大韓本草學會誌 제20권 제4호 (2005년 12월)
Kor. J. Herbology 2005 ; 20(4) : 141-149

忍冬藤의 免疫調節作用에 대한 實驗的 硏究(Ⅱ)

- 忍冬藤 각 fraction이 mice 비장세포에서 cytokines 생성에 미치는 영향 -

이영철#, 권택현, 옥인수, 서창우, 김양진, 노성수[1], 서영배[1*]

상지대학교 한의과대학 본초학교실, 1 : 대전대학교 한의과대학 본초학교실

The experimental Studies on the immunomodulational effects of Lonicerae Caulis et Folium.

- the effects of Lonicerae Caulis et Folium on cytokines production in mice splenocytes -

Young-Cheol Lee#, Taek-Hyun Kwon, In-Soo Ok, Chang-Woo Seo, Yang-Jin Kim, Seong-Soo Roh[1], Young-Bae Seo[1*]

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju 220-702, Korea,
1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

Abstract

In order to investigate the immunomodulational effects of Lonicerae Caulis et Folium, the author measured cytokines production(IL-10, IL-12(P35), IL12(P40), IFN-γ) in mice splenocytes.

The results were obtained as follows :

1. The water extract of Lonicerae Caulis et Folium significantly enhanced the gene expression of IL-12(P35), IL-12(P40), but reduced the gene expression of IL-10, IFN-γ.

2. In water fraction and ethyl acetate fraction, the gene expression of IL-12(P35), IFN-γ was sinificantly increased and that of IL-12(P40), IL-10 was decreased.

The above results demonstrate that Lonicerae Caulis et Folium has enhancing immune activity by upregulation of these cytokines. Therefore, if we make the relationship between these cytokines(IL-10, IL-12, IFN-γ) besides IL-1, IL-4, IL-6, TNF-α, IL-8, TGF-β and so on which concerned with immunopotentiation, the immunopotentiational mechanism of Lonicerae Caulis et Folium will be shown clearly.

Key words : Lonicerae Caulis et Folium, IL-10, IL-12, IFN-γ.

#제1저자 : 이영철. 상지대학교 한의과대학 본초학교실.
E-mail : lyc072@sangji.ac.kr, Tel : 033-730-0672, Fax : 033-730-0653
*교신저자 : 서영배. 대전대학교 한의과대학 본초학교실
E-mail : genin@dju.ac.kr, Tel : 042-280-2625
· 접수 : 2005년 10월 26일 · 수정 : 2005년 12월 16일 · 채택 : 2005년 12월 20일

서 론

인동등은 ≪名醫別綠≫[1]에 "味甘, 溫, 無毒. 主治寒熱身腫. 久服輕身, 長年, 益壽. 十二月採, 陰乾."라고 최초로 수록되었으며, 인동과에 속한 다년생 반상록 纏繞灌木인 인동 (*Lonicera japonica THUNB.*) 및 동속근연식물의 경지 및 경엽을 건조한 것으로, 淸熱解毒, 疏風通絡, 凉血止痢 및 疏散風熱 등의 효능으로 溫病發熱, 熱毒血痢, 癰腫瘡瘍, 風濕熱痺, 關節紅腫熱痛, 外感風熱, 瘟病, 熱毒血痢, 各種 癰疽, 腫毒 등에 사용되고 있다[2,3].

인동등의 성분은 황동류 화합물인 luteolin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid가 대부분을 차지하며, 휘발유인 cis-2,6,6-trimethyl-2-ethenyl-5-hydroxy-tetrahydropyrane, linalool 등이 0.6%를 차지하며 이외에 미량의 loganin, ino-sitol, alcohol, saponin, tannins 등을 함유하고 있다[4]. 이들 성분중 chlorogenic acid 함량은 현재 금은화 및 인동의 품질지표로써 사용되며[5], chlorogenic acid는 체내에서 단백질의 생성과 소멸에 관여하며, 백혈구 세포의 증식작용을 증가시키는 것으로 보고되었다.

