

보음약인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정의 면역조절 효과 비교

박시덕 · 이금홍 · 이영선¹ · 권영규² · 박종현 · 최선미³ · 신상우*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 성덕대학 전통건강자원개발과,
2: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실, 3: 한국한의학연구원 의료연구부

Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Adenophorae Radix*, *Liriopsis Tuber*, *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma* and *Polygonati Rhizoma*

Si Deok Park, Geum Hong Lee, Young Sun Lee¹, Young Kyu Kwon², Jong Hyun Park, Sun Mi Choi³, Sang Woo Shin*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University,
1: Department of Traditional Health Resource Development, College of Sung Duk,
2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University,
3: Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Adenophorae Radix (AR), *Liriopsis Tuber* (LT), *Dendrobii Monile* (DM), *Polygonati Officinalis* (PO), *Polygonati Rhizoma* (PR) have been used to treated a variety condition/diseases in traditional oriental medicine. The present study was conducted to investigate the immunomodulatory effects of the water-extracted AR, LT, DH, PO and PR. In spleen cell proliferation assay, DH was significantly enhanced mitogenic activity compared with control group. In RT-PCR, DH and PO induced IL-2 and IFN γ cytokine gene expression in mouse spleen cells. Methotrexate(MTX), immune supression agent, was significantly inhibited mouse spleen cell proliferation(1600 mg/ml). In spite of MTX treatment, DH and PO sustained the spleen cell proliferation. In the flow cytometry analysis, DH stimulated mouse spleen cells showed an increase in B-cell phenotype (CD45R/B220). The water-extracted DH and PO inhibited NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cell. DH induced IL-2 and IFN γ gene expression in human peripheral mononuclear cells. The GC-MS analysis show that the main component of water-extracted DH was b-Nitroethyl alcohol. The main components of water-extracted PO were Dipirartril-tropico, Methyl sulfoxide and Demsox. These data suggest that among these extracts, DH has a protective effect of immune suppression caused by MTX. DH may be enhance cellular and humoral immune response by the regulation of cytokine gene expression, NO production and B cell production.

Key words : *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma*, immunomodulatory effects, Methotrexate, IL-2, IFN γ

서론

免疫이란 항상성을 유지하는 현상으로 생체가自己和非自己를 식별하여 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 비자기로 인식 배제시킴으로 생체의 생리적 기능을 원활하게 하는데 중요한 역할을 한다^{1,2)}.

* 교신저자 : 신상우, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : swshin@swshin.com, · Tel : 053-770-2250

· 접수 : 2007/01/15 · 채택 : 2007/03/14

한의학적 면역의 개념은 正邪論에서 찾아 볼 수 있는데, 正은 正氣를 지칭하며 正氣는 인체의 抗病力과 관련되며 질병발생에 있어서 內的 근거가 되므로 인체의 正氣가 왕성하면 邪氣가 쉽게 침범하지 못하고, 邪는 邪氣로서 正氣의 허한 틈을 타서 인체를 침범하여 질병을 발생시킨다³⁾. 전통적으로 한의학에서 사용되는 많은 약재들은 숙주 방어 기능을 증가시키는 자양, 강장의 효과가 있음이 보고 되고 있다⁴⁾. 최근에는 正氣를 회복시킴으로서 신체 내 면역력을 조절하고 신체 방어기전에 효과적인 한약재를 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{5,9)}.

正氣를 補益하고 虛弱을 扶持하여 虛를 치료하는 補益藥의 종류는 氣血陰陽의 네 방면으로 나누어 補氣藥, 補陽藥, 補血藥, 補陰藥으로 분류된다¹⁰⁾. 이 중 補陰藥은 陰液을 滋養하여 陰虛證을 改善 혹은 消除하는 약물을 말하며, 陰虛證이란 인체의 陰에 속하는 功能이 감퇴된 병리상태이다³⁾.

補陰藥의 대표 약물은 沙蔘, 麥門冬, 石斛, 玉竹, 黃精 등을 들 수 있다. 그 중에서 沙蔘 (*Adenophorae Radix*)은 도라지과 (*Campanulaceae*)에 속한 多年生 草本인 잔대 *Adenophora triphylla* var. *japonica* HARA. 와 그 同屬 近緣植物의 根을 乾燥한 것이다¹⁰⁾. 사삼의 效能 및 主治는 《神農本草經》에 “微苦微寒 主血積 驚氣 際寒熱 補中 益肺氣 久服利人 一名 知母 生川谷” 이라고 처음으로 記錄된 以來 益肺氣, 清肺養肝 養陰養肝 祛痰止咳 益胃生津 排膿消腫 祛風止瀉 등의 效能으로 久嗽肺痿 肺熱咳嗽 口渴 胃痛 皮膚瘙癢 등의 治療에 應用되고 있다¹¹⁻²¹⁾.

사삼의 성분으로는 Taraxerone, Carotene, Daucostrol, Octacosanomic acid, Phospholipids, Phosphatidic acid, Phosphatidyl choline, Phosphatidyl ethanolamine, Phosphatidyl glycerol, Phosphatidyl inositol, DiPhosphatidyl glycerol 등이 함유 되어 있으며, 現代 臨床에선 心臟病, 心筋炎, 慢性氣管支炎, 百日咳, 赤白帶下, 產後乳汁不足, 齒痛 등에 활용되고 있다. 사삼의 藥理作用에는 祛痰, 強心, 免疫調節 및 抗真菌作用 등이 보고 되어 있다^{17,21-24)}. 《廣南本草》에서는 “能補肺氣, 以及六腑之陰氣. 肺氣盛則五臟六腑之氣增盛” 이라 하여 사삼이 肺氣를 盛하게 함으로써 五臟六腑의 功能을 盛하게 함을 언급하였다²⁵⁾. 이와 같이 사삼은 補陰, 益肺氣, 益胃生津 등의 補益성이 많아 면역학적 개념에서 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료되지만 安²⁶⁾의 사삼의 消炎, 抗菌에 대한 실험적 보고 외에 면역작용에 관한 연구보고가 미미한 실정이다.

맥문동 (*Liriopsis Tuber*)은 백합과 (*Liliaceae*)에 속한 多年生 草本인 맥문동 *Liriope platyphylla* WANG et TANG 또는 소엽맥문동 *Ophiopogon japonicus* KER-GAWL. 의 塊根을 乾燥한 것으로, 夏季에 채취하여 건조한다¹⁰⁾. 성분 연구로는 steroid계 saponin, isoflavonoid, oligosaccharides 및 polysaccharide 등이 함유되어 있는 것으로 보고된다. 맥문동의 效能에 관한 연구로는 혈당강화 작용, 항염작용, IgM 항체생산억제 등 다양한 약리활성이 보고 되어 있다²⁷⁻³³⁾. 최근 연구에서 맥문동의 butanol 분획이 각종 암세포주에 대하여 강한 세포 독성을 나타낸다고 보고한 바 있어 항암제로서의 가능성을 보고하였다²⁷⁾.

