

Original Article / 원저

保元湯의 免疫調節 作用에 관한 研究

황주민¹⁾ · 정 명²⁾ · 조정훈³⁾ · 임규상^{2,4)} · 윤용갑^{3,4)}

¹⁾다정 한의원, ²⁾원광대학교 한의학전문대학원, ³⁾원광대학교 한의과대학 ⁴⁾한국 전통의학연구소

Studies on Immunoregulatory Effects of Bowon-tang in the Immune Cells

Joo-Min Hwang¹⁾ · Myung Jung²⁾ · Jung-Hoon Cho³⁾ · Kyu-Sang Lim^{2,4)} · Young-Gab Yun^{2,4)}

¹⁾ Da Jung Korea Medicine Clinic

²⁾ Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

³⁾ College of Korean Medicine Wonkwang University

⁴⁾ Korea Traditional Medicine Institute

Abstract

Objectives : The water extract of Bowon-tang composited with the *Panax*, *Astragalus* and *Glycyrrhiza Radix* has been traditionally used for treatment of a sickly child and smallpox in oriental medicine. However, little is known about the regulatory effects of Bowon-tang on the production, expression and activity of immune mediators [nitric oxide, prostaglandin E₂, inducible nitric oxide synthetase, cyclooxygenase-2], the macrophage activation factor production, the proliferation, subset expression, the killing activity, and the capping in immune cells.

Methods : In this study, we investigated the effects of water extracts from Bowon-tang, *Panax*, *Astragalus* or *GR* in mouse immune cells or human Jurkat T cells.

Each extract (25-200 $\mu\text{g/ml}$) *per se* had no cytotoxic effect in unstimulated macrophages, but concentration-dependently regulated NO and PGE₂ production, iNOS expression, and COX-2 activity in mouse peritoneal macrophages with MAF stimulation. These regulatory effects were synergistically increased by their combination (Bowon-tang).

Results : The extract of Bowon-tang concentration-dependently regulated T cell proliferation, CD4⁺ and CD8⁺ expression, and NK killing activity in mouse splenocytes and capping in Jurkat T cells.

Conclusions : These results suggest that the water extract of Bowon-tang composited with the *Panax*, *Astragalus* and *GR* may be useful for therapeutic drugs against a sickly constitution and immune diseases, probably by regulating the production of immune mediators.

Key words : Bowon-tang; prostaglandin E₂ (PGE₂); nitric oxide synthetase (iNOS); cyclooxygenase-2 (COX-2); macrophage activation factor (MAF)

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. 緒 論

保元湯은 黃芪 人蔘 甘草로 구성되어 있으며 東醫寶鑑 小兒門에서 痘疹을 치료하는 처방으로 총 15회 인용되어 있으며, 痘疹의 豫後가 불량하여 濃色이 淡하여 虛한 경우나, 氣血이 俱虛하여 痘疹이 오래된 경우에 다양한 가감법으로 응용하여 痘疹의 치료에 사용된 처방이다¹⁾. 임상적으로 활용되는 대표적인 處方인 四君子湯, 補中益氣湯, 十全大補湯과 이에 대한 連繫方이 모두 保元湯을 기본으로 하고 있어 氣虛로 인한 모든 질환 즉 바이러스성 疾患에 溫補益氣作用을 하는 임상처방의 기본방이라 할 수 있다²⁾. 특히 이 처방은 水痘가 오랫동안 지속되어 허약할 때 사용하는데, 수두는 바이러스성 疾患이라 면역증강요법이 필요하다. 따라서 保元湯은 면역증강에 관련된 基本方으로 處方構成도 모두 補氣藥으로 구성된 특징이 있다. 人蔘, 黃芪, 甘草가 모두 補氣藥이기 때문에 이에 관한 면역학적 研究가 필요하여 실험적으로 접근하게 되었다.

痘疹은 頭瘡, 疱瘡이라고도 하며, 속칭으로는 媽媽라고도 한다. 천연두 바이러스에 의해 발병되며 주요 증세는 高熱과 전신에 나타나는 특유한 發疹이다. 전염력이 매우 강하고, 예전에는 대유행을 되풀이하며 많은 사망자를 내기도 했으나, 19세기 이후 영국 의사 E. Jenner가 창시한 種痘法이 보급되고부터 격감하였다³⁾.

바이러스 감염에 대한 방어는 숙주가 숙주세포 내에서 증식한다는 점 때문에 다른 미생물에 대한 면역 반응과는 차이가 있다. 만일 바이러스가 체내에 감염되면, 면역반응에 의한 세포독성 및 항체 생산이 유도되어 바이러스 증식을 억제하거나, 바이러스를 파괴하는 세포들이 활성화되어 인체의 항상성을 유지할 수 있다^{3,4)}.

保元湯이 痘疹을 치료하는 방제로써 널리 사용되어 왔던 문헌적 근거로 보아 保元湯과 그 구성약물에 바이러스 질환의 치료를 위한 면역조절 작용이 있을 것으로 사료된다. 한편 人蔘, 黃芪, 甘草 각각의 약물의 면역조절능에 대한 연구는 국내외에서 활발히 진행되어오고 있으나⁵⁻²⁸⁾, 保元湯 자체에 대한 연구는 家兔의 損傷 組織에 미치는 影響과 CCl_4 로 유도된 마우스의 간 증독의 복원 효과에 대한 연구가 있을 뿐 구체적인 면역조절작용에 대한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 저자는 保元湯이 痘疹의 치료 方劑로 사용되어 왔던 문헌적 근거를 바탕으로 保元湯과 그 구성 藥物들에 면역조절 작용이 있을 수 있는 점에 착안하여, 保元湯과 그 구성 藥物인 黃芪 人蔘 甘草에 대한 면역조절작용에 대한 효과를 검증하였다. 즉, 마우스의 면역세포를 대상으로 일산화질소(nitric oxide, NO), 프로스타글란딘 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2), 종양괴사인자(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α), 인터페론-감마(interferon-gamma, INF- γ) 등의 생성과 inducible nitric oxide synthetase(iNOS)의 발현, cyclooxygenase(COX-2)의 활성화, T 세포의 증식, T 세포의 아형 발현, natural killer cell의 살해능을 조사하였고, 인간유래 T 세포주인 Jurkat cell을 대상으로 capping 현상을 조사함으로써 면역조절작용에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 시약

Anti-mouse tumor necrosis factor-alpha (anti-TNF- α), anti-mouse interferon- γ (anti-IFN- γ), anti-iNOS, anti-mouse CD3, anti-mouse CD28, prostaglandin E_2 (PGE_2) and cyclooxygenase-2 (COX2) assay kit은 R&D Systems (Minneapolis,

Corresponding author : Yonggab Yun, PhD. Professor, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.
(Tel : 82-63-850-6834, E-mail : yunyg@wku.ac.kr)

• Recieved 2015/10/7 • Revised 2015/11/6 • Accepted 2015/11/13

U.S.A.)사로부터 구입했다. Lipopolysacchride (LPS), Concanavalin A (Con A)는 Sigma-Aldrich 사 (U.S.A.)로부터 구입했으며, Cell proliferation assay kit는 Pramega(U.S.A.)사로부터 구입했다. 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로 Sigma-Aldrich와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) 藥物의 추출 및 제조

실험에 사용한 人蔘은 6년 근으로 충남 금산, 黃芪는 강원도 임계, 그리고 甘草는 내몽고산으로 부산의 운곡한약품에서 각각 구입하였으며, 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였다. 증거표본은 원광대학교 한의과대학 방제학교실에 보관 중에 있다. 藥物의 제조는 人蔘, 黃芪, 甘草는 각각 160g 씩 정량하여 대용약탕기(DWP-1800T)에 주입하였고, 각각 1,800 ml 씩 증류수를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 또한 保元湯은 Table 1과 같이 배오하여 총 160 g에 1,800 ml 증류수를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 이와 같이 추출한 120 ml의 藥物을 -70℃에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

3) 實驗動物

무균환경에서 사육된 5주령의 수컷 BALB/c 계 마우스를 중앙실험동물(주)(서울시 서초구)에서 구입하였고, 사료와 무균 물을 무제한 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도와 습도는 대기 환경에서 유지하였다.

