

우황이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향

손은화, 박재현, 김경란, 김병오, 이동권, 표석능*

성균관대학교 약학대학

Effects of the Administration of Bezoar Bovis on Immune Responses of Mice

Eun-Wha Son, Jae-Hyun Park, Kyung-Ran Kim, Byung-O Kim,
Dong-Kwon Rhee, and Suhkneung Pyo*

Sung Kyun Kwan University, College of Pharmacy, Suwon, Kyunggi-do, 440-746, Korea

Abstract—The effects of Bezoar Bovis on immune responses of ICR mice were studied. In the present study, the Jerne hemolytic plaque assay (PFC) was used to evaluate the humoral immune response to sheep red blood cells, and macrophage regulatory function was measured by quantitating the production of molecules secreted by macrophages. Bezoar Bovis was given in single daily p.o doses for short term (1, 2 days) or long term (7, 14 days). PFC response for taken 3 days after short term exposure to Bezoar Bovis was increased. The production of nitric oxide in macrophages was also stimulated. In contrast, long term exposure to Bezoar Bovis resulted in inhibitory effect of Bezoar Bovis on nitric oxide, TNF- α and IL-6 production in macrophages. These findings suggest that treatment with Bezoar Bovis may result in differential immunological effect depending on treatment schedule.

Key words—Bezoar Bovis; macrophage, PFC, NO, TNF.

우황청심원의 주성분인 우황은 오래전부터 중풍성 질환, 뇌질환, 심장성질환, 신경성질환등에 청열해독제(淸熱解毒劑)로써 널리 이용되어져왔다.^{1,2)} 현재에도 우황의 우수한 효과가 다양하게 이용되고 있으나, 아직까지 우황의 면역학적 활성에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 우황청심원은 임상적으로 정서불안, 자율신경실소증, 뇌졸중, 고혈압 등에 복용하고 있으며, 다양한 이용도를 고려해 볼 때 면역학적인 효과도 기대되는 바가 크다.

면역 반응은 크게 두가지 기작에 의해 이루어 지는데 하나는 체액성면역(humoral immune res-

ponse)이며 다른 하나는 세포성면역(cell-mediated immune response)이다. 이러한 면역반응은 특정항원에 대하여 특이적으로 일어난다. 이런 항원특이성 면역반응외에도 체내에는 어떤 항원에 대해 노출된 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격대상세포를 파괴하는 일종의 자연 면역반응이 있다.³⁾ 이러한 면역반응에 관계하는 세포중 하나가 대식세포이다. 대식세포는 외부로부터의 자극에 의해서 활성화되면 탐식능력과 종양세포 파괴 기능이 항진되며,⁴⁾ 뿐만 아니라 세포의 크기가 증가되고 여러 가지의 세포 분비물이 증가하게 된다. Interferon(IFN), lipopolysaccharide(LPS) 등의 면역조절물질에 의해 대식세포는 활성화되어 암세포

*교신저자 : Fax 0331-292-8800

에 독성이 있는 여러 가지 물질들을 분비하게 되며, 활성화된 대식세포에 의해 분비된 TNF- α , IL-1, nitric oxide(NO) 등이 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로 제시되어져 왔다.^{5,6)} 이 밖에도 대식세포는 자체에서 생산되는 여러 가지 물질을 통해서 뿐만 아니라 외부로부터 들어오는 이물질을 직접 내부로 흡수하여 죽이거나 분해하여 제거하는 기능(phagocytosis)을 가짐으로써 자연면역반응에 매우 중요한 기능을 수행한다. 또한 외부로부터 흡수한 항원을 적절히 변형시켜 세포 표면으로 발현(antigen presenting process)하여 T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 함으로써 그 항원에 대한 면역반응을 유도(T-helper, T-cytolytic cell response)하고 궁극적으로는 B 임파구로 하여금 항체를 만들도록 한다.⁷⁾ 이와 같이 활성화된 대식세포에서 생산되는 여러 가지 물질은 간접적으로 T 임파구와 B 임파구를 포함한 다른 면역 세포들을 자극하며 더욱 복잡한 면역반응을 유발시키기도 한다.

