

Original Article / 원저

葛根湯이 면역조절작용에 미치는 영향

조대연 · 윤용갑^{*} · 정 명 · 이은혜 · 복영옥 · 정창옥 · 임규상^{**}

^{*}원광대학교 대학원 한의학과, ^{**}원광대학교 한의학전문대학원 한국 전통의학 연구소

Effect of *Gal-Geun-Tang* on Antigen-Specific Immune Response

*Dae-yeoun Cho · Young-gab Yun · Myung Jung · Eun-hye Lee · Young-ok Bok ·
Chang-ohk Jung · Kyu-sang Lim*

Abstract

Objectives : *Gal-Geun-Tang* (GT) has been described from SANGHAN in Korean traditional medicine and known to act against cold, fever, hypertension, and nasal catarrh. However, little has yet been learned about the effect of GT on immune function. In the current study, in vitro and in vivo immunomodulatory activity of GT (water extract) was investigated.

Methods : Water extract of GT induced in vitro proliferation of spleen cells and significantly increased their proliferative responses during anti-CD3 activation. Using purified splenic T and B cells, it was revealed that GT has a mitogenic activity to B cells and promotes their proliferation induced by lipopolysaccharide, whereas T cell proliferation was not triggered and GT was rather inhibitory to T cell activation caused by anti-CD3 antibody. In the presence of antigen presenting cells (APC), GT addition resulted in a significant increase of IFN γ and IL-4, but not IL-2, production. However, addition of high concentration (1,000 μ g/ml) of GT led to a marked reduction in T cell cytokine production and under such condition, GT facilitated apoptosis of T cells when examined by flow cytometry with propidium iodide staining.

Results : In vivo immunomodulation of GT was also investigated using a mouse model. Following keyhole limpet hemocyanin (KLH) immunization, GT (1 mg/day) was orally administered for 9 days. Cell numbers in thymus, spleen and peripheral blood were not altered by GT administration, indicating that such dose is not immunotoxic. Cell numbers in draining lymph nodes (LN) and ex vivo Ag-specific proliferation of LN cells were significantly elevated by GT administration. However, any preferential stimulation of T or B and CD4⁺ or CD8⁺ T cell subpopulations was not observed in a flow cytometric analysis of LN cells. This result shows that GT does not promote in vivo B cell proliferation while GT enhances Ag-specific proliferation of LN cells, unlike what was observed in vitro.

© 2016 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.

Conclusions : For a further understanding of in vivo immunomodulatory activity of GT, ex vivo cytokine production of LN cells obtained from KLH-immunized mice was evaluated. Ag-specific IFN γ production was significantly higher in GT-treated mice when compared to PBS-treated control mice. In contrast, IL-4 production in GT-treated group was comparable to control group unlike to in vitro data. In addition, GT administration did not result in any significant differences in serum levels of Ig (IgM, IgG1 and IgG2a) between GT-treated and control groups. Taken together, these data strongly support that GT promotes immune response, more profoundly type 1 helper T cell (Th1) activity and GT may be applicable for treatment of intracellular parasite infection such as viral diseases.

Key words : Gal-Geun-Tang(GT); cold; fever; hypertension; nasal catarrh; immune function

I. 緒 論

葛根湯은 張仲景의 傷寒論의 太陽病에 기록된 方劑¹⁾로 處方의 藥物의 構成을 보면 葛根 桂枝 麻黃 芍藥 甘草 大棗 生薑으로 되어 있으며, 感冒 發熱 無汗 惡寒 脈浮而有力 項背強痛 自下利 등의 症狀에 活用되어 왔다²⁻⁴⁾. 近來에 와서는 上氣道感染, 腦炎, 腦膜炎, 慢性 鼻炎, 頸椎痛, 麥粒腫, 유행성이하선염, 습진, 두드러기, 高血壓 및 中耳炎, 扁桃腺炎, 淋巴腺炎, 結膜炎 등 炎症性疾患에 다양하게 活用되고 있다^{1,5)}.

葛根湯은 初期의 感染病態에 活用하는 方劑로써 外部로부터 체내로 침입한 異物 즉 바이러스, 세균, 알레르겐 등을 효과적으로 처리하며 抗菌력이 弱한 感染症에 비교적 즉각적인 효과를 나타낸다. 이는 發汗에 의한 體溫降下와 體液老廢物의 排泄작용뿐만 아니라, 感染病 初期에 생체방어 시스템중 면역작용을 증가시키기 때문인 것으로 알려져 있다⁶⁾.

葛根湯의 구성약물에 대한 藥理作用을 조사해 보면, 葛根은 muscarin양 작용과 macrophage 탐식능 개선작용이 있으며, 麻黃은 항알레르기작용, 항염증작용이 있고, 桂枝는 항염작용과 살균작용을 하며, 芍藥은 항염작용, 항알레르기작용, macrophage 탐식능 향진 작용, 농양억제작용등이 있으며 大棗는 세포에 영

양을 공급함과 동시에 ethyl- α -D-fructofuranoside는 cyclic AMP를 증량하여 항알러지작용을 하는 것으로 알려져 있고 甘草는 LH-1이 免疫세포를 활성화하며 감초성분중 glycyrrhizin은 항알러지작용, NK 세포 활성화작용이, glycyrrhetic acid와 glycyrrhizin은 항염작용, 해열작용을 하며, 대식세포의 탐식능을 활성화하고 免疫기억세포의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁷⁻¹⁹⁾.

그러므로 葛根湯은 면역시스템에 영향을 미침으로써 치료효능을 발휘하는 방제임을 알 수 있으며, 이에 대한 보다 객관적인 검증이 필요하다고 생각하여, 葛根湯이 시험관내에서 B세포, T세포 증식과 IL-2, IFN γ 및 IL-4의 생산에 미치는 영향과 경구투여한 葛根湯이 생체 내에서 T 및 B 림프구의 항원특이적 반응에 미치는 영향을 조사하여 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 3-5주된 Balb/c 마우스를 화학연구소 (대전)에서 구입하였으며, 항온 항습장치 (대중기기산업, 서울) 내에서 사육하면서 7주된 생쥐를 실험에 사용하였다.

Corresponding author : Kyu Sang Lim, Professional graduated school of Oriental medicine Wonkwang university, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 54538, KOREA.
(Tel:063-850-6916, E-mail: kslim@wku.ac.kr)

• Recieved 2016/7/15 • Revised 2016/8/9 • Accepted 2016/8/16

2. 세포 배양액

본 실험에서 세포의 배양을 위해서 IMDM (Hyclone, Logan, UT, USA)을 기본배양액으로 하여 10%의 열처리된 비 활성화시킨 우태혈청 (fetal bovine serum; FBS, Moregate, Melbourne, Australia), 1% antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, Sigma Chemical, MO, USA), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (2ME)을 첨가한 완전 배양액을 사용하였다.

3. 葛根湯 및 물 추출물 제조

葛根湯은 許의 圖解常用韓方方劑²⁰⁾에 수록된 내용을 사용하였으며, 내용은 표와 같다(Table 1).

Table 1. Oriental Crude Drug Composition of Gal-Geun-Tang extract (GT)

Drug name	Crude drug name	Dose (g)
葛根	<i>Radix Puerariae</i>	4
麻黃	<i>Herba Ephedrae</i>	4
桂枝	<i>Ramus Cinnamomi Cassiae</i>	2
芍藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	2
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	2
大棗	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	3
生薑	<i>Fructus Zizyphi Jujubae</i>	1
Total		18

葛根湯 10첩 분량인 180g에 물 1 l 를 가하여 대용 약탕기로 2시간30분 전탕한 다음 거즈로 여과하고, 3,200 rpm 으로 20분간 원심분리 한(상등액을 얻기 위한 방법) 다음 이 상등액을 농축기(rotary evaporate)로 충분히 농축한 후 -70°C(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시킨 후 freeze dryer로 동결 건조 시킨 것을 시료로 사용하였다.

4. 시험관 내에서 葛根湯의 처리

동결 건조한 葛根湯을 100 mg/ml에 용해시킨 후 고압 멸균하여 사용하였다. 표적 세포를 준비한 후 제시

된 농도의 葛根湯을 가하여 3일간 배양한 후, 세포 증식 및 사이토카인 생산량을 측정하여 비교하였다.