2. 方法

1) 비장세포의 분리

건강한 수컷 마우스를 대상으로 에테르에 마취시킨 다음 후경골탈추법으로 즉사 시킨 후 슬라이드 글라스로 부드럽게 압착하여 단일 세포 부유액을 만든 다음 40 μm 나일론 메시를 통과 시켰다. 세포는 Ca²⁺과 Mg²⁺가 들어 있지 않은 HBSS를 이용하여 2회 원심 세척하였다. 그 후 Ficoll-hypaque을 사용하여 림프구를 분리한 다음 RPMI 1640 배양액으로 3회 원심 세척한 후 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 95% 이상의 세포 생존율을 확인하고 혈구계산용 슬라이드를 이용하여 세포의 수를 산정한 후 배양하면서 각종 실험에 사용하였다.

2) 복강 대식세포의 유도 및 분리

건강한 수컷 마우스에 Brewer's thioglycollate broth를 마리당 2 ml씩 복강내로 주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 마우스를 후경골 탈추법으로 즉사시킨 다음 heparin (5 U/ml)이 첨가된 HBSS 10 ml를 복강에 주입하고 복강을 잘 마사지 하였다. 마사지 후 26gauge 10 ml용 주사기를 이용하여 복강으로 유입된 세포를 얻은 후 2회 원심 세척하였다. 분리된 세포는 10% FBS와 1% P/S가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 배양접시에 접종한 후 37℃와 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 대식세포외 다른 세포를 제거하기 위해서 냉각 HBSS를 이용하여 3회 반죽 세척하였다. 부착된 마우스 복강

Table 1. Oriental Crude Drug Composition of Bowon-tang (160g)

Oriental drug name	Crude drug name	Scientific name	Dose(g)
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax schinseng</i>	40
黃芪	<i>Astragalus Radix</i>	<i>Astragalus membranaceus</i>	80
甘草	<i>Glycyrrhiza Radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	40

내 대식세포는 10% FBS와 1% P/S가 첨가된 RPMI 1640 배지에 접종한 후 실험 목적에 따라 시간을 정하여 배양하여 사용하였다.

3) 대식세포활성인자의 생산

비장세포를 75 cm² 플라스크 배양용기에 2.5×10⁵ cells/ml 농도로 접종하고 37°C CO₂ 배양기(5% CO₂, 95% 대기)에 3시간 동안 안정화 시킨 후 100 µg/ml의 접종하고 保元湯 추출물을 주입하고 2시간동안 방치하였다. 그 후 10 ng/ml의 phobol myristate acetate (PMA, Sigma)를 처리하고 30분간 방치한 후 주의 깊게 3회 세척한 다음 2 µg/ml의 Concanavalin A(Con A, Sigma)를 처리하고 48시간동안 배양하여 상층액을 취하고 세포잔액을 제거하기 위해서 3,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액만을 주의 깊게 얻어 -70°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4) Jurkat T 세포 배양

Jurkat T 세포는 American Tissue Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여, 10% FBS와 1% P/S가 함유된 RPMI 1640 완전 배지를 사용하여 37°C와 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하면서 유지하였고, 충분히 성장한 세포를 대상으로 保元湯과 그 구성 藥物의 추출물이 capping에 미치는 영향을 조사하는데 사용했다.

5) 비장세포 증식능 측정

마우스로부터 분리된 비장세포를 2.0×10⁶/ml로 적정하여 96 well 배양용기(flat form)에 well 당 100 µl를 분주한 후 측정하고자 하는 藥物을 농도별로 주입하여 37°C CO₂ 배양기(5% CO₂/95% 대기)에서 48시간 배양하여 세포의 증식능도 측정하였다. 세포증식능의 측정은 Promega사의 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation assay kit를 사용하였다. 요약하면, 배양종류 1시간 30분전에 시약을 20 µl를 주입하고 상기의 배양조건을 유지한

다음 Promega사가 권하는 방법에 따라 흡광도는 ELISA reader(490 nm)로 측정하였다.

6) MTT 분석

림프구와 복강대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물처리 또는 추출물과 LPS (1 µg/ml)을 동시에 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면, 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 5×10⁵ cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 藥物을 처리하였다. 4시간동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액이 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액(50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가함으로써 용해했다. Formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

7) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변환한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설페닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 µl의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 µl씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 Spectrophotometer(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

8) 사이토카인과 PGE2측정

대식세포 활성화인자(macrophage activating factor, MAF)으로 복강내 대식세포($5 \times 10^5/ml$)를 자극하기 전 保元湯과 그 구성 藥物의 추출물을 여러 농도(10-500 $\mu g/ml$)로 2시간동안 전 처리하였다. IFN- γ , TNF- α , PGE $_2$ 등 면역 활성물질의 생성에 미치는 藥物의 효과를 검증하기 위해서 MAF(1:8 배지)로 자극한 후 IFN- γ , TNF- α 와 PGE $_2$ 를 세포 상층액에서 측정하였다. 이들 물질의 정량은 18-24시간 동안 측정된 양을 측정하였다. 측정방법은 각각의 물에 대한 R&D사(Minneapolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

9) COX-2 활성 측정

각 추출물과 MAF(1:8 배지)가 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 COX activity assay kit (Cyman Chemical)을 이용하여 Cyman(U.S.A)에서 제공하는 방법에 준하여 COX-2 억제제를 처리하고 COX-2의 활성을 측정하였다.

10) iNOS의 Western blot

각 추출물과 MAF(1:8 배지)가 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μg 을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 미지방 skim milk가 함유된 TBBS로 4℃에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1:1,000)를 주입하여 3 시간동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG(1:2,000)을 주입하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL방법으로 발색시켰다.

11) NK세포의 살해능 측정

保元湯과 그 구성 藥物이 NK 세포(자연살해세포)의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 7주령의 BALB/c계 마우스를 대상으로 1주간 각각의 藥物을 100 mg/kg 농도로 투여하였다. 그 후 후경골탈추방법으로 마우스를 즉시시킨 후 비장을 적출하여 Ca $^{2+}$ 과 Mg $^{2+}$ 이 들어있지 않은 HBSS를 페트리 접시에 주입하고 비장을 슬라이드 글라스를 이용하여 으깨고 피펫팅을 하여 단일 세포를 유리하여 40 μm 의 라일론 매쉬로 거른 다음 1% P/S가 함유된 RPMI1640으로 2회 원심세척하고 Ficoll을 이용하여 밀도구배법으로 원심분리하여 림프구 층을 얻고 RPMI1640 배양액으로 1회 세척하고 적혈구 용해액을 주입하고 적혈구를 파괴시킨 후 다시 RPMI 1640 배양액을 이용하여 2회 세척하여 효과세포로 사용하였다.

마우스 자연살해세포의 표적세포는 Yac-1 세포를 배양하여 세척한 후 $^{51}CrO_4$ (100 μCi)를 주입하여 방사 표지한 후 사용하였다. 효과세포와 표적세포 비율을 10:1의 비율로 적정하고 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO $_2$ 와 95% 대기 상태의 배양기에서 4시간 배양 후 원심분리하여 상등액을 취하여 γ -counter에서 방사능을 측정하였다(A cpm). 대조군으로 표적세포에 배지만 넣어주어 방사능의 자연 누출을 측정하였으며(B cpm), 또한 1.005% Nonidet P-40을 넣어 방사능의 최고치를 측정하였다(C cpm). 자연살해세포능의 계산은 다음과 같은 식으로부터 표적세포의 specific lysis를 계산하였다.

$$\text{Specific lysis} = (A-B)/C \times 100$$

12) Capping assay

Jurkat T 세포의 capping을 유도하기 위해서 mouse anti-human CD3(1:200)과 mouse anti-human CD28(1:200) 항체를 각각 또는 이들 항체를 동시에 4℃에서 30분까지 자극한 후 FITC가 부착된 anti-mouse IgG 항체를 PBS에 10배 희석하여 처리한 다음 PBS로 잔여 항체를 잘 세척하고 즉시

capping을 유도하기 위해서 37°C에서 30분간 방치하였다. 그 후 37°C PBS로 2회 세척을 하고 2% paraformaldehyde를 이용하여 고정한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 保元湯 및 그 구성 藥物이 capping에 미치는 효과를 알아보기 위해서 Jurkat T 세포를 2시간 전에 처리하고 상기와 같은 방법으로 capping을 유도하여 형광현미경 시야에서 관찰하였다.

