

귀비탕이 Stress 부하 후 혈중 호르몬 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향

은재순* · 송정모¹

우석대학교 약학대학, 1: 한의과대학

Effects of Kwibi-tang on Serum Levels of Hormone and the Non-Specific Immune Response after Immobilization Stress in Mice

Jae Soon Eun*, Jung Mo Song¹

College of Pharmacy, 1: College of Oriental Medicine, Woosuk University

To investigate the effects of Kwibi-tang water extract (KBT) on the non-specific immune response in C57BL/6 mice stressed by immobilization, we evaluated the changes in the contents of serum histamine and corticosterone and the phagocytic activity of macrophages. The level of serum histamine and corticosterone was determined with spectrofluorometer. The cell viability was determined by a MTT assay method. The subpopulation of lymphocytes was determined by a flow cytometry. The phagocytic activity was determined with luminometer. KBT decreased the serum level of histamine and corticosterone increased by immobilization stress. Also, KBT enhanced the phagocytic activity and decreased the level of nitric oxide in murine peritoneal macrophages decreased by immobilization stress. These results indicate that KBT may be useful for the prevention and treatment of stress via suppression of serum histamine and corticosterone level and enhancement of the non-specific immune response.

Key words : Kwibi-tang(歸脾湯), stress, histamine, corticosterone, phagocytosis

서론

스트레스는 외부환경의 물리적, 심리적, 정신적 압력과 내부 보호 저항력 사이의 균형이 깨져, 인간개체의 보호 능력이 손상되어 신체 및 정신적으로 증상이 나타난다. 생체에는 면역현상과 같은 특이적인 방어기구 외에 외상, 감염, 속박, 고·저온 및 정신적인 stress 등의 자극을 방어하는 비특이적방어기구 (stress 반응)가 존재하여, 외부 환경의 변화에도 불구하고 내적 환경을 항상 일정하게 유지하려는 자율신경계 - 부신수질계의 항상성 (homeostasis) 유지 기구가 있다. 이러한 생체의 방어반응이 일어나는 것을 general adaptation syndrome이라 하며, 경고반응기, 저항기 및 피로기의 3단계로 구분된다^{1,2)}. 현재까지 stress의 first mediator로는 histamine, vassopressin, catecholamine, serotonin, CRF 및 ACTH 등이 알려져 있다³⁻⁸⁾. 최근에는 stress가

corticosteroid를 증가시켜 면역억제작용을 나타낼 뿐만 아니라 lymphocytes 및 macrophages의 활성화에도 영향을 주어 면역계를 변화시키는데, 면역계에 대한 stress의 영향은 glucocorticoid에 의해 mediate 될 뿐만 아니라 catecholamines, endogenous opioids 및 pituitary hormone 등에 의해서도 mediate 된다고 알려져 있다^{9,10)}.

본 연구는 현대인의 질병 원인 중 가장 커다란 요인이 되고 있는 stress를 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 진행되었다. 실험에 사용한 한방탕제인 歸脾湯은 思慮過度하고 勞傷心脾하여 怔忡, 健忘, 驚悸, 盜汗, 發熱, 體倦하고 食少 不眠하며, 혹은 脾虛로 血을 統攝하지 못하여 血이 妄行하는 모든 證을 다스리는 處方이다¹¹⁾.

연구자들은 귀비탕이 특이적 면역반응을 증강시켜 stress에 효능이 있음을 이미 보고한바 있다¹²⁾. 따라서 본 실험에서는 귀비탕이 혈 중 호르몬 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 관찰하고자, 귀비탕을 경구로 투여한 다음 생쥐 (C57BL/6)에 immobilization stress를 가하고 혈 중 histamine 및

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학
· E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1569
· 접수 : 2003/11/18 · 수정 : 2003/12/22 · 채택 : 2004/01/15

corticosterone 양의 변화와 복강 macrophages의 phagocytic activity 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간의 지연을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용한 mouse는 C57BL/6계 수컷 18±2 g을 대한 실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20±3 ℃, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 phospho-cellulose powder, orthophthal aldehyde는 Wako Co., histamine · 2HCl, corticosterone, Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), FITC-conjugated *E. coli* particle, lipopolysaccharide (LPS, 055:B5), γ -interferon (γ -IFN, Huv-IFN), N-naphthylethylenediamine · 2HCl, lucigenin, zymosan, sulfanilamide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture 용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), spectrofluorometer (Kotron Co.), luminometer (Berthold Co. 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 귀비탕의 구성은 방약합편¹¹⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Kwibi-tang(KBT)