인동등의 실험적 연구 보고로 Kang 등[6]은 인동의 물분획이 HMC-1 비만세포주에 대한 활성을 억제함을 보고하였고, Kim 등[7]은 인동등의 주성분인 luteolin이 직장 상피세포에서 IL-8 생성을 억제함을 보고하였으며, Lee 등[8]은 금은화의 TNF-α 생성을 억제함으로써 항염작용이 있음을 보고하였다. 또한 Tae 등[9]은 TNF-α 생성을 억제함으로써 proteinase-activated receptor 2 (PAR2)로 야기되는 생쥐의 부종에 대해 인동등 물 추출물이 억제작용이 있음을 보고하였고, 이외에 인동의 호중구 탐식능 증가작용[10], 간손상에 대한 보호 효과 [11]등이 보고되었다. 저자는 앞선 연구[12]에서 인동등에 의하여 생쥐 비장세포의 증식효과, 백혈구 증가 및 $CD4^+$ T cell, $CD8^+$ T cell, $CD19^+$ B cell의 증가 등의 면역증진 효과를 입증하였다.

이와같이 인동등은 면역억제 뿐만 아니라 면역증진에도 일정하게 작용하는 것으로 밝혀져, 특히 면역조절작용과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되나 아직까지 면역조절에 대한 연구가 미진한 상태이다. 이에 저자는 인동등의 효능, 생장적 특성 및 연구 보고 등을 바탕으로 면역조절작용을 살펴보기 위하여 *in vitro*에서의 IL-10, IL-12, IFN-γ 등의 유전자 발현을 측정하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험 방 법

1. 재 료

1) 약재

본 실험에 사용한 인동은 부여군 농업기술센타에서 제공받은 것으로 99년 5월에 일년생 가지와 잎을 채취한 것으로 음건하여 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 웅성 4주령의 BALB/C 생쥐를 한국생명공학연구원에서 공급받아 실험당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

① 시약 : 실험에 사용된 시약은 mitogen으로서 cyclophosphamide (CTX), lipopolysaccharides (LPS), RPMI-1640, fetal bovine serum, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), diethyl pyrocarbonate (DEPC), RBC lysis solution 등은 Sigma(U.S.A)사 제품을 사용하였으며, RNAzol^B (Tel-Test, Inc.) *Taq* polymerase와 deoxynucleotide triphosphate (dNTP)등은 TaKaRa (Japan)사 제품을, 역전사효소 (Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase : M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 제품을, 이 밖에 agarose (FMC, U.S.A)는 Pharmingen (U.S.A)사의 제품을 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기 : 사용된 기기는 flow cytometer (Becton Dikinson, U.S.A), imager system (Ko-dak, U.S.A), microcentrifuge (Hanil LTD, KOREA), UV-Vis spectroph-otometer (Shimazue, Japan), turbo thermalcycler^{TM} (Bioneer Co., Korea), CO_2 incubator (Rapco, U.S.A), β-counter (Backman, U.S.A), clean bench (KMC-14001, Vision scientific Co. Korea) rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), autoclave (Hirayama, Japan), deep freezer (Eyela, Japan) 및 blood cell counter (Min-os, Sweden)등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액(Lonicera japonica extract : LJE)제조

인동등 200g을 분말로 분쇄한 후 증류수 1,500ml을 첨가하여 열탕 추출기에서 3시간 동안 추출하여 추출액을 얻고, 이를 흡입 려과하여 여액을 감압 증류장치로 감압 농축하고, 농축액을 다시 동결 건조기를 이용하여 인동 90g을 분말로 얻은 후 랭동 보관하였으며, 실험에 적당 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 비장세포에서 RT-PCR

C57BL/6 mouse에서 spleen cell을 분리하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, RBC lysis 용액 2 ㎖을 넣고 37℃ water bath에서 5분간 방치한 후 즉시 10 ㎖의 D-PBS를 첨가하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 spleen cell을 96 well plate에 $2x10^6$ cells씩 넣은 후 인동 100 ㎍/㎖농도로 첨가한 후 3시간 동안 incubator (37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다.