석곡 (*Dendrobii Herba*)은 난초과 (*Orchidaceae*)에 속한 *Dendrobium nobile* Lindl. 또는 기타 동속근연식물의 지상부를 건조한 것으로, 性은 微寒하고 味는 甘하며 胃 · 腎으로 귀경한다. 또한 益胃生津 滋陰清熱 등의 효능이 있어 熱病傷津 · 九乾煩渴 · 病後虛熱 · 目暗不明 등의 병증에 이용되고 있으며, 甘寒한 성미로 인해 주로 胃中虛熱을 없애주고 煩渴을 그치게 하며, 아울러 腎中에 浮火를 맑게 해주어 虛熱을 없애준다¹⁰⁾. 주요 성분으로는 금채석곡에 dendrobine, dendramine, nobilonine, dendroxine, dendrine, 6-hydroxydendroxine, 점액질과 전분 등을 함유한다. 석곡에 관한 연구보고로는 골다공증에서의 효능과 반응성 산소

기의 발생을 억제한다는 연구 결과가 보고되었다³⁴⁻³⁸⁾.

옥죽 (*Polygonati Odorati Rhizoma*)은 백합과 (*Liliaceae*)에 속한 多年生 草本인 동굴레 *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* OHWI 및 왕동굴레 *P. robustum* NAK., 옥죽 *P. odoratum* (MILL.) DRUCE의 根莖을 건조한 것으로, 봄과 가을에 채취하여 曬乾한다. 성분으로는 根莖에는 convallamarin, convallarin, vitamin A 등을 함유하고, 전분 25.6~30.6% 및 점액질을 함유한다¹⁰⁾. 한방과 민간에서 자양 · 강장효과 외에도 당뇨, 갈증해소, 허약증상, 영양불량, 폐결핵, 감심작용, 혈압저하, 혈당조하, 말기암의 보조 치료제 등에 효능이 있다고 보고되어 있다³⁹⁻⁴¹⁾.

황정 (*Polygonati Rhizoma*)은 백합과 (*Liliaceae*)에 속한 多年生 草本인 층층동굴레 *Polygonatum stenophyllum* MAX., 전황정 *P. kingianum* COLL et HEMSLE., 낭사황정 *P. cyrtonema* HUA. 의 根莖을 건조한 것으로, 가을에 채취해서 蒸하여 曬乾한다. 황정의 根莖에는 점액질 전분 및 당분을 함유한다¹⁰⁾. 황정은 한방과 민간에서 자양 및 강장의 목적으로 많이 이용되어 왔으며, 여러 가지 허약증상, 영양불량, 폐결핵으로 인한 기침, 당뇨 등의 약재로 사용되었으며 황정에 함유되어 있는 물질들이 혈당강화 효과가 있는 것으로 보고되어 있다⁴²⁻⁴⁴⁾.

본 연구자는 補陰 약재 중 대표약물인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정의 면역조절 작용을 비교하고자 면역세포인 비장세포와 대식세포를 이용 임파구 증식능, RAW264.7 대식세포의 NO 생성 억제 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포의 cytokine 생성, 마우스 비장의 B세포에 미치는 영향을 확인하기 위한 연구를 수행 하여 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 검액의 준비

실험에 사용한 補陰 藥材는 Table 1과 같다. 실험에 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Oriental Crude Drugs for invigorating yin(補陰)

Oriental Crude Drug	Scientific name
사삼(沙蔘)	<i>Adenophorae Radix</i>
맥문동(麥門冬)	<i>Liriopsis Tuber</i>
석곡(石斛)	<i>Dendrobii Herba</i>
옥죽(玉竹)	<i>Polygonati Odorati Rhizoma</i>
황정(黃精)	<i>Polygonati Rhizoma</i>

상기 약물 40 g씩을 증류수 1200 ml에 첨가하고 2시간 동안 중탕하여 검액 700 ml를 각각 추출하였다. 추출한 검액들은 멸균 거여즈를 이용하여 1차 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15분간 원심분리를 실시하여 상층액만을 채취하고 이를 1.2 μ m와 0.45 μ m의 membrane filter(Milipore Co., USA)로 여과하여 사용하였다.

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)오리엔트(경기도 가평, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. ICR 마우스는 독성 약리작용 내분비 영향에 대한 실험 등 각종 연구

용으로 이용범위가 넓다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 급여 하면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2 °C, 습도는 55±2 %를 유지하였다.

3. 면역억제제 준비

Methotrexate(MTX: C₂₀H₁₁N₈O₅, Sigma, U.S.A)를 RPMI 1640 media에 20 mg/ml의 농도로 녹여서 사용하였다.

4. 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 마쇄한 후 4 °C Hanks Balanced Salt Solution(GibcoBRL, NY)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-paque(Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800 rpm 에서 30분 원심 분리하여 임파구 층을 수거한 후, RPMI 1640(GibcoBRL) media로 1회 더 세척하고 10 % fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁 시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4 % tryphan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

5. 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7(America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(GibcoBRL)에 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin(GibcoBRL)을 첨가하여 100 mm dish에 80 % 세포의 밀도를 유지하면서 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

6. 비장세포 증식능 분석

마우스 비장세포를 2×10⁵ cells/100 µl 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가하여, 전체 부피가 100 µl가 되게 조정하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96® Aqueous one solution cell proliferation assay kit(Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다. 48시간 배양한 배양액 100 µl에 시약을 20 µl 첨가한 후 37 °C, 5 % CO₂ incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

7. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 Griess(Sigma) 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid + 1 % a-naphthylamide in H₂O) 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

8. RT-PCR을 이용한 iNOS 및 사이토카인 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee(TEL-TEST, INC)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1 % diethyl pyrocarbonate가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 µl를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 µl를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4 °C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 °C에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70 % DEPC-ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 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 uM oligo dT primer 0.5 µl, DEPC-distilled water 4 µl를 PCR tube에 넣어 42 °C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 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 uM sense 및 antisense primer 0.25 µl, Tag polymerase(5 U/µl, Promega Co.) 0.25 µl)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 µl 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 µl 첨가하여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94 °C에 3분간 1 cycle 반응 후 94 °C 45초, 57 °C 45초, 72 °C 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72 °C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2 % agarose gel에 전기 영동하여 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사(Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequence used for detection of Th1 type cytokine and iNOS gene expression in mouse spleen cells and RAW 264.7 macrophage cells.

	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'
IFNγ	5' -CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3'
	5' -GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'
iNOS	5' -GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3'
	5' -GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

Table 3. Primer sequence used for detection of cytokine in human peripheral mononuclear cells.