5. 마우스 면역과 葛根湯의 투여

KLH (keyhole limpet hemocyanin, Sigma) 100 µg을 동량의 CFA (complete Freund's adjuvant, Sigma)와 혼합하여 마우스의 footpad에 피하로 주입 하였다. 葛根湯 투여군에는 葛根湯(10 mg/ml)을 매일 1회 0.1 ml씩 경구로 강제 투여하고, 대조군에는 동량의 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)를 투여 하였으며, 항원 면역 후 다음 날부터 마우스를 희생시키기 전날까지 매일 1회 총 9일간 투여하였다.

6. 림프절 세포와 T, B세포의 준비

마우스의 비장세포와 림프절 세포를 주사침을 사용하여 유리시키고, 9초 동안 멸균 증류수에 노출시키는 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 파괴시킨 후 인산염 완충액 (PBS)으로 세척하였으며, trypan blue 염색 방법을 이용하여 생존 세포의 수를 측정하였다. 얻어진 림프절 세포와 비장세포부터 각각 T, B세포를 분리하기 위하여 플라스틱 배양접시를 이용하여 37°C에서 1시간 배양한 후, 비부착성 세포와 부착성 세포를 분리하여 수거하였다. 비부착성 세포로부터 항 B220 항체를 부착시킨 미세한 자성구슬 (magnetic bead; MACS, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)을 이용하여 남아있는 B세포를 제거하여 순수한 T세포를 얻었다. 또한 비부착성인 NK 및 T 세포가 일부 제거된 부착성 세포를 수거한 후, 항 Thy1.2 항체 자성구슬을 이용하여 남아있는 T세포를 제거하여 순수한 B세포를 얻었다. 세포의 농도를 1×10^6 cells /ml 조정하여 3일간 배양하였다.

7. 채혈 및 혈청의 준비

Avertin™ (1g당 0.025ml, Sigma)을 마우스 복강에 주사하여 마취시킨 후, 1 ml 주사기를 사용하여 마우

스의 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 1.5 ml 원심튜브에 넣고 실온에서 응고시킨 후, 소형원심분리기 (Hani)를 사용하여 혈청을 분리하여 실험시까지 -20°C 에 보관하였다.

8. 사이토카인 측정 : ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Microplate (96 well; Nunc A/S, Roskilde, Denmark)에 coating antibody ($1.25\ \mu\text{g/ml}$)을 넣어 4°C 에서 12-18시간 동안 부착시킨 후, plate를 wash buffer(9.0g NaCl , 1ml Tween 20/L pH 7.4)를 이용하여 1회 ($400\ \mu\text{l}$) 세척하였다. blocking buffer (8.0g NaCl , $1.42\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $0.2\text{g KH}_2\text{PO}_4$, 0.2g KCl , $5.0\text{g bovine serum albumin (fraction V/L)}$ pH 7.4)를 well당 $0.3\ \text{ml}$ 씩 가하고 2시간 blocking 후, wash buffer를 사용하여 4회 세척한 다음, 적당한 농도로 희석한 시료들과 표준 사이토카인 (standard)을 각 well에 넣고 실온에 1.5시간 동안 정치하였다. 다시 상기한 방법으로 세척하고 적정농도로 희석한 biotin으로 표지된 detection antibody를 각 well에 가한 후 1시간 동안 반응시켰다. 다시 wash buffer로 4회 세척한 다음, 효소 (horseradish peroxidase) 표지된 avidin을 working reagent에 1:4000-8000으로 희석한 후, 각 well에 넣고 다시 45분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 다시 wash buffer를 이용하여 4회 세척한 다음, 기질(TMB: 3,3',5,5-tetramethyl benzidine, Sigma)을 well당 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣은 후 암소에 정치시켰다. 30분 후 모든 과정을 멈추기 위해 stop solution ($1.8\text{N H}_2\text{SO}_4$)를 well당 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣은 뒤, 1시간 이내로 분광 광도계(Peckard spectra count TM, A Cberra Company)를 이용하여 450nm 의 파장에서 O.D값을 구하였다. 실험에서 사용한 모든 항체는 Biosource (Camarillo, CA, USA)와 Phamingen사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 모든 과정은 실온에서 실시하였다.

9. KLH-specific IgG1, IgG2a와 IgM ELISA

Microplate (96 well; Nunc A/S)에 $2\ \mu\text{g/ml}$ 농도의 KLH를 well당 $100\ \mu\text{l}$ 씩 가하고 4°C 에서 12-16 시간 부착시킨 후, wash buffer (PBS with Tween 20 0.05%/l)로 3회 wash하고, blocking buffer (PBS with 10% FBS) $200\ \mu\text{l}$ 를 각 well에 가하였다. 1시간 후 wash buffer로 3회 세척한 후, 적당한 농도로 희석된 시료를 각각의 well에 넣고 암실에서 정치시켰다. 2시간 후 같은 방법으로 세척한 후, biotin으로 표지된 anti-IgG1, anti-IgG2a 항체를 가하고 1시간 후 세척을 반복하였다. 다시 효소 (horseradish peroxidase)로 표지된 avidin를 가하여 각 well에 $100\ \mu\text{l}$ 씩 넣은 후 1시간동안 반응시켰다. Wash buffer로 7회 세척한 후 기질(TMB: 3,3',5,5-tetramethyl benzidine, Sigma)을 well당 $0.1\ \text{ml}$ 씩 넣은 후 암실에 두었다. 30분 후 모든 과정을 멈추기 위해 stop solution ($2\text{N H}_2\text{SO}_4$)를 well당 $100\ \mu\text{l}$ 씩 넣은 뒤 1시간 이내로 분광 광도계(Peckard spectra count TM, A Cberra Company)를 이용하여 450nm 의 파장에서 O.D값을 구하였다.

10. 세포증식 반응 검사 (티미딘 흡수법)

항원 자극에 의한 림프구의 증식 반응을 측정하기 위해 96 well-plate에 $1 \times 10^6\ \text{cells/ml}$ 세포 부유액 $200\ \mu\text{l}$ 씩 분주한 후, 항원을 가하여 각각 3 well씩 배양하였다. 3일간 배양하되, 배양 최종 18시간 동안 티미딘 (thymidine) $0.5\ \mu\text{Ci/well}$ 을 첨가한 후, 세포수거기 (12 well cell harvester, Skatron Instruments, Sterling, VA, USA)를 이용하여 glass-fiber filter 위에 세포를 수거하였다. 방사능 활성(radioactivity)은 liquid scintillation counter(Packard Instrument)를 이용하여 측정하였다.

11. Apoptosis 측정

배양한 세포를 수거하여 차가운 PBS로 2회 세척한

후, 1×10^5 세포를 binding buffer 100 μ l로 부유시켰다. 여기에 annexin-V (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 10 μ l씩 가하여 암실에서 반응시켰다. 15분간 반응시킨 후 binding buffer 400 μ l를 가한 다음 유식세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

12. 면역형광법 및 유식 세포 분석 (flow cytometry)

세포 부유액을 0.5% 우혈청 알부민, 0.1% sodium azide가 첨가된 PBS에 부유시킨 후, $2-5 \times 10^5$ 세포에 항체를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 원심세척한 후 4% paraformaldehyde로 고정시켜 유식세포 분석기(FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CD, USA), Lysis-II 프로그램(Becton Dickinson Co.), Winmdi software(Joe Trotter, The Scripps Research Institute)를 사용하여 분석하였다. forward scatter/side scatter gating을 통해 죽은 세포를 배제하고 생존 세포만을 분석하였다.

III. 實驗 結果

1. 비장세포 증식에 미치는 葛根湯의 효과

면역 반응에 관여하는 림프구의 활성화에 대하여 葛根湯이 미치는 영향을 실험하기 위하여 2차 면역기관인 비장(spleen)의 림프구를 사용하였다. 시험관내에서 여러 농도의 葛根湯에 노출시켜 3일간 배양한 후 티미딘(thymidine) 흡수법을 이용하여 비장세포의 증식을 비교하였다. 100 μ g/ml 이상 농도의 葛根湯을 첨가한 경우 비장세포의 증식이 유의한 정도로 유도되었다 ($P < 0.01$). 또한 T세포가 활성화한 상태에서 그 효과를 보기 위하여 항 CD3를 사용하여 비장세포를 자극 배양하면서 葛根湯의 농도를 달리하여 처리하였다. 앞서의 결과와 마찬가지로 항CD3에 의해 유도된 비장세포 증식이 100 μ g/ml의 葛根湯 농도에서 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었다 ($P < 0.05$). 그러나 1,000 μ g/ml의 고농도에서는 그 증식이 현저하게 억제

되었다(Fig. 1).

