

황기 육계의 배합에 따른 면역활성 비교

정다영, 하혜경, 이호영, 이남현, 신현규*

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Comparative analysis on immune response of combination with Astragali Radix and Cinnamomi Cortex

Da Young Jung, Hyeakyung Ha, Ho-Young Lee, Nam-Hun Lee, Hyeunkyo Shin*

Herbal Medicine EBM Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

ABSTRACT

Objective : Astragali Radix (AR) and Cinnamomi Cortex (CC) are used to enhance immune response in Asian traditional medicine. Immuno-potential of the combination of AR and CC were evaluated on the cellular and humoral immune response using murine macrophage cell line (RAW 264,7) and OVA-immunized mice.

Methods : This study was designed to investigate the immuno-potential effects of AR, CC, and AR with CC on nitric oxide synthesis in RAW 264,7 cells and proliferation and production levels of Intereukin-2 (IL-2) in mouse splenocytes. In addition, we evaluated the plasma-specific antibody responses and splenocyte proliferation on ovalbumin (OVA)-immunized mice treated with herbal extracts.

Results : Combination treatment with AR and CC increased nitric oxide synthesis in RAW 264,7 cells and IL-2 level in splenocytes ($p < 0.001$). Combination of AR and CC significantly enhanced the Concanavalin A- (Con A ; T cell mitogen) and lipopolysaccharide-(LPS ; B cell mitogen) induced splenocyte proliferation on the OVA-immunized mice. Combination of AR and CC also significantly enhanced plasma levels of OVA-specific IgG ($p < 0.01$), IgG1 ($p < 0.05$) and total IgM ($p < 0.01$) compared with the OVA-immunized control group.

Conclusion : These results suggest that combination of AR and CC could be used as therapeutic profile on activation of immune response.

Key words : Astragali Radix, Cinnamomi Cortex, immune response, synergistic effect

서론

한의학에서는 扶正祛邪의 원칙에 따라 질병 치료와 예방을 하게 된다¹⁾. 이러한 扶正祛邪 원칙의 치료 수단중 한약 처방은 무작위적인 한약의 조합이 아니라, 약재의 성질을 나타내는 氣味·歸經, 약재 간 상호 배합관계인 七情論, 그리고 처방 구성의 원리인 君臣佐使論 등의 본초 및 방제 이론을 바탕으로 한약재를 배합하여 구성된다²⁾.

이들 이론중 七情論의 7가지 배합 분류에서 약성과 효능이 다른 2종의 약물이 서로 배합되어 한 종의 약물이 추가 되는 다른 약물의 효능을 증대시키는 相使이론을 실험하기로 하였다³⁾. 따라서 補氣藥 조합으로 황기와 육계를 선정하였는데, 황기는 보기작용이 우수하고, 육계는 조양작용이 뛰어나, 이

두 약이 배합하면 相使작용으로 온후하게 하여 陽氣를 강화하고 血脈을 통창하게 하여, 八珍湯에 이 두 약을 가한 十全大補湯은 氣血兩虛를 치료하는⁴⁾ 대표적인 보약이 되었다. 따라서 황기, 육계 각각의 한약재와 황기 육계를 합한 한약재의 인체 방어에 가장 기본적인 면역활성 검색을 대식세포 및 비장세포의 활성화 효과, 면역글로불린의 생성량 변화 등으로 확인하여 相使이론으로 배합된 황기와 육계에 의한 시너지 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

*교신저자 : 신현규. 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약EBM연구센터.
· Tel : +82-42-868-9464. · Fax : +82-42-864-2120. · E-mail : hkshin@kiom.re.kr.
· 접수 : 2011년 11월 13일 · 수정 : 2011년 11월 30일 · 채택 : 2011년 12월 16일

1) 약재추출

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge, *Astragali Radix*, AR, Jeongseon, Korea) 3년근과 육계 (*Cinnamomum cassia* Blu, *Cinnamomi Cortex*, CC, Vietnam)는 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 구입하였다. Table 1과 같이 두 약재를 각각 또는 동일한 비율로 배합하고 이들 약재에 10배의 증류수를 가한 후 100° C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (Glas-Col® Combo Mantle, Terre Haute, USA)을 이용하여 추출한 후 동결건조기 (PVTFD100R, Ilshin, Korea)를 사용하여 건조 분말을 얻었다. 처방에 포함되는 약재의 양은 건조약재를 기준으로 처방되므로 실험에서도 임상에서와 유사한 처방 조건이 되도록 건조 약재의 양으로 환산하여 비교하였다. 약재별로 추출물의 수율이 다르게 나타나므로 모든 실험에서 동일량의 건조약재에 대한 활성을 검색하기 위하여 이후의 모든 실험에 대한 적용 용량을 Table 1과 같이 수율을 적용하였다. 각 건조약재량 100 μ g/ml의 경우 추출 수율에 따라서 황기의 실제 추출물량은 17.3 μ g/ml, 육계는 5.3 μ g/ml, 황기와 육계의 배합시료는 14.2 μ g/ml에 해당된다.