본 연구는 다양한 투여간격을 시도하여 우황이 대식세포와 항체 생성에 미치는 영향을 검토함으로써, 최적의 투여간격으로 우황을 임상적으로 활용하는데 중요한 보충자료가 되고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 재료 - 본 연구에서 사용된 실험 동물은 5~6주령의 ICR계 흰쥐로 국립보건안전원에서 분양받아 실험에 사용하였다. 흰쥐(20~25 g)를 대조군과 한약간재상에서 구입한 우황을 경구 주사한 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 3 마리씩 사용하였다. 대조군에는 정수(filtered water)를, 투여군에는 검액 10 mg/kg/day를 경구 주사하였고, 투여일은 단기일(1일, 2일)과 장기일(7일, 14일)로 나누어 매일 1회 연속 투여하였다. 또한 우황을 투여하고 며칠이 지난 후에는 어떠한 효과가 나타나는지 알아보기 위하여 단기(1일, 2일) 투여하고 3일 후에, 그리고 장기(14일) 투여하고 7일 후에 실험하였다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 미국의 Sigma사(St Louis, MO)에서 구입하였다.

흰쥐 비장 세포의 분리 - 5~6주령 흰쥐를 ether로 치사시켜 무균 상태에서 비장을 꺼내어 3 ml RPMI 1640(Gibco co., U.S.A.) 배지가 있는 60

mm petri dish 에 넣었다. 5 ml 주사기를 통과시켜 비장 세포를 부유시킨 후 잘 현탁하여 원심분리관에 옮겨서 100 g에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 버린 후 수회 세척하고 분리한 흰쥐의 비장 세포를 원하는 농도로 희석시켰다.

용혈반 형성 세포(plaque forming cell)측정 - B 임파구의 분화능력을 검색하기 위해 면양적혈구(sheep red blood cell, SRBC)에 대한 항체 생성능력을 Cunningham의 방법⁸⁾을 개량하여 측정하였다. SRBC(5×10^8 cells/mouse, sheep blood cells, Korea media, Korea)를 복강내에 주사하여 면역화시켰다. 면역화시킨 흰쥐를 4일 후에 ether로 치사시켜 비장을 적출하고 위에서 설명한 방법대로 비장세포를 준비하였다. 현탁된 SRBC를 FBS를 함유하지 않은 RPMI 1640 용액으로 3회 세척하고(100 g, 10분) 침전상태로 만들었다. 0.5% agar와 0.5 mg/ml DEAE-dextran(diethylaminoethyl-dextrane)을 FBS를 함유하지 않은 RPMI 1640 용액에 완전히 녹인 후, agar가 굳지 않도록 47°C를 유지하였다. 10 ml roundbottom tube에 400 μ l의 agar용액과 25 μ l의 SRBC 및 50 μ l의 비장세포 부유액을 가하고 이 용액에 3배 희석한 guinea pig complement(Gibco Co., U.S.A.)를 25 μ l 가하였다. 이 혼합액 200 μ l를 petri dish에 떨어뜨려 즉시 slide glass를 덮은 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 형성된 용혈반 형성 세포수를 측정하였다.

흰쥐의 복강내 대식세포 분리 - 대식세포의 분리를 위하여 Klimetzek 등이 사용한 방법⁹⁾을 이용하였으며 간단히 서술하면 다음과 같다. RPMI 1640 배양액으로 생쥐 복강을 두 번 세척한 후 세척용액을 원심분리하여 얻은 복강세포를 배양액으로 두 번 세척하고 10%의 fetal bovine serum과 2% penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI배양액으로 1×10^6 cells/ml 농도로 만들었다. 세포를 teflon coated petri dish에 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후 미부착 세포를 제거했다. 새로운 배양액을 가하고 10분간 40°C에서 배양한 다음 petri dish 표면을 차가운 phosphate buffer(PBS)용액으로 세척하여 대식세포를 얻었다.

TNF- α 생성 측정 - 대식세포를 페럼균 협막 다당류와 함께 다양한 시간 동안 배양한 후 배양 상등액

중의 TNF- α 생성측정을 TNF- α 에 민감한 L929세포를 이용하여 실시하였다.¹⁰⁾ 100 μ l L929(1×10^4 cells/well) 세포를 96 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 시료와함께 50 μ l RPMI 1640 배양액과 50 μ l actinomycin D(2 μ g/ml)를 가한후 18시간 동안 더 배양하고 MTT(5 mg/ml) 25 μ l를 가하였다. 4시간 동안 배양한 후 150 μ l DMSO를 가하고 생성된 formazan이 녹을 때까지 혼합한 뒤 Molecular device microplate reader (Menlo, CA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 측정-대식세포를 페렴균 협막 다당류와 함께 다양한 시간 동안 배양한 후 배양 상등액중의 NO 생성 농도를 Ding 등의 방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 100 μ l의 배양 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴후 각각의 well에 100 μ l Griess 시약을 가하여 Molecular device microplate reader (Menlo, CA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NaNO₂를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 종류수에 녹인 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride와 5% H₃PO₄ 용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

