

대표적 보기약인 인삼, 당삼, 황기, 백출, 산약 물추출액의 면역조절효과 비교

신상우 · 이영선 · 박종현 · 권택규¹ · 서성일¹ · 권영규^{2*}

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 계명대학교 의과대학,
2 : 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실

Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Ginseng Radix*, *Pilose Asia-bell*, *Astragali Radix*, *Astractylodes Rhizoma alba* and *Dioscoreae Rhizoma*

Sang Woo Shin, Young Sun Lee, Jong Hyun Park, Taeg Kyu Kwon¹, Seong Il Suh¹, Young Kyu Kwon²

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-828, Korea

1: School of Medicine, Keimyung University, Daegu 700-712, Korea

2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-828, Korea

This study was carried out to investigate the comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Ginseng Radix*(GR), *Pilose Asia-bell*(PA), *Astragali Radix*(AR), *Astractylodes Rhizoma alba*(AA) and *Dioscoreae Rhizoma* (DR). The parameter examined to assess apparent immunomodulatory effect of the water-extracted GR, PA, AR, AA and DR included the regulation of Nitric oxide (NO), the expression of Th1/Th2 type cytokine, the change of B cell phenotype. The water-extracted GR, PA, AR, AA and DR inhibited NO production and iNOS protein expression in LPS stimulated RAW 264.7 macrophage cells. In the Th1 and Th2 cytokine expression, the water-extracted GR, PA, AR, AA and DR induced IL-2 and IFN γ mRNA gene expression. Therefore, it seems that the water-extracted GR, PA, AR, AA and DR have a inducing effect of Th1 type cytokines. In the Flow cytometry analysis, the water-extracted GR, PA, AR, AA and DR did not change B cell phenotype (CD45R/B220). The water-extracted GR, PA, AR, AA and DR have a reducing effect of immune suppression cause by Methotrexate (MTX), an agent of immune suppression. These results suggest that the immunomodulatory effects of the water-extracted GR, PA, AR, AA and DR may be, in part, associated with the inducing IL-2 and IFN γ mRNA gene expression in and regulation of NO production in macrophage cells.

Key words : *Ginseng Radix*, *Pilose Asia-bell*, *Astragali Radix*, *Astractylodes Rhizoma alba* and *Dioscoreae Rhizoma*, Th1/Th2 cytokine, NO, Methotrexate

서 론

한의학에서는 병태조직에 관한 것보다는 인체의 생활능력과 疾病에 대한 抵抗能力을 증시하여 치료방법이 대부분 인체의 氣의 보존과 배양을 목표로 하고 있다. 한의학적인 관점에서 정기허(正氣虛)는 모든 질병을 일으키는 내적(內的) 조건이며, 正氣는

인체의 생리활동을 정상적으로 유지시키고 내외의 병인으로부터 인체를 방어하고 질병으로부터 회복시키는 작용을 뜻하는 것으로 이러한 관점은 西洋醫學 중에서 생체의 방어기능에 관계된 면역학적 관점과 많은 유사성을 가지고 있다¹⁻²⁾. 따라서, 정기를 회복시키므로써 신체내 면역력을 조절하고 신체방어 기전에 효과적인 한약재 탐색연구가 활발히 진행되고 있다³⁻⁷⁾.

正氣를 補益하고 虛弱을 扶持하여 虛證을 치료하는 補益藥의 종류는 氣血陰陽의 네 방면을 나누어 補氣藥, 補陽藥, 補血藥, 補陰藥으로 분류된다⁸⁾. 이 중 氣의 생성이 부족하거나 지나

* 교신저자 : 권영규, 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교

· E-mail : ykkwon@dhu.ac.kr, · Tel :053-770-2242

· 접수 : 2004/05/28 · 수정 : 2004/06/30 · 채택 : 2004/08/03

치게 많이 소모되어 氣의 功能이 감퇴된 氣虛證을 消除 혹은 改善하는 藥物이 補氣藥이며 이에 속하는 약물들로는 人蔘, 黨參, 黃芪, 白朮, 山藥 등을 대표적으로 들 수 있다^{8,9)}.