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5' -CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3'
	5' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-6	5' -GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3'
	5' -GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IFNγ	5' -CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3'
	5' -GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'

9. Western blotting을 이용한 iNOS 단백질발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 10 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin 10 µg/ml Na₃VO₄, 10 µg/ml Na₃P₂O₇)를 가하여 (100 µl/1×10⁶ cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4 °C에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 µg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane(NC)에 transfer하였다. 이 NC를 3 % non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween(TBS-T; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1 % Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham/Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

10. Flow cytometer를 이용한 마우스 비장세포의 세포표현형 분석

각 실험군 비장세포의 B 세포 표현형 변화를 조사하기 위하여 마우스 비장세포에 각각의 한약재를 처리하고 48시간 배양한 후 배양된 비장세포를 수거하여 차가운 wash buffer(HBSS, 2 % FBS, 0.1 % sodium azide, 1 % HEPES buffer)로 세척한 후 1 µl(1 µg/million cells)의 FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal Ab로 염색한 후 4 °C에서 30분간 반응시킨 후 차가운 wash buffer로 2번 세척한 후 flow cytometry(Becton Dickison, FACSCalibur, France)를 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

11. 인체 말초혈액 단핵구 분리 및 사이토카인 유전자 분석

신체 건강한 20대 남성들에게서 말초혈액을 채혈하고, 채혈한 말초혈은 Heparin으로 처리한 tube에 넣고 Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Sweden)을 이용하여 1600rpm에서 30분간 원심분리하여 말초혈단핵구를 분리하였다. 분리한 세포는 RPMI 1640 media(Hyclon, USA)로 3회 washing한 후, 10 % fetal bovine serum(Hyclon, USA), 1 % Antibiotic-Antimycotic (Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 1640 media에 부유시킨 뒤 60π dish에 2×10⁶(n=6)의 농도로 세포를 넣고 LPS(Sigma, USA)와 한약재를 바로 처리한 후 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 이후 RNA분리는 RNA-Bee(TEL-TEST, INC)를 이용하여上記와 동일한 방법으로 실험하였고, RT-PCR을 거쳐 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사(Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 3과 같다.

12. GC-mass 를 이용한 성분 분석

GC-mass 분석은 HewlettPackard(HP)6890 gas chromatography 와 HP 5903N mass spectrometer기를 이용하여 분석하였다. GC 기기는 5 % Phenyl Methyl Siloxane 와 함께 HP-5MS 정밀한

column과 연결되어 filter 된다. 분석 조건 : helium carrier gas flow rate, 0.7 ml/min; oven 온도, 60 °C (15분간 유지)에서 280 °C; split ratio, 30:1. MS 기기의 electron impact (EI)는 m/z 범위 50-800 mass unit에서 70eV. 그 성분은 internal(computer) library, NIST/EPA/MSDC libraries로 mass spectra의 비교에 의해 확인된다.

결 과

1. 補陰藥인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정 열수추출액이 비장세포 증식능에 미치는 영향

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 살펴보았다. 각 약재별 열수추출액을 농도별(10, 100 µg/ml)로 분리된 마우스 비장세포에 처리하여 관찰하였다. 그 결과 마우스 비장세포의 증식능은 각 약재 농도별(10, 100 µg/ml)에서 사삼의 경우 1.33±0.02, 1.34±0.01로 대조군 1.26±0.01에 비해 100 µg/ml에서 유의한 증가가 관찰되었다. 맥문동의 경우 1.35±0.03, 1.31±0.04로 맥문동 10 µg/ml에서 유의한 증가가 관찰되었다. 석곡의 경우 1.69±0.01, 1.32±0.03로 10 µg/ml에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 옥죽의 경우 1.32±0.03, 1.38±0.03로 100 µg/ml에 유의한 증가가 관찰되었다. 황정의 경우 1.32±0.02, 1.28±0.01로 비장세포증식능에서 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

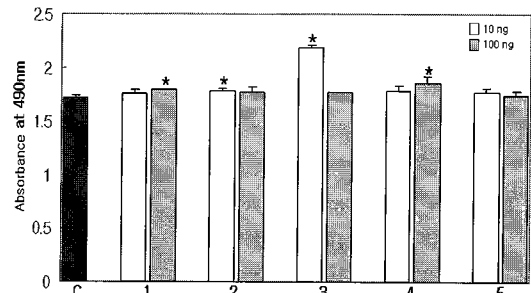


Fig. 1. Effect of various herbal extracts on the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells(2×10⁶ cells/ml) were cultured with 10 or 100 µg/ml extract of 1 : Adenophorae Radix(AR), 2 : Liriodopsis Tuber(LT), 3 : Dendrobii Herba(DH), 4 : Polygonati Odorati Rhizoma(PO), 5 : Polygonati Rhizoma(PR) for 24 hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean ± S.D in triplicate cultures. * Significantly different from control group (p<0.01)

2. 면역억제제 처리 마우스 비장세포에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 면역억제제에 의해 저하된 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향을 조사하기 위하여, Methotrexate 면역억제제 MTX인 마우스 비장세포 증식능이 50 % 억제되는 농도(IC₅₀, 100 µg/ml)에 각 약재 추출액을 처리하여 MTX 처리에 의해 감소된 임파구증식억제에 미치는 영향을 관찰하였다. 마우스 비장세포 증식능 관찰에서 대조군 1.34±0.09에 비해 MTX 처리시 0.47±0.02로 유의한 감소가 관찰

되었다. 비장세포 증식능에 미치는 영향을 살펴본결과, MTX 처리에 의한 사삼, 맥문동, 황정 열수추출액의 경우, 각 농도(10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 사삼의 경우 0.45 ± 0.02 , 0.49 ± 0.01 , 맥문동의 경우 0.46 ± 0.01 , 0.45 ± 0.01 , 황정의 경우, 0.45 ± 0.01 , 0.48 ± 0.01 로 MTX에 의해 유도된 비장세포 증식억제를 회복시킬 수 없음이 관찰되었다. 석곡의 경우 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.72 ± 0.01 과 0.57 ± 0.02 로 MTX에 의해 유도된 비장세포 증식 억제를 유의하게 증가시킬 수 있음이 관찰되었다. 옥죽의 경우 10 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.47 ± 0.01 과 0.54 ± 0.01 로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 MTX에 의해 유도된 비장세포 증식 억제를 유의하게 증가시킬 수 있음이 관찰되었다(Fig. 2).

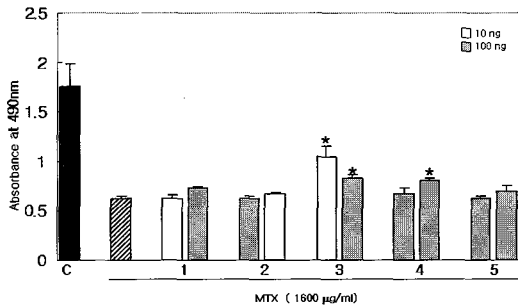


Fig. 2. Effect of various herbal extracts on the cell proliferation in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with various herbal extracts (10 or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR) for 24 hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean \pm S.D in triplicate cultures. * Significantly different from MTX treated group ($p<0.05$).

3. 마우스 비장세포에서 사이토카인 IL-2, IFN γ 생성에 미치는 영향
 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 Th1 type 사이토카인에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 약재 열수추출액을 처리하여 IL-2, IFN γ 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조약물로는 T세포 특이 mitogen인 concanavalin A(Con. A; Sigma, U.S.A)를 사용하였다. 그 결과 석곡의 경우 IL-2 와 IFN γ 의 유전자 발현이 관찰되었으며, 옥죽과 황정에서는 IL-2, IFN γ 유전자가 약하게 발현되었으며, 맥문동과 사삼은 IL-2 유전자만 약하게 발현되었다(Fig. 3).