IL-6의 생성 측정-우황을 투여한 흰쥐에서 대식세포를 분리하여 그 배양 상등액에서 IL-6 양을 Vunakis와 Langone의 방법¹²⁾을 개량한 ELISA 방법으로 측정하였다. Rat에서 만들어진 IL-6에 대한 단일클론성항체(IgG_{2a})(Genzyme, U.S.A.)를 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 적당히 희석하여 96 well plate에 12시간 동안 coating하였다. PBS-Tween 20으로 수세 후 대식세포의 배양 상등액을 2배씩 희석하여 가하고 37°C에서 2시간동안 결합하도록 하였다. PBS-Tween 20으로 수세 후 rat에서 만들어진 biotin을 결합하고 있는 IL-6에 대한 단일클론성항체(IgG₁)를 가하여 결합하였다. 다시 PBS-Tween 20으로 수세 후 horseradish peroxidase를 결합하고 있는 streptavidin을 가하여 biotin과 결합하도록 하였다. PBS-Tween 20으로 다시 수세하고 horseradish peroxidase의 기질인 TMB(KPL, Gaithersburg, MD)를 가하여 반응하도록 하였다. 기질과 동량의 0.18

M 황산 용액을 가하여 반응을 정지한 후 Molecular device microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리-실험결과 평균치의 실험오차를 계산하였고, 대조군과의 차이를 student-t test를 사용하여 검정하였으며, p값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

항체 생성 세포수에 미치는 효과-우황이 항체 생성세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 면역적혈구로 면역화시킨 후 면역적혈구에 대한 항체 생성 세포 수를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 단기 1일, 2일 투여에서는 대조군에 비하여 별다른 효과가 없었으나, 장기 7일, 14일간의 연용투여에서는 대조군에 비하여 항체 생성 세포 수가 현저하게 감소하였다. 투여하고 며칠 후에 실험한 항체 생성 세포수의 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1일 투여하고 3일 후에 실험한 군에서 대조군에 비해 PFC가 크게 증가하였으며, 2일 투여하고 3일 후에 실험한 군에서 통계학적 유의성은 없으나 약간

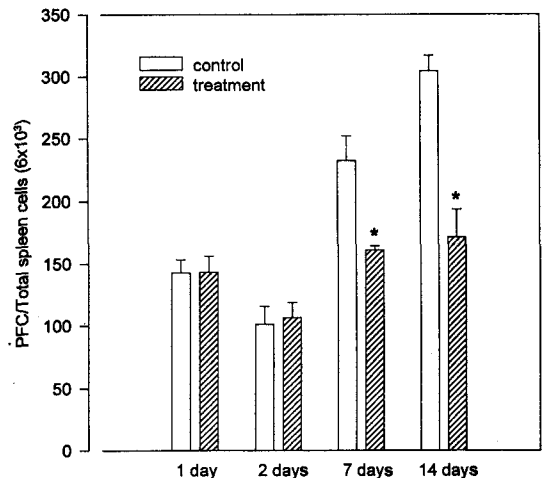


Fig. 1. Effects of Bezoar Bovis on PFC response after exposure. ICR mice were administered p.o for days as indicated with daily dosages of 10 ml/kg of Bezoar Bovis. Splenocytes were obtained from mice on day 1, day 2, day 7 or day 14. 0.5 ml of 5% SRBC was injected ip to all mice 4 day before the PFC assay was performed. Significant difference from the control, *p<0.01.