① RNA의 추출 : 3시간 배양 후 96 well plate를 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol[B]를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DEPC를 처리한 20 ㎕의 증류수에 녹여 -80℃에 보관하여 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR) : 역전사 반응은 준비된 total RNA 3 ㎍에 해당하는 양을 75℃에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denatured total RNA 3 ㎍에 2.5 ㎕의 10 mM dNTPs mix, 1 ㎕의 random sequence hexa-nucleotides (25 pmole/25 ㎕), RNA inhibitor로서 1 ㎕의 RNase inhibitor (20 U/㎕), 1 ㎕의 100 mM DTT, 4.5 ㎕의 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)를 섞은 후, 1 ㎕의 M-MLV RT (200 U/㎕)를 더하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 ㎕가 되도록 하였다. 이 20 ㎕의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 spin down하여 37℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시켰다. 이렇게 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR에 사용하였다.

③ cDNA의 PCR 증폭 : PCR은 Turbo Themalcycler[TM]를 이용하여 실시하였다. 반응은 합성된 3 ㎕의 first-strand cDNA가 주형으로 사용되었으며, β-actin, interleukin-10, interleukin-12, interferon-γ에 대한 primer sets (10 pmole/㎕)를 혼합 후 1 ㎕씩 넣어주고, 여기에 3 ㎕의 2.5 mM dNTPs, 3 ㎕의 10×PCR buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 그리고 2 units의 *Taq.* polymerase를 첨가한 뒤, 증류수로서 최종 부피가 30 ㎕가 되게하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은, 95℃ predenaturation 5분 : annealing 55℃ 1분 : elongation 72℃, 1분 : denaturation 95℃, 1분씩을 30 cycles 한 뒤, postelongation을 72℃에서 3분 동안 해주었다. 각각의 증폭된 산물은 전기영동을 통해 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다 :

IL-10은 sense oligonucleotide, 5′-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3′ : antisense oligonucleotide 5′-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3′ : IL-12는 sense oligonucleotide, 5′-CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG-3′ : antisense oligonucleotide 5′-TCCGGAGTAATTTGGTGCTTCACAC-3′ : IFN-γ는 sense oligonucleotide 5′-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTTAG-3′ : antisense oligonucleotide 5′-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3′ : β-actin은, sense oligonucleotide, 5′-TGGAATCCTGATCCATGAAC-3′ : antisense oligonucleotide 5′-TAAAACGCAGCTCAGTAGTCCG-3′. PCR product의 양은 1-D program을 이용하여 Ht값으로 측정하였다.

3. 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

실 험 성 적

1. 비장세포에서 RT-PCR

1) IL-12(P35) 유전자 발현에 미치는 영향

IL-12(P35)의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-12(P35)의 control(lane 1)의 Ht값은 64로 나타났고, LJE 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도에서는 Ht값이 110로서 IL-12(P35)의 PCR product가 control(lane 1)보다 71.88% 증가되었다 (Fig. 1).

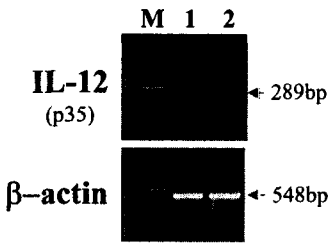

Fig. 1. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) on IL-12(p35) gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, LJE(100 ㎍/㎖) and internal control(β-actin).

2) IL-12(P40) 유전자 발현에 미치는 영향

IL-12(P40)의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-12(P40)의 control(lane 1)의 Ht값은 124로 나타났고, LJE 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도에서는 Ht값이 165로서 IL-12(P40)의 PCR product가 control(lane 1)보다 33.1 % 증가되었다 (Fig. 2).

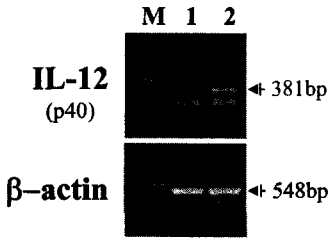

Fig. 2. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) on IL-12(p40) gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, LJE(100 ㎍/㎖) and internal control(β-actin).