생체내에는 면역기능을 수행하기 위해 혈액, 입과질, 비장 및 위장관 등 생체 여러 조직 및 기관에 많은 면역세포들이 존재하고 있다. 면역세포 구성원에는 입과구, 단핵식세포, 다핵형 백혈구 및 혈소판 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 입과구 및 단핵 식세포로 알려져 있다¹⁾. 따라서, 본 연구에서는 보기약, 보혈약, 보양약, 보음약 등으로 나누어지는 補益藥 그룹간의 면역조절 효과를 비교해 보기 위하여, 그 첫째로 보기약 중 인삼(*Ginseng Radix*), 당삼(*Pilose Asia-bell*), 황기(*Astragali Radix*), 백출(*Astrachylodes Rhizoma alba*) 및 산약(*Dioscoreae Rhizoma*) 물추출액을 대상으로 하여 이들 간의 면역조절 작용을 마우스 입과구와 대식세포를 이용하여 입과구에서 이들 약재의 T세포에 미치는 효과를 비교하기 위하여 Th1/Th2 type cytokine의 발현을 B세포에 미치는 효과를 비교하기 위하여 B세포 표현형의 변화 그리고, 대식세포에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 NO 생성 및 억제에 미치는 영향을 검색함으로써 각 약재의 면역반응에 미치는 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 검액의 준비

본 실험에 사용된 補氣藥들은 문헌조사를 통해 선별하였으며, 선별된 보기약은 Table 1과 같다. 實驗에 使用된 藥材는 대구 한의대학교 附屬 韓方病院에서 구입하였고, 良質의 것을 精選하여 使用하였다.

Table 1. Oriental Crude Drugs for Invigorating Qi(氣)

Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific name	Dose(g)
人蔘	Panax ginseng	<i>Ginseng Radix</i>	40
黨參	Codonopsis pilosula	<i>Pilose Asia-bell</i>	40
黃芪	Astragalus membranaceus	<i>Astragali Radix</i>	40
白朮	Atractylodes macrocephala	<i>Astrachylodes Rhizoma alba</i>	40
山藥	Dioscorea opposita	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	40

상기 약물 40g씩을 증류수 1200ml를 첨가하여 2시간 동안 중탕하여 검액 700ml를 각각 추출하였고, 추출한 검액들은 멸균 거여즈를 이용하여 1차 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15分間 遠心分離를 실시하여 상층액을 채취한 다음 이를 1.2 μ m와 0.45 μ m의 membrane filter(Milipore Co., USA)로 除菌하여 使用하였다.

2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)대한바이오파밍(충북 음성, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55 \pm 2%를

유지하였다.

3) 면역억제제 준비

Methotrexate (MTX : C₂₀H₁₁N₈O₅, Sigma, U.S.A)를 RPMI1640 배지에 20mg/ml로 만든 후 실험에 따라 사용하였다.

2. 방법

1) 비장세포 분리

에테르 마취 후 마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장 세포로 만든 후 4 $^{\circ}$ C, HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-paque를 이용하여 입과구층을 모은 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 배지로 한번 더 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켰다. 입정액을 취하여 0.4% tryphan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 살아 있는 비장 세포 수를 측정하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포주를 ATCC로부터 분양 받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 5% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin를 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

3) 비장세포 증식능 실험

마우스 비장세포를 2 \times 10⁵/100 μ l 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100 μ l가 되게 조정하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에 넣어 48시간 배양하였다. 입과구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면 배양액 100 μ l에 시약을 20 μ l첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에 넣어 1시간 30분 배양한 후 ELISA reader 490 nm에서 측정하였다. 입과구 증식 결과는 실험군의 [(평균 O.D.) - (평균background O.D.) \pm S.D] 값으로 표시하였다.

4) Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% *n*-naphthylamide in H₂O) 100 μ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

5) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 및 cytokine 발현 측정

RNA분리는 TRIzol를 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 TRIzol 900 μ l를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100 μ l를 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -2