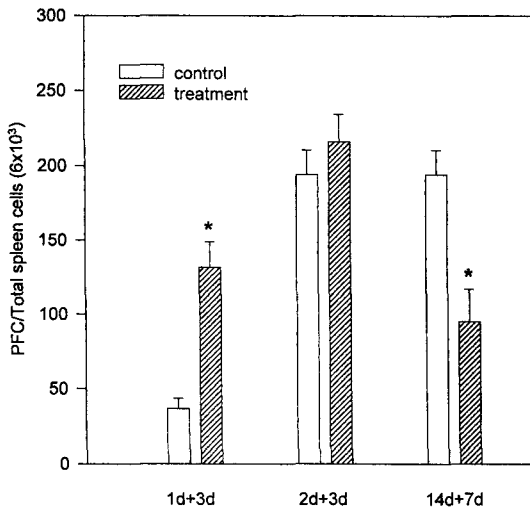


Fig. 2. Effects of Bezoar Bovis on PFC response for taken 3 or 7 days after drug exposure. ICR mice were administered p.o for days with daily dosages of 10 mg/kg of Bezoar Bovis. Splenocytes were obtained from mice on 3 days (1 day or 2 days-treated group) or 7 days (14 days-treated group) later. 0.5 ml of 5% SRBC was injected ip to all mice 4 day before the PFC assay was performed. Significant difference from the control. *P<0.01.

증가하였다. 14일간 투여하고 7일 후에 실험한 군에서는 오히려 항체 생성 세포수가 현저하게 감소하였다. 따라서 우황은 단기간 투여를 한다음 일정기간이 지난후에는 항체세포수를 증가시키는 것으로 사료된다.

Nitric oxide 생성에 미치는 영향 - 우황이 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 우황을 투여한 흰쥐로부터 대식세포를 분리 배양하여

그 상층액으로부터 세포 독성물질로 알려진 nitric oxide를 측정하였다. 그 결과 단기투여 1일과 2일에서는 NO 분비량의 변화는 없으나, 7일, 14일간의 연용투여에서는 투여군의 NO 분비량이 감소되었다. 이러한 감소 효과는 7일 투여실험에서 가장 크게 나타났다(Table I). 한편 2일 투여하고 3일 후에 실험한 군에서 NO 분비량이 크게 증가하였고, 1일 투여하고 3일 후에 실험한 군과 14일간 투여하고 7일 후에 실험한 군에서는 NO 분비량에 변화가 없었다(Table II).

Table II. Effect of Bezoar Bovis on the production of NO₂⁻ in peritoneal macrophages obtained from mice on 3 or 7 days later

Treatment	NO ₂ ⁻ production (μM)		
	1+3 days	2+3 days	14+7 days
None	5.30±0.17	5.39±0.17	5.12±0.26
B.B ^a	4.87±0.06	7.47±0.14*	4.57±0.26
None+LPS			
+IFN-γ	11.13±0.20	11.13±0.20	9.62±0.46
B.B ^a +LPS			
+IFN-γ	20.13±0.14 [†]	25.88±0.21 [†]	11.87±0.19

ICR mice were administered p.o for 1, 2 or 14 days with daily dosages of 10 mg/kg of Bezoar Bovis. Peritoneal macrophages were harvested 3 days or 7 days later after drug exposure. After macrophages were incubated with medium alone or were treated with IFN-γ (10 U/ml) plus LPS (1 μg/ml) for 20 hours, the supernatants were collected for NO₂⁻ assay. The results are mean±S.E. for quintuplicates from a representative experiment. *Significantly different from control (no administration); p<0.05. [†]Significantly different from group administered with Bezoar Bovis; p<0.001. B.B^a: Bezoar Bovis.

Table I. Effect of Bezoar Bovis on the production of NO₂⁻

Treatment	NO ₂ ⁻ production (μM)			
	1 day	2 day	7 day	14 day
None	4.44±0.25	5.75±0.33	4.03±0.18	5.62±0.09
B.B ^a	4.50±0.38	6.00±0.47	3.41±0.02*	5.30±0.23*
None+LPS+IFN-γ	9.16±0.29	10.58±0.29	5.95±0.08	7.70±0.04
B.B+LPS+IFN-γ	10.16±0.32 [†]	12.66±0.28 [†]	8.48±0.23 [†]	7.82±0.09

ICR mice were administered p.o for days as indicated with daily dosages of 10 mg/kg of Bezoar Bovis. Peritoneal macrophages were harvested 3 days or 7days later. After macrophages were incubated with medium alone or were treated with IFN-γ (10 U/ml) plus LPS (1 μg/ml) for 20 hours, the supernatants were collected for NO-2 assay. The results are mean±S.E. for quintuplicates from a representative experiment. *Significantly different from control (no administration); p<0.05. [†]Significantly different from group administered with Bezoar Bovis; p<0.01. ^aBezoar Bovis

Table III. Release of TNF- α by macrophage induced by Bezoar Bovis as determined by L929 fibroblast bioassay