3) IFN-γ 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IFN-γ의 control(lane 1)의 Ht값은 76으로 나타났고, LJE 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도에서는 Ht값이 68로서 IFN-γ의 PCR product가 control(lane 1)보다 10.52% 감소되었다(Fig. 3).

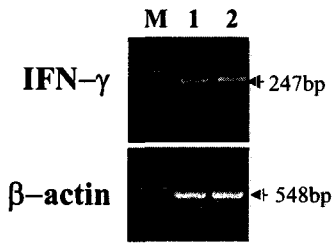

Fig. 3. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) on IFN-γ gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, LJE(100 ㎍/㎖) and internal control(β-actin).

4) IL-10 유전자 발현에 미치는 영향

IL-10의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-10의 control(lane 1)Ht값은 98로 나타났고, LJE 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도에서는 Ht값이 109로서 IL-10의 PCR product가 control(lane 1)보다 11.22% 증가되었다(Fig. 4).

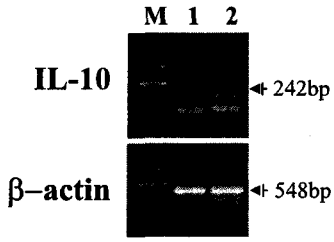

Fig. 4. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) on IL-10 gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, LJE(100 ㎍/㎖) and internal control(β-actin).

5) Partial fraction에 있어서 IL-12(P35) 유전자 발현에 미치는 영향

IL-12(P35)의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-12(P35)의 control(lane 1)의 Ht값은 36이었는데, LJE chloroform fraction 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도의 Ht값은 65로 control(lane 1)보다 80.6% 증가되었고, LJE butanol fraction 100 ㎍/㎖(lane 3) 농도에서의 Ht값은 105로 control(lane 1)보다 191.7% 증가되었으며, LJE ethyl acetate fraction 100 ㎍/㎖(lane 4) 농도의 Ht값은 125로 control(lane 1)보다 247.2% 증가되었고, LJE water

fraction 100 ㎍/㎖(lane 5) 농도의 Ht값은 204로 control(lane 1)보다 466.7% 증가되어, water fraction에서 다른 fraction에 비해 가장 많은 증가를 보였다(Fig. 5).

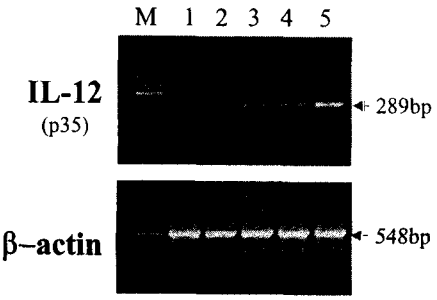

Fig. 5. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) partial fractions on IL-12(p35) gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, Chloroform fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 3, butanol fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 4, ethyl acetate fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 5, water fraction(100 ㎍/㎖) of LJE and internal control(β-actin).

6) Partial fraction에 있어서 IL-12(P40) 유전자 발현에 미치는 영향

IL-12(P40)의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-12(P40)의 control(lane 1)의 Ht값은 93이었는데, LJE chloroform fraction 100㎍/㎖(lane 2) 농도의 Ht값은 145로 control(lane 1)보다 55.9% 증가되었고, LJE butanol fraction 100 ㎍/㎖(lane 3) 농도의 Ht값은 164로 control(lane 1)보다 76.3 % 증가되었으며, LJE ethyl acetate fraction 100 ㎍/㎖(lane 4) 농도의 Ht값은 158로 control(lane 1)보다 69.9% 증가되었고, LJE water fraction 100 ㎍/㎖(lane 5) 농도의 Ht값은 175로 control(lane 1)보다 88.2% 증가되어, water fraction에서 다른 fraction에 비하여 가장 많은 증가가 나타났다(Fig. 6).