韓藥名	生藥名	重量 (g)
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
龍眼肉	<i>Longanae Arillus</i>	4
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Spinosi Semen</i>	4
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	4
人參	<i>Ginseng Radix Alba</i>	4
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	4
白茯苓	<i>Hoelen Alba</i>	4
木香	<i>Saussureae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	12
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	4
Total		43.2

처방 3첩 분량을 증류수 2,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 귀비탕 분말 27.0g (이하 KBT라 함)을 얻어, 동물 실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

4. Immobilization stress 부하

1) Stress 2시간 부하 조건

생쥐 1군을 5 마리로 하여 normal군 (정상군) 및 control군 (stress 부하군)에는 생리식염수만을 실험군에는 KBT 500 mg/kg을 경구로 1회 투여하고, 1 시간 후에 생쥐를 바닥에 등쪽으로 눕힌 후 반창고로 다리, 꼬리 및 입을 움직이지 못하게 고정하여 2 시간 동안 immobilization stress를 가한 후 histamine 및 corticosterone 측정시에는 즉시 도살하였으며, thymocytes 및 splenocytes 실험시에는 15 시간 후에 도살하였다. 또한 반복투여에 의한 KBT의 영향을 알아보기 위해, 500 mg/kg을 1일 1회씩 5 일간 경구투여한 후 동일한 실험을 실시하였다.

2) Stress 15시간 부하 조건

생쥐 1군을 5 마리로 하여 normal군 (정상군) 및 control군 (stress 부하군)에는 생리식염수만을 실험군에는 KBT 500 mg/kg을 경구로 1회 투여하고, 1 시간 후에 생쥐를 플라스틱 원통에 넣어 움직이지 못하게 하여 15 시간 동안 immobilization stress를 가한 후 즉시 도살하였다. 또한 반복투여에 의한 KBT의 영향을 알아보기 위해, 500 mg/kg을 1일 1회씩 5 일간 경구투여한 후 동일한 실험을 실시하였다.

5. 혈청 중 Histamine 함량 측정

Immobilization stress를 가한 생쥐를 단두하여 얻은 혈액을 원심분리 (3,000 rpm, 10 min.)하여 혈청을 얻었다. 혈청 1 ml당 0.4N-HClO₄ 2.5 ml를 가하여 단백질을 제거한 후 격렬하게 진탕하고 원심분리 (3,000 rpm, 5 min.)하여 상층액을 분리하였다. 미리 활성화시킨 phospho-cellulose powder를 3 × 0.6 cm column에 충전한 후 0.03M-phosphate buffer와 0.06M-phosphate buffer로 차례로 세척한 다음 물로 세척하고 0.1M-borate buffer를 histamine 용출용매로 사용하여 용출시켰다. 용출액 3 ml에 orthophthal aldehyde 0.2 ml를 가하여 spectrofluorometer (excitation: 350 nm, emission: 444 nm)로 형광을 측정하여 표준 histamine 검량선에 의해 정량하였다¹³⁾.

6. 혈청 중 Corticosterone 함량 측정

동일한 방법으로 얻은 혈청 중 corticosterone 함량은 Zenker 등의 방법¹⁴⁾에 준하였다. 즉 혈청 0.3 ml에 증류수 0.7 ml를 넣어 혼합하고 chloroform 10 ml를 가하여 15초 이상 격렬하게 진탕한 다음 원심분리 (2,500 rpm, 5 min.)하여 상층액을 제거하였다. 다시 chloroform층을 0.1N-NaOH 용액 1 ml로 세척한 다음 원심분리 후 상층액을 분리 제거하였다. 세척한 chloroform층 9 ml에 형광시액 (H₂SO₄ : 50% C₂H₅OH = 2.4 : 1) 3 ml를 가한 다음 15초 이상 격렬하게 진탕하였다. 원심분리 (2,500 rpm, 5 min.)한 후, 상층의 chloroform층을 완전히 제거하고 잔류액을 2

시간 동안 발색시킨 후 spectrofluorometer (excitation: 470 nm, emission: 520 nm)로 형광을 측정하여 표준 corticosterone 검량선에 의해 정량하였다.