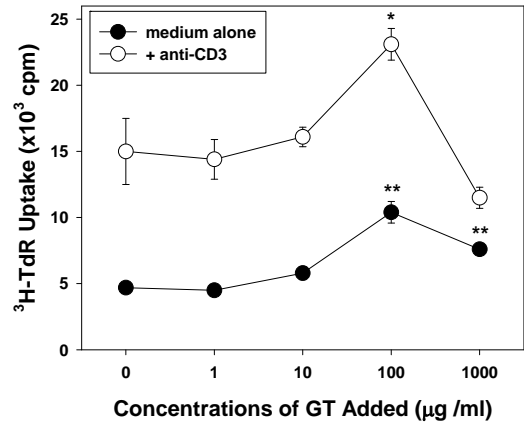


Fig. 1. Effect of water extract of GT on SPC proliferation. SPC were in vitro stimulated with immobilized anti-CD3 (0.1 μ g/ml) for 3 days. Data are means \pm SE of three experiments. (*, $P < 0.05$ vs control; **, $P < 0.01$ vs control)

2. T, B세포의 증식에 미치는 葛根湯의 효과

葛根湯이 비장세포의 증식을 유도하고, 활성화한 림프구의 증식을 증가시키는 상기 결과를 좀 더 자세히 알아보기 위하여 림프구 중 T 및 B 림프구에 각각 어떻게 작용하는지를 실험하였다. 림프절로부터 T세포를, 비장세포로부터 B세포를 순수 분리하여 실험을 반복하였다. T세포를 여러 농도의 葛根湯으로 처리하였으나 葛根湯의 농도와 상관없이 T세포의 증식은 유도되지 않았다. 항 CD3 항체로 T세포를 자극하여 증식을 유도하면서 葛根湯을 가하였을 때는 葛根湯농도에 의존적으로 T세포의 증식이 현저히 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). T세포와는 달리 B세포는 100 μ g/ml 농도의 葛根湯에 의해 유의하게 세포의 증식이 유도되었으며, LPS에 의해 활성화한 B세포의 증식도 현저히 증가되었다(Fig. 3). 그러나 1,000 μ g/ml 농도의 葛根湯에 의해서는 B세포의 증식이 현저히 억제되었다(Fig. 3).

3. T 림프구의 사이토카인 생산의 변화

전 실험을 통해 葛根湯은 B세포의 증식을 유도하고

활성화 B세포의 증식을 증가시킨 반면, 활성화 T세포의 증식을 억제하였다. 이에 葛根湯이 T세포의 면역학적 기능도 억제하는지를 확인하고자 분비성 단백질

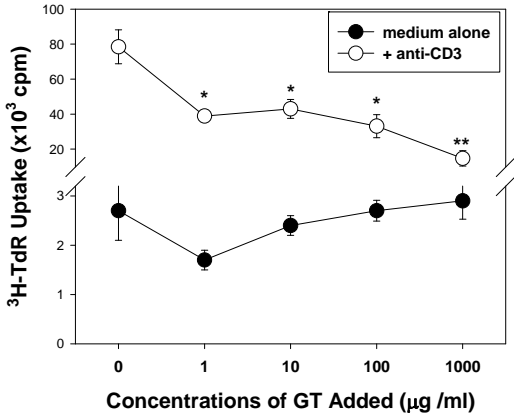


Fig. 2. Effect of GT extract on T cell proliferation.

Purified T cells were incubated in medium alone or stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody (0.1 µg/ml) for 3 days in the presence of antigen-presenting cells. (*, P<0.05 vs control; **, P<0.01 vs control)

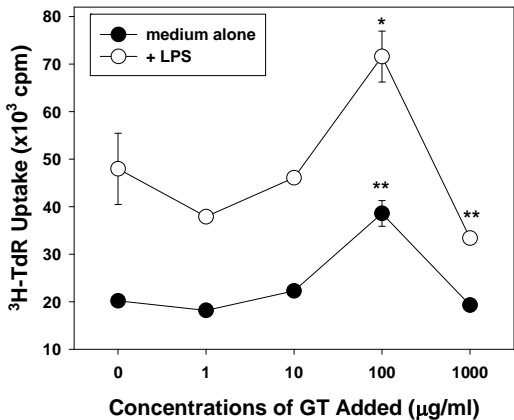


Fig. 3. Effect of GT extract on B cell proliferation.

Purified B cells were incubated in medium alone or stimulated with LPS (10 µg/ml) for 3 days. (*, P<0.05 vs control; **, P<0.01 vs control)

질인 사이토카인의 생산에 미치는 葛根湯의 효과를 조사하였다. 순수 분리한 T세포를 항 CD3 (0.1 µg/ml)로 자극을 하면서 1-1,000 µg/ml 농도의 葛根湯을 가한 후 3일간 배양하여 상청액을 수거하였으며, 상청

액 중의 사이토카인 양을 ELISA 방법으로 조사하였다. T세포의 성장 인자인 IL-2 생산은 葛根湯처리에 의해 변화되지 않았다(Fig. 4). 반면에 10 및 100 µg/ml 농도의 葛根湯을 가한 경우 IFN-γ 생산은 각각 44.7±2.0 및 47.0±3.1 µg/ml로서 대조군에서의 생산 (29±4.2 µg/ml)에 비해 현저히 증가하였으며(Fig. 5), 10 µg/ml 농도의 葛根湯을 가한 경우 IL-4의 생산도 1,526.0 ±165.1 µg/ml로서 대조군에서의 생산 (802.4±9.1 µg/ml)에 비해 현저히 증가하였(Fig. 6). 그러나 고농도 (1,000 µg/ml)의 葛根湯에 노출시킨 경우에는 IFN-γ 생산(1.2±0.2 µg/ml, Fig. 5) 및 IL-4의 생산(9.7±1.2 µg/ml, Fig. 6)이 매우 현저하게 억제되었다. 이러한 결과는 적당한 농도의 葛根湯은 T세포의 활성을 증진시키지만 고농도의 葛根湯은 T세포에 대하여 강력한 활성 억제작용을 나타냄을 보여준다.

4. T세포의 Apoptosis에 미치는 葛根湯의 효과

전 실험들에서 고농도의 葛根湯이 T세포의 증식이나 사이토카인 생산을 억제하는 것을 관찰하였으므로 이러한 결과가 T세포에 미치는 葛根湯의 세포독성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 고농도의 葛根湯처리 후 활성화 T세포의 아포토시스를 측정하였다. T세포를 항 CD3로 자극한 후 葛根湯의 농도를 달리하여 배양하고 세포를 수거하여 측정하였던 바, 1, 10, 100 µg/ml 농도의 葛根湯에 의해서는 대조군과 비교하여 커다란 차이를 보이지 않았지만, 1,000 µg/ml의 葛根湯의 농도에서 apoptosis가 현저히 높아졌으며, 2일 후에는 37.2%에서 70.1%로 약 2배 정도 높아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 이러한 결과로 보아 고농도의 葛根湯 추출물은 T세포의 사멸을 유도함으로써 T세포 기능을 억제함을 알 수 있었다.

5. In vivo에서 葛根湯의 효과

in vitro 실험에서 적당한 농도의 葛根湯이 B세포의 증식과 T세포의 사이토카인 생산을 증가시켰으며

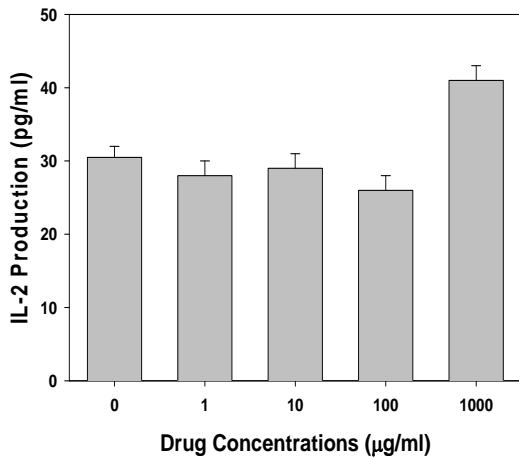


Fig. 4. Effect of GT on IL-2 production by T cells.