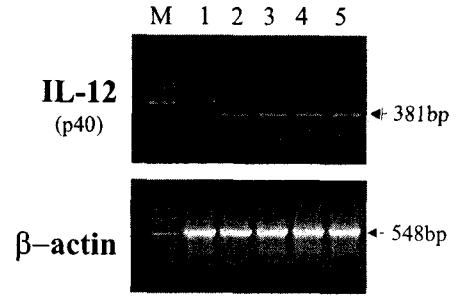

Fig. 6. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) partial fractions on IL-12(p40) gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, Chloroform fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 3, butanol fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 4, ethyl acetate fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 5, water fraction(100 ㎍/㎖) of LJE and internal control(β-actin).

7) Partial fraction에 있어서 IL-10 유전자 발현에 미치는 영향

IL-10의 표준 지표 유전자(internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IL-10의 control(lane 1)의 Ht값은 157이었는데, LJE chloroform fraction 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도의 Ht값은 210로 control(lane 1)보다 33.8% 증가되었고, LJE butanol fraction 100 ㎍/㎖(lane 3) 농도의 Ht값은 207로 control(lane 1)보다 31.8% 증가되었으며, LJE ethyl acetate fraction 100 ㎍/㎖(lane 4) 농도의 Ht값은 200으로 control(lane 1)보다 69.9% 증가되었으며, LJE water fraction 100 ㎍/㎖(lane 5) 농도의 Ht값은 224로 control(lane 1)보다 88.2% 증가되어, water fraction에서 다른 fraction에 비하여 가장 많은 증가가 나타났다(Fig. 7).

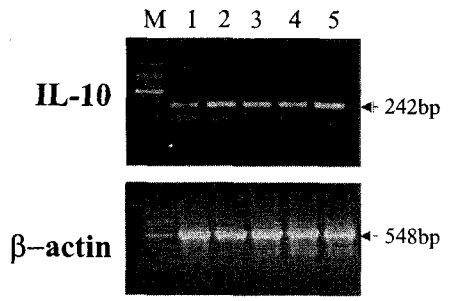

Fig. 7. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) partial fractions on IL-10 gene expression in splenocytes
The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs.

Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, Chloroform fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 3, butanol fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 4, ethyl acetate fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 5, water fraction(100 ㎍/㎖) of LJE and internal control(β-actin).

8) Partial fraction에 있어서 IFN-γ 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ의 표준 지표 유전자(Internal control)에는 β-actin이 사용되었다. IFN-γ의 control(lane 1)의 Ht값은 161이었는데, LJE chloroform fraction 100 ㎍/㎖(lane 2) 농도의 Ht값은 197로 control(lane 1)보다 22.4% 증가되었고, LJE butanol fraction 100 ㎍/㎖ (lane 3) 농도의 Ht값은 206으로 control(lane 1)보다 31.8% 증가되었으며, LJE ethyl acetate fraction 100 ㎍/㎖(lane 4) 농도의 Ht값은 227로 control(lane 1)보다 40.1% 증가되었고, LJE water fraction 100 ㎍/㎖ (lane 5) 농도의 Ht값은 227로 control(lane 1)보다 40.1% 증가되어, water fraction에서 다른 fraction에 비하여 가장 많은 증가가 나타났다(Fig. 8).

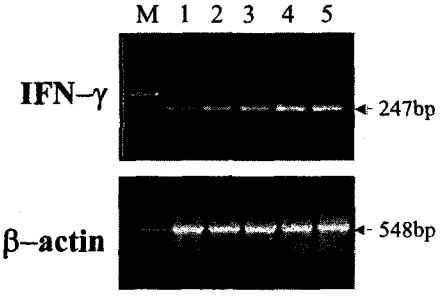

Fig. 8. Effects of Lonicerae Caulis et Folium(LJE) partial fractions on IFN-γ gene expression in splenocytes

The mice spleen cells were cultured with LJE for 3 hrs. Cytoplasmic RNA was isolated and RT-PCR was performed. Lane M, 100bp DNA marker : lane 1, RPMI-1640 media control : lane 2, Chloroform fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 3, butanol fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 4, ethyl acetate fraction(100 ㎍/㎖) of LJE : lane 5, water fraction(100 ㎍/㎖) of LJE and internal control(β-actin).