13) 통계 분석

모든 실험은 3회 반복하였고, 결과는 평균값± 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 SigmaPlot(San Jose, CA, USA)의 Student's t-test를 이용해서 p-value를 구하였으며, p < 0.05인 경우 *로 유의성을 표기하였다.

III. 實驗 結果

1. 保元湯과 구성 藥物이 세포 생존율에 미치는 영향

保元湯과 구성 藥物의 추출물이 IFN- γ 와 TNF- α 가 처리된 또는 처리되지 않은 복강내 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 복강내 대식세포 ($5 \times 10^5/ml$)를 RPMI 1640(1% P/S, 10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음 여러 가지 농도의 保元湯과 구성 藥物의 추출물을 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 사용된 농도에서 세포독성이 없었다. 또한 여러 가지 농도의 保元湯과 구성 藥物의 추출물을 2 시간 동안 전처리하고 IFN- γ (10 ng/ml)와 TNF- α (10 ng/ml)로 동시에 자극하고 세포생존율을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 어떠한 藥物이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 IFN- γ (10 ng/ml)와 TNF- α (10 ng/ml)를 동시에 자극했을 경우 생존율은 약 83%로 감소하였으나, 保元湯과 구성 藥物의 추출물을 25-200 $\mu g/ml$ 의 농도로 2 시간 동안 전처리했을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 높아졌

다. 특히 50 $\mu g/ml$ 부터 농도가 높아질수록 IFN- γ 와 TNF- α 로 자극된 대조군에 비해 세포 생존율이 향상되었다(p < 0.05).

2. 保元湯과 구성 藥物이 MAF 생성에 미치는 영향

保元湯과 구성 藥物의 추출물이 대식세포 활성화인자 (macrophage activating factor, MAF)인 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 비장을 적출하고 백혈구를 분리한 다음 여러 농도로 保元湯과 구성 藥物의 추출물을 2시간 동안 처리하고 10 ng/ml의 phobol myristate acetate (PMA)를 1시간 동안 자극한 후 2 $\mu g/ml$ concanavalin A (ConA)를 처리하고 48시간 배양하였다. 그 후 즉시 배양 상층액을 얻어 R&D사의 IFN- γ 와 TNF- α assay kit를 이용하여 sandwich ELISA법으로 사이토카인을 측정하였다.

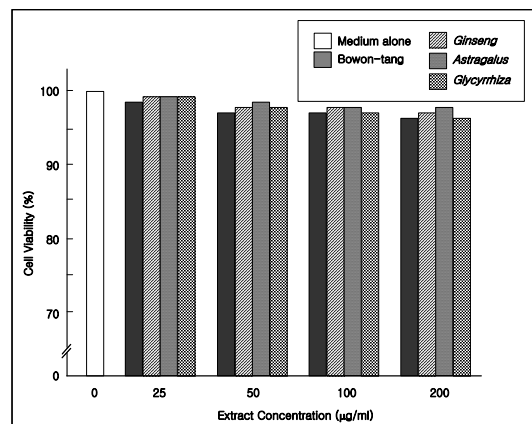


Fig. 1. Cell viability in *Ginseng Radix*, *Astragalus Radix*, *Glycyrrhiza Radix* or Bowon-tang (*Ginseng+ Astragalus+ Glycyrrhiza*)-treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Peritoneal macrophages (5×10^5 /well plate) were incubated for 24 h in the presence or absence of each extract at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

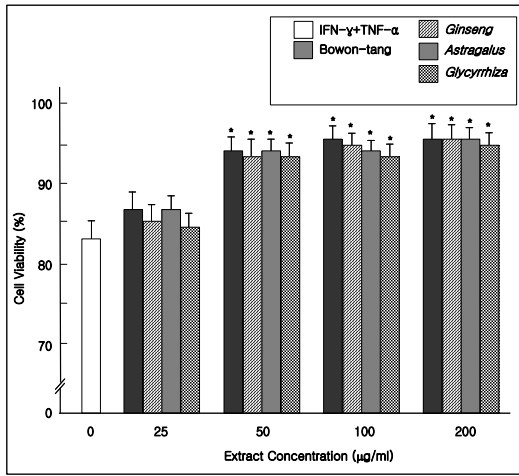


Fig. 2. Cell viability in *Ginseng* Radix, *Astragalus* Radix, *Glycyrrhiza* Radix or Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*)–treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Peritoneal macrophages (5×10^5 /well plate) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without IFN- γ (10 ng/ml) plus TNF- α (10 ng/ml) for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. *:p<0.05 indicate significant LPS alone treated control group.

그 결과 保元湯과 그 구성 藥物은 농도가 증가될수록 IFN- γ 의 생성을 증가 시켰다. 특히 保元湯과 甘草의 경우 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서도 유의하게 IFN- γ 의 생성을 증가 시켰다(p < 0.05). 그러나 고농도(200 $\mu\text{g/ml}$)의 保元湯과 그 구성 藥物의 추출물을 처리했을 때는 증가하는 효과가 없었다(Fig. 3).

TNF- α 의 생성은 保元湯이 처리된 실험군은 농도에 의존적으로 증가하는 효과를 보였으나, 그 구성 藥物의 경우는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 증가하는 효과를 보였다(Fig. 4).

결과적으로 활성인자인 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성에 가장 효과적인 保元湯과 그 구성 藥物의 농도는

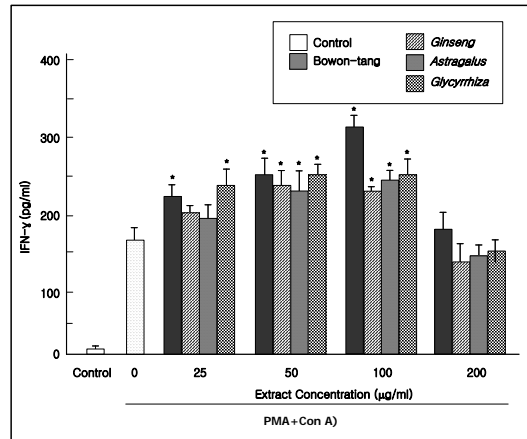


Fig. 3. Effects of *Ginseng* Radix, *Astragalus* Radix, *Glycyrrhiza* Radix or Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extracts on the productions of IFN- γ in BALB/c mouse splenocytes stimulated with MAF. Cells (5×10^5 /ml) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without MAF (1:8 medium) for 18 h at indicated concentrations. The productions of IFN- γ was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. *:p<0.05 indicates significant MAF alone treated group.

100 $\mu\text{g/ml}$ 임을 알 수 있었다. 따라서 保元湯의 농도를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 정하여 MAF을 생산하였고, -70 $^{\circ}\text{C}$ deep freezer에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

3. 保元湯과 구성 藥物이 NO 생성에 미치는 영향

保元湯과 구성 藥物의 추출물이 MAF 유도 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강내 대식세포(5×10^5 /ml)를 접종하고 3시간 후에 각각의 藥物을 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯 추출물 자극에 의해 생산된 MAF(1:8 배지)를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 결

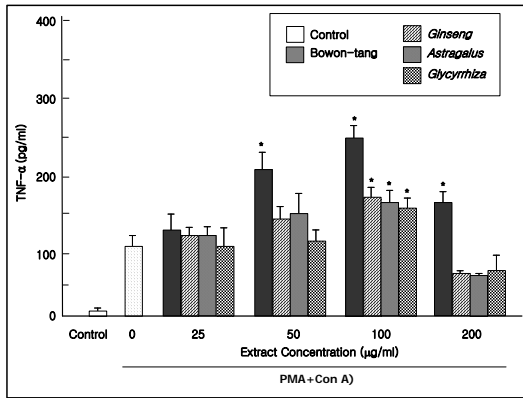


Fig. 4. Effects of *Ginseng Radix*, *Astragalus Radix*, *Glycyrrhiza Radix* or *Bowon-tang* (*Ginseng*+*Astragalus*+ *Glycyrrhiza*) water extracts on the productions of TNF- α in BALB/c mouse splenocytes stimulated with MAF. Cells ($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without MAF (1:8 medium) for 18 h at indicated concentrations. The productions of TNF- α was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. *:p<0.05 indicates significant MAF alone treated group.