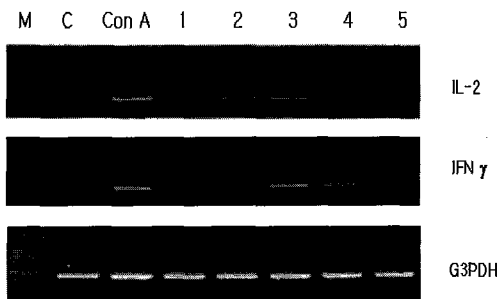


Fig. 3. Effect of various herbal extracts on cytokine gene expression in mouse spleen cells. Mouse spleen cells were incubated with various herbal extract in mouse spleen cells for 24 hr. Total RNA was prepared, and expression of IFN γ and IL-2 cytokine gene were analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control gene. C : control, conA : concanavalinA, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR)

4. RAW 264.7 에서 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 RAW 264.7 세포주에서 NO 생성능에 관한 효과를 살펴보기 위하여 RAW 264.7 세포주에 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액을 처리하고 24시간 배양하여 NO 생성능을 조사하였다. 석곡 열수추출액의(10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)경우 대조군 5.51 ± 0.06 에 비해 12.68 ± 0.07 , 9.46 ± 0.06 으로 유의한 증가함이 관찰되었고, 옥죽의 경우 6.21 ± 0.23 , 8.48 ± 1.23 으로 유의한 증가가 관찰되었다. 사삼의 경우 5.31 ± 0.07 과 7.03 ± 0.04 로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의한 증가가 관찰되었다. 맥문동, 황정의 경우 5.21 ± 0.06 , 5.35 ± 0.07 , 5.19 ± 0.07 및 5.01 ± 0.06 으로 대조군에 비해 NO 생성의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 4). NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR 기법을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. NO 생성능이 큰 폭으로 증가하였던 사삼, 석곡, 옥죽 열수추출액에서 iNOS 유전자 발현이 관찰되었고, NO 생성능의 변화가 없었던 맥문동, 황정 열수추출액에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

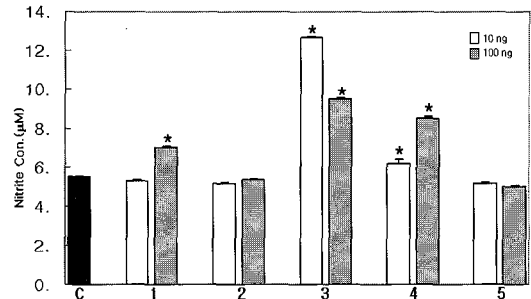


Fig. 4. Effect of various herbal extracts on NO production and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with various herbal extracts for 24 hr. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean \pm S.D. of three independent experiments. C : control, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR). * Significantly different from control group ($p<0.05$).

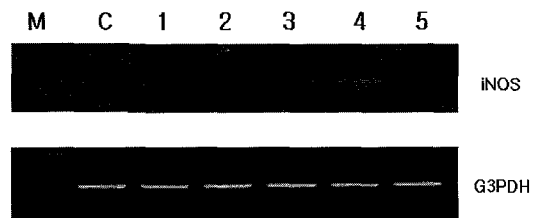


Fig. 5. Effect of various herbal extracts on NO production and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with various herbal extracts for 24 hr. Total RNA was prepared, and iNOS was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control gene. C : control, LPS : lipopolysaccharide, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR)

5. LPS로 자극된 RAW 264.7에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제 효과

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 과다하게 NO 생성된 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 LPS와

이들 약재를 동시에 처리하여 NO 생성능의 조절 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 15.3±0.15로 5.29±0.04에 비해 유의하게 증가하였다. LPS와 각각의 약재를 동시에 처리하였을 때, 사삼열수추출액(10, 100 µg/ml)의 경우 15.79±0.19, 12.49±0.07로 8.2±0.15로 100 µg/ml에서 유의한 NO 생성 억제 효과가 관찰되었으며, 맥문동 열수추출액(10, 100 µg/ml)의 경우 15.±0.07, 13.47±0.22로 100 µg/ml에서 유의한 NO 생성 억제 효과가 관찰되었다. 석곡 열수추출액(10, 100 µg/ml)의 경우 13.59±0.01, 8.63±0.09로 처리 농도 모두에서 유의한 NO 생성 억제 효과가 관찰되었다. 옥죽, 황정 열수추출액의 경우 16.23±0.19, 12.66±0.08, 15.23±0.11 및 13.29±0.07로 100 µg/ml에서 유의한 NO 생성 억제 효과가 관찰되었다(Fig. 6). NO 생성과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과에서는 LPS와 약재를 동시에 처리하였을 때, 석곡과 황정 열수추출액에서는 iNOS 단백질 발현이 관찰되었으며, 사삼, 맥문동, 옥죽 열수추출액에서는 LPS 단독에 비해서 약한 iNOS 단백질 발현이 관찰되었다(Fig. 7).

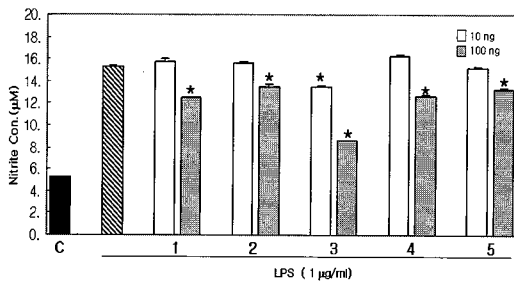


Fig. 6. Effect of various herbal extracts on the NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 µg/ml LPS in the presence of various herbal extracts for 24 hr. (A) The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. C : control, LPS : lipopolysaccharide, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopsis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR). * Significantly different from LPS-stimulated group (p<0.05).

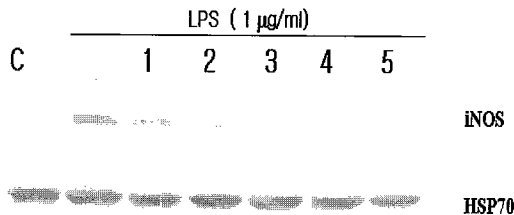


Fig. 7. Effect of various herbal extracts on the NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 µg/ml LPS in the presence of various herbal extracts for 24 hr. The protein extracts were prepared, and then analyzed for iNOS expression by Western blotting. HSP70 was used as control protein. C : control, LPS : lipopolysaccharide, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopsis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR)

6. Flow cytometer를 이용한 마우스 비장세포의 CD45R/B220의 변화

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추출액이 B 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포를 분리하여 각

추출액을 100 µg/ml 농도로 처리한 후 FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody를 이용하여 분석하였다. 대조약물로는 B세포 특이 mitogen인 LPS를 처리하여 비교하였다. FACs를 이용한 분석 결과, 석곡 열수추출액에서는 CD45R/B220의 증가가 관찰되었으나, 사삼, 맥문동, 옥죽 및 황정 열수추출액에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 8).