考 察

앞선 연구보고[12] 및 다른 연구 결과에서 인동등이 면역조절작용에 깊은 영향을 주고 있음을 입증하였다. 이에 저자는 Th1/Th2 세포 및 이들에서 분비되는 cytokines(IFN-γ, IL-10, IL-12 etc.)에 의해 조절되는 면역조절 기능을 인동등 물 분획 및 각 분획 처리에 의한 생쥐 비장세포에서의 유전자 발현을 측정하였다.

지금까지의 연구에 의하면 T helper 세포의 2 subset중 Th1 세포는 IL-2, IFN-γ, lymphotoxin 등을 생산하고 Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10을 생산하는 것으로 알려졌으며[42,58,61], Th2세포에서 생산된 IL-4는 세포독성 T세포 (cytotoxic T lymphocyte)의 활성화를 증가시키고 대식세포의 tumoricidal activity를 향상시키는 것으로 보고되었다[13].

IL-12은 대식세포에서 유래되어 NK세포와 T 림프구로 하여금 IFN-γ를 분비하게 하며, $CD4^+$ T 림프구에 대해 분화인자로서 작용하여 이들 세포로 하여금 식균세포 매개성 면역을 돕도록 IFN-γ를 생성하는 Th1 유사세포로의 특이적 분화를 증진시킨며, $CD8^+$ T 림프구의 세포용해능을 증진시킨다[14,15]. IL-2와 같이 처리했을때에는 NK 세포, LAK 세포 및 cytotoxic T 세포를 활성화시키고 B lymphoblastoid 세포로부터 생산된다[16,17].

IL-10은 대식세포에 의한 cytokine인 TNF, IL-1 및 IL-12의 생성을 억제하며, T 림프구의 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능을 저해한다[1]. 그리고 B 세포와 Th2 세포에서 생산되고 활성화된 monocytes/macrophages 에서 생산된 cytokine과 Th1 세포에서 분비되는 cytokine의 생성을 억제하며 B 세포의 증식과 Ig 분비를 촉진시킨다[18-21].

IFN-γ는 주된 macrophage의 활성인자이며, T 림프구에 의해 대식세포가 활성화되도록하는 수단을 제공한다[22]. 또한, Th1 cells에서 생성되고 macrophage를 활성화시켜 항바이러스 활성을 나타낸다[23]. 또한 IFN-γ는 $CD8^+$의 반응 조절에도 관여하는 것으로 알려졌다[24,25].

이들(IL-10, IL-12, IFN-γ)사이의 관계를 살펴보면 Lymphocytes 및 식세포에 의해서 생산된 IL-10은 IL-12에 대하여 억제하는 작용을 하며, lymphocytes에 의해서 생산된 IFN-γ는 식세포 및 이들이 생산하는 IL-12에 대하여 활성화시키는 작용을 한다. 또한 Th2 세포가 생성한 IL-10이 Th1 세포의 cytokine 생성들을 억제하며, IFN-γ는 Th2 세포의 cytokine 생성을 억제한다는 사실로 보아 이들은 서로 다른 cytokine 생성을 통하여 상호억제 작용을 하여 면역조절에 관여하는 것으로 생각된다[26].

이상의 내용과 본 실험의 성적을 비교하면 인동등은 Th cell을 활성화하여 IFN-γ의 생성을 증가시킬

수 있으며 이는 또한 macrophage를 더욱 활성화시킬 것으로 사료된다. 이에 저자는 인동을 chloroform fraction, butanol fraction, ethyl acetate fraction, water fraction으로 구분하여 다시 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5~8.에서와 같이 특히 water fraction, ethyl acetate fraction에서 IL-12(P35), IL-12(P40), IFN-γ, IL-10 등의 유전자 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나 IL-10의 유전자 발현은 가시적으로 현격한 증가를 보이지는 않았다. 이상에서 볼 때 water fraction에서의 특정 성분들이 면역증강에 작용하는 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에서 IL-12(P35)의 현격한 증가는 바로 IL-12의 유전자 발현의 증가로 이해될 수 있을 것이다. IL-12는 IFN-γ와 함께 사람과 쥐에 있어서 mycobacteria, salmonella에 대한 방어 능력을 향상시키는 것으로 보고되었으며[27], 세포내 기생충, fungi 및 viruses등의 감염에도 저항하는 cytokine으로 알려졌다[28].