Treatment	TNF- α production (U/ml)			
	1 day	2 days	7 days	14 days
None	43.04 \pm 1.68	24.25 \pm 0.83	6.69 \pm 0.17	1.11 \pm 0.07
B.B ^a	41.54 \pm 1.59	21.07 \pm 0.19	0.01 \pm 0.01*	0.01 \pm 0.01
None + LPS + IFN- γ	34.43 \pm 5.04	16.92 \pm 0.76	6.63 \pm 0.05	0.01 \pm 0.04
B.B ^a + LPS + IFN- γ	51.74 \pm 0.30 [†]	18.36 \pm 0.63	14.49 \pm 0.18 [†]	0.01 \pm 0.02

ICR mice were administered p.o for days as indicated with daily dosages of 10 mg/kg of Bezoar Bovis. Peritoneal macrophages were harvested 3 days or 7 days later. After macrophages were incubated with medium alone or were treated with IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (1 μ g/ml) for 20 hours, the supernatants were tested on L929 indicator cell for TNF- α activity. The results are mean \pm S.E. for quintuplicates from a representative experiment. *Significantly different from control (no administration); p<0.001. [†]Significantly different from group administered with Bezoar Bovis; p<0.001. ^aBezoar Bovis.

우황을 흰쥐에 투여 하였을 때, 우황이 resident macrophage를 암세포에 쉽게 반응 할 수 있는 responsive(inflammatory) macrophage로 변화시키는 지 알아보기 위하여, 각 대조군과 투여군에서 분리한 대식세포를 IFN- γ 10 u/ml과 LPS 1 μ g/ml을 함께 처리한 후 그 상층액으로부터 NO 분비량을 측정하였다. LPS와 IFN- γ 에 대한 NO 분비량의 변화는 다음과 같다. 1일, 2일 단기투여에서는 LPS와 IFN- γ 를 처리하지 않고 배양했을 때와는 달리 대조군에 비하여 투여군의 NO 분비가 유의성있게 증가하였고, 7일 투여에서도 LPS와 IFN- γ 를 처리하지 않고 배양했을 때와는 반대로 LPS와 IFN- γ 를 처리했을 때 투여군에서 NO 분비량이 증가하였다. 그러나 14일간의 장기적인 연용투여에서는 LPS와 IFN- γ 를 처리했어도 대조군과 투여군이 별 다른 차이를 나타내지 않았다(Table I).

우황을 투여하고 3일 또는 7일 후에 대식세포를 분리하여 LPS와 IFN- γ 를 처리한 실험에서 위에서 나타난 결과와 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 우황을 1일, 2일 투여하고 3일 후에 실험한 군 모두에서 각각 유의성 있게 NO 분비가 증가되었으나 14일간 투여하고 7일 후에 실험한 군에서는 대조군과 투여군이 유의성 있게 차이를 나타내지 않았다(Table II). 따라서 흰쥐의 대식세포를 배양하여 LPS와 IFN- γ 를 가했을 때, 우황을 단기(1일, 2일) 투여한 군에서 NO 분비가 증가되는 점으로 보아 우황은 생체내로 주입되어 대식세포를 responsive macrophage로 변화시키며, 변화된 responsive macrophage는 외부자극(LPS와 IFN- γ)에 의하여 활성화되는 것으

로 사료된다.

TNF- α 와 IL-6 생성에 미치는 영향 - 우황이 대식세포를 활성화시켜 세포 독성물질로 알려진 TNF- α 를 분비하게 하는지 알아보기 위하여 우황을 투여한 흰쥐의 대식세포를 배양하여 그 상층액으로부터 TNF- α 생성량을 알아보았다. 분비된 TNF- α 활성은 L929 indicator 세포를 이용하여 L929 세포증식 저해율로 알아보았다. 그 결과 단기투여(1일, 2일)와 장기투여 14일군이 모두 TNF- α 분비량에 변화를 나타내지 않았으나, 예외적으로 7일간 우황

Table IV. Effect of Bezoar Bovis on the production of TNF- α in peritoneal macrophages obtained from mice on 3 or 7 days later as determined by L929 fibroblast bioassay

Treatment	TNF- α production (u/ml)		
	1+3 day	2+3 day	14+7 day
None	43.33 \pm 6.03	26.17 \pm 1.65	25.78 \pm 0.89
B.B ^a	43.46 \pm 4.62	4.06 \pm 0.15*	2.93 \pm 0.02*
None + LPS + IFN- γ	30.45 \pm 3.01	12.19 \pm 3.62	0.01 \pm 0.02
B.B ^a + LPS + IFN- γ	28.37 \pm 0.01	14.60 \pm 1.02	0.34 \pm 0.04