T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody (0.1 µg/ml) for 3 days in the presence of antigen-presenting cells. IL-2 levels in culture supernatant were determined by ELISA. Data are means±SE of three experiments.

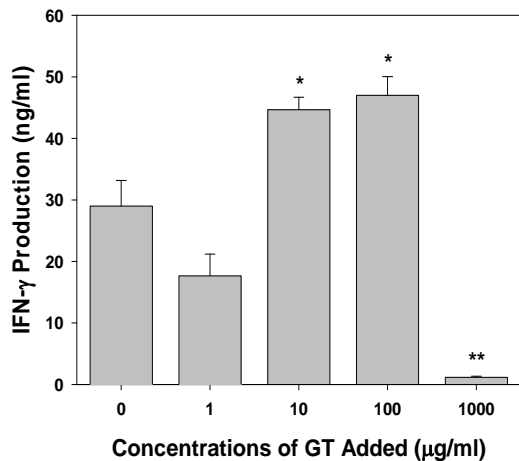


Fig. 5. Effect of GT on IFN-γ production by T cells.

T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody (0.1 µg/ml) for 3 days in the presence of antigen-presenting cells. IFN-γ levels in culture supernatant were determined by ELISA. Data are means±SE of three experiments (*, P<0.05; **, P<0.01 vs control).

로 葛根湯추출물이 in vivo에서도 면역반응을 증강시킬 수 있는지를 확인하였다. 마우스를 KLH 항원으로 면역시킨 후 매일 1 mg의 葛根湯을 경구로 강제 투여하였다. 우선 葛根湯의 면역독성 여부를 확인하기 위해서 흉선, 비장 그리고 말초 혈액내의 세포수를 비교

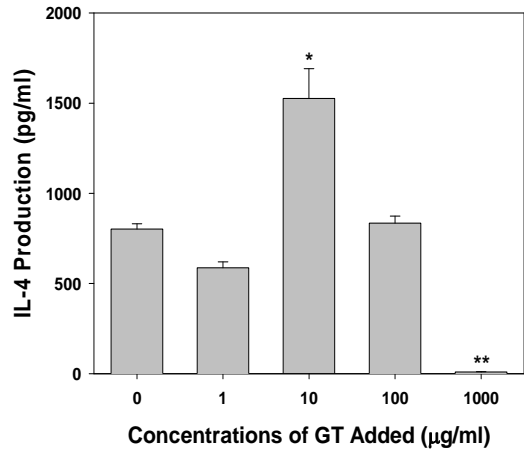


Fig. 6. Effect of GT on IL-4 production by T cells.

T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody (0.1 µg/ml) for 3 days in the presence of antigen-presenting cells. IL-4 levels in culture supernatant were determined by ELISA. Data are means±SE of three experiments (*, P<0.05; **, P<0.01 vs control).

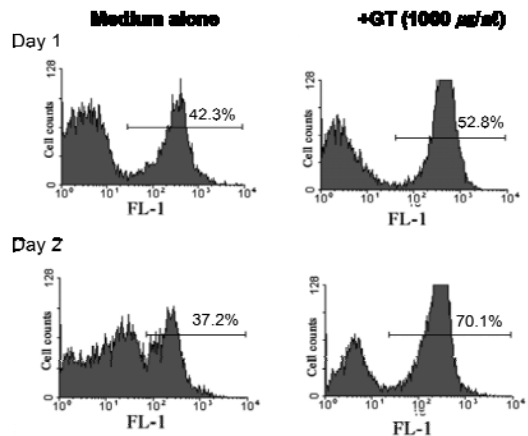


Fig. 7. Induction of T cell apoptosis by high concentration of GT (1,000µg/ml).

T cells stimulated with plate-bound anti-CD3 antibody (0.1 µg/ml) for 3 days in the presence of antigen-presenting cells were harvested and stained with FITC-conjugated annexin-V.

하였다. 그 결과, 폐, 흉선, 비장(Fig. 8)의 무게, 그리고 흉선, 비장 및 말초 혈액내의 백혈구 세포수(Fig. 9)가 대조군과 葛根湯 투여군 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 1일 1mg의 葛根湯 투여는 마우스에 독성을 나타내지 않음을 보여주었다.

6. 葛根湯을 처리한 마우스 림프구의 항원특이적 반응

생체 내에서 葛根湯 투여가 항원특이적 반응을 알아 보기 위하여 우선 림프절의 세포수를 측정, 비교하였다. 왜냐하면 항원이 조직내로 들어오면 항원제시 세포(APC)는 항원을 세포내로 받아들인 후 림프절로 이동하며, 그 곳에서 림프구에 제시하고, 항원을 인식한 림프구가 증식하여 그 수가 증가하기 때문이다.

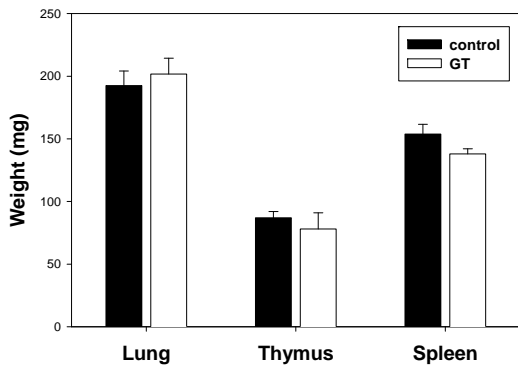


Fig. 8. In vivo toxicity of GT. Extract of GT (1 mg/day mouse) was orally administrated for 9 days and collected organs were weighed.

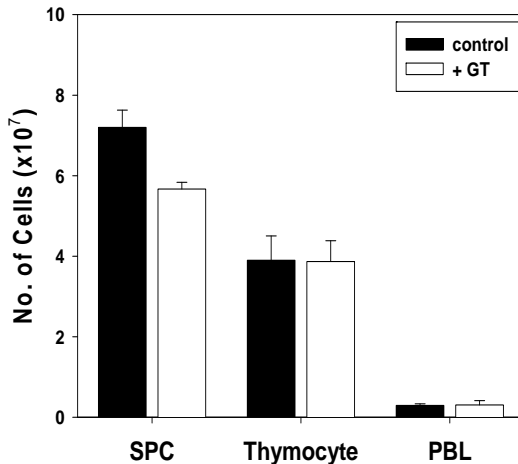


Fig. 9. In vivo immunotoxicity of GT. Extract of GT (1 mg/day mouse) was orally administrated for 9 days and then immune organs and peripheral blood(PBL) were collected and the numbers of released cells were enumerated.

PBS를 투여한 대조군 ($2.2 \pm 0.3 \times 10^7$ cells)에 비해 葛根湯을 투여한 葛根湯 투여군 ($3.6 \pm 0.4 \times 10^7$ cells)에서 림프절내 림프구의 수가 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

in vitro에서 葛根湯은 B세포에 대해 세포증식을 유도하고 활성화 T세포에 대해서는 오히려 증식을 억제하였으므로 in vivo에서 葛根湯 투여가 림프절내 B 및 T림프구의 분포 변화를 야기하는지를 확인하기 위해 림프절내의 세포의 분포를 유식세포분석기를 이용

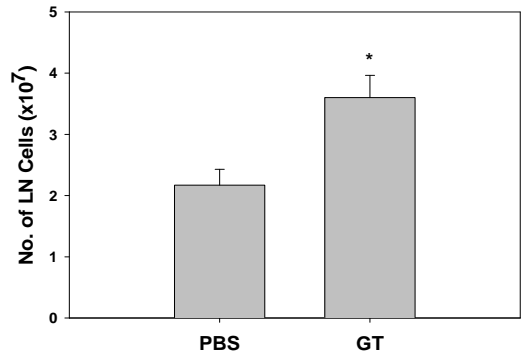


Fig. 10. Effect of GT treatment on number of draining LN(lymph node) cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN were collected and total numbers of LN cells were enumerated. Data are means \pm SE of 7 mice (*P < 0.01 vs PBS control)

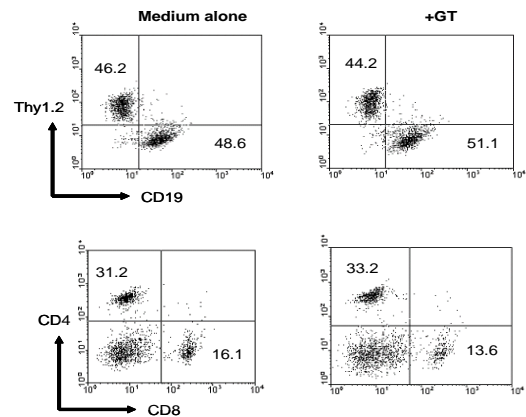


Fig. 11. Effect of GT treatment on distributional change of draining LN cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN were collected and distribution of LN subpopulations were analyzed by flow cytometry. Representative data from 7 mice are presented .