Table 1. Combinations of Crude Drugs in Herbal

Herbal medicine	Componented crude drugs (g)		
	AR*	CC†	AR+CC†
황기 <i>Astragali Radix</i>	60	-	30
육계 <i>Cinnamomi Cortex</i>	-	60	30
Total (g)	60	60	60
Yield (%)	17.27	5.28	14.22

**Astragali Radix* extract

†*Cinnamomi Cortex* extract

‡*Astragali Radix* and *Cinnamomi Cortex* mixture extract

2. 실험 방법

1) 대식세포의 활성화 검색

(1) 대식세포의 증식능 검색

황기 (AR), 육계 (CC) 및 배합 황기·육계 (AR+CC)가 대식세포의 증식에 미치는 효과를 비교하였다. Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여 사용하였고 5.5% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, NY, U.S.A.), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Gibco BRL, NY, U.S.A.)를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, NY, U.S.A.)에서 5% (v/v) CO₂, 37° C에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 AR, CC, AR+CC의 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 양성대조군으로 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 tetrazolium salt인 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 ELISA reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리군인 control well의 흡광도에 대한 약제 처리 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plate에 2.5×10^5 cells/well로 분주한 후 12시간 배양하여 안정화 시키고 AR, CC, AR+CC의 추출물을 독성이 없는 범위 내에서 농도별 (10-1000 μ g/mL)로 처리하였다. 양성대조군으로 LPS를 농도별 (20, 200 ng/mL)로 처리하였으며 18 시간 배양 후 상층액을 수집하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 Griess reagent (Promega, WI, U.S.A.)를 이용하여 nitrite 양을 측정하여 계산하였다.

2) 생쥐 비장세포 분리 및 증식능 검색

(1) 비장세포의 분리 및 배양

6주령의 수컷 ICR 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장에서 비장세포를 분리한 후 RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)로 적혈구를 제거하였다. 10% FBS 와 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, NY, U.S.A.)을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, NY, U.S.A.)에 비장세포를 부유시켜 5% CO₂, 37° C에서 배양하였다.

(2) 비장세포의 증식능 검색

AR, CC 및 AR+CC 추출물이 비장세포 증식에 미치는 효과를 비교하기 위하여 분리한 비장세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 이들 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 비교물질로 각각 T cell lymphocyte와 B cell lymphocyte에 대한 mitogen인 Con A와 LPS를 0.5 및 1 μ g/mL로 처리하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리군인 control well의 흡광도에 대한 약제 처리 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였다.

(3) Cytokine (IL-2, IL-4) 측정

비장세포에서의 cytokine 분비량을 측정하기 위하여 48-well plate에 2×10^6 cells/well로 분주한 후 12시간 배양하여 안정화 시키고 AR, CC, AR+CC의 추출물을 독성이 없는 범위 내에서 100 μ g/mL 및 500 μ g/mL로 처리하였다. 양성대조군으로 Con A를 처리하였으며 24 시간 배양 후 상층액을 수집하여 IL-2, IL-4 level을 Duoset mIL-2 및 mIL-4 ELISA kit (R&D systems, MN, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

3) OVA 감작 생쥐에서 면역 활성화 검색⁵⁾

(1) 실험동물 및 항원물질 투여

6주령 (17~19 g)의 수컷 C57BL/6 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 1주일간 순화시킨 다음 정상군 (naive group), Ovalbumine (OVA, Thermo, IL, U.S.A.) /Aluminium (Alum, Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.) /Saline 투여군인 대조군 (control group) 군, OVA/Alum 및 AR, CC, AR+CC군 (약물투여군)으로 분리하여 실험에 사용하였다. 동물실험은 실험동물 관리규정을 준수하였으며 한국한의학연구원내 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다. OVA/Alum은 항원으로 생쥐 한 마리당 OVA 100 μ g 및

Alum 200 μg 을 함유하는 100 μL 의 saline을 1일, 8일, 15일에 복강 투여하여 항체 생성을 유도하였으며 정상군은 동일량의 saline을 복강 투여하였다. 정상군과 대조군은 증류수를, 투여군은 각 투여약물을 건조약재 해당량으로 1 g/kg/day 용량으로 1일~21일까지 오랄 존대를 사용하여 1일 1회 경구투여 하였다. 22일에 엔토발 (pentobarbital, 한림제약, 용인, 150 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)을 복강 투여한 후 마취하에 복강절개하여 후대정맥에서 채혈한 후 비장을 적출하고 방혈치사 하였다. 채혈된 혈액은 항응고제로 K_2EDTA 가 처리된 BD Microtainer (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)에 보관 후 전혈구수 측정 후 원심분리하여 혈장을 분리하고 다음 실험시까지 -80°C 에 보관하였다.

(2) OVA 감작된 생쥐 비장세포의 증식능 검색 (mitogen effect)

적출한 비장에서 앞서와 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 96-well plate에 분주한 다음 무처리 또는 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 Con A (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 각각 첨가하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit를 사용하여 세포 증식능을 검색하는 방법으로 AR, CC, AR+CC 투여에 대한 mitogen effect를 검색하였다.