과 아무런 藥物이 처리되지 않고 MAF로 자극한 대조군은 $15.3 \pm 1.8 \mu M$ 의 아질산염을 생성시켰다. 25 $\mu g/ml$ 과 50 $\mu g/ml$ 의 保元湯과 人蔘 및 黃芪 처리군에서는 NO 생성을 증가시키는 효과가 있었으나, 100 $\mu g/ml$ 농도에서는 NO 생성 효과가 없었다. 다른 藥物과 달리 甘草 처리군에서는 농도에 의존적으로 NO 생성 억제 효과가 있었다(Fig.5).

4. 保元湯과 구성 藥物이 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된

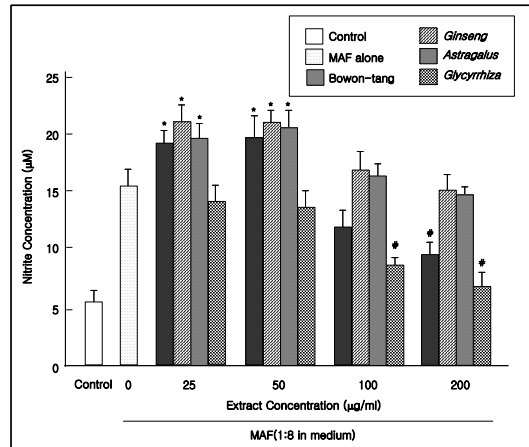


Fig. 5. Effects of *Ginseng Radix*, *Astragalus Radix*, *Glycyrrhiza Radix* or *Bowon-tang* (*Ginseng*+*Astragalus*+ *Glycyrrhiza*) water extracts on NO production by MAF-treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Peritoneal macrophages ($5 \times 10^5/well$ plate) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without MAF (1:8 medium) for 24 h. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments. * or #p:<0.05 indicates significant MAF alone treated group.

다. IFN- γ 와 TNF- α 와 같은 MAF으로 대식세포를 자극하면 유도성 NOS (inducible NOS, iNOS)가 과량 발현되면서 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 따라서 상기에서 실험한 藥物에 의한 NO 생성 조절과 iNOS와의 발현 관계를 알아보기 위해서 保元湯과 그 구성 藥物을 25-200 $\mu g/ml$ 의 농도로 peritoneal macrophages에 2시간동안 전 처리한 후 2회 세척하고 保元湯(100 $\mu g/ml$) 처리에 의해 만들어진 MAF을 새로운 RPMI 1640 배지(1% P/S, 10% FBS 함유) 1:8로 희석하여 18시간 배양하였다. 그 후 iNOS의 발현을 western blot 방법으로 조사한 결과 Fig. 6과 같이 保元湯과 구성 藥物은 25 $\mu g/ml$ 과 50 $\mu g/ml$ 에서 iNOS 발현을 증가 시켰으나, 고농도에서는 억제하는

경향을 보였다. 특히 保元湯은 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 MAF 단독으로 처리한 대조군에 비해서 iNOS 발현을 유의하게 억제 시켰으며($p < 0.05$), 甘草는 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MAF 단독으로 처리한 대조군에 비해서 iNOS 발현을 유의하게 억제 시켰다. 이러한 결과는 Fig. 5의 NO 생성 조절 결과와 잘 일치되었다.

5. 保元湯과 구성 藥物이 PGE2 생성에 미치는 영향

保元湯과 구성 藥物의 추출물이 MAF 유도 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강내 대식세포($5 \times 10^5/ml$)를 접종하고 3시간 후에 각각의 藥物을 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯처리에 의해 생산된 MAF(1:8 배지)를 처리하여 24시간 배양하였다.

그 결과 아무런 藥物이 처리되지 않고 MAF로 자극한 대조군은 $598 \pm 53.7 \text{ pg/ml}$ 로 배지만 처리한 대조군에 비해 PGE₂의 생성을 유도하였다. MAF와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯과 그 구성 藥物을 처리한 결과 MAF만 처리한 대조군에 비해 PGE₂의 생성을 유의하게 증가 시킨($p < 0.05$) 반면, 다른 농도에서는 유의한 증가 효과는 없었다. 그런데 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯은 오히려 PGE₂의 생성을 억제 시킨 효과가 있었고, 甘草의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 다른 藥物보다 PGE₂의 생성을 억제 시키는 효과가 있었다.

6. 保元湯과 구성 藥物이 COX-2 활성에 미치는 영향

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다. 그래서 본 연구에서도 PGE₂ 생성에 직접적으로

영향을 미치는 COX-2 활성을 Cayman (U.S.A)사의 COX activity assay kit를 이용하여 조사하였다.

그 결과 아무런 藥物이 처리되지 않고 MAF로 자극한 대조군을 100%로 정했을 때 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯과 구성 藥物은 COX-2의 활성을 유의하게 증가시켰으나($p < 0.05$), 다른 농도에서는 유의한 증가 효과는 없었다(Fig. 8). 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯은 COX-2의 활성을 억제하는 효과가 있었고, 甘草의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 다른 藥物보다 COX-2의 활성을 억제 시키는 효과가 있었다(Fig. 8).

이는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 염증 매개물질인 PGE₂의 생성과 억제가 COX-2의 활성과 밀접한 상관성이 있음을 보여주고 있다.

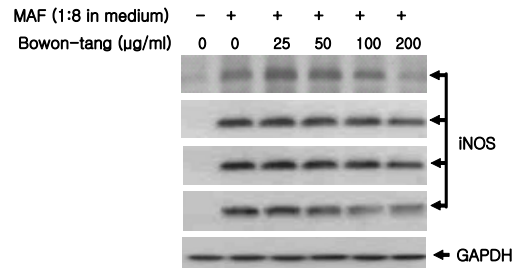


Fig. 6. Effects of *Ginseng Radix*, *Astragalus Radix*, *Glycyrrhiza Radix* or Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extracts on the iNOS expression by MAF-treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Cells ($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without MAF (1:8 medium) for 18 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

7. 保元湯 추출물이 비장면역세포의 증식에 미치는 효과

한편 지금까지 保元湯과 그 구성 藥物이 세포독성,

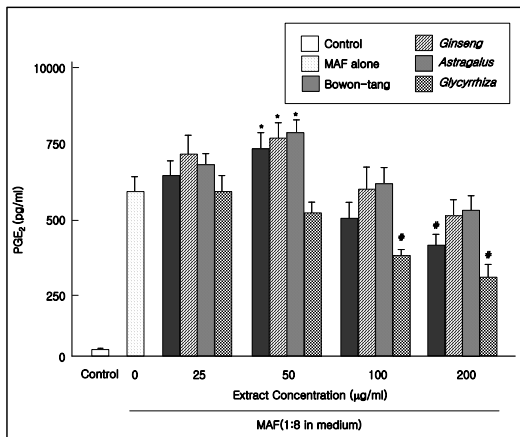


Fig. 7. Effects of *Ginseng* Radix, *Astragalus* Radix, *Glycyrrhiza* Radix or Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extracts on the PGE₂ production by MAF-treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Cells ($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without MAF (1:8 medium) for 24 h. PGE₂ production assay was carried out as described in Materials and methods. * or #; $p < 0.05$ indicates significant MAF alone treated control group.

IFN- γ 와 TNF- α (MAF) 생성, NO 생성과 iNOS 발현, PGE₂ 생성과 COX-2 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 保元湯은 그 구성 藥物の 특성에 따라 면역활성을 조절할 수 있는 藥物로 확인되었다. 따라서 이러한 保元湯의 면역조절 효과를 보다 면밀하게 조사하기 위해서 본 연구는 保元湯 추출물만을 선택하여 마우스 비장세포의 증식 효과를 실험 하였다.