하여 T 및 B 림프구의 비율과 CD4⁺ 및 CD8⁺ T림프구의 비율을 비교하였다. 그 결과 대조군과 葛根湯 투여군 간의 세포아군들의 분포에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 11).

분리된 림프구를 여러 농도의 KLH로 자극 배양한 후 림프구의 항원 특이적 증식능을 티미딘의 흡수법으로 측정하여 비교하였다. 그 결과, 항원을 가하지 않은 경우에는 PBS를 투여한 대조군과 葛根湯을 투여한 마우스 림프구 간에 세포들의 증식이 미미하였고 차이를 보이지 않았다. 그러나 항원을 가한 경우 증식능이 항원의 농도에 의존적으로 두드러지게 증가하되 葛根湯 투여군에서 유의하게 높은 증식 반응을 보였다(Fig. 12).

葛根湯의 생체내 투여가 항원 특이적 면역반응을 증강시켜 주는지를 확인하기 위하여 T세포의 사이토카인의 생산을 비교하였다. 림프절 세포들을 *in vitro* 에서 KLH 항원으로 자극 배양하여 3일 후 배양 상층액 중에 분리된 사이토카인의 양을 ELISA 방법으로 측정하였다. IL-2의 생산은 대조군과 葛根湯 투여군이 비슷하였으며(Fig. 13), IFN- γ 의 생산은 葛根湯

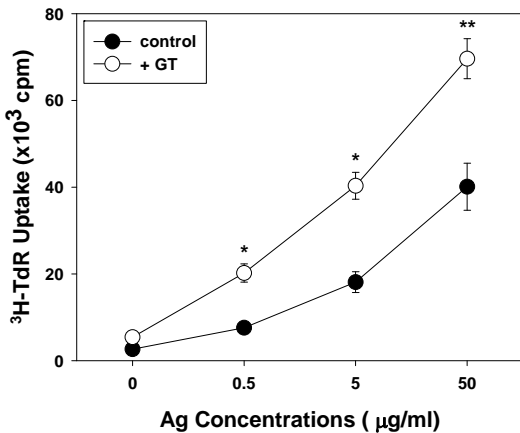


Fig. 12. Effect of GT treatment on Ag-specific proliferation of LN cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN cells were collected and then *in vitro* stimulated with KLH for 3 days. Data are means±SE of 7 mice (*, P<0.05; **, P<0.01 vs control).

투여군에서 증가하여, 특히 2일 및 3일째 생산량은 각각 평균 823.3 및 4,733.3 pg/ml로서, 대조군의 평균 442.5 및 2,067.0 pg/ml에 비해 2배 정도의 증가치를 보였다(P<0.05, Fig. 14). IL-4의 생산은 두 군 간에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 15).

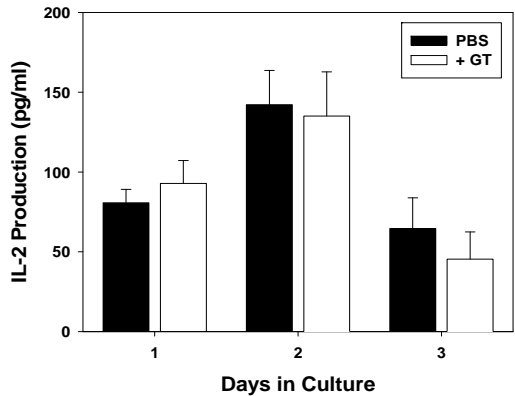


Fig. 13. Effect of GT treatment on Ag-specific IL-2 production by LN cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN cells were collected and then *in vitro* stimulated with KLH for 3 days. Data are means±SE of 7 mice.

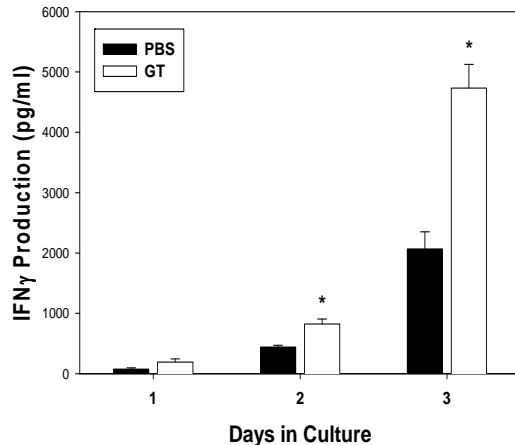


Fig. 14. Effect of GT treatment on Ag-specific IFN γ production by LN cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN cells were collected and then *in vitro* stimulated with KLH for 3 days. Data are means±SE of 7 mice. (*, P<0.05 vs control)

7. 항원에 특이적인 항체 생산의 변화

in vitro 실험에서 葛根湯이 활성화 T세포의 증식은 억제하였으나 B세포에 대해서는 증식을 유도하고 활성화 B세포의 증식을 증가시켰다(Fig. 3). 따라서 in vivo에서 葛根湯의 투여가 B세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 혈청내의 KLH 항원에 특이적인 항체의 생산을 측정, 비교하였다. IgM은 면역

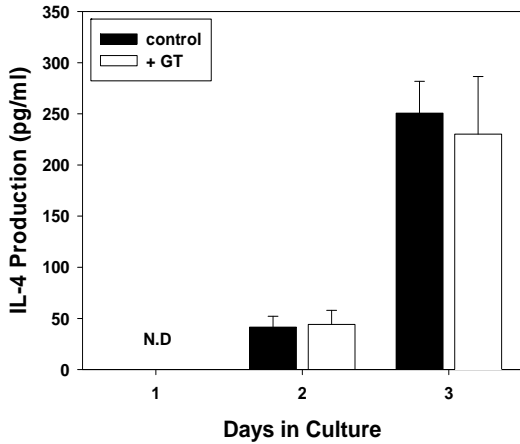


Fig. 15. Effect of GT treatment on Ag-specific IL-4 production by LN cells.

Ten days after KLH antigen was administered into footpad, popliteal LN cells were collected and then in vitro stimulated with KLH for 3 days. Data are means±SE of 7 mice.

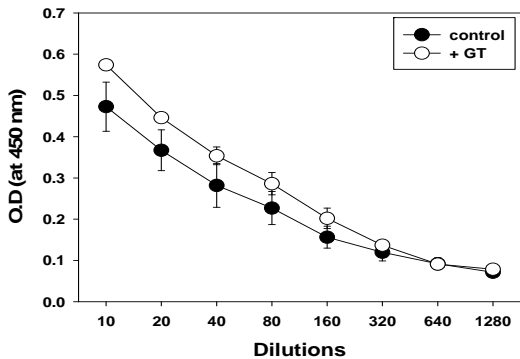


Fig. 16. Effect of GT treatment on Ag-specific IgM production.

Ten days after KLH immunization, serum was collected and then concentrations of KLH-specific IgM were determined by ELISA. Data are means±SE of 7 mice.

반응 초기에 B세포가 생산하는 항체로 IgM의 생산을 비교한 결과, 葛根湯 투여군에서 다소 높았으나 통계적 유의차는 보이지 않았다(Fig. 16).