(3) 혈중 항체 생성량 측정

생체내 항체 생성량을 측정하기 위하여 감작항원으로 사용한 OVA에 대한 특이적 (OVA-specific) 또는 비특이적 (total) 면역 글로불린의 양을 측정하였다. 생쥐 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, OVA-specific IgG2a, total IgM level은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bethyl Laboratory, Inc., Texas, USA)를 사용하여 측정하였다. OVA-specific IgG, IgG1 및 IgG2a를 검색하기 위하여 microtiter plate에 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in carbonate buffer, pH 9.6) 용액을 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C 에서 24시간 반응시켜 OVA를 부착시켰다. Total IgM을 측정하기 위하여 IgM capture antibody (Ab)를 carbonate buffer (pH 9.6)에 1 : 100으로 희석하여 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C 에서 24시간 반응시켜 Ab를 부착시켰다. 각각 wash buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 3번 세척한 후 blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)를 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 비특이적인 결합부위를 차단하였다. Wash buffer로 세척한 후 혈장을 1 : 1000 (OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1), 1 : 5 (OVA-specific IgG2a) 또는 1 : 10,000 (total IgM)으로 희석한 후 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a 또는 IgM을 1 : 100,000으로 희석하여 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치한 후 세척하였다. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB)용액을 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 로 가하여 빛을 차단하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 2 M H_2SO_4 를 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 로 가하여 반응을 종결시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 통계처리

모든 측정 결과는 mean \pm SEM으로 나타냈으며 실험군 간의 차이는 Student's t-test (Excel 2007 program)법으로 유의성을 검증하였고, $P < 0.05$ 이하에서 통계적 유의성이 있다고 나타났다.

결 과

1. 대식세포 활성화에 미치는 영향

대식세포는 1차적인 면역 반응과 관련되므로 AR+CC가 대식세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향을 검색하였다. 양성 대조군으로 사용한 LPS는 0.5 및 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 각각 대조군보다 $31.28 \pm 1.61\%$ ($p < 0.001$) 및 $24.00 \pm 0.70\%$ ($p < 0.001$)의 세포증식 효과를 나타냈다. 각각의 약재를 건조약재 해당량으로 환산하여 처리하였을 때 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 AR은 $40.04 \pm 3.36\%$ ($p < 0.001$), AR+CC는 $52.53 \pm 4.15\%$ ($p < 0.001$)의 증식효과를 나타냈으나 CC는 같은 농도에서 세포증식 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 1-A). CC는 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 무처리군과 비교하여 10% 이상의 세포 증식을 저하가 나타나서 이후의 RAW 264.7 세포를 사용하는 실험에서는 최고 처리 농도를 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 결정하였다.

대식세포의 활성화 지표인 NO 생성량을 측정된 결과, 양성 대조군으로 사용한 LPS (20-200 ng/mL)는 농도의존적으로 NO생성을 증가시켜 200 ng/mL에서 $31.34 \pm 0.54 \mu\text{M}$ 이 생성되었다. AR은 농도 의존적으로 NO 생성을 유발하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $21.19 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$)을 생성하였지만 CC는 NO 생성을 유발하지 않는 것으로 나타났다. AR+CC에서는 농도 의존적으로 NO 생성을 유발하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $22.63 \pm 1.20 \mu\text{M}$ ($p < 0.001$)로 나타났다 (Fig. 1-B).

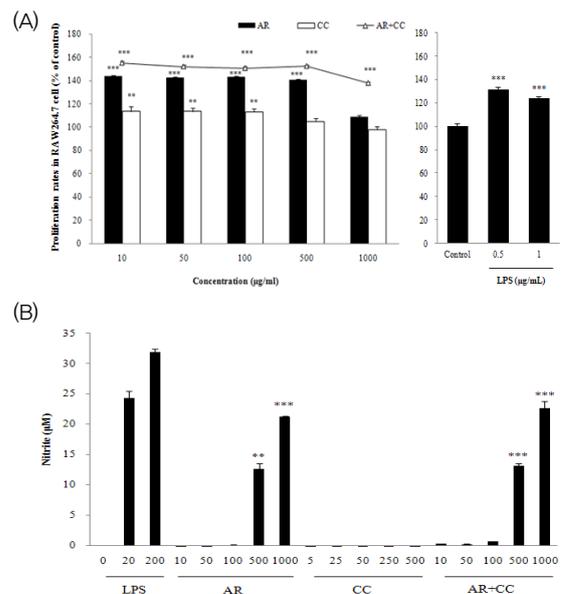


Figure 1. The effects of AR, CC and AR+CC in RAW 264.7 murine macrophages. (A; Macrophage proliferation B; NO stimulation) The units of concentrations of LPS and AR, CC, AR+CC are ng/mL and $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The values are presented as means \pm SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with LPS 0 (control).