마우스 비장세포를 분리하여 96 well plate에 접종하고 3시간 동안 방치 한 후 保元湯 추출물을 여러 농도(25-200 $\mu g/ml$)로 2시간 동안 처리한 후 2회 원심 세척한 후 Con A (2 $\mu g/ml$)로 48시간 동안 자극한 후 세포증식능을 측정된 결과 Fig. 8과 같이 Con A로 자극하지 않은 藥物 처리군의 어떠한 농도에서도 세포 증식의 효과는 없었다. 그러나 藥物을 처리하고

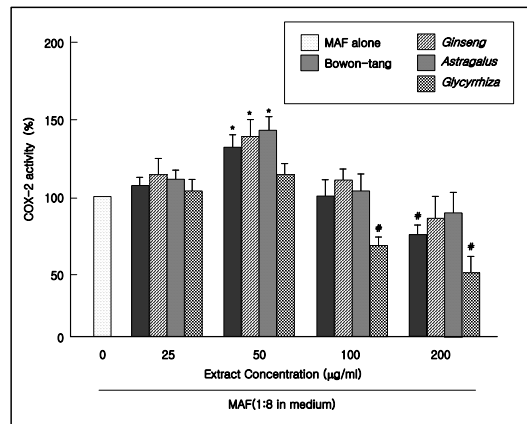


Fig. 8. Effects of *Ginseng* Radix, *Astragalus* Radix, *Glycyrrhiza* Radix or Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extracts on the PGE₂ production by MAF-treated peritoneal macrophages of BALB/c mouse. Cells ($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 $\mu g/ml$ LPS for 18 h. COX-2 activity assay was carried out as described in Materials and methods. * or #; $p < 0.05$ indicates significant MAF alone treated control group.

Con A로 자극할 경우 保元湯 추출물의 농도에 의존적으로 세포증식 효과가 있었다.

이와 같이 保元湯 추출물이 일정한 자극에 대하여 비장세포를 증식하는 것으로 보아 생체에서 병리적인 상태에서 면역기능이 활성화됨을 시사하는 중요한 관점을 관찰할 수 있었다.

8. 保元湯 추출물이 T-세포 아형의 증식에 미치는 효과

保元湯 추출물이 마우스 림프구 중 T-세포의 아형의 증식 및 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 1주일간 여러 농도의 保元湯 추출물을 경구 투여한 후 림프절을 적출하여 림프구를 분리한 후 FITC가 결합된 anti-mouse CD4 항체와 PE가 결합된 anti-mouse

CD8 항체를 이용하여 반응시킨 후 유식세포 분석기 (flow cytometry)로 분석하였다. 그 결과 Fig. 9와 같이 50 mg/kg(body weight)의 保元湯 추출물을 투여한 실험군은 PBS를 투여한 대조군에 비해서 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 발현이 증가되는 효과를 보였다. 또한 保元湯 추출물의 농도에 따른 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 발현을 확인한 결과 Fig. 10과 같이 CD4⁺ 세포의 경우 50 mg/kg의 保元湯 추출물을 투여한 실험군에서 유의하게 증가되었고(p<0.05), CD8⁺ 세포의 경우는 50 mg/kg과 100 mg/kg의 농도에서 유의하게 증가되는 효과가 있었다(p<0.05).

이는 保元湯이 림프구 중 T 세포 증식에 영향을 미치고 있어 세포매개성 면역증강에 작용하고 있음을 시사하고 있다.

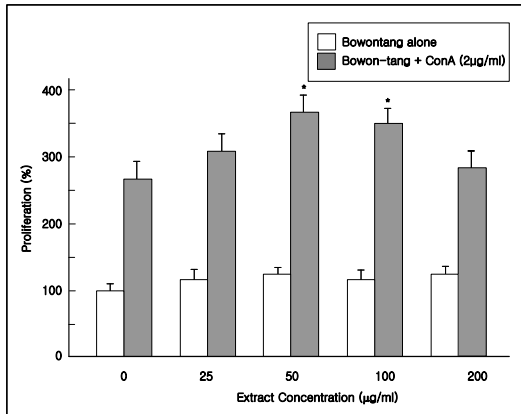


Fig. 8. Effects of Bowon-tang (*Ginseng+Astragalus+Glycyrrhiza*) water extracts on the splenocyte proliferation of BALB/c mouse by Con A treatment. Cells ($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 2 $\mu g/ml$ Con A for 48 h. Cell proliferation assay was carried out as described in Materials and methods. *:p<0.05 indicates significant Con A alone treated control group.

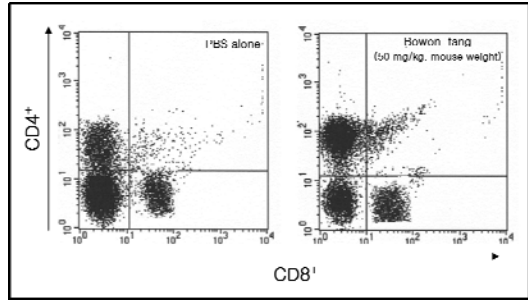


Fig. 9. Effects of Bowon-tang (*Ginseng+Astragalus+Glycyrrhiza*) water extract administration on the CD4⁺ or CD8⁺ cell expression of BALB/c mouse. Mice were administrated with or without Bowontang water extract (50 mg/kg · body weight) for 1 week , and then killed the mice with cervical dislocation method. Cells ($1 \times 10^6/ml$) were obtained lymphocytes from lymph node and stained with FITC-conjugated anti-mouse CD4⁺ antibody and PE-conjugated anti-CD8⁺ antibody. Flow cytometric assay was carried out as described in Materials and methods.

9. 保元湯 추출물이 NK cell의 활성화에 미치는 효과

保元湯 추출물이 마우스 자연살해 세포 활성화에 미치는 효과를 알아보기 위해서 1주일간 여러 농도의 保元湯 추출물을 경구 투여한 후 비장을 적출하여 림프구를 분리한 후 ⁵¹CrO₄가 부착된 Yac-1 세포를 혼합 배양하여 세포 살해 활성을 측정 하였다. 그 결과 保元湯 추출물의 농도에 의존적으로 자연살해능이 향상됨을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 이러한 결과는 保元湯이 마우스의 자연 살해세포의 활성을 증가시킬 수 있으며, 면역강화제로 이용할 수 있는 가능성을 제시해 주었다.

10. 保元湯 추출물이 Jurkat T-세포의 capping에 미치는 효과

마지막으로 保元湯이 인간 유래 T-세포주인 Jurkat

세포의 capping 유도에 미치는 효과를 알아보기 위하여 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯 추출물을 이용하여 2시간 동안 Jurkat T-세포에 전처리하고 anti-human CD3 항체와 anti-human CD28로 자극하고 FITC가 부착된 Goat anti-mouse IgG 항체로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

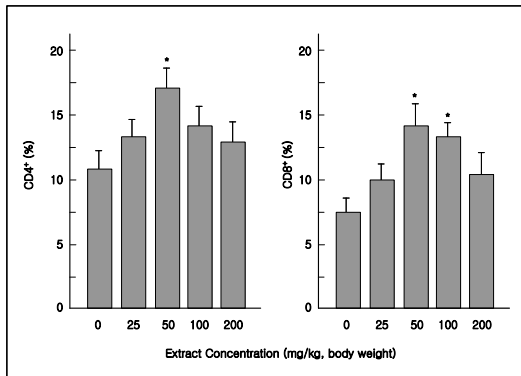


Fig. 10. Effects of Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extract administration on the CD4⁺ or CD8⁺ cell expression of BALB/c mouse. Mice were administrated with or without Bowontang water extract (25–200 mg/kg · body weight) for 1 week , and then killed the mice with cervical dislocation method. Cells ($1 \times 10^6/ml$) were obtained lymphocytes from lymph node and stained with FITC-conjugated anti-mouse CD4⁺ antibody and PE-conjugated anti-CD8⁺ antibody. Flow cytometric assay was carried out as described in Materials and methods. *:p<0.05 indicates significant PBS alone administrated control group.

그 결과 Fig. 12와 같이 PBS만 처리된 대조군에서는 T-세포 활성화의 지표인 capping이 유도되지 않았지만, anti-human CD3 항체와 anti-human CD28 항체로 자극한 대조군은 capping이 잘 유도 되었다. 더욱이 保元湯 추출물(50 mg/kg)을 처리한 실험군에서는 보다 뚜렷한 capping이 유도됨을 확인할 수 있었다.