0℃에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5× RT buffer 2 μl, 10 mM dATP 0.25 μl, 10 mM dGTP 0.25 μl, 10 mM dTTP 0.25 μl, 10 mM dCTP 0.25 μl, MMLV reverse transcriptase (200 U/μl) 0.25 μl, RNase inhibitor (28 U/μl) 0.25 μl, 50 μM oligo dT primer 0.5 μl, DEPC-DW 4 μl를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controller; MJResearch, Inc.)에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10× PCR buffer 3 μl, 25 mM MgCl₂ 1.8 μl, 10 mM dATP 0.3 μl, 10 mM dGTP 0.3 μl, 10 mM dTTP 0.3 μl, 10 mM dCTP 0.3 μl, 50 μM sense 및 antisense primer 0.25 μl, Taq polymerase (5 U/μl, Promega Co.) 0.25 μl를 혼합하고, 여기에 D.W.를 넣어 최종 용액량이 20 μl되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5 μl를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94℃에 3분간 1 cycle 반응 후, 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초간 35 cycles 반응시켰으며, 72℃에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2.과 같다.

Table 2. Primer sequence used for detection of Th1/Th2 type cytokine and iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-2	5'-GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' 5'-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IFN γ	5'-CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3' 5'-GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'
IL-4	5'-ACA AAA ATC ACT TGA GAG AGA TCA T-3' 5'-AGT AAT CCA TTT GCA TGA TGC TCT T-3'
IL-6	5'-CTC GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A-3' 5'-ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T-3'
IL-10	5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA-3' 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A-3'
iNOS	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

6) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현

세포에서의 단백질 분리는 lysis buffer(50mM Tris-Cl, 25mM EDTA, 650mM NaCl, 5% Triton X-100, 100X PMSE, 100X protease inhibitor cocktail, 5X lysis buffer)를 이용하여 분리하였다. 추출된 단백질을 95℃에서 5분간 가열한 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후 Protran[®] nitrocellulose membrane 에 전이시켰다. 10% skim milk를 함유한 PBST(0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 incubation하면서 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, anti-iNOS 항체와 함께 incubation 후 ECL 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜

iNOS 단백질 발현을 조사하였다. 대조 단백질 밴드로 HSP70을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 관찰하였다.

7) Flow cytometer를 이용한 B세포 Phenotypic analysis

각 실험군의 비장세포의 B 세포 phenotype의 변화를 조사하기 위하여 마우스 비장세포에 각각의 한약재를 처리하고 48시간 배양한 후 배양된 비장세포를 수거하여 cold wash buffer로 세척한 후 10μl의 R-phycoerythrin(R-PE)-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 mAb를 제조회사의 설명에 따라 염색한 후 4℃에서 30분간 배양하였다. 배양 후 cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan(Becton Dickinson, BD biosciences, USA)을 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

결 과

1. 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액의 RAW264.7 대식세포주에서 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현

대표적인 보기약들의 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성능에 관한 효과를 살펴보기 위하여 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약을 10 및 100μg/ml의 용량으로 24시간 배양하여 대식세포에서 NO 생성능에 관해 조사한 결과, 10μg/ml의 농도에서는 NO 생성능의 차이가 관찰 되지 않았다. 100μg/ml의 백출 물추출액의 경우 대조군과 다른 보기약의 추출액에 비해 NO 생성능이 증가됨이 관찰되었다. NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 대조군과 차이를 보이지 않은 인삼, 당삼, 황기 및 산약에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰 할 수 없었다. 그러나, 백출(100μg/ml)의 경우 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다 (Fig. 1).

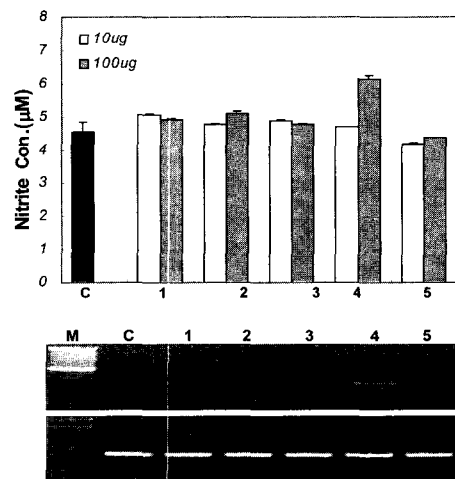


Fig. 1. Effect of Various Herbal Extracts on NO production and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with Various Herbal Extracts for 24h. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes. 1: Ginseng Radix, 2: Ptilose Asia-bell, 3: Astragali Radix, 4: Astractylodes Rhizoma alba, 5: Dioscoreae Rhizoma

2. 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액의 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제효과