2. 비장세포 증식능에 미치는 영향

분리한 비장세포에 AR, CC, AR+CC을 농도별로 처리하여 비장세포의 증식능을 검색한 결과, AR은 농도의존적으로 비장세포의 증식을 유발시켜 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $104.59 \pm 5.42\%$ ($p < 0.001$)의 최고 증식효과를 나타냈으며 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. CC는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $53.00 \pm 5.05\%$ ($p < 0.001$)의 최고 증식효과를 나타냈으며 그 이후 감소하는 경향을 나타내고 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 유의성 있는 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$). AR+CC도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $85.54 \pm 3.63\%$ ($p < 0.001$)의 최고 증식효과를 나타냈으며 이후 증식 정도가 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-A).

3. Cytokine 생성에 미치는 영향

비장세포에 의해 분비된 cytokine (IL-2, IL-4)의 분비량을 측정된 결과, IL-2 level은 무처치군에서 18.88 ± 1.73 pg/mL, AR의 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 38.00 ± 2.55 ($p < 0.001$), 19.05 ± 0.50 pg/mL로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가 시 무처치군과 비교하여 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. CC의 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 24.67 ± 0.00 pg/mL ($p < 0.001$), 13.86 ± 1.72 pg/mL로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가 시 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 AR+CC의 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 29.67 ± 0.00 ($p < 0.001$), 74.00 ± 4.41 pg/mL ($p < 0.001$)로 유의적으로 높은 IL-2를 생성하였다 (Fig. 2-B). 특히 AR+CC의 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 AR 또는 CC의 같은 농도와 비교하여 높은 IL-2 분비를 나타냈다 ($p < 0.001$). 그러나 IL-4 level은 detection limit이하로 측정할 수 없었다.

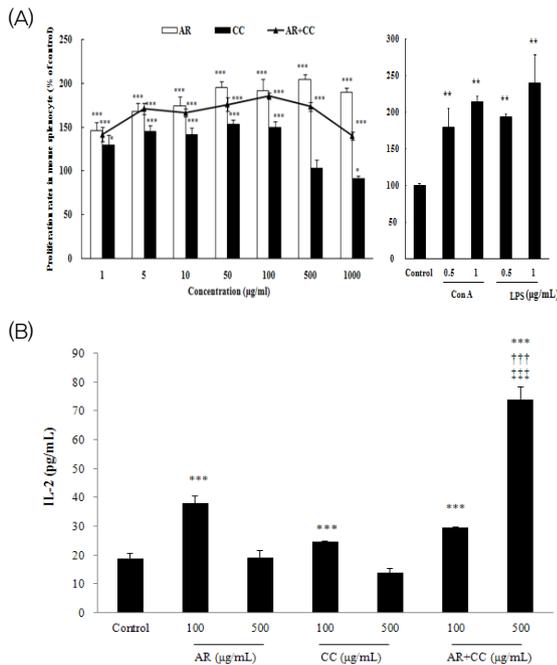


Figure 2. The effect of AR, CC and AR+CC in splenocyte. (A ; Splenocyte proliferation B ; IL-2 level in splenocyte) The values are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with control. ††($p < 0.01$) and †($p < 0.05$) are significant differences with AR group and CC group, respectively.

4. OVA 감작된 생쥐에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 검색하기 위하여 AR, CC, AR+CC를 투여하고 비장세포를 분리하여 항원으로 사용한 OVA, B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대한 mitogen effect를 검색하였다. 각 투여군에서 무처치군을 대조군으로 하여 이에 대한 세포 증식효과를 Fig. 3에 나타냈다. 무처치군에서 항원인 OVA에 대해서는 비장세포 증식능이 유발되지 않았고, Con A와 LPS 처리 시 각각 $73.43 \pm 3.57\%$, $158.94 \pm 7.52\%$ 의 비장세포 증식을 유발하였다. OVA로 감작시킨 대조군에서는 OVA 처리 시 $31.34 \pm 2.71\%$, LPS 처리 시 $89.26 \pm 4.35\%$, Con A 처리 시 $218.06 \pm 3.68\%$ 의 증식을 유발하였다. AR군은 각각 $32.90 \pm 4.56\%$, $74.23 \pm 3.09\%$, $217.14 \pm 6.23\%$ 로 비장세포의 증식을 유발하였고 CC군은 $13.24 \pm 2.94\%$, $71.30 \pm 4.26\%$, $205.46 \pm 3.45\%$ 를 나타낸 반면, AR+CC군은 $20.91 \pm 6.76\%$, $141.95 \pm 17.71\%$, $303.79 \pm 6.71\%$ 를 나타냈다. 대조군과 각 약제 투여군을 비교한 결과 AR군과 CC군은 OVA, LPS, Con A 처리시 대조군과 차이가 나타나지 않았으나 AR+CC군은 LPS 및 Con A 처리시 유의성 있게 비장세포 증식을 유발시키는 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$), AR 또는 CC군과의 비교에서도 유의한 증식효과를 나타냈다 ($p < 0.001$, Fig. 3).

