감공탕 가미방이 갑상샘 기능장애에 미치는 효과, 동의생리병

- 리학회지, 17, 648-655, 2003.
4. 손윤희, 김철호, 전병훈, 남경수. Thyroglobulin에 대한 단일 클론항체의 혈소판응집 저해작용, 동의생리병리학회지 18, 534-537, 2004.
  5. 남경수, 손윤희, 백태선, 김철호, 임종국, 황철원. Anti-thyroglobulin monoclonal antibody의 제작 및 특성, 한국생명과학회지 12, 460-463, 2002.
  6. Moon, S.K. Kang, B.S., Kim, Y.G., Chung, T.W., Kim, J.R., Cha, B.Y., Moon, J.Y., Lim, J.K., Shon, Y.H., Nam, K.S., Ko, J.H., Jeon, B.H., Kim, C.H. Induction of an autoimmune thyroiditis by deglycosylated thyroglobulin induction of a Tc1-mediated experimental autoimmune thyroiditis by deglycosylated porcine thyroglobulin, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 26, In press, 2004.
  7. 錢百炎: 中草藥注射劑, 上海科學技術出版社, 中國, p. 71-130, 1981.
  8. Nam, K.S., Kim, J.W., Choi, M.J., Han, M.Y., Choe, I.S., Chung, T.W. Production and characterization of monoclonal antibody that simultaneously recognizes methamphetamine and its major metabolite, *Biol. Pharm. Bull.* 16, 490-492, 1993.
  9. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. *Current protocols in Immunology*, National Institutes of Health, U.S.A (vol. 1), 1991.
  10. 大澤利昭, 永井克孝: 免疫生化學研究法, 續生化學實驗講座, 東京化學 同人, 日本 (5), p.165-191, 1989.
  11. 矢田純一, 藤原道夫: 新リンパ球機能檢索法, 中外醫學社, 日本, p.352-364, 1990.
  12. Minami, M., Shreffler, D.C., Cowing, C. Characterization of the stimulator cells in the murine primary mixed leukocyte response. *J. Immunol.* 124, 1314-1320, 1980.
  13. Yoshizawa, K., Yano, A. Mouse T lymphocytes proliferative responses specific for human MHC products in mouse anti-human xenogeneic MLR. *J. Immunol.* 132, 2820-2829, 1984.
  14. Eto, S. and Fujuhira, T. Autoimmune hypothyroiditis. *The Japanese J. Clin. Med.* 46, 894-900, 1988.
  15. 平野俊夫: 免疫のしくみと疾患, p.10-20, 1993, 羊土社, 日本.
  16. Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. Heterogeneity of Natural Killer Cells, *Annual Review of Immunology* 2, 359-394, 1984.
  17. Podack, E. R. Molecular mechanisms of cytolysis by complement and by cytolytic lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 3, 127-164, 1986.
  18. Ortaldo, J.R., Winkler-Pickett, R.T., Nagashima, K., Yagita, H. and Okumura, K. Direct evidence for release of pore-forming protein during NK cellular lysis. *J. Leuk. Biol.* 52, 483-488, 1992.
  19. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S. and Loudon, R. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor(NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827-845, 1989.
  20. Chan S.H., Perrssia B., Gupta J. W., Kobayashi M., Pospisil M., Young H.A. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173, 869-879, 1991.