7. 세포분리

Immobilization stress를 가한 생쥐의 macrophage의 분리는 stress를 가하기 3일 전에 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하여 실험하였다. 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

8. 복강 macrophages의 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 macrophage를 2 × 10⁶ cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 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^{15,16}. 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 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

9. 복강 macrophage의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 µg/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 1 × 10⁵ cells/ml 되도록 조정 한 후, 100 µl를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25 µl를 가 하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 µl를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다¹⁷.

10. 복강 macrophages의 nitric oxide 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 2 × 10⁶ cells을 분주한 후 macrophage로 부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법¹⁸으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 첨가하여 24시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96 well module에 넣

고, 37 °C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

11. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 Student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. 혈청 중 histamine 함량에 미치는 효과

Stress를 가하지 않은 normal군의 혈청 중 histamine 함량은 50.8±3.8 ng/ml 이었으나, 2시간 stress를 가한 control군은 68.6±3.7 ng/ml로 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가하였을 때는 62.4±3.8 ng/ml로 control군에 비해 별 차이가 없었으나, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가하였을 때는 57.5±3.1 ng/ml로 감소하였다. 15시간 stress를 가한 control군은 78.4±4.3 ng/ml로 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가하였을 때는 72.6±3.2 ng/ml로 control군에 비해 별 차이가 없었으나, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가하였을 때는 64.5±3.4 ng/ml로 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of KBT on the concentration of serum histamine in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Histamine (ng/ml)
Normal	-	Saline	50.8±3.8
Control	2	Saline	68.6±3.7*
KBT	2	500 (1 day)	62.4±3.8
KBT	2	500 (5 day)	57.5±3.1*
Control	15	Saline	78.4±4.3**
KBT	15	500 (1 day)	72.6±3.2
KBT	15	500 (5 day)	64.5±3.4*

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 5 days, and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The serum histamine was determined with spectrofluorometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. *, Significantly different from normal group (*: p<0.01, **: p<0.001). *: Significantly different from control group (p<0.05).

2. 혈청 중 corticosterone 함량에 미치는 효과

Stress를 가하지 않은 normal군의 혈청 중 corticosterone 함량은 326.7±13.8 ng/ml 이었으나, 2시간 stress를 가한 control군은 482.9±25.7 ng/ml로 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가하였을 때는 453.7±23.7 ng/ml로 control군에 비해 별 차이가 없었으나, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가하였을 때는 383.3±22.8 ng/ml로 감소하였다. 15시간 stress를 가한 control군은 469.7±25.2 ng/ml로 대조군에 비해 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가하였을 때는 425.6±18.5 ng/ml로 control군에 비해 별 차이가 없었으나, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가하였을 때는 355.3±17.8 ng/ml로 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of KBT on the concentration of serum corticosterone in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Corticosterone (ng/ml)
Normal	-	Saline	326.7±13.8
Control	2	Saline	482.9±25.7*
KBT	2	500 (1 day)	453.7±23.7
KBT	2	500 (5 day)	383.3±22.8 [#]
Control	15	Saline	469.7±25.2*
KBT	15	500 (1 day)	425.6±18.5
KBT	15	500 (5 day)	355.3±17.8 [#]

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 5 days, and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The serum corticosterone was determined with spectrophotometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. *, Significantly different from normal group ($p < 0.001$). [#]: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

3. 복강 macrophages의 lucigenin chemiluminescence에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. Normal군의 macrophages로부터 생성되는 CL양 보다 stress를 2시간 부하한 control군의 macrophages에서 생성되는 CL 양은 normal군에 비해 약간 감소하였으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 macrophages에서 생성되는 CL양은 control군에 비해 증가하였다. Normal군의 macrophages로부터 생성되는 CL양 보다 stress를 15시간 부하한 control군의 macrophages에서 생성되는 CL양은 normal군에 비해 현저히 감소하였으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 macrophages에서 생성되는 CL양은 control군과 별 차이가 없었다 (Fig. 1). 이러한 현상은 FITC-conjugated *E. coli* particle의 탐식능 실험에서도 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