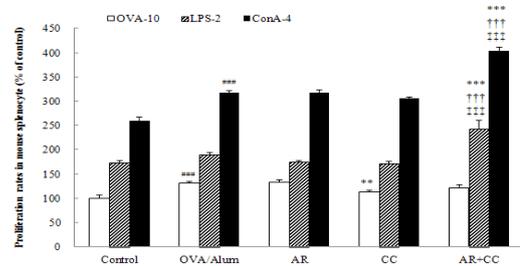


Figure 3. The mitogen effect of AR, CC and AR+CC on OVA-immunized mice. Splenocytes were prepared from Naive, control or AR, CC, and AR+CC-administrated mice on Day 22 and cultured with OVA, Con A or LPS for 48 h. Cellular proliferation was shown as a percentage of the proliferation of cells cultured without a mitogen (% of control). The values are presented as means \pm SEM. Differences between naive and control groups were evaluated in each group (***; $p < 0.001$). Significant differences with control groups were designated as **; $p < 0.01$ and ***; $p < 0.001$. ††($p < 0.01$) and †($p < 0.05$) are significant differences with AR group and CC group, respectively.

5. 생체 내에서 항체생성능에 미치는 영향

생체 내에서 약제 추출물이 면역반응 활성화에 미치는 영향을 검색하기 위하여 실험동물의 혈장 내에서 항원으로 사용한 OVA에 대한 특히 항체의 생성 정도를 비교하였다. 혈장을 이용하여 OVA-specific IgG, IgG1 및 IgG2a를 ELISA 법으로 검색한 결과, 정상군과 비교하여 대조군에서 OVA-specific IgG 및 IgG1의 흡광도가 유의성 있게 증가되어 ($p < 0.001$) OVA에 감작되었음을 나타냈다. 반면 OVA-specific IgG2a는 흡광도가 매우 낮아 검출이 어려웠

으며 흡광도의 변화도 나타나지 않았다. 대조군과 비교하여 AR, CC 및 AR+CC군에서 OVA-specific IgG 및 IgG1 모두 유의성 있게 증가하였으나 각 약제 투여군간의 차이는 없는 것으로 나타났다 (Fig. 4-A). OVA-specific IgG2a는 각 약제 투여군에서 흡광도의 차이를 나타내지 않았다.

초기 면역반응에서 증가하는 혈중 total IgM을 정량한 결과 정상군과 대조군에서 각각 $231.07 \pm 22.96 \mu\text{g/mL}$ 와 $372.33 \pm 45.60 \mu\text{g/mL}$ 으로 OVA 감작시 증가되는 것으로 나타났고 ($p < 0.05$), AR군에서 $417.89 \pm 53.12 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군과 차이가 없었으나 CC군은 $526.64 \pm 31.62 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$)으로 증가하였고, AR+CC군은 $703.34 \pm 75.27 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$)으로 유의성 있게 증가되었고, 이는 AR 또는 CC군과의 비교에서도 유의한 증가를 나타내 ($p < 0.001$) 두 약제를 배합하였을 때 상승작용을 하는 것을 확인하였다 (Fig. 4-B).

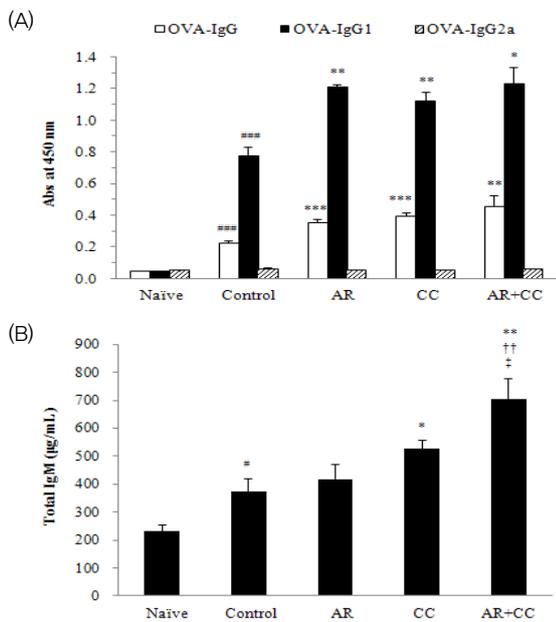


Figure 4. The plasma levels of OVA-specific IgG, IgG1 and IgG2a (A) and total IgM (B) on OVA-immunized mice. Data represent the means \pm SEM ($n=5\sim6$). Differences between naive and control groups were evaluated in each group (*; $p < 0.05$ and ###; $p < 0.001$). Significant differences with control groups were designated as *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ and ***; $p < 0.001$. †† ($p < 0.01$) and † ($p < 0.05$) are significant differences with AR group and CC group, respectively.