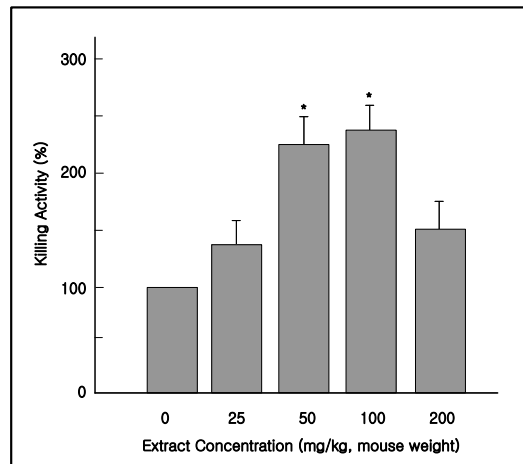


Fig. 11. Effects of Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extract administration on the killing activity of BALB/c mouse. Mice were administrated with or without Bowontang water extract (25–200 mg/kg · body weight) for 1 week , and then killed the mice with cervical dislocation method. Cells ($1 \times 10^6/ml$) were obtained lymphocytes from splenocytic and incubated with $^{51}\text{CrO}_4$ -conjugated Yac-1 cells. Killing activity assay of natural killer cells was carried out as described in Materials and methods. *:p<0.05 indicates significant PBS alone administrated control group.

한편 T-세포의 capping 유도에 있어서는 자극 시간에 따라 그 활성이 다르기 때문에 본 실험에서는 시간에 따른 capping 현상을 확인하기 위하여 保元湯 추출물(25-200 $\mu\text{g/ml}$)을 2시간 동안 전 처리하고 anti-human CD3 항체와 anti-human CD28 항체로 자극한 후 2분, 10분 그리고 20 분간 3단계로 나누어 capping을 조사한 결과 Fig. 12와 같이 anti-human CD3 항체와 anti-human CD28 항체를 동시에 자극한 대조군은 시간에 의존적으로 capping 유도가 잘됨을 확인할 수 있었다. 또한 保元湯 추출물을 처리한 전 실험군에서도 capping이 잘 유도됨을 확인할 수 있다. 특히 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 保元湯 처리

군에서 20분에 도달된 capping 비율은 anti-human CD3 항체와 anti-human CD28 항체만 처리한 대조군에 비해서 유의하게 capping 유도에 효과가 있었다. 따라서 이러한 결과는 保元湯이 인간 유래 T세포인 Jurkat cell에서도 그 활성을 유도할 수 있는 효과를 보여주고 있다.

지금까지의 실험을 종합하여 보면 in vitro, in vivo에서 保元湯과 그 구성약물의, 면역조절기능이나 면역강화작용의 유효성을 증명하고 있다

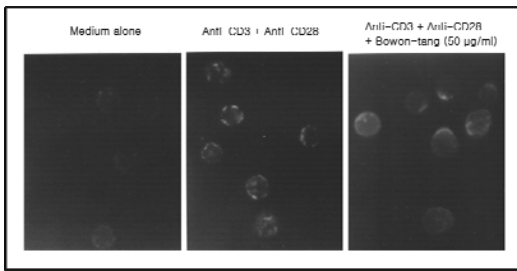


Fig. 12. Effects of Bowon-tang (*Ginseng*+*Astragalus*+*Glycyrrhiza*) water extract administration on the Capping in Jurkat T-cells. Cells ($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2 h at 37°C, and then incubated with or without anti-human CD3 plus anti-human CD28 antibody for 2–20 min at 4°C, following by incubation with goat anti-mouse IgG antibody conjugated with FITC (1:10 in PBS). After the washing of antibody, cells were shifted to 37°C for 20 min. Capping assay was carried out using fluorescent microscope.

IV. 考 察

韓醫學에서 正氣虛는 모든 질병을 일으키는 內的인 病理條件이며, 正氣는 인체의 생리활동을 보존하고 내적인 병인으로부터 인체를 방어하고 질병으로부터 회복시켜 체내의 항상성을 유지한다는 의미로 해석할

수 있다. 이러한 점에서 생체의 방어기구를 통하여 체내의 항상성을 유지하는 면역학적 개념과 유사성을 가지고 있다. 현대 한의학은 전통적으로 처방된 한약재의 효능을 탐색하고 그 효능가치를 높이기 위하여 약재의 보완 처방을 하여 정기를 회복시키기 위한 연구를 활발히 진행하고 있다.

생체는 면역계를 작동하여 외부와 내부의 이물질을 제거함으로써 체내의 항상성을 유지하는데, 면역계는 탐식세포, 자연살해세포, 보체(complement) 등으로 이루어진 자연면역(natural immunity)을 담당하는 선천면역(innate immunity)과 T 세포와 B 세포 같이 특이면역(specific immunity)을 담당하는 획득면역(acquired immunity)으로 나눌 수 있는데, 획득면역은 T 세포 작용에 의한 세포매개성 면역(cell mediated immune response)과 B 세포 작용에 따른 체액성 면역(humoral immunity)으로 구분된다²⁹⁾.

따라서 특정 藥物을 이용한 면역 활성을 조사하기 위해서는 탐식세포의 탐식능과 관련되고 염증 매개물질로 알려진 NO 및 PGE₂의 생성과 자연살해세포의 살해능에 미치는 영향뿐만 아니라 T 세포의 활성 및 탐식세포의 활성에 주요 사이토카인으로 작용하는 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성에 작용하는 효과 그리고 T 세포의 증식능과 T 세포의 아형인 CD4⁺ 세포인 협조 보조세포 T 세포(helper/induce T cells), CD8⁺ 세포인 세포독성 및 억제 T 세포(cytotoxic/suppressor T cells)의 발현과 T 세포의 활성의 지표로 사용되는 capping 현상에 미치는 영향에 대해서 조사해야 한다.

保元湯은 東醫寶鑑 小兒門에 기재된 處方으로 人蔘, 黃芪, 甘草로 구성된다. 保元湯의 사용은 小兒의 驚風를 치료하고 허약한 체질에 활용된다고 하였으며, 痘疹의 증상에 따라 다양한 가감법과 함께 운용되었다¹⁾. 保元湯을 구성하는 藥物중 人蔘(*Panax schinseng*)은 補氣藥으로 사용되어온 중요한 한약재 중의 하나다. 동양에서 가장 오래된 藥物學書인 神農本草經에 人蔘은 五藏을 補하고 元氣를 보충한다고

기록되어 있다. 人蔘의 생리활성은 체계적인 약리학적인 접근으로 심혈관계, 면역계, 신경계에 대한 효과와 해독작용, 항암작용, 그리고 항당뇨작용 등이 보고되었다³⁻⁹⁾. Ginsenosides, polyacetylenes, polysaccharides, phenolic compounds, proteins, acidic peptides 과 같은 여러 가지 특이성분을 함유하고 있다. 특히 人蔘 사포닌(ginsenosides)은 人蔘의 주요성분으로 알려졌으며, 최근 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

黃芪는 (*Astragalus membranaceus*)는 콩과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 중북부 지역에서 자생하며, 補氣劑로서 민간요법으로 널리 사용되고 있다. 韓醫學에서는 그 뿌리를 주로 약재로 사용하고 있으며, 補中益氣, 托毒 등의 효능이 있고, 內傷勞倦 및 모든 氣虛證에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이에 관한 주요한 약리효능 연구로는 혈압강하작용, 강심작용, 간장보호작용, 혈당강하 작용 등이 보고되어 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 黃芪 구성성분으로는 triterpenoid glycoside계통과 flavonoid계통이 주를 이루고 있다¹⁴⁾. 또한 人蔘과 黃芪의 配伍는 강력한 補氣助元작용을 한다. 임상적으로 保元湯은 주로 補氣藥으로 인체 질환치료제로 활용한다고 보고했다.

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)는 韓醫學에서 가장 많이 사용되는 약초로 면역조절, 항바이러스, 항암작용을 한다¹⁶⁾. 또한甘草는 코티솔의 증가, 멜라닌 자극 호르몬의 감소, 해독작용은 물론, 동맥경화의 예방 및 염증반응의 완화 등 여러 가지 약리 작용이 있는 것으로 알려졌다²⁶⁻²⁸⁾.甘草는 주로 glycyrrhinic acid와 18 β -glycyrrhetic acid와 같은 화합물을 함유하는데 최근에는 간손상 및 방사능에 대해 보호하는 효과가 알려졌다^{25,26)}.