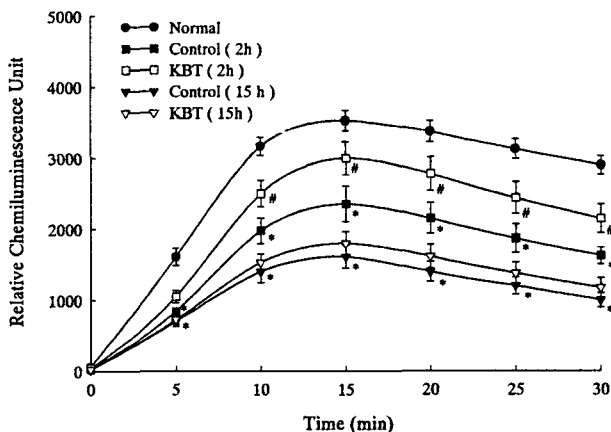


Fig. 1. Effects of KBT on lucigenin chemiluminescence in immobilization stress mice. KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. *, Significantly different from normal group ($p < 0.001$). [#]: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

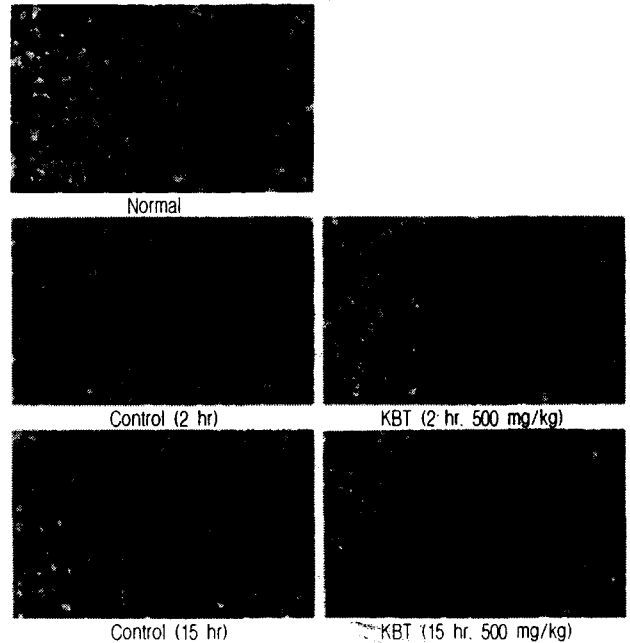


Fig. 2. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from KBT-administered mice. KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days. Photographs (taken at 200 × magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles. The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

4. 복강 macrophages의 nitric oxide 생성에 미치는 효과

Normal군의 macrophages로부터 생성되는 nitric oxide (NO) 양은 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 $3.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 $22.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 로 증가하였으며, stress를 2시간 부하한 control군의 macrophages에서 생성되는 NO양은 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 $16.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 로 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 macrophages에서 생성되는 NO양은 $11.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 로 감소하였다. Stress를 15시간 부하한 control군의 macrophages에서 생성되는 NO양은 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 $13.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 로 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 macrophages에서 생성되는 NO양은 $11.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 로 control군에 비해 별 차이가 없었다 (Table 4).

Table 4. Effect of KBT on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Nitric oxide (μM)
Normal	-	Saline	22.3 ± 1.2
Control	2	Saline	$16.6 \pm 1.5^*$
KBT	2	500	$11.4 \pm 1.1^{\#}$
Control	15	Saline	$13.4 \pm 0.7^{**}$
KBT	15	500	11.8 ± 0.4

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI1640 media in the presence LPS and γ -interferon. The data represents the mean±SE of 5 mice. *, Significantly different from normal group (*: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$). [#]: Significantly different from control group ($p < 0.01$). The nitric oxide production of LPS and γ -interferon non-treated group is $3.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$.

고 찰

歸脾湯은 宋代의 嚴²⁰⁾에 의하여 濟生方에 최초로 수재된 처방으로 思慮過度로 心·脾를 傷함으로 인한 健忘怔忡을 치료할 목적으로 立方되어 心脾兩虛, 氣血不足으로 인한 증상을 치료하는 처방이다.