고찰

황기는 보중익기탕, 가미대보탕, 십전대보탕, 황기건중탕 등 다수의 처방에 포함되어 있고 신체허약, 익기(益氣), 강장(強壯) 등의 효능을 갖는 보약으로 많이 사용되는 약제이다⁶⁾. 최근 황기의 연구결과를 살펴보면, 고지혈증과 비만 치료의 효과가 보고되었고^{7,8)}, 알러지 치료 효과⁹⁾, 면역조절¹⁰⁾, 항노화 효과¹¹⁾ 등이 보고되었다. 육계는 팔미환, 십전대보탕, 오령산, 쌍화탕 등과 같은 처방에 포함되며, 심혈관, 혈소판응집억제, 항응혈, 진정·진통·해열, 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 이와 같이 보기(補氣)작용의 황기와 조양(助

陽) 작용의 육계를 배합하면 상승작용으로 온후하게 하여 양기(陽氣)를 강화하며 혈맥(血脈)을 통창(通暢)하는 작용을 나타내어 기허, 양허(陽虛)와 기혈부족, 陰虛 증상에 많이 사용하는 것이며, 이 두 약제가 함께 포함된 처방으로는 십전대보탕, 쌍화탕, 인삼양영탕, 녹용대보탕 등이 있고, 이중 팔물탕에 이 두 약제를 가한 십전대보탕은 허로(虛勞)로 인하여 발생하는 기혈양허(氣血兩虛)를 치료한다고 알려져 있다¹³⁾.

저자는 선행 연구로 십전대보탕에서 황기·육계의 함량 변화에 따른 효능연구를 진행하여 십전대보탕에서는 팔물탕을 기본으로 하여 황기와 육계가 8:2인 경우 가장 우수한 면역활성화 효과가 나타났으며, 팔물탕에 육계만 첨가한 시료가 가장 낮은 활성을 나타냄을 발표하였다¹⁴⁾. 그러나 선행연구에서는 황기와 육계 두가지 약제에 대해서만 비교하지 않고 팔물탕을 기본으로 하여 황기, 육계의 비율에 대한 *in vitro* 비교 연구를 진행한 것으로 황기와 육계가 함께 사용되는 다른 처방에 대해서는 이전 보고에 따른 황기, 육계의 비율을 그대로 적용하기에 무리가 있었다. 이에 본 연구에서는 두 약제의 배합 전·후 면역 활성을 비교하기 위하여 대식세포 및 비장세포의 활성화 효과, 혈중 면역글로불린의 생성량 변화 등 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 면역조절 효과를 검색하고 황기와 육계가 포함된 다른 처방에 대한 적용을 고려하고 철정이론에서 두약제의 관계를 규명하고자 하였다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하고, 활성화된 면역반응 산물이 T cell을 활성화하여 세포성 면역반응이 유도되므로 면역활성 검색에 주로 이용된다¹⁵⁾. 대식세포 활성화 지표 중의 하나인 NO는 cytokine이나 미생물의 영향을 받아 대식세포에서 생성되는 반응질소중간체(Reactive nitrogen intermediates, RNI)로서 nitric oxide synthase (NOS)와 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 세포 내 감염을 일으키는 미생물에 대한 방어능 및 암세포 등에 대해 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있고¹⁶⁾, NO가 필요이상 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체내 유해한 작용을 나타내는 것으로도 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 이렇듯 NO는 이중적 성질을 가지고 있어 대식세포의 면역반응 조절연구에 많이 이용되고 있다²⁰⁻²²⁾. 따라서 약물처리 시 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 NO 생성을 촉진하면 면역능을 증가시키는 것으로 판단될 수 있다.

황기 또는 육계의 처리시 낮은 농도에서 대식세포의 증식을 증가시키고 고농도(건조약재량 $1000 \mu\text{g/mL}$)에서는 유의성 있는 증식효과를 나타내지 않지만 세포독성도 나타나지 않았다. 두 약제의 배합은 단독 처리 했을 때보다 모든 농도에서 대식세포의 증식을 증가시키고 특히 황기 또는 육계가 증식효과를 나타내지 않는 $1000 \mu\text{g/mL}$ 에서도 유의성 있는 증식효과를 나타내므로 황기나 육계의 단독 처리보다 두 약제를 배합하는 것이 대식세포의 증식에 효과적인 것으로 판단된다. 또한 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성능의 경우 황기는 농도의존적으로 NO 생성을 촉진시켰으나 육계는 모든 처리농도에서 NO 생성에 영향을 미치지 못한 반면 두 약제의 배합 시 NO 생성이 증가되는 것으로 나타났다. 두 약제는 1:1로 배합된 것으로 배합추출물 $1000 \mu\text{g/mL}$ 의 경우 황기 $500 \mu\text{g/mL}$ + 육계 $500 \mu\text{g/mL}$ 와 비교할 수

있으며 해당 농도에서의 NO 생성량이 배합추출물의 경우 황기 NO생성 유발량의 1.77배에 해당하며 이는 황기에 의한 NO 생성 유발 효과가 육계와의 배합으로 증폭된 것으로 판단된다.