또한 IL-12는 Th1 type $CD4^+$ cell을 상승시켜 herpes simples virus에 대해서 면역작용을 하는 것으로 밝혀졌다[29]. 본 실험의 결과와 이러한 사실들을 비교해볼 때 인동이 이들 균에 대한 항균작용이 있음을 간접적으로 규명해주고 있다.

이처럼 인동등은 IL-12(P35), IL-12(P40), IFN-γ등의 유전자 발현을 현저하게 증가시키는 것으로 보아 忍冬은 면역증강 작용이 있는 것으로 사료되며, 이에 면역조절과 관련이 있는 여러 cytokine의 발현을 같이 연구하여 보다 상세한 면역 조절 mechanism을 밝혀야 할 것으로 사료된다.

結 論

인동등 추출물(LJE)의 면역조절작용을 평가하기 위하여 IL-10, IL-12(P35), IL-12(P40), IFN-γ등의 유전자 발현을 측정하였던 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. IL-12(P35), IL-12(P40)의 유전자 발현은 현저한 증가를 보였으나 IL-10, IFN-γ의 유전자 발현은 각각 소폭의 증가 또는 감소를 보였다.
2. 물 분획(water fraction) 및 ethyl acetate 분획에서 IL-12(P35), IFN-γ의 유전자 발현이 현저하게 증가하였으며, IL-12(P40), IL-10의 유전자 발현은 소폭의 증가를 보였다.

이상의 결과로 보아 인동은 상기한 면역증강 cytokine 발현을 통하여 면역력을 증가시킴으로써 이와 관련된 다양한 질환에 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 IL-1, IL-4, IL-6, TNF, IL-8, TGF 등의 cytokines의 발현과 이들 사이의 관계를 밝혀낸다면 인동의 면역조절 mechanism이 보다 명확하게 규명될 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 陶弘景集·尙志均點校 : 名醫別錄, 北京, 人民衛生出版社, 1986 : 50-51.
2. 全國韓醫科大學敎授共編著 : 本草學, 서울, 永林社, 1991 : 233-234.
3. 鄭普燮 辛民敎共編 : 鄕藥(生藥)大辭典, 서울, 圖書出版 永林社, 1990 : 938-940.
4. 中國醫學科學院藥物硏究所等編 : 中藥志, 北京, 人民衛生出版社, 1988 : 256-267.
5. ≪現代中醫藥文庫≫ 編輯委員會 : 中藥現代硏究與應用, 北京, 學苑出版社, 1997 : 2931-2963.
6. Kang OH, Choi YA, Park HJ, Lee JY, Kim DK, Choi SC, Kim TH, Nah YH, Yun KJ, Choi SJ, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Inhibition of trypsin-induced mast cell activation by water fraction of Lonicera japonica. Arch Pharm Res. 2004 ; 27(11) : 1141-1146.
7. Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH, Lee YM. Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. Int Immunopharmacol. 2005 ; 5(1) : 209-17.
8. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from Lonicera japonica flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. Int J Mol Med. 2001 ; 7(1) : 79-83.
9. Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of Lonicera japonica in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. Clin Chim Acta. 2003 ; 330(1-2) : 165-71.
10. S. Hu, W. Cai, J. Ye, Z. Qian and Z. Sun,

Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils. *Zentralbl. Veterinarmed., Reihe* 1992 : 39 : 593 - 599.