인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 LPS와 이들 약재를 동시에 처리시 NO 생성능의 조절 및 Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, LPS 단독 처리시에서는 NO 생성능이 대조군에 비해 유의하게 증가되었으나, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리시, 인삼의 경우는 LPS 단독 처리시와 큰 차이를 발견할 수 없었으나, 다른 약재의 경우 NO 생성능이 감소됨이 관찰되었다. NO 생성 조절과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과 LPS 자극에 의해 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, LPS와 각 약재를 동시에 처리시 iNOS 단백질 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

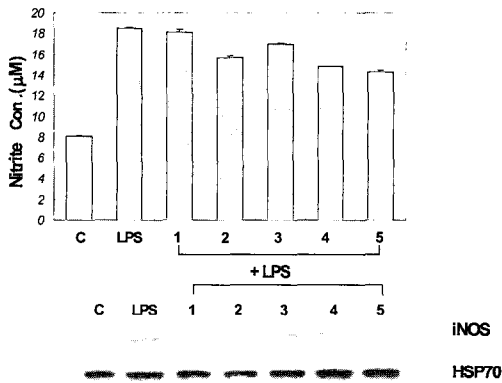


Fig. 2. Effect of Various Herbal Extracts on NO production and iNOS protein expressions in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 µg/ml LPS in the presence of Various Herbal Extracts for 24h. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. The protein extracts were prepared, and then the samples analyzed for iNOS expression by Western blotting as described in the method. HSP70 was used as control protein. 1 : *Ginseng Radix*, 2 : *Pilose Asia-bell*, 3 : *Astragali Radix*, 4 : *Astractylodes Rhizoma alba*, 5 : *Dioscoreae Rhizoma*

3. 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액의 사이토카인 발현에 미치는 영향

인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 T 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 약재를 처리한 후 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조약물로는 T 세포 특이 mitogen인 Concanavalin A (Con. A)를 사용하였다. 마우스 비장세포에 각 추출액 100 µg/ml 농도로 처리한 후 IL-2, IFN γ , IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자 발현을 관찰한 결과, 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 경우 주로 Th1 type의 사이토카인인 IL-2 및 IFN γ 유전자 발현이 관찰되었으며, 황기의 경우 IL-10의 유전자 발현이 유도됨이 관찰되었다(Fig. 3).

4. FACs를 이용한 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액 처리에 의한 비장세포의 B 세포 Phenotypic analysis

인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 B 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 추출액 100 µg/ml 농도를 처리한 후 PE-anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody를 이용해서 표현형을 분석한 결과, 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 경우 CD45R/B220의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 대조약물로는 B세포 특이 mitogen인 LPS를 처리하여 비교하였다.

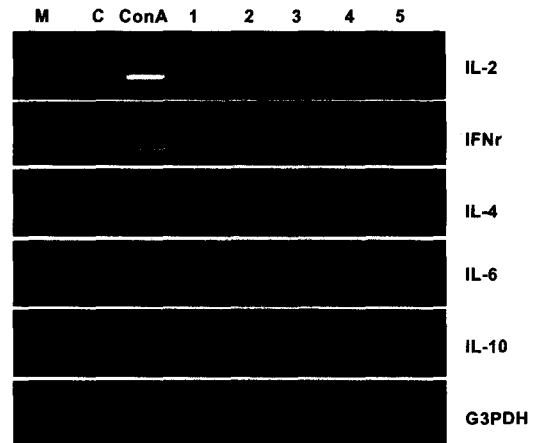


Fig. 3. Effect of Th1/Th2 Cytokine Gene Expressions on Various Herbal Extracts in Mouse Spleen Cells. RAW 264.7 cells were incubated with various herbal medicines in RAW 264.7 cells for 24h. Total RNA was prepared, and IL-2 cytokine gene expressions were analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes. 1 : *Ginseng Radix*, 2 : *Pilose Asia-bell*, 3 : *Astragali Radix*, 4 : *Astractylodes Rhizoma alba*, 5 : *Dioscoreae Rhizoma*