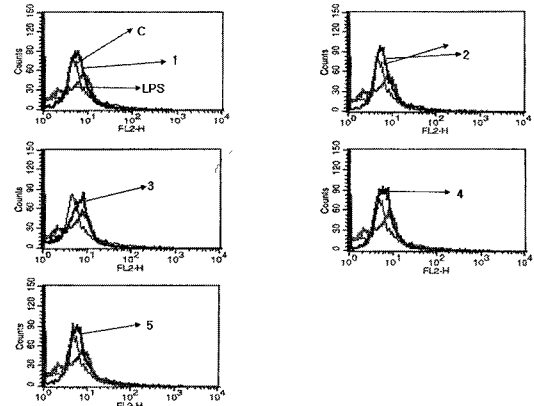


Fig. 8. Flow cytometry analysis of various herbal extracts-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells(4×10⁶ cell/ml) were incubated with various herbal extracts or LPS for 48 hr. The cultured spleen cells were stained with FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 and analyzed by flow cytometry. C : control, LPS : lipopolysaccharide, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopsis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR)

7. 인체 말초혈액 단핵구 분리 및 사이토카인 유전자 분석

사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정의 열수추출액이 T세포에서의 작용에 미치는 효과를 확인하기 위하여 인체 말초혈액에서 단핵구를 분리하여 각 약재를 처리한 후 IFNγ, IL-6 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조약물로는 T세포 특이 mitogen인 b-actin을 사용하였다. 인체 말초혈액 단핵구에 각 열수추출액을 100 µg/ml 농도로 처리한 후 IFNγ, IL-6 유전자 발현을 관찰한 결과, 석곡과 옥죽 열수추출액은 IFNγ, IL-6에서 강하게 발현되었고, 사삼 열수추출액은 IFNγ에서는 약하게 IL-6에서는 강하게 발현되었다. 맥문동 열수추출액은 IFNγ에서만 발현되었고, 황정 열수추출액은 IFNγ, IL-6 모두에서 발현되지 않았다(Fig. 9).

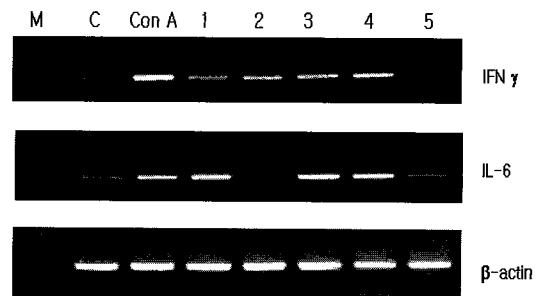


Fig. 9. Effect of various herbal extracts on cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cell. The cells were incubated with various herbal medicines for 24h. Total RNA was prepared, and expression of IFNγ and IL-6 cytokine gene were analyzed by RT-PCR, b-actin was used as control gene. C : control, conA : concanavalin A, 1 : *Adenophorae Radix*(AR), 2 : *Liriopsis Tuber*(LT), 3 : *Dendrobii Herba*(DH), 4 : *Polygonati Odorati Rhizoma*(PO), 5 : *Polygonati Rhizoma*(PR)

8. GC-MS에 의한 석곡의 성분 분석

GC-MS로 석곡 열수추출액과 에탄올 추출액을 DMSO에 녹여 성분을 조사한 결과, 열수추출액에서는 24종 그리고 에탄올 추출액에서는 18종의 성분이 동정되었다. 이들 추출물에서 GC-MS 결과 상대적으로 높은 몇 가지 분리 성분은 열수추출의 경우 b-Nitroethyl alcohol 성분이 주를 이루었고 그 이외에 다양한 소량의 성분들이 분리되었다(Table 4). 에탄올 추출액의 경우 2-Amino-1-propanol, Dimethyl sulfone 과 b-Sitosterol 등 다양한 성분으로 이루어져 있음을 확인 할 수 있었다(Table 5).

Table 4. Chemical composition of the water extract of *Dendrobii Herba*.

No.	Compounds	RT(min)a
1	b-Nitroethyl alcohol	1.4
2	Ethyl aldehyde	1.66
3	Nitrous oxide	1.75
4	Acetaldehyde	1.83
5	Dimethyl sulfone	4.12
6	Propylene oxide	4.92
7	2-Aminobutane hydrochloride	6.4
8	2,3,4,6-tetra-o-benzyl-benzene	8.46
9	4-Pyridinamine	21.51
10	6-deutero-2-methylpyridine	26.81
11	6-deutero-2-methylpyridine	26.87
12	p-Aminopyridine	27
13	3-Pyridinamine	27.21
14	a-Pyridinamine	27.66
15	3,3,4-trimethyl-4-3-Aminopyridine	27.91
16	3-Aminopyridine	27.99
17	6-deutero-2-methylpyridine	28.12
18	tert-Butoxybenzene	28.19
19	b-Aminopyridine	28.79
20	Amino-3 pyridine	29
21	methyl 11-imino-12-methoxy-14-histamine,n-trifluoroacetyl	29.07
22	Hexamethylcyclotrisiloxane	29.3
23	Cyclotrisiloxane	37.36
24	Cyclotrisiloxane	51.69

a Retention time (in minutes)

Table 5. Chemical composition of the ethyl alcohol extract of *Dendrobii Herba*

No.	Compounds	RT(min)a
1	2-Amino-1-propanol	1.41
2	trimethylsulfonium iodide	1.55
3	b-Methoxyethanol	1.61
4	3-Methyl-4-pentanol	2.29
5	Dimethyl sulfone	4.17
6	Ethyl nonanoate	20.85
7	4-Decyne	23.07
8	3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid	26.91
9	3,4-Dimethoxyphenylacetone	27.17
10	3,5-dihydroxy-7-methoxydihydrop	27.9
11	4-nitroindole[2,3-alcyclodec-1-	28.42
12	2-heptenoic acid,4-cyclopropyl	28.7
13	5-allyl-1,3-dimethyl-5-phenylba	28.8
14	2-Pinen-10-ol	29.95
15	1,5-di(methoxymethyl)-6,8-dimet	30.3
16	n-(methyl-d2)-aniline	30.71
17	b-Sitosterol	35.72
18	Progesterone	37.68

a Retention time (in minutes)

9. GC-MS에 의한 옥죽의 성분 분석

GC-MS로 옥죽 열수추출액과 에탄올 추출액을 DMSO에 녹여 성분을 조사한 결과, 열수추출액에서는 13종 그리고 에탄올 추출액에서는 10종의 성분이 동정되었다. GC-MS로 옥죽 열수추출액과 에탄올 추출액을 조사한 결과 상대적으로 높은 성분의 경우 열수추출액의 경우 Dipirartril-tropico, Methyl sulfoxide과 Demsox 등이 확인 되었으며, 에탄올 추출액의 경우 Ammonia, stigmast-5-en-3-ol, Acetaldehyde, Ethylene glycol과 a-Ethylallyl alcohol 등 다양한 성분들이 분리 되었다(Table 6, 7).

Table 6. Chemical composition of the water extract of *Polygonati Odorati Rhizoma*.