비장은 말초 림프기관으로, 주로 T 세포, B세포 및 대식세포 등으로 구성되어 있으며, 외부 항원의 침입에 대해 T 세포, B 세포 및 대식세포는 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 유도한다²³⁾. 비장의 크기 및 세포의 수는 면역반응에 밀접한 관련이 있으므로²⁴⁾ 면역증진능을 관찰하기 위한 지표로 평가된다. 이에 비장세포 증식효과를 검색한 결과 황기 처리 시 5 μ g/ml 이상에서 무처치군과 비교하여 50% 이상의 유의성 있는 증식효과를 나타냈다. 육계 처리 시 100 μ g/ml 이하에서는 30% 이상 세포 증식 효과를 나타냈으나 고농도 처리 시 (1000 μ g/ml)에는 오히려 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 두 약재를 배합했을 때는 황기 또는 육계 단독 처리시의 세포 증식도의 중간 값으로 비장세포의 증식을 유발하여 두 약재의 배합으로 인한 시너지 효과는 나타나지 않았다.

비장세포 증식의 Th1 및 Th2 세포 중 어느 세포에 기인된 것인가를 확인^{25,26)}하기 위해 Th1 세포에서 분비되는 cytokine인 IL-2와 Th2 세포에서 분비되는 IL-4 level을 측정하였다. IL-2는 CD4 T cell에 의해 생산되며, natural killer (NK)cell, lymphokine activated killer (LAK) cell, B cell의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있고, IL-4는 B cell 성장인자로서 T 림프구, 비만세포, 호염기성세포에서 생성되며 B cell 증식 및 분화, T cell활성의 조절을 하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 비장세포에서 약물의 처리에 따른 IL-2 분비 유발 효과를 검색한 결과 황기 또는 육계의 저농도(100 μ g/mL)처리 시 무처치군보다 증가되었으나 고농도 (500 μ g/mL)에서는 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면 두 약재를 배합한 시료 처리 시 농도의존적인 IL-2 분비 유발 효과를 나타냈을 뿐만 아니라 두 약재의 단독 처리시 보다 높은 분비 유발 효과를 나타내 이는 황기와 육계의 시너지 효과로 판단되며 Th1 세포를 활성화하여 면역기능을 활성화 하고 있음을 의미한다. IL-4는 ELISA 법으로 검출이 되지 않아 Th2 세포에 대한 영향은 확인할 수 없었다.

생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 확인하고자 OVA를 외부 항원으로 사용하여 감작시킨 생쥐²⁸⁾에 약물을 투여한 후 비장세포의 증식효과 (mitogen effect)를 검색한 결과, 황기 또는 육계의 단독 투여는 감작 항원으로 사용한 OVA, 각각 T 세포와 B 세포의 mitogen인 Con A와 LPS에 대해 OVA 감작된 대조군과 비교하여 차이가 없는 것으로 나타났으나 두 약재의 배합시료 투여군은 LPS 및 Con A에 대해 mitogen effect를 상승시키는 것으로 나타나 두 약재의 조합으로 인하여 비장내 T 세포와 B 세포를 매개로 하는 면역반응, 즉 세포성 면역와 체액성 면역을 증가시키는 것으로 판단된다.

또한 생체 내에서 체액성 면역의 조절 효과를 검색하고자 혈장내 항체량을 검색한 결과 각 약물투여군에서 OVA 감작 대조군과 비교하여 OVA-specific IgG 및 IgG1를 유의성 있게 증가시켰으나 각 약물간의 차이는 없는 것으로 나타났다. 반면 total IgM level은 대조군과 비교하여 황기 투여군에서 차이가 없었으나 육계 또는 두 약재의 배합 투여군에서 유의성 있게 증가되었고 특히 두 약재의 배합으로 IgM의 생성을

더 효과적으로 상승시키는 것으로 나타났다. 따라서 황기와 육계의 배합은 IgM level을 상승시키는 일차적인 항체 반응을 향상시키며, 그 후 항원에 대한 이차 항체 반응에서 중요한 부분을 차지하는 OVA-specific IgG 및 OVA-specific IgG1 level 상승효과를 나타내 항원 특이적 면역 반응을 활성화 시키는 것으로 판단된다.

결론

황기, 육계, 황기와 육계의 배합 등 3개 약물의 면역반응에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 비교 연구를 진행한 결과,

1. 육계는 NO 생성에 영향을 미치지 못했으나 황기 또는 황기와 육계 배합 추출물이 대식세포의 NO 생성 유발효과를 나타냈다.
2. 황기, 육계, 황기와 육계 배합물 모두 비장세포 증식능을 나타냈고, 육계 단독은 고농도에서 세포독성을 나타냈다. 두 약재의 배합으로 비장 세포증식 효과가 증가되지는 않았다.
3. 황기, 육계, 황기와 육계 배합물 모두 비장세포에서 IL-2의 분비를 증가시켰으며 특히 배합물의 경우 가장 우수한 IL-2 분비능을 나타냈다.
4. OVA로 감작된 생쥐에서 황기, 육계, 황기와 육계 배합물 투여 시 배합물 투여군만 비장 세포에서 Con A 및 LPS에 대한 mitogen effect를 상승시켰다.
5. OVA로 감작된 생쥐에서 황기, 육계, 황기와 육계 배합물 투여 시 혈중 OVA-specific IgG 및 IgG1 level을 증가시켰으나 total IgM level은 육계 및 배합물 투여군에서만 증가되었고 특히 배합물 투여군에 더 우수한 total IgM level의 증가를 나타냈다.