IgG1의 생산에 있어서는 葛根湯 투여군에서 다소

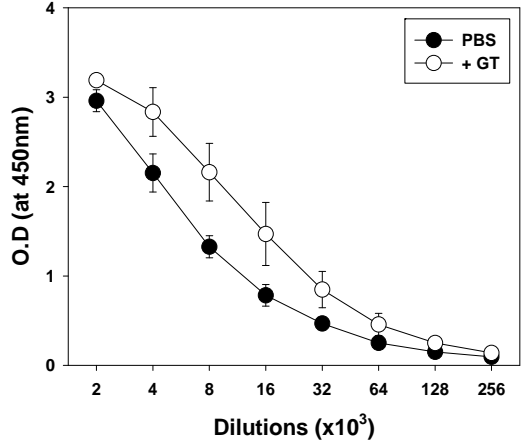


Fig. 17. Effect of GT treatment on Ag-specific IgG1 production.

Ten days after KLH immunization, serum was collected and then concentrations of KLH-specific IgG1 were determined by ELISA. Data are means±SE of 7 mice.

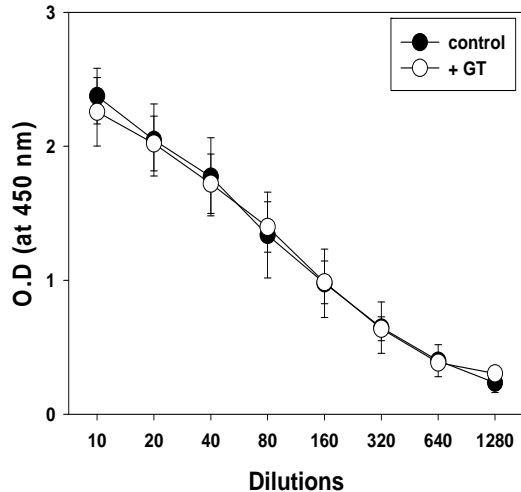


Fig. 18. Effect of GT treatment on Ag-specific IgG2a production.

Ten days after KLH immunization, serum was collected and then concentrations of KLH-specific IgG2a were determined by ELISA. Data are means±SE of 7 mice.

높았으나 통계학적 유의차는 없었으며(Fig. 17), IgG2a의 경우 대조군과 葛根湯 투여군 간에 생산의 차이를 보이지 않았다(Fig. 18).

IV. 考 察

葛根湯은 葛根 麻黃 桂枝 芍藥 大棗 甘草 生薑으로 構成된 方劑로 感冒의 대표적 方劑이고 이 方劑는 桂枝湯에 麻黃과 葛根을 配伍한 것으로 볼 수 있으며, 桂枝湯으로 免疫力을 극대화하고 麻黃, 桂枝, 生薑으로 혈관을 확장시켜 체표쪽으로 수분과 영양분을 이동시키고 체표를 열어 發汗 시키고 葛根, 芍藥, 大棗는 영양분을 공급해 줘 체내의 熱로 인해 수분이 말라서 筋肉이 萎縮된 상황을 풀어낸다¹⁾.

葛根湯의 效能을 現代醫學的인 藥理作用과 비교해 보면 다음과 같다⁷⁻¹⁹⁾.

葛根에서 daidzein의 解熱作用은 解肌退熱과, 진정 작용은 治項背強과, cyclic AMP phosphodiesterase 저해 작용은 治喘으로 비교할 수 있고 이는 혈압강화 작용, 혈소판응집억제작용, 난포호르몬양작용, 관상동맥혈관 확장작용, muscarin양작용, 그리고 macrophage 탐식능 개선작용으로 보고되고 있다.

麻黃에서 ephedrine과 pseudoephedrine의 發汗作用은 發汗解表와, 기관지평활근 이완작용은 宣肺平喘과, 이뇨작용은 利水로 비교할 수 있고 이는 체온상승 작용, 입모근 수축 작용, 중추신경 흥분 작용, 심박출량 증가 작용, 혈압상승작용, 항알레르기작용, 항염증 작용, 혈소판응집 억제작용으로 보고되고 있다.

桂枝에서 cinnamic aldehyde의 해열 및 피부혈관 확장 작용은 發汗解表와, 溫通經脈으로 비교되어지고 이는 혈소판응집 억제작용, 항염작용, hexobarbital 수면연장작용, 스트레스성 케양 억제 작용, 살균작용, 담즙분비 항진작용등이 보고되고 있다.

芍藥에서 paeoniflorin의 혈관 평활근경련 억제작용과 항침해수용작용은 緩急止痛과 비교할 수 있고

이는 혈압강화작용, 말초혈관 확장작용 혈청 BUN 저하 작용, 항염작용, 항알레르기작용, macrophage 탐식능 항진 작용, 농양억제작용, 진정작용, 소화성궤양 억제 작용, 자궁운동 항진운동등이 보고되고 있다.

甘草에서의 Glycyrrhetic acid와 Glycyrrhizin 항염 작용, 해열작용은 청열해독과 비교할 수 있고 이는 Macrophage 탐식능을 활성화하고 免疫기억세포의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

免疫이란 외부로부터 침입하는 미생물, 同種의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물등과 특이하게 반응하여 항체를 만들며 이것을 배제하여 그 개체의 恒常性을 유지하는 현상이다. 더 나아가 免疫이란 생체가 自己와 非自己를 식별하는 기구이며 免疫反應이란 非自己를 항원으로 인식하고 특이하게 항체를 생산하여 이에 대처하여 처리하는 연쇄적인 반응이라 하겠다. 이때 액성항체 및 세포성 면역이 작용하는데, 그 기초에는 T, B세포계의 상호 작용이 있다²¹⁾. 非自己의 인식은 생물학적으로 오래 기억되어 되풀이되는 非自己의 침입을 효과적으로 막는 것을 말한다.

現代醫學의 免疫의 개념은 自己와 非自己로 본다면 한의학적으로 볼 때는 正氣와 邪氣로 비교할 수 있다. 正氣는 체내의 모든 抗病物質을 말하며 臟腑·經絡·榮衛氣血의 정상적인 생리기능을 포괄한다. 邪氣는 모든 病因素의 總稱이며 六淫之邪와 體內의 陰陽(臟腑經絡 榮衛氣血을 포괄함) 失調에 의한 病理變化(虛症) 病理產物(瘀血, 痰飲)등의 病邪가 모두 邪氣에 속한다고 볼 수 있다. 이진 正氣와 邪氣가 서로 싸워 나타나는 현상을 免疫反應이라 말할 수 있고 이에대한 韓醫學的 原理는 正邪鬪爭이며 正邪相爭·正勝邪却(病癒) 및 正不勝邪(病發)의 3가지 유형으로 표현되며 治法에 있어서는 扶正祛邪라 말할 수 있다. 正虛者는 扶正함을 爲主로 하고 邪實은 祛邪를 爲主로 하고, 正虛邪實者는 扶正祛邪를 같이 행해야 하다. 다시말해 한의학에서의 扶正祛邪란 治法은 免疫反應에 작용하여 면역성 질병을 치료하는 중요한 법칙이며, 扶正은 免疫을 촉진시키고, 祛邪는 免疫反應을 억제시킨다고 말할

수 있다²²⁻²⁸⁾.

이러한 관점에서 葛根湯이 면역조절 작용에 영향을 준다고 사료되어 *in vitro*와 *in vivo*에서 실험을 하였다.