No.	Compounds	RT(min)a
1	Ammonia	1.41
2	Acetyl chloride	1.52
3	Methyl sulfoxide	3.61
4	Demsox	3.68
5	Dipirartril-tropico	3.75
6	1,2-Ethanediol	3.88
7	Dimethyl sulfone	4.12
8	Propane, 1-fluoro-	4.17
9	2-methyl-1-D1-aziridine	4.87
10	Trimethylurea	6.37
11	2-(E)-Penten-1-ol	12.22
12	3-Ethoxy-1-propanol	12.37
13	3-Nitrophthalic acid	27.64

a Retention time (in minutes)

Table 7. Chemical composition of the ethyl alcohol extract of *Polygonati Odorati Rhizoma*.

No.	Compounds	RT(min)a
1	Ammonia	1.41
2	Acetaldehyde	1.51
3	n-Octaldehyde	1.62
4	Ethylene glycol	3.89
5	Sulfonylbis-methane	4.13
6	2-methyl-1-D1-aziridine	4.88
7	a-Ethylallyl alcohol	12.29
8	3-Amino-s-triazole	12.33
9	7-Dodecen-1-ol	22.7
10	stigmast-5-en-3-ol	35.72

a Retention time (in minutes)

고찰

한의학에서는 正氣 위주의 질병관을 가지고 있는데, 正氣虛는 모든 질병을 일으키는 내적 조건이므로, 正氣는 인체의 생리 활동을 정상적으로 유지시키고 내외의 병인으로부터 인체를 방어하며 질병으로부터 회복시키므로 疾病因子에 관한 것보다는 인체의 생활능력과 疾病에 대한 抵抗能力을 증시하여 치료방법이 대부분 인체의 氣의 보존과 배양을 목표로 하고 있다³⁾. 이러한 한의적 관점은 서양의학에서 생체의 방어기능에 관계된 면역학과 많은 유사성을 가지고 있다.

면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나눌 수 있으며, 생체내에는 혈액, 임파선, 비장 및 위장관 등 여러 조직 및 기관에 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재한다. 면역

에 관여하는 세포로는 T 세포, B 세포, 대식세포 및 NK 세포 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 T 세포, B 세포, 대식세포로 알려져 있다^{1,2)}.

補陰藥은 인체의 陰에 속하는 功能이 감퇴된 병리상태인 陰虛證을 改善 혹은 消除할 수 있는 약물로서, 대표적인 약물로는 沙蔘, 麥門冬, 石斛, 玉竹, 黃精 등을 들 수 있다.

이들 補陰藥에 관한 연구로는 사삼의 경우, 항균 소염작용에 효과가 있으며 맥문동의 경우, 항당뇨 항암효과, 석곡의 경우 골다공증 항산화, 옥죽은 당뇨 혈압조절등, 황정은 혈당강화효과 등에 관한 연구들이 보고되었으나^{17,21-24,27,29,34,38)}, 면역작용에 관한 실험적 연구는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 補陰藥의 대표약물인 사삼, 맥문동, 석곡 및 옥죽, 황정 등이 면역조절에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 마우스 비장세포 증식능, RAW 264.7 세포주의 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포의 Th1 사이토카인의 발현 및 CD45R/B220 변화를 조사하고 이중 효과가 인정된 석곡, 옥죽의 구성성분을 GS-MS를 통해 조사하였다.

비장은 韓醫學에서 인체의 氣를 주관하며 외부의 邪氣를 방어하는 장기로 적색수질에는 대식세포와 많은 적혈구로 이루어진 sinusoid로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳이다. 백색수질은 T 세포로 이루어진 periarteriolar lymphoid sheath (PALS)를 형성하여 동맥을 둘러싸고 있으며, PALS의 바깥쪽에 위치한 marginal zone은 primary lymphoid follicle로 형성되어 있으며 B 세포가 풍부하다^{1,2)}. 이러한 이유로 면역력 측정을 위한 실험 재료로 광범위하게 이용되고 있다.

본 실험에서는 대표적인 補陰藥인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정 열수추출액이 비장세포 증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 약재별 열수추출액을 농도별(10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 관찰하였다. 마우스 비장세포의 증식능 측정에서 열수추출액에서는 약간의 증가를 보였다. 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽에서 비장세포증식능이 관찰되었으나 황정의 경우 세포증식능의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

MTX는 비타민인 엽산의 대사길항제로 핵산의 합성을 억제해 세포재생 및 증식을 막으며, 면역억제제로서 생체에 투여하게 되면 DNA 합성을 저해하고 세포 독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소 현상을 초래하는 것으로 알려져 있으며 암의 성장을 억제하는 세포독성물질로 각종 암의 치료에 광범위하게 사용되고 있다⁴⁵⁻⁴⁸⁾. 면역억제제에 의해 저하된 세포의 회복 효과를 알아보기 위하여, 대표적인 補陰藥들이 MTX 처리에 의한 세포증식억제에 미치는 효과를 조사하였다. MTX 면역억제제와 병용 처리하였을 때 석곡과 옥죽 열수추출액 처리에 의해 비장세포증식 억제가 현저하게 감소됨이 관찰되었다(Fig. 2).

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증 등의 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{49,50)}. NO는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로, T 세포에서 유래된 사이토카인이나 외부 항원의 자극에 의해 활성화되어 생성되며 leishmaniasis, listeriosis 및 tularemia 등 세포 내 감염을 일으키는 미생물에 방

어능, tuberculosis, leprosy 및 암 등에 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있고, 또한 대식세포가 생성하는 NO가 필요 이상으로 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있어 대식세포의 면역반응 조절연구에 많이 이용되고 있다⁵¹⁾. NO는 이종적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저 농도의 NO는 신경전달물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고 되어 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키거나 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절 할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다⁵²⁻⁵⁴⁾.

본 실험에서 補陰藥의 대표적인 약재들의 RAW 264.7 세포주의 NO 생성능에 관한 효과를 살펴본 결과, 사삼, 석곡, 옥죽 열수추출액의 경우 대조군에 비해 NO 생성능이 유의하게 증가함이 관찰되었다. 반면 맥문동과 황정에서는 NO 생성능의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 큰 쪽으로 증가하였던 석곡, 옥죽 열수추출액의 경우에 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 있었으며 사삼의 경우 약한 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다. NO 생성능의 변화가 없었던 맥문동, 황정 열수추출액에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

대표적인 補陰藥들이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO생성 억제능에 미치는 효과를 살펴본 결과, LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리 시, 석곡 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 큰 폭의 감소가 관찰되었으며 사삼, 맥문동, 옥죽, 황정 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5). NO 생성 조절과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 확인한 결과, LPS 자극에 의해 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, 석곡 처리군에서는 거의 iNOS 단백질 발현이 관찰 되지 않았다(Fig. 5).

이상의 결과를 볼 때, 대표적인 補陰藥들 중 석곡과 옥죽 추출액이 NO 생성능과 과도한 NO 생성억제능에 우수한 효과가 관찰 되었다.