결론적으로 황기 또는 육계 단독으로도 각 약재의 특성에 따라 면역 반응의 일부를 활성화 시키지만 이 두 약재의 배합은 대식세포의 NO 생성에 대해 활성화 효과를 나타내며, OVA로 감작된 생쥐에 투여 시 Con A 및 LPS에 대해 비장세포의 mitogen effect를 상승시켰으며, 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 모두 증가시켰으므로 면역반응의 항원 비특이적 면역반응과 항원특이적 면역 반응을 모두 활성화시키는 것으로 판단된다. 따라서 황기 또는 육계의 단독 효능보다는 두 약재를 배합했을 때의 면역 활성화 효과가 더 우수하다는 것을 검증하였다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '한약물 상호작용의 과학화 연구 (#K09061)'에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lim EM, Lee SH. The meaning of immunity in the documents of oriental medicine. *Journal of the Korea institute of oriental medical informatics*, 2006 ; 12(1) : 129-45.
2. Lee SI. *Herbology*. Seoul : Sooseowon, 1976 : 39-49.
3. Ju YS. *Woonkok Herbology*. Seoul : Seolimje, 2002 : 56.
4. Kang BS, Kim YP. *Herbology for combination of herbal medicine in clinical use*. Seoul : Younglimsa, 1994 : 204.
5. Gupta A, Khajuria A, Singh J, Singh S, Suri KA, Qazi GN. Immunological adjuvant effect of *Boswellia serrata* (BOS 2000) on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. *International Immunopharmacology*, 2011 ; 11(8) : 968-75.
6. Ahn DK. *An illustrated book of Korean herbal medicine*. Seoul : Kouhaksa, 1998 : 961.
7. Kim HJ, Kim JB. Effects of *Astragali Radix* on the diet-induced hyperlipidemia in rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2008 ; 22(3) : 575-79.
8. Ju JM, Kim MR, Suk JM, Lee YS, Park JH. Effects of mixed medicinal herbs on altering body weight and lipid profiles in rats fed high-fat diet. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2009 ; 23(3) : 662-72.
9. Kang H, Kim YB, Ahn KS. Immuno modulatory effect of *Astragali Radix* on OVA induced allergic mouse model. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2005 ; 19(3) : 612-17.
10. Lee YS, Han OK, Park CW, Suh SI, Shin SW, Yang CH, Jeon TW, Lee ES, Kim KJ, Kim SH, Yoo WK, Kim HJ. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted *Astragali radix* in methotrexate-treated mouse spleen cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003 ; 84 : 193-8.
11. Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS. Anti-aging effect of *Astragalus membranaceus* root extract. *Journal of Society for Cosmetic Scientists Korea*, 2007 ; 33(1) : 33-40.
12. Kim HC. *Herbal Medicine Pharmacology*. Seoul : Jipmoondang, 2001 : 252-4.
13. Kang BS, Kim YP. *Herbology for combination of herbal medicine in clinical use*. Seoul : Younglimsa, 1994 : 204.
14. Lee HY, Ha H, Jung DY, Choi JY, Lee NH, Ma JY, Yu YB, Shin HK. Study on Pharmacological Activity of *Sipjeondaebotang* by Difference in Component Ratio between *Astragali Radix* and *Cinnamomi Cortex*. *Journal of Korean Oriental Medicine*, 2008 ; 29(1) : 156-66.
15. Liew FY, Lia Y, Millot S. Tumor necrosis factor synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of Immunology*, 1990 ; 145 : 4306-10.
16. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by *Juzen-taiho-to* in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *American Journal of Chinese Medicine*, 2000 ; 28 : 217-26.
17. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokoch T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysacchride-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Endotoxin Research*, 2001 ; 7 : 431-8.
18. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Research*, 2003 ; 17 : 485-9.
19. Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction : role nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002 ; 33 : 1026-36.
20. Thornberry NA, Molineaux SX. Interleukin-1 beta converting enzyme : a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Science*, 2005 ; 4 : 3-12.
21. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2006 ; 20(5) : 879-896.
22. Sung CS, Wong CS. Cellular mechanisms of neuroinflammatory pain : the role of interleukin-1beta. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, 2007 ; 45(2) : 103-109.
23. Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. In vivo effect of chronic treatment with (MET5)-enkephain on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Science*, 2000 ; 66 : 829-34.
24. Mosmamm TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 1989 ; 7 : 145-73.
25. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M,

- Romagnani S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88: 346-50.
26. Carter LL, Dutton RW. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 1996; 8: 336-42.
27. Stephens R, Eisenbarth SC, Chaplin DD. T helper type 1 cells in asthma: friend or foe? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2002; 2: 31-7.
28. Janeway, Trevers. *Immunobiology*. 3rd. London: Current Biology. 715-31.