따라서 본 연구는 正氣를 補益하고 虛弱을 治療하는 補益藥 중 人蔘, 黃芪 및 甘草로 배운 保元湯과 그 구성 藥物의 효과를 조사하기 위해서 마우스 세포를 대상으로 먼저 이들 藥物이 세포독성에 미치는 영향을 조사한 후, 탐식세포의 탐식능에 미치는 영향을

알아보기 위해서 NO의 생성과 이 생체 반응 문자를 조절하는 iNOS의 발현과 PGE₂의 생성과 이 물질을 조절하는 COX-2의 활성을 조사하였다. 또한 대식세포의 활성화인자 MAF를 保元湯 추출물로 자극하여 생산한 후 MFA의 활성 성분을 검증하기 위해서 IFN- γ 와 TNF- α 를 검증하여 탐식세포능과 자연살해세포의 살해능을 조사하였다. 더불어 T 세포의 활성화와 관련된 증식과 CD4⁺와 CD8⁺ 세포의 발현과 인간 유래 T 세포주인 Jurkat 세포를 이용하여 capping 유도에 대해서 조사한 바 매우 흥미로운 결과를 얻었다.

먼저 본 연구에 사용된 保元湯과 구성 藥物의 전 농도(25-200 $\mu\text{g/ml}$)에서 세포독성이 없었으며, IFN- γ 와 TNF- α 에 의해 손상된 세포 사멸을 막아주는 세포독성에 대한 보호효과가 있었다(Fig. 2).

IFN- γ 는 CD4⁺ 세포 중 Th1 세포에 의해서 생성되고 항 바이러스 효과뿐만 아니라 대식세포를 활성화 시켜 반응산소 중간물질(reactive oxygen species)의 생성과 NO의 생성을 촉진하는 사이토카인으로 알려졌다³⁰⁻³⁴⁾. 또한 TNF- α 는 IFN- γ 자극에 의해 활성화된 대식세포로부터 생성되는 사이토카인으로 각종 면역세포는 물론 자신의 세포도 활성화 시키는 작용이 있다^{35,36)}. 본 연구에서는 保元湯과 그 구성 藥物이 MAF 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 마우스 비장면역세포를 대상으로 여러 농도의 藥物을 2 시간 동안 전 처리한 후 PMA와 Con A로 자극하여 MAF를 생산하고 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성을 조사한 결과 INF- γ 는 保元湯과 그 구성 藥物의 농도가 50-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 많이 생성되었고(Fig. 3), TNF- α 는 保元湯과 구성 藥物의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 생성되었음을 확인 하였다(Fig. 4). 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 保元湯 추출물은 다른 구성물 藥物과 비교해 IFN- γ 와 TNF- α 생성능이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었기 때문에 MAF을 이용한 면역 효과 실험에 사용하였다.

한편 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로

서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포를 IFN- γ 와 TNF- γ 로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생하면서 활성화 된다^{50,51}. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 활성화된 대식세포에서 COX-2의 발현이 촉진되어 많은 양의 PGE₂를 생산하게 된다³⁷. 그러므로 본 연구에서 保元湯 처리에 의해 생산된 MAF으로 마우스 복강내 대식세포를 대상으로 保元湯과 그 구성 藥物을 여러 농도로 처리하여 NO와 PGE₂의 생성을 측정하고 이들 분자를 조절하는 iNOS와 COX-2의 활성을 조사한 결과 25 $\mu\text{g/ml}$ 또는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 이들 분자의 생성 및 발현을 촉진하는 효과가 있었던 반면, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 억제하는 효과가 있었다. 따라서 保元湯과 그 구성 藥物은 대식세포의 활성을 조절할 수 있는 효과가 있음을 확인 하였고, 甘草의 NO 생성 억제와 保元湯 및 黃芪 人蔘의 NO 생성 증가를 통하여 면역기능의 일부를 조절하는 기능을 발휘하고 있음을 시사하고 있다. 이러한 결과를 바탕으로 T 세포의 활성화와 NK 세포의 활성은 保元湯 추출물을 선택하여 보다 집중적으로 조사하였다.

保元湯이 마우스 비장면역세포 중 T 세포의 증식과 T 세포 아형의 발현에 미치는 효과를 조사한 결과 50 mg/kg 또는 100 mg/kg의 농도에서 T 세포 증식과 CD4⁺와 CD8⁺ 세포의 발현을 높이는 효과가 있었다. CD4⁺ 세포는 Th1과 Th2 세포로 나누어지는데, IFN- γ 와 TNF- α 와 같은 대식세포 활성을 유도하는 사이토카인은 Th1세포에서 분비된다. 본 연구의 결과 保元湯은 Th1세포의 분화와 활성을 조절할 수 있는 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 CD8⁺세포의 발현에 있어서도 향상된 효과는 세포 매개성 면역반응을

조절 할 수 있는 효과도 있다는 것을 가능하게 한다. 더불어 保元湯은 마우스 NK 세포의 활성을 높이는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 또한, Fig. 8과 Fig. 9의 결과에 따르면 保元湯 추출물이 생체에서 병리적인 상태에서만 면역기능이 활성화됨을 알 수 있고, 림파구 중 T세포 증식에 영향을 미치고 있어 림파성 면역증강에 작용하고 있음을 알 수 있다.

한편 T 세포의 cap을 형성하는 과정을 capping이라고 하는데, capping은 수축성 microfilament의 활성화에 관여하는 에너지 요구 과정이라 알려졌다. 이때 microfilament는 T 세포의 수용체에 결합한 정보를 세포질에서부터 핵내로 이동시키는데 매우 중요한 역할을 한다⁴⁰. 保元湯이 T 세포의 capping에 미치는 효과를 알아보기 위하여 인간 유래 T 세포주인 Jurkat 세포를 대상으로 조사한 결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 상승효과가 있음을 확인하였다(Fig. 12).

이상의 실험결과 保元湯은 그 구성 藥物의 특성에 따라 대식세포의 활성을 조절할 수 있는 효과를 보였을 뿐만 아니라 T 세포의 증식, 아형의 발현, capping 그리고 NK 세포의 활성을 조절할 수 있는 효능이 확인되어 면역기능이 저하된 각종 인체 질환에 활용할 수 있는 方劑라고 생각된다. 따라서 이러한 결과를 한의학적인 관점으로 볼 때 人蔘, 黃芪, 甘草를 각각 단독으로 처리한 효과 보다는 이들 藥物을 배소한 保元湯이 면역조절 작용에 효과적임을 나타내고 있어, 方劑學的 君臣佐使 理論에 입각한 處方 構成이 매우 중요함을 입증하여 주고 있으며, 한약을 이용한 새로운 치료제 개발에 方劑學的 處方 構成 理論 도입이 필요함을 시사하고 있다. 앞으로 *in vitro*뿐만 아니라 *in vivo* 실험에 方劑學的 개념을 이용한 處方 構成 理論인 君臣佐使論을 활용한다면 보다 효과적이고 부작용이 없으면서, 실용성이 높은 천연물을 이용한 치료제 개발에 대한 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

V. 結 論

痘疹의 諸症을 치료하고 증상에 따라 다양한 가감법으로 활용되고 있는 保元湯과 그 구성 藥物인 人蔘, 黃芪, 甘草의 약리 효능을 마우스 복강내 대식세포와 비장세포를 대상으로 면역조절 효능을 검증하고, 保元湯 추출물의 효능을 집중적으로 연구하기 위해서 마우스 T 세포의 증식, 아형의 발현 및 NK 세포의 활성을 조사한 후 Jurkat T 세포주를 대상으로 capping 유도실험을 하 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 保元湯의 構成藥物인 人蔘, 黃芪, 甘草 추출물의 농도에서 세포독성은 없었고, INF- γ 와 TNF- α 에 의한 세포독성으로부터 보호하는 효과가 있었다.
2. 保元湯 추출물은 비장세포에서 INF- γ 와 TNF- α 와 같은 대식세포 활성화인자(MAF) 생산에 효과적이었다.
3. 保元湯과 구성 藥物을 전처리하고 MAF을 처리한 결과 NO와 PGE₂ 생성을 조절하는 효과가 있었는데, 그 이유는 iNOS의 발현과 COX-2의 활성을 조절하는 藥物의 효과에서 비롯되었다는 것을 확인할 수 있었다.
4. 保元湯은 T 세포의 증식과 CD4⁺와 CD8⁺ 세포의 발현 유도 및 NK 세포의 활성에 대한 조절과 Jurkat T 세포의 capping을 유도하는 효과가 있었다.