11. S. Ohta, N. Sato, S.H. Tu and M. Shinoda, Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. *Yakugaku Zasshi* 199 3 : 113 : 870 - 880.
12. Young-Cheol Lee, Young-Bae Seo, The experimental studies immunomodulational effects of Lonicerae Caulis. The Korea Journal of Herbology 2000 : 15(1) : 19-29.
13. Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, Tedder TF : CD19 REG-ULATES B LYMPHOCYTE SIGNALING THRESHOLDS CRITICAL FOR THE DEVELOPMENT OF B-1 LINEAGE CELLS AND AUT-OIMMUNITY : Journal of Immunology , 1996 : 157(10) : 4371-4378.
14. Benjamin D, Sharma V, Kubin M, Klein JL, Sartori A, Holliday J, Trinchieri G : IL-12 EXPRESSION IN AIDS-RELATED LYMPHOMA B CELL LINES : Journal of Immunology , 1996 : 156(4) : 1626-1637.
15. Galon J, Sudarshan C, Ito S, Finbloom D, O'Shea JJ : IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells : Journal of Immunology, 1999 : 162(12) : 7256-7262.
16. Podlasky FJ, Nanduri VB, Hulmes JD, Pan YCE, et al : Molecular characterization of a novel cytokine : Cytotoxic lymphocyte maturation factor. J Cell Bioch Supplement 15 F Abstracts, 20th Annual Keystone Symphosia, 1991 : 78.
17. Schartonkersten T, Afonso LCC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P : IL-12 IS REQUIRED FOR NATURAL KILLER CELL ACTIVATION AND SUBSEQUENT T HELPER 1 CELL DEVELOPMENT IN EXP-ERIMENTAL LEISHMANIASIS : Journal of Immunology ('95), 1995 : 154(10) : 5319-5330.
18. Chabot S, Williams G, Hamilton M, Sutherland G, Yong VW : Mech-anisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction : Journal of Immunology, 1999 : 162(11) : 6819-6828.
19. Moore KW, Vieira P, Fiorentio DF, Trounstine ML, Khan TA, Mosmann, TR : Homology of Cytokine Synthesis Inhibitory factor(IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. Science 1990 : 248 : 1230-1234.
20. Mosmann TR, Moore KW : The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunology today 1991 : 12 : A49-A53.
21. Perrin GQ, Johnson HM, Subramaniam PS : Mechanism of interleukin-10 inhibition of T-helper cell activation by superantigen at the level of the cell cycle : Blood, 1999 : 93(1) : 208-216.
22. Bailer RT, Holloway A, Sun JW, Margolick JB, Martin M, Kostman J, Montaner LJ : IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression : Journal of Immunology , 1999 : 162(12) : 7534-7542.
23. Kasahara, T., J. J. Hookes, S. F. Dougherty, and J. J. Oppenheim. Interleukin 2-mediated immune ingerferon (IFN-γ) production by human T cells and T cell subsets. J. Immunol. 1983 : 130 : 3299.
24. Deeths MJ, Kedl RM, Mescher MF : CD8(+) T cells become nonrespo-nsive (anergic) following activation in the presence of costimulation : Journal of Immunology , 1999 : 163(1) : 102-110.
25. Ely KH, Kasper LH, Khan IA : Augmentation of the CD8+ T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during Toxoplasma gondii infection : Journal of Immunology, 1999 : 162(9) : 5449-5454.
26. Trinchieri G : CYTOKINES ACTING ON OR SECRETED BY MAC-ROPHAGES DURING INTRACELLULAR INFECTION (IL-10, IL-12, IFN-GAMMA) : Current Opinion in Immunology, 1997 : 9(1) : 17-23.
27. Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL : IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men : Current Opinion in Immunology, 1999 : 11(3) : 346-351.
28. Montaner LJ, da Silva RP, Sun JW, Sutterwala S, Hollinshead M, Vaux D, Gordon S : Type 1 and type 2 cytokine regulation of macro-phage

endocytosis : Differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10 : Journal of Immunology, 1999 : 162(8) : 4606-4613.

29. Sin JI, Kim JJ, Arnold RL, Shroff KE, McCallus D, Pachuk C, McEl-hiney SP, Wolf MW, Pompa-de Bruin SJ, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Weiner DB : IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model : IL-12 enhances Th1-type CD4(+) T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge : Journal of Immunology, 1999 : 162(5) : 2912-2921.