Stress는 corticosterone^{21,22)} 및 catecholamine^{23,24)}과 같은 생체 hormone 합성을 증가시켜 면역능을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, 정신적인 stress는 phagocytosis의 감소, lymphocyte의 반응성 감소 및 natural killer cell의 활성을 감소시킴으로써 bacteria나 virus에 의한 질병 유발율이 매우 커지게 되며^{25,26)}, 암세포의 증식도 촉진되는 것으로 보고되었다²⁷⁾. 또한, 면역계는 다양한 stress에 의해 영향을 받아 그 기능이 감소하는 것으로 알려져 있는데, 특히 특이적 및 비특이적 면역계가 억제되고 있음이 보고되었다^{27,29)}.

한편, stress는 동일한 stress라 하더라도 주어지는 시간 및 사용한 쥐의 strain에 따라 면역계에 미치는 영향에 차이가 있다고 알려져 있다^{30,31)}. 따라서 본 실험에서는 immobilization stress의 조건을 2시간 및 15시간으로 하여 실험하였으며, KBT 투여 방법도 1회 및 5회로 하여 1회 투여 및 반복투여의 효과를 관찰하였다. 또한, 사용한 생쥐는 면역계에 민감한 반응을 나타내는 C57BL/6J를 사용하였다.

귀비탕 (KBT)이 immobilization stress에 의해 변화되는 혈 중 corticosterone 및 histamine 합량과 면역계에 대해 영향을 관찰하고자 실험한 결과, 생쥐에 immobilization stress를 2시간 및 15시간 부하 하였을 때 serum histamine양은 normal군에 비해 증가하였으며, 15시간 부하 하였을 때가 2시간 부하 하였을 때에 비해 더욱 증가하였다. KBT 1일 및 5일 투여하였을 때 serum histamine양은 감소하였으며, 5일 투여하였을 때가 1일 투여하였을 때보다 더 많이 감소하였다. 이러한 결과는 stress의 기간이 길수록 histamine의 분비도 증가하고 있음을 시사하는 것이며, KBT가 histamine의 분비를 억제하여 stress에 영향을 주고 있음을 의미하는 것으로서, 이러한 결과는 cold stress³²⁾ 및 electric shock stress³³⁾ 시 serum histamine이 증가한다는 보고와도 동일한 결과이다.

생쥐에 immobilization stress를 2시간 및 15시간 부하 하였을 때 serum corticosterone양은 normal군에 비해 증가하였으며, 2시간 부하 하였을 때가 15시간 부하 하였을 때에 비해 더욱 증가하였다. Stress의 기간이 길어지면 serum corticosterone의 분비가 감소한다는 결과는 stress의 시간 경과에 따른 생체의 적응 때문이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다. KBT 1일 투여하였을 때는 serum corticosterone양에 영향을 주지 않았으나, 5일 투여하였을 때는 serum corticosterone양은 control군에 비해 감소하였다. Stress에 의해 serum corticosterone양이 증가하였다는 본 실험의 결과는 stress에 의해 serum corticosterone양이 증가한다는 Li 등³⁴⁾ 및 Eun 등²²⁾의 결과와도 동일한 결과이다. Nakano 등³⁵⁾은 부신 적출 rat에 stress를 부하하면 정상 rat에 비해 사망률이 증가하는데, glucocorticoid를 전처리하면 사망률이 감소한다고 하였으며,