ICR mice were administered p.o for 1, 2 or 14 days with daily dosages of 10 mg/kg of Bezoar Bovis. Peritoneal macrophages were harvested 3 days or 7days later after drug exposure. After macrophages were incubated with medium alone or were treated with IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (1 μ g/ml) for 20 hours, the supernatants were collected for NO₂⁻ assay. The results are mean \pm S.E. for quintuplicates from a representative experiment. *Significantly different from control (no administration); p<0.05. ^aBezoar Bovis.

을 투여한 군에서 TNF- α 분비량에 유의성있는 감소 효과를 나타내었다(Table III). 우황을 투여하고 3일 또는 7일 후에 실험한 결과에서 1일 투여하고 3일 후에 실험한 군에서 유의성은 없으나 약간의 TNF- α 가 증가되었고, 2일 투여하고 3일 후에 실험한 군과 14일 투여하고 7일 후에 실험한 군은 모두 TNF- α 분비량이 크게 감소되었다(Table IV).

또한 우황이 대식세포를 responsive macrophage로 변화시키는지 알아보기 위하여, 정수를 투여한 대조군과 우황을 투여한 투여군에서 대식세포를 분리 배양하여 IFN- γ 10 u/ml과 LPS 1 μ g/ml을 함께 처리한 후 그 상층액으로부터 TNF- α 분비량을 측정하였다. 그 결과 1일 투여실험에서 LPS와 IFN- γ 를 처리하지 않았을 경우와는 달리 대조군에 비해 투여군의 TNF- α 분비량이 크게 증가하였고, 2일 투여실험에서는 대조군의 TNF- α 분비량과 유사하였다. 장기간의 7일 투여에서는 LPS와 IFN- γ 를 가했을 경우에는 TNF- α 분비량이 크게 증가하였으나, 14일간의 장기적인 연용투여에서는 LPS와 IFN- γ 를 처리했어도 대조군의 TNF- α 분비와 차이를 보이지 않았다. 이와 같이 LPS와 IFN- γ 에 의한 대식세포의 TNF- α 생성량의 변화는 NO 분비량의 변화와 마찬가지로 우황에 의해 감작된 대식세포가 LPS와 IFN- γ 와 같은 외부자극에 의해 활성화되는 것으로 생각된다. 그러나 이러한 감작효과는 14일간의 연속 투여에서는 나타나지 않았다(Table III).

우황을 투여하고 3일 또는 7일 후에 실험한 경우에는, 대조군과 투여군에 LPS와 IFN- γ 를 가했을 때 우황을 1, 2일 투여하고 3일 후에 실험한군과 14일간 연용투여하고 7일 후에 실험한 군에서 모두 TNF- α 생성의 변화를 나타내지 않았다(Table IV). 이러한 실험 결과는 우황을 단기간 짧게 처리하고 적당한 투여간격을 두어도 TNF- α 분비에는 크게 영향을 미치지 않는 것을 시사한다.

우황에 의해 활성화된 대식세포가 IL-6를 분비하는 지 알아보기 위하여 ELISA 방법을 이용하였다. 우황을 위와 같은 방법으로 투여한 흰쥐의 대식세포를 분리하여 배양한 후 그 상층액으로부터 IL-6양을 측정 한 결과 대조군에 비해 투여군에서 특이한 유의성이 발견되지 않았다(결과를 별도로 기재하지 않았다).

본 연구는 우황을 이용하여, 1차적 면역반응에 관여하는 대식세포의 활성화에 미치는 영향과 2차적 면역반응에 관여하는 B세포에의 영향을 검토하여 우황이 면역체계에 미치는 영향을 알아보았다. 연구결과에 의하면 우황의 투여기간은 면역반응에 매우 중요한 요소로 작용하는 듯 하다. 단기간 투여기간(1일, 2일)과 장기간 투여기간(7일, 14일)을 나누어 생각해 볼 때, 단기간의 투여는 면역기능을 향진시키는 반면, 장기간 투여는 면역반응을 오히려 억제시키는 결과를 나타내었다. 특히, 단기간 투여하고 일정 투여간격을 두었을 경우(우황을 1일 투여하고 3일 후에 실험했을 때)에는 더욱 면역기능이 향진되었으며, 7일이상되는 우황청심원의 연용투여는 면역기능을 점차적으로 저하시켰다. 14일간 투여에서는 이러한 면역저하효과가 매우 현저하게 나타났으며, 또한 14일간 투여하고 7일 후에 실험하였을 경우에도 저하된 면역기능은 제대로 회복되지 못하였다.