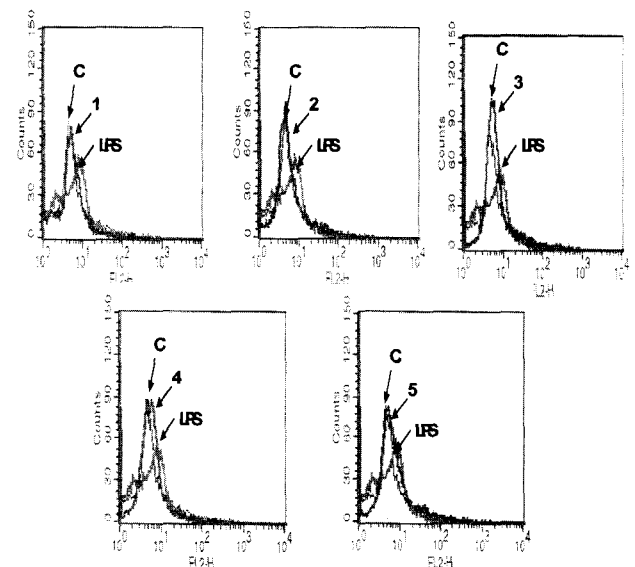


Fig. 4. Flow cytometry analysis of various herbal extracts-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (4×10^6 /ml) were incubated with various herbal extracts or LPS for 48hr. The cultured spleen cells were stained with R-phycoerythrin(R-PE)-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220, and analyzed by flow cytometry. 1 : *Ginseng Radix*, 2 : *Pilose Asia-bell*, 3 : *Astragali Radix*, 4 : *Astractylodes Rhizoma alba*, 5 : *Dioscoreae Rhizoma*

5. 면역억제제에 의한 세포증식능의 변화조사

Methotrexate 면역억제제를 이용하여 RAW264.7 마우스 대식세포주에서 세포증식능이 50% 억제되는 MTX 농도(100 µg/ml)

에 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액 100µg/ml를 처리하여 MTX에 의한 세포증식억제에 미치는 효과를 살펴본 결과, 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액 처리에 의해 세포증식억제가 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 5).

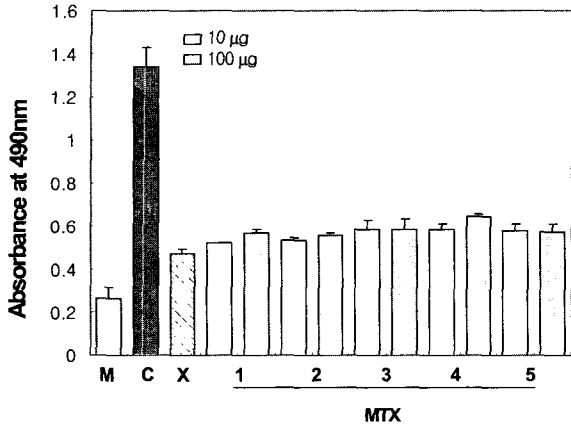


Fig. 5. Effect of on the cell proliferation in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with 10 or 100 mg/ml of Ginseng Radix, Pilose Asia-bell, Astragali Radix, Astractylodes Rhizoma alba, Dioscoreae Rhizoma for 24hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean + S.D in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates significant difference ($p < 0.05$). M : Media only, C : Cell only, X : MTX, 1 : Ginseng Radix, 2 : Pilose Asia-bell, 3 : Astragali Radix, 4 : Astractylodes Rhizoma alba, 5 : Dioscoreae Rhizoma

고찰

補氣藥은 肺氣虛, 脾氣虛, 心氣虛, 腎氣虛 등 인체 元氣가 허해졌을 때 이를 消除 혹은 改善시키는 약물로 人蔘, 黨蔘, 黃芪, 白朮, 山藥, 白扁豆, 甘草, 大棗, 蜂蜜 등이 이에 속한다. 이 중 인삼, 당삼, 황기, 백출, 산약은 氣虛證의 치료를 위한 처방에 君藥 혹은 臣藥으로 多用되는 약물들로서 대표적인 보기약이라고 할 수 있다^{8,9)}.