Nakano 등³⁶⁾은 stress 부하시 glucocorticoid의 분비에 histamine이 직접적인 mediator로써 관여한다고 하였다. 본 실험에서 KBT 투여시 corticosterone의 분비가 감소하였다는 결과는 KBT가 serum histamine의 분비를 억제하여 corticosterone의 분비를 억제할 것이 아닌가 추정된다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 이러한 phagocytosis는 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. Phagocytosis는 면역적인 측면에서 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다¹⁹⁾. Macrophage로부터 생성되는 chemiluminescence(CL)를 측정할 결과 stress를 2시간 부하 하였을 때 CL 양이 약간 감소하는 경향이었으나, KBT 500 mg/kg을 5일간 투여하였을 때는 control군에 비해 CL 양이 control군에 비해 증가하였다. Stress를 15시간 부하 하였을 때는 CL 양이 stress를 2시간 부하 하였을 때에 비해 더욱 감소하였고, KBT 500 mg/kg을 5일 투여하였을 때 control군에 비해 CL 양에 별 차이가 없었으며, 이러한 결과는 E. coli engulfment 실험을 통해서도 확인할 수 있었다. 본 실험 결과는 단 시간의 stress에 의해 감소되는 macrophages의 탐식능은 KBT가 회복시킬 수 있으나, 장시간의 stress에 의해 감소되는 macrophages의 탐식능은 KBT가 회복시킬 수 없음을 의미하는 것이다. Macrophages의 탐식능에 NO가 관여하고 있을 가능성을 확인하기 위해 NO 양을 측정하였다. Stress를 2시간 부하 하였을 때 macrophages로부터 nitric oxide (NO) 양은 감소하였으며, KBT 500 mg/kg을 5일 투여하였을 때 control군에 비해 NO 양이 감소하였다. Stress를 15시간 부하 하였을 때는 NO 양이 현저히 감소하였으며, KBT 500 mg/kg을 5일 투여하였을 때 control군에 비해 NO 양이 별 차이가 없었다. 본 실험에서 2시간 및 15시간 stress를 부하 하였을 때 macrophages의 phagocytic activity가 감소하고 NO 생성이 감소하였으며, 15시간 stress를 부하 하였을 때가 2시간 stress를 부하 하였을 때에 비해 더욱 감소되었다. 이는 stress에 의해 macrophages가 주도하는 비특이적 면역 반응이 감소됨을 시사하는 것이다. NO는 활성화된 macrophages의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에³⁷⁾, KBT를 투여하였을 때 phagocytic activity가 증가되고 NO 생성이 억제되었다는 것은 KBT에 의한 phagocytic activity의 증가에 NO가 일부 관여하고 있을 가능성을 시사하는 것이라 할 수 있으나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

결 론

귀비탕 (KBT)이 생쥐에 immobilization stress 부하 후 혈중

hormone 및 non-specific immune response에 미치는 영향은 다음과 같다. KBT는 immobilization stress에 의해 증가되는 serum histamine 양을 감소시켰고, serum corticosterone 양을 감소시켰으며, immobilization stress에 의해 감소되는 macrophages의 phagocytic activity를 증가시켰다. 또, KBT는 immobilization stress에 의해 감소된 nitric oxide의 양을 더욱 감소시켰다.

이상의 실험결과 귀비탕은 immobilization stress에 의해 증가되는 histamine 및 corticosterone의 양을 억제하고, 감소되는 비특이적 면역능을 회복시켜 stress를 회복시킬 수 있는 탕제라고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Kopin, I.J.: Catecholamines, adrenal hormones, and stress: In Neuroendocrinology (ed. Krieger, D.T., Hugjes, J.C.), Sinauer Association Inc., p.159, 1980.
- Guillemin, R.G.: Beta-lipotropin and endorphin: Implications of current knowledhe: In Neuroendocrinology (ed. Krieger, D.T., Hugjes, J.C.), Sinauer Association Inc., p.67, 1980.
- Bugajski, J. and Gadek, A.: Central H1- and H2-histaminergic stimulation of pituitary-adrenocortical response under stress in rats. Neuroendocrinology, 36(6), 424-430, 1983.
- Mormede, P.: The vasopressin receptor antagonist dPTyr (Me) AVP does not prevent stress-induced ACTH and corticosterone release. Nature, 302(5906), 345-346, 1983.
- Rivier, C. and Vale, W.: Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. Nature, 305(5932), 325-327, 1983.
- Fuller, R.W. and Sonddy, H.D.: Effect of serotonin-releasing drugs on serum corticosterone concentration in rats. Neuroendocrinology, 31(2), 96-100, 1980.
- Nakane, T., Audhya, T., Kanie, N. and Hollander, C.S.: Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing factor in cold, ether, immobilization, and traumatic stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(4), 1247-1251, 1985.
- Kaneko, M., Kancko, K., Shinsako, J. and Dallman, M.F.: Adrenal sensitivity to adrenocorticotropin varies diurnally. Endocrinology, 109(1), 70-75, 1981.
- Ader, R.: Psychoneuroimmunology. Academic Press, New York, pp.15-57, 1981.
- Danzer, R. and Kelley, K.W.: Stress and immunity: an integrated view of prelationships between the brain and the immune system. Life Sciences, 44(26), 1995-2008, 1989.
- 申載鏞: 方藥合編解說, 成輔社, 서울, p.61, 1988.
- Lee, T.Y., Han, M.S., Lee, D.H., Ko, D.W., Oh, C.H., Song, J.M., Eun, J.S.: Effects of Kwibi-tang on the specific immune response after immobilization stress in C57BL/6 mice. Korean Journal Oriental Physiology & Pathology. 17(5), 1208, 2003.
- Endo, Y.: In methods in Enzymology. Academic Press, pp.94-100, 1983.
- Zenker, N. and Bernstein, D.E.: J. Biol. Chem., 231, 695, 1958.
- Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.: Chemiluminenscence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259, 1994.
- Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminenscence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112, 163, 1988.
- Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.: A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immuno. Methods, 1993;162:1.
- Rocket, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A.: Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immunity, 59(9), 3280, 1991.
- Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr. R. B.: Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. J. Leucocyte Biol., 41, 450-455, 1987.
- 嚴用和: 嚴氏濟生方, 北京, 人民衛生出版社, p.117, 1980.
- Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Limori, K., Hoaki, Y., Tsuda, A. and Nagasaki, N.: Naloxone enhances stress-induced in noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. Life Sci., 30(19), 1663-1669, 1982.
- Eun, J. S., Oh, C. H. and Han, J. H.: Effects of Glycyrrhizae Radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. Kor. J. Pharmacogn., 20(1), 37-42, 1989.
- Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S. and Nagasaki, N.: Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. Pharmacol. Biochem. Behav., 16(2), 315-319, 1982.
- Shin, J. S., Lee, S. S., Kim, E. I., Shim, S. M. and Lee, M. K.: Effects of berberine on serum levels of catecholamines after immobilization stress in mice. Kor. J. Clin. Pharm., 7(2), 81-85, 1997.
- Nagata, S.: Stress-induced immune changes, and brain-immune interaction. J. UOEH, 15(2), 161-171, 1993.
- Teshima, H., Sogawa, H., Kihara, H., Kubo, C., Mori, K.