면역계는 항원에 감염되면 항원에 특이적인 세포들이 증식하여 면역반응이 일어난다. 이에 따라 葛根湯의 첨가가 비장세포의 증식을 유도하는지를 확인하였던 바, 100 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 葛根湯을 첨가한 경우에 비장세포의 증식을 유의하게 유도하였다(Fig. 1). 또한 항원 특이적 림프구 증식 반응시 葛根湯 노출이 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 항 CD3 항체를 이용하여 마우스 비장세포를 비특이적으로 자극하면서 葛根湯의 양을 달리하여 첨가한 후 세포의 증식능에 미치는 영향을 조사한 바, 葛根湯의 농도가 100 μg 까지는 葛根湯의 농도에 의존적으로 유의하게 증식하였지만, 고농도인 1,000 μg 에선 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 실험결과는 비장세포의 항원에 대한 반응이 葛根湯에 의해 증강될 수 있음을 시사하고 있다. 비장은 항원 특이적 림프구들이 항원을 인식하는 2차 면역기관으로서 성숙된 T세포나 B세포가 존재한다²¹⁾. 전 실험의 결과에 따라 비장세포의 증식이 T 혹은 B림프구, 또는 모든 림프구의 증식 때문인지를 확인하기 위하여, T, B세포를 분리하여 각각의 mitogen 존재 하에서 葛根湯의 양을 달리하여 첨가한 후 증식을 비교하였다. T세포에 葛根湯만을 첨가하는 경우에는 증식에 영향을 미치지 않았지만, 항CD3에 의한 자극 배양시 葛根湯 농도에 의존적으로 T세포의 증식이 두드러지게 억제되었다(Fig. 2). 반면에 B세포의 경우에는 葛根湯에 의하여 증식이 유도되었으며, 葛根湯의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 증식이 가장 높았고, 고농도에서 증식이 오히려 억제되는 것을 확인하였다. LPS 자극배양시에도 葛根湯 100 μg 의 농도에서 증식이 높았으며, 고농도에서 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

활성화된 T세포는 effector T세포로 분화되면서 분열, 증식하게 되는데, IL-2는 이러한 T세포의 성장 및

분화인자로 알려져 있으며²³⁾, B세포, 거식 세포, 자연 살해 세포의 성장 및 분화인자로도 알려져 있다. Fig. 2에서 T세포의 증식이 억제되는 것이 IL-2 생산의 영향인지를 확인하였지만, 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 항원에 의해 활성화된 T세포는 사이토카인을 생산하여 항원에 좀 더 특이적이며, 강력한 면역반응을 유도한다. 이를 좀 더 정확히 확인하고자 T세포 유래의 사이토카인 생산을 비교하였다. 순수 분리한 T세포를 항원제시세포 존재하에 항CD3로 자극을 하면서 葛根湯 농도를 1-1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양하게 처리하여 IFN- γ , IL-4, IL-2 사이토카인의 생산을 조사하였다. IFN- γ 생산은 葛根湯의 농도가 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 사이토카인 생산이 두드러지게 증가한 반면, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 葛根湯의 농도에서는 현저히 억제되는 경향을 보였으며(Fig. 5), 제2형 조력 T림프구가 생산하는 IL-4의 생산을 葛根湯의 농도별로 조사한 바, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 葛根湯 농도에서 증가하는 것으로 보였으며, 고농도인 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 두드러진 억제효과를 보였다(Fig. 6). 이러한 결과는 葛根湯의 농도가 낮은 경우에는 T세포의 활성을 증진시키나 고농도의 葛根湯에 노출되는 경우에는 오히려 T세포에 상당한 세포독성을 나타내는 것으로 볼 수 있다.

세포독성 물질은 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유발하여 항원에 반응을 하지 못하게 한다. 앞선 실험들에서, 葛根湯이 고농도에서 T세포의 증식이나, 사이토카인 생산이 두드러지게 억제되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과가 T세포에 미치는 葛根湯의 세포독성 효과에 의한 것인지를 확인하기 위하여, T세포의 apoptosis를 annexin-V 분석방법을 이용하였다. T세포를 항CD3로 자극한 후 葛根湯의 농도별로 첨가하여 배양 3일 후 세포를 수거하고 유식세포 분석(FACS)을 이용하여 측정한 바, 葛根湯의 농도가 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에선 대조군과 비교하여 커다란 차이를 보이지 않았지만 (실험 결과는 제시하지 않음), 葛根湯의 농도가 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 2배 정도의 apoptosis가 유도되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

이러한 결과로서 고농도의 葛根湯은 T세포에 독성을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

상기와 같은 실험 결과를 토대로, 葛根湯의 임상 응용 가능성을 파악하기 위하여 마우스 모델을 이용하여 in vivo에서 葛根湯의 면역조절 능력을 조사하였다. 마우스를 KLH 항원으로 면역 후 1mg의 葛根湯을 경구로 강제 투여하였다. 우선 葛根湯의 독성 여부를 확인하기 위해서 마우스 폐, 흉선 그리고 비장의 무게를 비교하였다. PBS를 처리한 대조군과 葛根湯을 투여한 실험군 간의 마우스 폐와 흉선, 비장의 무게는 차이를 보이지 않았다(Fig. 8). 또한, 말초 혈액내의 백혈구 수를 비교하였지만, 대조군과 비교하여 葛根湯을 투여한 실험군과 두드러진 차이를 보이지 않았으며(Fig. 9), 흉선내의 세포수를 비교하기 위해서 마우스의 흉선을 유리하고 trypan blue 염색방법을 이용하여 세포수를 비교 하였지만, 대조군과 葛根湯을 투여한 실험군 간에 차이를 보이지 않았다 (Fig. 9). 이러한 결과는 본 실험에서 매일 1mg의 葛根湯 경구 투여로는 마우스에 대한 독성이 없음을 시사하고 있다.

항원 특이적 림프구는 조직으로 침입한 항원을 림프절에서 인식한 후 분열, 증식하여 반응한다. 특이적 항원에 대한 수용체를 가지는 세포의 증식은 면역반응의 한 과정으로 葛根湯을 투여한 마우스와 대조군 마우스에서 림프구 수를 비교하였다. PBS를 투여한 대조군에 비해 葛根湯을 투여한 실험군 마우스의 림프절내 림프구의 수가 증가하였다(Fig. 10). 이러한 변화가 어느 특정 세포의 증식에 의한 것인지를 확인하고자 림프절내의 세포의 비율을 형광 염색방법을 이용하여 T, B세포의 비율과 T세포의 두 아군인 CD4+, CD8+ T세포의 비율을 조사하였지만, 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 11)²⁴⁾. 이러한 결과로 보아 葛根湯 투여가 특이적 항원에 대한 수용체를 가지는 세포의 증식을 증가시켜 주는 것으로 생각된다. 한편, in vitro에서는 葛根湯에 의해 B세포의 증식이 크게 증가하였으나 in vivo에서는 뚜렷히 나타나지 않았으

며, 이 점에서는 in vitro에서의 실험 결과가 in vivo에서의 실험 결과와 일치하지 않았다. 이러한 결과는 in vitro에서의 실험 결과만으로 in vivo에서의 효능을 예측하기는 어렵다는 사실을 시사하는 것이라고 생각된다.

葛根湯 투여에 의한 마우스 T세포 반응 증가를 더 자세히 이해하고자 티미딘 흡수법을 이용하여 세포의 증식과 사이토카인 생산을 조사하였다. 葛根湯을 투여한 마우스의 림프절 세포의 증식은 항원의 농도에 의존적으로 크게 증가하였다(Fig. 12). 또한 T세포 유래의 사이토카인 생산을 비교한 바, IL-2와 IL-4의 생산은 대조군과 두드러진 차이를 보이지 않았다(Fig. 13, 15). 하지만, IFN- γ 의 생산이 2-3일째 葛根湯을 투여한 마우스에서 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 14). 이러한 결과는 葛根湯 투여가 마우스의 면역반응을 대조군에 비해 증강시켰음을 보여주었다.

항원의 유입시 B세포는 항원의 독성이나 감염력을 낮추기 위해 항원의 특이적인 항체를 생산한다²⁵⁾. 따라서 葛根湯을 투여한 마우스의 혈청내 KLH항원에 특이적인 항체의 양을 조사하였다. IgM은 면역반응 초기에 B세포가 생산하는 항체로 IgM의 생산을 비교한 결과, IgM의 생산이 葛根湯 투여군에서 다소 높은 듯이 보였지만, 통계적 유의차를 보이지 않았다(Fig. 16). IL-4에 의해 유도되는 IgG1의 생산을 비교하였다^{25,27)}. 葛根湯 투여군에서 IgG1의 생산이 증가하는 것처럼 보였으나 개체간의 차이가 심하여 통계적 유의차를 보이지 않았다(Fig. 17). IgG2a는 IFN- γ 에 의해 유도되는^{28,29)} 항체로 IgG2a의 생산을 비교하였다. 하지만, 대조군과 葛根湯 투여군간의 IgG2a 생산의 차이를 보이지 않았다(Fig. 18). 이러한 결과는 시험관내 葛根湯이 저농도에선 T세포의 면역반응을 올리며, 동물모델을 이용한 실험에서도 오히려 마우스의 면역력을 증가시켜 주었다. 하지만, 고농도의 葛根湯은 오히려 T세포의 기능을 저하시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 것은 葛根湯이 농도에 의존적으로 T세포의 면역반응을 조절 할 수 있음을 제시한다. 본

연구에서 특히 주목할 점은 葛根湯의 T세포 활성화증이 단순한 활성화증가가 아니라 특히 세포성 면역반응을 증강시킨다는 점이었다. 사이토카인을 생산하여 다른 면역세포의 기능을 조절하는 조력 T세포는 IFN- γ 를 생산하는 1형 조력 T세포(type 1 helper T; Th1) 또는 IL-4 및 IL-5를 주로 생산하는 2형 조력 T세포(Th2)로 분화되어 각각 세포매개성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하게 된다³⁰⁻³⁷. 즉, 본 연구결과에 따르면 葛根湯 투여가 IFN- γ 생산을 증가시킴으로써 세포성 면역 반응은 증강시키나 IL-4의 생산에는 그 영향이 유의하지 않아 체액성 면역기능에는 영향을 미치지 않음을 보여주었다.