사이토카인은 선천 및 적응면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 선천면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 적응면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{50,55)}. 세포성 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응으로 T 세포는 Th1 림프구나 Th2 림프구로 분화되며, 이들 두 림프구는 상호 길항작용에 의해 면역체계를 유지한다. 주로 Th1 림프구는 지연형 과민반응, 항미생물반응 및 종양에 관한 숙주면역반응에 관여하며, Th2의 경우 즉시형 과민반응, 천식 및 알러지 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 많

은 연구에서 한약재의 이러한 Th1 type 관여 면역반응과 Th2 type 면역반응을 조사하기 위해 Th1세포와 Th2 type에서 분비되는 사이토카인 발현에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다^{50,55,56}.

IFN γ 는 Th1 아집단의 특정 사이토카인으로, T 림프구와 NK 세포가 대식세포를 활성화하여 포식된 미생물을 죽이도록 하는 방법을 제공하며, 미감작 CD4⁺ 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진시키고 Th2 세포의 증식을 억제하며, 마우스의 B 세포에 작용하여 IgG2a로의 전환을 촉진시키고 IgG1과 IgE 같은 IL-4 의존성 동형 전환을 저해 한다^{56,57}. IL-2는 항원 인식으로 T 세포에 의해 생성되며 항원 특이세포를 증식시키고, NK 세포 등 다른 면역세포의 증식과 분화를 촉진시키며, 항원으로 활성화된 T 세포의 세포사멸을 가능케 한다^{56,57}.

본 실험에서 대표적인 補陰藥들이 T 세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 마우스 비장세포의 사이토카인 유전자 발현 변화를 조사한 결과, 석곡, 옥죽 추출액의 경우 IL-2과 IFN γ 의 유전자의 발현이 관찰되었다(Fig. 3). 이 결과를 볼 때 대표적인 補陰藥들 중에 석곡과 옥죽 추출액의 면역반응 조절에 이들 사이토카인이 관여 할 것으로 생각된다.

모든 혈액세포와 면역세포는 조혈줄기세포에서 분화되어 형성된다. 조혈줄기세포가 분화됨에 따라 면역세포의 표면에는 각기 독특한 유형의 세포 표면 단백질을 발현하는데, 이를 CD (cluster of differentiation)라고 하며, 림프구 분화의 다양한 표식자에 대해 특이적인 단일클론 항체의 군을 의미한다^{58,59}. CD45RB는 백혈구 공통 항원으로 주로 조혈세포에서 발현되며 T 세포 및 B 세포의 항원 수용체 매개적 신호전달에 중요한 역할을 하는 티로신 인산분해 효소인 CD45의 아형이다.

본 실험에서 대표적 補陰藥들이 체액성 면역반응에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포에 B 세포 특이 표현형의 항체를 이용하여 표현형의 변화를 관찰한 결과, 석곡 추출액에서 CD45R/B220의 증가가 관찰되었다. 위의 결과로 볼 때, 석곡 추출액은 체액성 면역반응과 세포성 면역반응 모두에 관여함을 알 수 있었다.

補陰藥 중 이번 연구를 통해서 가장 유의성 있는 면역조절 효과가 관찰된 석곡과 옥죽 열수추출액의 성분을 GC-MS를 이용하여 조사한 결과, 석곡 열수추출액의 경우 b-Nitroethyl alcohol 성분이 주를 이루었고(Table 1), 옥죽 열수추출액의 경우 Dipirartril-tropico, Methyl sulfoxide과 Demsodrox 등 다양한 성분들이 분리 되었다(Table 3). 이들 성분은 기존에 알려진 석곡, 옥죽의 성분과는 차이가 있었다.

이상의 결과로 보아 대표적인 補陰藥인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정 열수추출액 중에서 석곡과 옥죽 열수추출액이 세포증식능, 사이토카인 유도능, 면역억제제 MTX치리에 의한 회복능에서 다른 추출액에 비해 상대적으로 가장 유의성 있는 생체면역반응 효과를 가진다고 생각된다.

결 론

補陰藥의 대표약물인 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽 및 황정 열수추

출액의 면역조절효과를 비교하고자 마우스 비장세포증식능과 RAW264.7 마우스 대식세포, NO 생성조절능 및 iNOS 유전자 발현, 인체 말초혈구세포의 사이토카인 발현, 마우스 비장세포의 B세포 표면항원에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

마우스 대식세포의 세포증식능은 사삼, 맥문동, 석곡과 옥죽에서 유의성 있게 증가하였으며, 황정 열수추출액에서는 세포증식능에 별다른 변화가 관찰되지 않았다.

면역억제제에 의한 마우스 비장세포의 세포증식능은 석곡, 옥죽 열수추출액의 경우 세포증식 억제가 현저하게 감소되었다.

마우스 비장세포에서 IL-2, IFN γ 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 석곡 열수추출액의 경우 IL-2 및 IFN γ 유전자 발현이 관찰되었고, 옥죽과 황정 열수추출액에서는 IL-2 와 IFN γ 유전자가 약하게 발현되었다.

RAW264.7 마우스 대식세포의 NO 생성능은 사삼, 석곡 열수추출액의 경우 유의하게 증가됨이 관찰되었다. NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사한 결과, 사삼, 석곡 및 옥죽 열수추출액의 경우 마우스 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다.

LPS로 자극된 마우스 대식세포에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제효과를 관찰한 결과, 사삼, 맥문동, 석곡, 옥죽, 황정 열수추출액의 경우는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 유의하게 감소하였다.

마우스 면역세포의 B세포 표현형을 관찰한 결과, 석곡 열수추출액에서는 CD45R/B220의 증가가 관찰되었으나, 사삼, 맥문동, 옥죽, 황정 열수추출액에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다.

인체 말초혈구세포에서 IFN γ 와 IL-6 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 석곡과 옥죽 열수추출액의 경우 IFN γ 와 IL-6 유전자가 강하게 발현되었다.

GC-MS에 의한 석곡과 옥죽의 열수추출액 성분을 분석한 결과 석곡 열수추출액에서는 b-Nitroethyl alcohol 성분이 주를 이루었고(Table 4, 5), 옥죽 열수추출액의 경우 Dipirartril-tropico, Methyl sulfoxide과 Demsodrox 등의 성분이 분리 되었다(Table 6, 7).