면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나눌 수 있으며, 혈액, 임파절, 비장 및 위장관 등 생체 여러 조직 및 기관에 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재한다. 면역에 관여하는 세포로는 T 세포, B세포, 대식세포 및 NK 세포 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 T 세포, B세포 및 대식세포로 알려져 있다¹⁾. 세포성 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응으로 T 세포는 Th1 림프구나 Th2 림프구로 분화되어 이들 두 림프구는 상호길항작용에 의해 면역체계를 유지하는 것으로 알려져 있다. 주로 Th1 림프구는 지연형 과민반응, 항미생물 반응 및 종양에 관한 숙주면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며, Th2의 경우 즉시형과민반응, 천식 및 알러지 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 많은 연구에서 한약재의 이러한 Th1 type 관여 면역반응과 Th2 type 면역반응을 조사하기 Th1세포와 Th2 type에서 분비되는 사이토카인 발현에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다. T세포에 의해 분비되는 사이토카인은 자연 및 특이면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을

자극하거나 저해하는 자연면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 특이면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹⁴⁾.

이번 연구에서 대표적 보기약인 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액의 T 세포 작용에 미치는 효과를 마우스 비장세포를 이용하여 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현의 차이를 비교해 본 결과, 각 추출액 100µg/ml 농도 처리 시 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 경우 주로 Th1 type의 사이토카인인 IL-2 및 IFN γ 유전자 발현이 관찰되었다. IL-2 및 IFN γ 유전자는 Th1 세포에서 분비되어 면역세포간의 상호작용을 매개하는 사이토카인으로 실험에 사용된 대표적 보기약의 면역반응 조절에 이들 사이토카인이 관여 할 것으로 생각된다. NO는 T 세포에서 유래된 사이토카인이나 외부 항원의 자극에 의해 활성화되어 생성되어 leishmaniasis, listeriosis 및 tularemia 등 세포 내 감염을 일으키는 미생물에 방어능, tuberculosis, leprosy 및 암 등에 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있으며, 또한 대식세포가 생성하는 NO가 필요 이상으로 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있어 대식세포의 면역반응 조절 연구에 많이 이용되고 있다¹⁵⁻²⁰⁾.

대표적 보기약의 대식세포에서의 면역조절능을 살펴보기 위하여 NO 조절능을 살펴본 결과, 실험에 사용된 대부분의 보기약에서 LPS에 의한 NO 생성능을 감소시킬 수 있음이 관찰되었다. 이는 실험에 사용된 대표적 보기약들이 LPS에 의해 과다하게 생성된 NO의 양을 조절함으로써 면역반응을 조절 할 것으로 생각된다. 대표적 보기약의 체액성 면역반응에 미치는 효과를 살펴보기 위하여, 마우스 비장세포를 이용하여 B 세포 특이 표현형의 항체를 이용하여 표현형이 변화를 관찰한 결과, 실험에 사용된 대표적 보기약의 처리에 의한 B세포 표현형의 변화는 관찰되지 않았다. Methotrexate (MTX)는 면역억제제로서 생체에 투여하게 되면 DNA 합성을 저해하고 세포 독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소 현상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 이러한 MTX로 유도된 면역억제 동물에 한방에서 사용되는 사군자탕이나 사물탕이 면역억제 동물의 면역 기능 항진에 관한 연구 결과들이 보고되었다²¹⁻²⁴⁾. 보기약의 이러한 면역억제제에 미치는 효과를 살펴본 결과, 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약 물추출액 처리에 의해 세포증식억제가 감소되는 것이 관찰되었다.

이러한 결과를 종합해볼 때, 실험에 사용된 대표적 보기약의 면역반응 조절은 B세포에 의한 면역반응보다는 주로 T세포의 활성화와 대식세포의 면역반응 조절등이 이루어져 면역억제제에 의한 면역억제를 보호해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결론

한약재 중 보기약에 속하는 대표적 약물인 인삼(Ginseng Radix), 당삼(Pilosae Asia-bell), 황기(Astragali Radix), 백출(Astractylodes Rhizoma alba) 및 산약(Dioscoreae Rhizoma) 물추