- and Nakagawa, T.: Prevention of immunosuppression in stressed mice by neurotrophin(NSF). *Life Sci.*, 47(10), 869-876, 1990.
27. Teshima, H., Sogawa, H., Kihara, H. and Nakagawa, T.: Influence of stress on the maturity of T-cells. *Life Sciences*, 49(21), 1571-1581, 1991.
 28. Antelman, S.M., Cunnick, J.E., Lysle, D.T., Caggiula, A.R., Knopf, S., Kocan, D.J., Rabin, B.S. and Edwards, D.J.: Immobilization 12 days (but not one hour) earlier enhanced 2-deoxy-D-glucose-induced immunosuppression: evidence for stressor-induced time-dependent sensitization of the immune system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 14(4), 579-590, 1990.
 29. Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T. and Weinstock, M.: Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol. Behav.*, 63(3), 397-402, 1998.
 30. Schedlowski, M. and Schmidt, R.E.: Stress and the immune system. *Naturwissenschaften*, 83(5), 214-220, 1996.
 31. Shanks, N. and Kusnecov, A.W.: Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice: in vivo dependence on macrophages. *Physiol. Behav.*, 65(1), 95-103, 1998.
 32. Beaven, M.A.: Histamine (second of two parts). *New. Engl. J. Med.*, 294(6), 320-325, 1976.
 33. Campos, H.A. and Jurpe, H.: Evidence for a cholinergic mechanism inducing histamine increase in the rat brain in vivo. *Experientia*, 26(7), 746-747, 1970.
 34. Li, T., Harada, M., Tamada, K., Abe, K. and Nomoto, K.: Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4⁺ T cells. *Anticancer Res.*, 17(6D), 4259-4268, 1997.
 35. Nakano, K., Suzuki, S., Oh, C.H. and Yamashita, K.: Possible role of glucocorticoids in a complement-activated state induced by cobra venom factor in rats. *Acta Endocrinol.*, 112(1), 122-129, 1986.
 36. Nakano K., Suzuki S. and Oh C.: Significance of increased secretion of glucocorticoids in mice and rats injected with bacterial endotoxin. *Brain Behavior and Immunity*, 1(2), 159-172, 1987.
 37. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.*, 18, 635-644, 1996.