이상의 결과 保元湯 추출물은 면역세포에 대한 효능이 保元湯을 구성하는 藥物의 특성에 따라 면역세포의 활성을 조절할 수 있는 효과를 나타내었다. 따라서 保元湯은 補氣藥으로 면역기능이 저하된 각종 인체 질환에 활용할 수 있는 方劑라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨

References

1. Heo J. Newly Cross-translated Dongeuibogam, Seoul:Beobinmunhwa, 2005:1673-775.
2. Yun YG, Graphic Korea Oriental Medical Traditional Medicine Formulae and prescription supplement Commentary, Seoul:Euseongdang, 2007:30,35,547.
3. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, Manual of Clinical Microbiology, USA:American Society for microbiology, 1991;8:864.
4. Tizard IR, Immunology: An Introduction, Saunders Colleges Publishing, N.Y, 1988;3:325-62.
5. Ahn YG, The Effect of Cimetidine, Ranitidine on the Immune Response in ICR Mice, Environ Health Toxicol, 1991;6(1):25-38.
6. Jeong JG, The effect of panax ginseng extract on the immunosuppressed mice by retinoic acid, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 1989:1-48.
7. Oh JS, The Effects of Korea Ginseng, Deer Horn Extracts and Filtrate of Escherichia coli Culture on Leukocyte Chemotaxis, J. of Microbiology, 1985;20(2):247-55.
8. Kim DH, Studies on the Effects of Glc-PPT and PPT, Intestinal Metabolites of Ginsenoside, on the Immune System, College of Korean Medicine, Wonkwang University,

- 2004;1-48.
9. Go BH, AnExperimental study on the effects of deer horn, rehmannia glutinosa, panax ginse, College of Korean Medicine, Kyunghee University, 1986;9:193-216.
 10. Kim S, Nah SY, Rhim H. Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca^{2+} channel-mediated cell death in rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, in press, 2007.
 11. Kang KS, Lee YJ, Park JH, Yokozawa T. The effects of glycine and L-arginine on heat stability of ginsenoside Rb1. *Biol Pharm Bull*, 2007;30(10):1975-8.
 12. Nakaya Y, Mawatari K, Takahashi A, Harada N, Hata A, Yasui S. The phytoestrogen ginsenoside Re activates potassium channels of vascular smooth muscle cells through PI3K/Akt and nitric oxide pathways. *J Med Invest*, 2007;54(3-4):381-4.
 13. Yu Z, Gao X, Yuan H, Liu T, Ma M, Chen X et al. Simultaneous determination of safflor yellow A, puerarin, daidzein, ginsenosides (Rg(1), Rb(1), Rd), and notoginsenoside R(1) in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2007;45(2):327-36.
 14. Kim SN, Ha YW, Shin H, Son SH, Wu SJ, Kim YS. Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in Panax ginseng C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J Pharm Biomed Anal*, 2007;45(1):164-70.
 15. Lee JH, Study of Hoangkidohongtang Extract on Antitumoral Activity and Immune Response. *Kor J oriental pathology*, 1996;10(1):133-43.
 16. Ma W, Nomura M, Takahashi-Nishioka T, Kobayashi S. Combined effects of fangchinoline from *Stephania tetrandra* Radix and formononetin and calycosin from *Astragalus membranaceus* Radix on hyperglycemia and hypoinsulinemia in streptozotocin-diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 2007;30(11):2079-83.
 17. Chen XJ, Bian ZP, Lu S, Xu JD, Gu CR, Yang D, et al. Cardiac protective effect of *Astragalus* on viral myocarditis mice: comparison with Perindopril. *Am J Chin Med*, 2006;34(3):493-502.
 18. Zhang BQ, Hu SJ, Qiu LH, Shan QX, Sun J, Xia Q et al. Diphasic effects of *Astragalus membranaceus* BUNGE (Leguminosae) on vascular tone in rat thoracic aorta. *Biol Pharm Bull*, 2005;28(8):1450-4.
 19. Matkowski A, Woźniak D, Lamer-Zarawska E, Oszmiański J, Leszczyńska A. Flavonoids and phenol carboxylic acids in the oriental medicinal plant *Astragalus membranaceus* acclimated in Poland. *Z Naturforsch [C]*, 2003;58(7-8):602-4.
 20. Zhou JY, Fan Y, Kong JL, Wu DZ, Hu ZB. Effects of components isolated from *Astragalus membranaceus* Bunge on cardiac function injured by myocardial ischemia reperfusion in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2000;25(5):300-2.
 21. Kwon MH. Effects of Radix Glycyrrhizae and Radix Tripterygii Wilfordii Water Extract on the Functions of Suppressor Immunocytes of the Mouse. College of Korean Medicine, Wonkwang University, 1994;4(1):337-59.

22. Han JH. A study on the Immuno-regulatory action of Glycyrrhizin, Glycyrrhetic acid and Glycyrrhizae Radis extract. Woosuk University, 1991:1-53.
23. Lee TG. Investigation Anti-HIV-1 viral activity of glycyrrhizin, School of Oriental Medicine Lab Collection of Dissertations, 1991;1(1):209-36.
24. Kim HG, Kim HM, Song BG, Lee EJ, Jeong HT. Pharmacology of Korean medicine. Seoul:Goryeo medicine, 2000:315-9.
25. Pak GM, Cho GG, Son YH, Lim JG, Nam GS. Antitumor and immunomodulatory effects of Glycyrrhizae radix aqua-acupuncture solution. Kor. J. Pharmacogn. 2000;31(1):7-15.
26. Feng C, Wang H, Yao C, Zhang J, Tian Z. Diammonium glycyrrhizinate, a component of traditional Chinese medicine Gan-Cao, prevents murine T-cell-mediated fulminant hepatitis in IL-10- and IL-6-dependent manners. Int Immunopharmacol. 2007;7(10):1292-8.
27. Niwa K, Lian Z, Onogi K, Yun W, Tang L, Mori H et al. Preventive effects of glycyrrhizin on estrogen-related endometrial carcinogenesis in mice. Oncol Rep. 2007;17(3):617-22.
28. Lin IH, Hau DM, Chen WC, Chen KT, Lin JG. Effects of glycyrrhizae and glycyrrhizic acid on cellular immunocompetence of gamma-ray-irradiated mice. Chin Med J(Engl). 1996;109(2):138-42.
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. New York, W.B. Saunders company. 2000:3-16.
30. Noubade R, Milligan G, Zachary JF, Blankenhorn EP, Del Rio R, Rincon M et al. Histamine receptor H(1) is required for TCR-mediated p38 MAPK activation and optimal IFN-gamma production in mice. J Clin Invest. 2007;117(11):3507-18.
31. Long M, Slaiby AM, Wu S, Hagymasi AT, Mihalyo MA, Bandyopadhyay S et al. Histone acetylation at the Ifng promoter in tolerized CD4⁺ cells is associated with increased IFN-gamma expression during subsequent immunization to the same antigen. J Immunol. 2007;179(9):5669-77.
32. Ren FY, Jin H, Piao XX, Piao FS. Ribavirin and IFN-alpha combination therapy induces CD4⁺ T-cell proliferation and Th1 cytokine secretion in patients with chronic hepatitis B. World J Gastroenterol. 2007;13(41):5440-5.
33. Ye Z, Tang C, Xu S, Zhang B, Zhang X, Moyana T, et al. Type 1 CD8⁺ T cells are superior to type 2 CD8⁺ T cells in tumor immunotherapy due to their efficient cytotoxicity, prolonged survival and type 1 immune modulation. Cell Mol Immunol. 2007;4(4):277-85.
34. Li JR, Gong RY, Tian KL, Wang J, Wang YX, Huang HJ, et al. Study on the blood-borne virus co-infection and T lymphocyte subset among intravenous drug users. World J Gastroenterol. 2007;13(16):2357-62.
35. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. New York:W.B. Saunders company. 2000:235-69.
36. Kelly J, Khan AA, Yin J, Ferguson TA, Apte RS. Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of

- tissue injury in mice. *J Clin Invest*, 2007;117(11):3421-6.
37. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, 1995;86(3):1184-95.
38. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol*, 2002;35(1):116-26.
39. Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN, et al. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J Exp Med*, 2000;191(12):2131-44.
40. Lee JH, Ryu H, Han MK, Kim UH, Chung HT. Nitric oxide inhibits capping in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997;232(3):827-31.