출액을 대상으로 하여 이들 간의 면역반응에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능의 경우 10 μ g/ml의 농도에서는 선정 약재 모두에서 NO 생성능의 차이가 관찰되지 않으나, 100 μ g/ml의 백출 물추출액의 경우 대조군과 다른 보기약의 추출액에 비해 NO 생성능이 증가됨이 관찰되었다. NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사한 결과, 산약(100 μ g/ml)의 경우 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 이들 약재의 NO 생성 억제능 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 살펴본 결과, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리시, 인삼의 경우는 LPS 단독 처리시와 큰 차이를 발견 할 수 없었으나, 다른 약재의 경우 NO 생성능이 감소됨이 관찰되었으며, iNOS 단백질 발현 또한 감소되는 것을 관찰되었다. 이들 약재의 T 세포에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 약재를 처리 한 후 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 주로 Th1 type의 사이토카인인 IL-2 및 IFN γ 유전자 발현이 관찰되었으며, 황기의 경우는 IL-2, IFN γ 및 IL-10의 유전자 발현이 유도됨이 관찰되었다. B 세포에 미치는 효과를 살펴보기 위해 PE-anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody를 이용해서 표현형을 분석한 결과, 인삼, 당삼, 황기, 백출 및 산약의 경우 CD45R/B220의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 면역억제제를 이용하여 RAW264.7 마우스 대식세포주에서 세포증식 억제 보호효과를 살펴본 결과 이들 약재 처리에 의해 세포증식 억제가 감소되는 것이 관찰되었다. 이상의 결과를 종합해볼 때, 선정된 대부분의 보기약은 B세포에 의한 면역반응보다는 T세포 중 Th1 type 사이토카인 유도 및 대식세포에서 NO 조절 등에 관여하여 면역 반응에 관여하며, 이러한 면역반응은 면역억제제에 의한 면역억제를 보호해 주는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 김세종. 면역학. p 1-21, 고려의학, 서울, 1994.
2. 安德均. 면역과 한방. p 19-21, 열린책들, 서울, 1994.
3. 김기환, 이인란, 정인성, 정희용, 윤연숙. 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현. 고려인삼학회지. 22: 324-330. 1998.
4. 표명윤, 양기숙, 현수미. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide 로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. 응용약물학회지. 9: 194-200. 2001.
5. 백남인, 김영숙, 경중수, 박기현. 황기(黃耆)의 간기능 보호 성분. 생약학회지. 27: 111-116. 1996.
6. 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향. 대한면역학회지. 12:

- 113-118. 1990.
7. 김영성, 정승기, 이형구. 어성초 및 상국음이 면역기능에 미치는 영향. 대한한의학회지. 16: 295-318. 1995.
8. 전국한의과대학 본초학교수. 本草學. p 544, 영림사, 서울, 1991.
9. 전국한의과대학 병리학교실. 한방병리학. p 218, 일지사, 서울, 2002.
10. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to Candida albicans. J Microbiol Biotechnol. 10: 8-15. 2000.
11. Okamura S, Shimoda K, Yu LX, Omori F, Niho Y. A traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-yoei-to) augments the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Int J Immunopharmacol. 13: 595-598. 1991.
12. 김종수, 신상습, 김철호, 박선동, 박원환. 신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine의 IL-6 발현에 미치는 영향. 대한침구학회지. 15: 147-155. 1998.
13. 송봉근, 이언정, 김형균, 진선두, 김성재, 김동혁. 황기가 면역세포의 기능에 미치는 영향. 대한본초학회지. 13: 115-128. 1998.
14. 김용석, 이재동, 김창환, 최도영, 박동석, 남상수, 강성길, 이윤호, 안병철, 최용태, 고희균, 주정주. 공진난 약침자극이 혈액 및 각 면역 조직의 임파구와 CD4+ T세포에 미치는 영향. 대한침구학회지. 16: 179-202. 1999.
15. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999.
16. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol 35, 21-28, 2000.
17. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci 69, 625-635, 2001.
18. Ishihara T, Okura T, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J Ethnopharmacol 72, 141-150, 2000.
19. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406, 301-309, 2000.
20. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of Rhodiola sachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. J

- Ethnopharmacol 76, 119-123, 2001.
21. 김창환, 고희균, 배원영. 황기수침(黃耆水鍼)이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지. 11: 49-66. 1994.
 22. 김일영, 이상재, 김광호. 하수오가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 4: 152-169. 2000.
 23. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 동국대학교대학원 박사학위논문. 1996.
 24. YS Lee, OK Han, CW Park, SI Suh, SW Shin, CH Yang, TW Jeon, ES Lee, KJ Kim, HJ Kim. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J Ethnopharmacol 84, 193-198, 2003.