우황이 B 임파구의 항체 생성능에 미치는 효과는 1일 투여하고 3일 후에 실험한 군에서 가장 유의성 있는 증가를 보였다. 2일간 투여하고 3일 후에 실험한 군에서도 유의성은 없으나 PFC수가 증가하였다. 그러나 14일간 연용투여하고 7일 후에 실험한 군에서는 PFC수가 감소되었으며, 이는 14일간의 연용투여로 인한 PFC 감소효과가 7일이 지난 후에도 회복되지 못하고 나타난 결과로 생각된다. 항체 생성능에 미치는 투여일수에 따른 효과는 1일, 2일 단기투여시에는 변화가 없으나 7일간의 장기투여에 있어서는 PFC 수가 감소되었고, 이러한 감소현상은 14일째에 더욱 현저하게 나타났다. 따라서 항체 생성능을 증가시키려면 우황은 단기투여 후에 일정기간의 투여간격을 요하며, 장기적인 연용투여는 항체 생성 능력을 감소시킨다. 우황이 대식세포를 활성화시켜 면역증강작용을 나타내는지 알아보기 위하여 우황을 처리한 대식세포가 분비하는 NO, TNF- α , IL-6의 양을 측정하였다. NO 생성에 있어서, 우황을 2일간 투여하고 3일 후에 실험한 흰쥐의 대식세포에서 NO 분비량이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. 그러나 우황을 매일 투여한 흰쥐의 대식세포의 경우 NO 분비량에 변화를 나타내지 않았으며, 7일간, 14일간 반복적인 연용투여군에서는 오히려 대조군에 비해 NO 분비량이 크게 감소하였다. 이러한 감소현상은 14일간 투여하고 7일 후에 실험한

고 찰

흰쥐의 대식세포가 분비하는 NO분비량에서도 나타났다. 14일간의 장기적인 연용투여로 인한 감소효과가 7일 후에도 제대로 회복되지 못하고 대식세포의 활성화를 감소시키는 것으로 여겨진다.

TNF- α 의 분비에 있어서는 1일 투여하고 3일 후에 실험한 군을 제외하고는, 투여하고 며칠 후에 실험한 군은 모두 대조군에 비해 크게 TNF- α 분비량이 감소되었으며, 투여 1일, 2일, 7일, 14일 실험군에서도 모두 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 대체로 우황은 대식세포의 TNF- α 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각되며, 투여간격을 두어도 크게 TNF- α 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각 되어진다.

대식세포가 활성화되어 암세포를 죽이게 되기까지는 임파구와 같이 배발생(blastogenesis)를 일으키기 보다는 다양한 신호전달에 반응하여 어떤 기능을 증강시키거나 잃어버림으로써 성장 변화를 거치게 된다.⁵⁾ 정상조직내에 존재하는 resident macrophage는 어떤 signal에 의하여 암세포와 같은 외부 신호에 쉽게 반응 할 수 있는 responsive(또는 inflammatory) macrophage로 변하게 된다. 이러한 responsive macrophage는 직접 암세포를 죽일수는 없지만, 탐식능력과 H₂O₂ 생성능력이 증가하여 INF- γ , LPS와 같은 유인 신호에 의해 쉽게 암세포를 사멸할 수 있는 능력을 갖게된다.

우황이 대식세포의 활성화 단계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우황을 투여한 흰쥐의 대식세포를 분리 배양하여 IFN- γ 와 LPS를 함께 처리하였다. 그 결과 단기투여(1일, 2일)에서 투여군의 대식세포가 더 많은 양의 NO를 분비하였다. 7일간 투여했을 때 나타난 NO분비 감소에 대해서도 IFN- γ 와 LPS를 함께 처리했을 경우에는 투여군에서 NO분비 증가가 유의성있게 나타났다. 이러한 결과는 IFN- γ 와 LPS가 우황을 투여했던 대식세포의 TNF- α 생성에 미치는 영향과도 유사하다. 이는 우황이 생체내로 주입되어 대식세포를 감작시키게 되어, IFN- γ 와 LPS와 같은 면역조절제에 의해 그 활성이 자극되어 증가하는 것으로 생각되어진다. 그러나 14일간 연용 투여에서는 IFN- γ 와 LPS를 처리하였을 때에도 NO분비가 증가되지 않은 점으로 보아 14일간의 연용투여가 대식세포의 활성화를 억제하여 대식세포의 감작과 자극을 억제하는 것으로 사료되며, 이러

한 현상은 14일간 투여하고 7일 후에 있어도 동일하게 나타났다. 즉, 1,2일 투여하고 3일 후에 실험하였을 경우와는 달리 IFN- γ 와 LPS를 처리하였을 때 투여군의 NO분비가 증가되지 않았다.