IFN- γ 는 type II interferon이라고도 부르며, CD4+ T세포나 CD8+ T세포에 의해 만들어지는데, 면역반응을 조절하기 때문에 immune interferon이라고도 부른다. IFN- γ 는 CD4+ T세포를 제1형 조력세포(Th1)로 유도하며, 바이러스 증식의 억제와 같이 세포성 면역반응을 활성화하는 것으로 알려져 있다.

반면에 IL-4는 체액성 면역반응의 조절에 관여하는 사이토카인으로 제2형 조력 T(Th2) 세포나 비만세포, 호산구에 의해 생산되며³⁰, 활성화된 CD4+ T세포가 관여하는 Th2반응 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹. 따라서 Fig. 15에 제시된 바와 같이 葛根湯 투여가 IL-4의 생산에는 유의한 영향을 미치지 않음은 체액성 면역반응에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합할 때, 葛根湯의 체내투여는 체액성 면역반응 보다는 세포성 면역기능을 유도할 것으로 판단되며, 따라서 葛根湯의 복용은 감염증, 특히 바이러스 질환과 같은 세포내 감염증의 예방에 유효할 것으로 기대된다.

V. 結 論

감기, 열, 고혈압, 비염 등에 효능이 있다고 알려진 葛根湯의 면역조절 기능을 확인하고자, 葛根湯이 시

험관내에서 B세포와 T세포의 증식과 IL-2, IFN γ 및 IL-4의 생산에 미치는 영향을 실험하고 경구투여한 葛根湯이 생체내에서 T 및 B 림프구의 항원특이적 반응에 미치는 영향을 확인하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. in vitro에서 葛根湯의 면역세포 활성의 조절

- 가. 葛根湯 추출물은 B림프구의 증식을 증가시켰다.
- 나. 葛根湯 추출물은 T세포의 증식을 억제하나, IFN- γ 및 IL-4의 생산은 증가시켰다.
- 다. 고농도에서 葛根湯은 T세포의 apoptosis를 현저히 촉진시켰다.

2. in vivo에서 경구 투여한 葛根湯의 면역 기능의 조절

- 가. 葛根湯의 면역독성은 관찰되지 않았다.
- 나. 葛根湯이 항원특이적 증식 반응을 증가시켰으나 림프절에서 T 및 B세포의 비율과 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포의 비율에는 영향을 주지 않았다.
- 다. 葛根湯은 IFN- γ 생산을 증가시켰으나, IL-4 생산과 항원특이적 항체 (IgM, IgG1 및 IgG2a)의 분비에는 영향을 미치지 않았다.

3. 葛根湯의 경구 투여시 세포성 면역반응을 증가시키는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

References

1. Yun YG, East Medical Traditional Medical Formulae and prescription Commentary.

- Seoul:Euisseongdang, 1998:145.
2. Lee SI, Tian Z, prescription Commentary, Seoul:Seongbosa, 1987:361.
 3. Heo J. Dongeuibogam, Seoul:Hanmi Medicine, 2001:610.
 4. Chae IS, Treatise on Febrile Interpretation Translation, Seoul:Gomunsa, 1991:328-9.
 5. Pak HJ, Treatise on Febrile Coming to say, Seoul:Pharmaceutical News Agency, 1991:48.
 6. No YB, Modern Commentary and Clinical Application of Galgeun-tang, Seoul:Uirim, 2004;15(308):22.
 7. Cho CG, Oriental medical study on immunity, Oriental medicine, 1986;15(1, 12, 33):19-20.
 8. Lee JH, Pathogen Microbiology, Seoul:Sumunsa, 1973:133.
 9. Jeong YH, Experimental Study on immunomodulatory effect of Gamiboa-tang, Journal of Korean Oriental Pediatrics, 2000;14(2):76-8.
 10. Hwang UO, Literature Review on immunity, Oriental Medical Society, 1989;10(1):219, 222-3.
 11. Park YS, Pharmacology of Herbal Commentary, Seoul:Academic books, 2002:199-201.
 12. Wang YS, Subcommittee to study and application TCM compound, TCM Scientific & Technical Publishers, 1993:349-50.
 13. Cho GH, East-West of the Herbal prescription medical analysis methodology, Seoul:Goryeo medicine, 1999:84.
 14. Sa MJ, Modern Traditional Chinese Medicine Library, Beijing:Academy Press, 1997:71-3.
 15. Park JH, Jung JH, Kim JS, Park HJ, Studies on Quality Control of Crude Drugs Preparations, Chemical Analysis of Galgeun-tang, Pharmacognosy, 1997;28(1):44-6.
 16. GuBo DD, Gye CI, Kim IH, Cho PH, The ROK pharmaceutically, Seoul:Dongnam Publishers, 1985:54-5, 64, 67.
 17. GukJi JG, Sam DB, SeokJeong MM, GeumChon JG, Lee YT, The latest Immunology, Seoul:jibmundang, 1990:33.
 18. Jin JI, Herbal Medicine Dictionary, Seoul:Songak, 1990:16-7, 20-1, 68-9, 76-7, 138-9, 254-5, 258-9.
 19. Shin MG, Complete translation of traditional Chinese medicine Dictionary, Seoul:Jeongdam, 1999:34-5, 68-70, 213, 990, 1207-8, 1679, 2195.
 20. Heur HW, Illustrated common Chinese medicine Prescription, Beijing:Hwaann publishing company, 1980:52.
 21. Kim SJ, Immunology, Seoul:Goryeo medicine, 1994:2-5.
 22. Picker LJ, Butcher EC, Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing, Annu Rev Immunol, 1993;10:561-91.
 23. Jain J, Loh C, Rao A, Transcriptional regulation of the IL-2 gene, Curr Opin Immunol, 1995;7:333-42.
 24. Wyllie AH, Kerr JR, Currie AR, Cell death: the significance of apoptosis, Int Rev Cytol, 1980;68:251-306.
 25. Jumper MD, Splawski JB, Lipsky PE, Meek K, Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cells, J Immunol, 1994;152:438-45.
 26. Herrod HG, IgG subclass deficiency, Allergy Proc, 1992;13:299-302.
 27. Ward ES, Ghetie V, The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy.

- Thera, Immunol, 1995;2:77-94.
28. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 2003;3:23-5.
 29. Schultz U, Chisari FV. Recombinant Duck Interferon Gamma Inhibits Duck Hepatitis B Virus Replication in Primary Hepatocytes. *J Virol*, 1999;73:3162-8.
 30. Nelms K, Keegan D, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, 1999;17:701-38.
 31. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*, 1990;145:3796-806.
 32. O'Garra A, N AN. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*, 2000;10:542-50.
 33. Ezekowitz RA, Hoffman J. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998;10:9-53.
 34. Lihenan SA, Martinez-Pormares L, Gordon S. Macrophage letins in host defense. *Microbes Infect*, 2000;2:279-88.
 35. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 1999;17:189-220.
 36. Claude C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol*, 1999;163:4647-50.
 37. Von Boehmer H, Kisielow P, Kishi H, Scott B, Borgulya P, The HS. The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature

T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen. *Immunol Rev*, 1989;109:143-51.