이상의 결과를 보아 대표적 補陰藥 중 石斛과 玉竹의 열수추출액은 면역조절능력이 뛰어나며 이러한 면역조절능력으로 생체 내에서 생물활성조절자(BRM)으로 작용할 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 김세종. 면역학. 서울, 고려의학, 1-21, 1994.
2. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울, 서울대학교 출판부, 1-3, 1986.
3. 전국한의학대학교 병리학교실. 한방병리학. 서울, 한의문화사, 128-132, 2004.
4. 이영선, 한옥경, 박찬우, 전태원, 이은실, 신상우, 김광중, 김

- 효정. 韓方混合液 APA-01의 면역 증강 효과. 동의생리병리학회지 16: 483-489, 2002.
5. 길영성, 정승기, 이형구. 어성초 및 삼국음이 면역기능에 미치는 영향. 대한의학학회지 16: 295-318, 1995.
 6. 김기환, 이인란, 정인성, 정희용, 윤연숙. 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현. 고려인삼학회지 22: 324-330, 1998.
 7. 백남인, 김영숙, 경중수, 박기현. 황기의 간기능 보호성분. 생약학회지 27: 111-116, 1996.
 8. 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. 當歸 추출물이 면역계에 미치는 영향. 대한면역학회지 12: 113-118, 1990.
 9. 표명윤, 양기숙, 현수미. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. 응용약물학회지 9: 194-200, 2001.
 10. 전국 한의과대학 본초학교수. 本草學. 서울, 영림사, 587-594, 1991.
 11. 손성연, 손풍익. 神農本草經. 태원시, 산서과 학기출판사, 33, 1991.
 12. 허 준. 東醫寶鑑. 서울, 남산당, 88: 716-717, 1994.
 13. 이시진. 本草綱目(上冊). 북경, 인민위생출판사, 710-714, 1982.
 14. 왕 암. 增補本草備要. 서울, 고문사, 4-5, 1974.
 15. 유계우. 中醫藥入門. 남창시, 강서과학기술출판사, 236-237, 1989.
 16. 中藥臨床應用編寫組編. 중약임상응용, 광둥, 인민출판사, 390-392, 1975.
 17. 팽명천. 中國藥膳學. 북경, 인민위생출판사, 208-209, 1985.
 18. 호세림. 中國道志藥材. 함이빈시, 홀롱강과학기술출판사, 512-514, 1989.
 19. 상해중의학원. 中草藥學. 홍콩, 중화상무인서국홍콩분관, 571-573, 1975.
 20. 진가모. 本草蒙筌. 왕숙민등점교 북경, 인민위생출판사, 119, 1988.
 21. 왕본상. 現代中藥藥理學. 천진, 천진과학기술출판사, 1363-1364, 1997.
 22. 中醫大辭典編纂委員會. 中醫大辭典. 북경, 인민위생출판사, 101, 102, 249, 1993.
 23. 陰健·郭力弓 主編. 中藥現代研究與臨床應用. 북경, 중의고적출판사, 248, 249, 1994.
 24. 黃泰康 主編. 常用中藥成分與藥理手冊. 북경, 중국의역과기출판사, 1352-1353, 1994.
 25. 난무·전남본초. 곤명시, 운남인민위생출판사, 408-413, 1975.
 26. 안덕균, 김재학. 濟疴와 沙蔘중의 유리당 함량 및 효능에 관한 비교연구. 본초분과학회, 7(1):3-13, 1992.
 27. 임정교, 강명수, 박인경, 김순동. 맥문동 물 추출물의 식이가 Streptozotocin으로 유도한 당뇨 흰쥐의 혈당과 혈청 콜레스테롤 함량에 미치는 영향. J East Asian Soc Dietary Life 15(1):20-28, 2005.
 28. 이인자, 안지윤. 맥문동 열수추출물의 사염탄소로 유발된 흰쥐의 간손상에 대한 보호 효과. 생약학회지 34(2):166-171, 2003.
 29. 이인자, 백남인, 조성지, 방만호, 김무성, 박창기, 김금숙, 성재덕. 맥문동(Liriope platyphylla W. T.) 스테로이드 사포닌의 항암활성. 韓國農化學會誌 41: 5, 1998.
 30. Han, D.S. Pharmacognosy. 5th ed. 서울, 동명사, 148, 1993.
 31. Shibata, M., Noguchi, R., Suzuki, M., Iwase, H., Soeda, K., Niwayama, K., Kataoke, E. and Hamano, M. Pharmacological studies on medicinal plant components. I. On the extracts of Ophiopogon and some folk medicine. Proc. Hoshi Pharm. 13: 66-76, 1971.
 32. Back, N.I., Cho, S.T., Bang, M.H., Lee, I.Z., Park, C.G., Kim, M.S., Kim, K.S. and Sung, J.D. Cytotoxicity of steroid saponins from the tuber of Liriope platyphylla W.T., Agri. Chem. Biotechnol 41: 390-394, 1998.
 33. 김순동, 구연수, 이인자, 김일두, 윤광섭. General Components and Sensory Evaluation of Hot water Extract from Liriope Tuber. 한국영양식량학회지 30: 1, 2001.
 34. 한홍준, 김종환, 조한백, 최규섭. 석곡이 난소적출로 골다공증이 유발된 흰쥐에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 13(2):120-135, 2000.
 35. Mizue, O., Wenzhe, F., Koji, H., Quanbo, X., Yasuhiro, T., Katsuko, K., Tsuneo, N., Tomohiro, S., Kenji, T. and Shigetoshi, K. Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of Rhodiola sacra. Journal of Ethnopharmacology 67(1):111-119, 1999.
 36. Reiter, R.J. Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. FASEB J. 526-533, 1995.
 37. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E. free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now? J. Lab. Clin. Med. 119: 598-620, 1992.
 38. 김영균, 양기호, 조수인. 석곡의 항산화 효과. 대한본초학회지 20(4):53-60, 2005.
 39. Ahn, D.G. Restorative of Korea. Yeollin Chakdle, Seoul, Korea, 307-312, 1993.
 40. Lee, E.S. Hypoglycemic effect of BuOH of polygonatum Odorum extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Duksung Women's University, Korean J. Nutri. 28: 727-736, 1994.
 41. Kim, J.K., Lee, Y.J. Pharmacognostical studies on the rhizome of Polygonatum robustum Nakai. Kor. J. Pharmacogn 11: 69-74, 1980.
 42. Brill, S., Dean, E. Solomon's seal. Hearst Books. New York, 261, 1994.
 43. Bailey, C., Day, C. Diabetic Care 12: 553, 1989.
 44. Akhtar, M.S., Ali, M.R. Planta Medica 51, 81, 1985.
 45. 김창환, 고흥균, 배원영. 황기수침이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지 11: 49-66, 1994.
 46. 김일영, 이상재, 김광호. 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한예방의학학회지 4: 152-169, 2000.

47. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역 기능저하에 미치는 영향. 동국대학교대학원 박사학위논문 1996.
48. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Suh, S.I., Shin, S.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Lee, E.S., Kim, K.J., Kim, H.J. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *J Ethnopharmacol* 84: 193-198, 2003.
49. Haslberger, A., Romanin, C., Koerber, R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Mol Biol Cell* 3: 451-460, 1992.
50. Shacter, E., Arzadon, G.K., Williams, J.A. Stimulation of interleukin-6 and prostglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. *Blood* 82: 2853-2864, 1993.
51. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J chin Med* 28: 217-226, 2000.
52. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 69: 625-635, 2001.
53. 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* 2: 141-150, 2000.
54. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. 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.
55. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A. and Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 211: 24-32, 1996.
56. Abbas, Lichtman, 강재성 외. 세포분자면역학. 서울, 범문사, 243-274, 2004.
57. Janeway. 김태규 외. 면역생물학. 서울, 라이프사이언스, 307-356, 2002.
58. 타다 토미오. 황상익 외. 면역의 의미론. 서울, 한울, 75-87, 100-103, 1998.
59. Roitt, 김주덕 외. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사, 35-62, 1991.