대식세포는 면역반응에서 직접 자연면역반응에 관여하기도 하지만, 항원특이성 면역반응을 일으키기도 한다. 이 과정에서 대식세포는 항원을 세포 표면에 노출시켜 항원에 대한 임파구의 면역반응을 유도하기도 하며, 여러 가지 물질을 분비함으로써 임파구에 의한 면역반응에 보조적 역할을 하기도 한다.⁵⁾ 대식세포가 분비하는 IL-6는 임파구 분화에 영향을 미치는 cytokine으로 알려져 있다. 특히 B세포 분화요소로 알려진 IL-6는 B 세포를 항체생성세포로 분화시키는데 중요한 역할을 한다.¹³⁾ 연구결과에 의하면 우황은 대식세포의 IL-6분비에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 우황이 항체형성 세포 수에 미치는 영향은 대식세포가 분비하는 IL-6에 의한 영향이 아닌 것으로 생각되어진다.

결 론

우황이 흰쥐 면역세포에 미치는 영향은 투여간격에 의하여 증강작용과 억제작용을 나타내었다. 우황은 단기(1일, 2일) 투여하고 적정간격을 둔 실험에서 항체 생성 능력을 증강시키고 대식세포를 활성화시켜 NO분비를 증가시키는 등 면역기능을 증강시켰다. 또한 단기 투여 실험에서 IFN- γ 와 LPS와 같은 면역조절제에 의해 대식세포의 활성이 자극되는 점으로 보아 생체내로 주입된 우황은 대식세포를 감작시키는 것으로 생각되어진다. 그러나, 장기(7일, 14일) 우황을 투여했을 경우에는 면역기능을 저하시키는데, 이러한 현상은 우황이 장기간 연용투여 되었을 경우 체내에서 완전히 대사되지 못하고 축적됨으로써 축적된 우황의 대사물에 의해 면역계에 억제작용이 나타난다고 보아진다.

지금까지의 연구 결과를 종합해 볼 때, 실제로 질병치료나 예방에 있어서 임상적으로 사용하고 있는 우황의 적절한 투여용량과 투여간격 확립에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다. 본 연구결과는 흰쥐의 면역계에 대하여 우황이 관련된 직접적인 손상을 나타내는 것을 증명하지 않으며 단지 새로운 면역조절물질 개발에 생약제제 이용 가능성을 제시

하고, 우황의 면역계에 대한 연구에 활용자료가 될 수 있을 것이다.

인용문헌

1. 한약학 (1985) 22-23. 대한약사회. 서울.
2. 본초학 (1995) 669-671. 대한약사회. 서울.
3. Silverstein, S. and Unkeless, J. (1991) Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 3: 47-57.
4. Adams, D. O., and Hamilton, T. A. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 283-318.
5. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, I. and Rachlin, E. M. (1988) Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 157: 87-92.
6. Thomas, P. M., and Edginton, S. (1984) Human monocyte mediated tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* 132: 1980-1986.
7. Weir, D. M. (1986) Handbook of experimental immunology. Vol 1 & 11. 4th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publication. London.
8. Cunningham, A. (1973) Plaque assay for antibody producing cells. *Prog. Allergy* 17: 5-8.
9. Klimetzek, V. and Remold, H. G. (1980). The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell Immunol.* 53: 237-266.
10. Mand, H. M. and Vogel, S. N. (1991) Measurement of mouse and human TNF: *In Current protocols in immunology* (ed). 6.10.1-6.10.5 Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, NY.
11. Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 141: 2407-2412.
12. Vunakis, H. V. and Langone, J. J. (1980) Immunochemical technique. *In Methods in enzymology* (ed.), 419-439 Academic Press, New York, NY.
13. Van Snick, J. (1990) Interleukine-6 : An overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 253-278

(1998년 2월 15일 접수)