

加味大補湯이 생쥐의 복강 Macrophages에 미치는 영향

송정모 · 오찬호¹ · 소준노¹ · 김대근² · 은재순^{2*}

우석대학교 한의과대학, 1:이공대학, 2:약학대학

Effect of Kamidaebo-tang on Murine Peritoneal Macrophages

Jung Mo Song, Chan Ho Oh¹, June No So¹, Dae Keun Kim², Jae Soon Eun^{2*}

Department of Oriental Medicine, 1 : College of Science and Technology, 2 : College of Pharmacy, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of Kamidaebo-tang water extract (KDT) on murine peritoneal macrophages. KDT (50 or 250 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days to mice. KDT increased the production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine peritoneal macrophages, but decreased the production of interleukin-1 β . Also, KDT enhanced the production of lucigenin chemiluminescence from peritoneal macrophages. These results suggest that KDT enhances the non-specific immune response *via* increase of tumor necrosis factor- α and nitric oxide and phagocytic activity from peritoneal macrophages.

Key words : Kamidaebo-tang(加味大補湯), cytokine, peritoneal macrophage, phagocytosis

서 론

加味大補湯은 太平惠民和劑局方¹⁾에 수재된 十全大補湯에서 川芎을 祛하고 陳皮, 五味子, 遠志를 첨가한 人蔘養榮湯에 補肝腎, 強筋骨하는 杜仲과 續斷, 寧心安神하는 元肉, 益胃生津하는 麥門冬, 益胃溫中하는 砂仁 및 白芍, 消導調中하는 神麩 및 麥芽, 行氣解鬱하는 香附子, 祛濕解痙하는 防風을 加한 처방으로 大補氣血, 補肝腎, 寧心安神, 益胃生津하는 효능이 있는 처방이다^{2,4)}. 한방탕제에 대한 면역학적 연구는 많이 보고되었으며⁵⁻⁸⁾, 가미대보탕이 Th2 세포를 활성화하여 특이적 면역반응을 증강시킬 수 있음이 이미 보고된 바 있다⁹⁾. 따라서 본 실험에서는 특이적 면역반응을 증가시키는 가미대보탕이 생쥐의 비특이적 면역반응에는 어떠한 영향을 미치는 가를 관찰하고자 복강 macrophage로부터 분비되는 cytokine인 tumor necrosis factor- α 와 interleukin-1 β 및 phagocytic activity를 측정할 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용한 생쥐는 8 주령 BALB/c계 수컷을 대한실험

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학
E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1569

· 접수: 2002/08/03 · 수정: 2002/09/05 · 채택: 2002/10/04

동물에서 구입하여, 온도 20±3℃, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, 055:B5), zymosan, γ -interferon (γ -IFN, Hu γ -IFN), sulfanilamide, lucigenin, N-naphthylethylenediamine · 2HCl은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse TNF- α immunoassay kit, mouse IL-1 β immunoassay kit는 R&D Co., FITC-conjugated *E. coli* particle은 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.) luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 약재는 우석대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 가미대보탕 3첩을 증류수 1,500 ml로 3 시간 동안 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다

음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 48.6g을 얻어(이하 KDT라 칭함), 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

Table 1. Prescription of Kamidaebo-tang

韓藥名	生藥名	重量 (g)
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	8
白芍藥	Paeoniae Radix	8
龍眼肉	Longanae Arillus	6
當歸	Angelicae gigantis Radix	6
人參	Ginseng Radix Alba	4
黃芪(蜜灸)	Astragali Radix	6
肉桂	Cinnamomi Cortex Spissus	4
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	4
甘草(灸)	Glycyrrhizae Radix	4
白茯苓	Hoelen Alba	4
麥門冬	Liriopsis Tuber	4
熟地黃	Rehmanniae Radix Vapratum	4
杜仲	Eucommiae Cortex	4
續斷	Phlomis Radix	4
真砂仁	Amomi Semen	4
白芷	Amomi cardamomi Fructus	4
神麩	Massa Medicata Fermentata	4
麥芽	Hordei Fructus Germinatus	4
五味子	Schizandrae Fructus	3
防風	Ledebourielae Radix	3
遠志	Polygalae Radix	2
香附子	Cyperi Rhizoma	6
生薑	Zingiberis Rhizoma	8
大棗	Zizyphi Fructus	6
Total		114

4. Macrophages 분리

Macrophage의 분리는 KDT 50 및 250 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후, 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4℃에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

5. Cytokines 측정

동일한 방법으로 macrophage를 분리하여 2 x 10⁷ cells/ml로 조제한 다음, 96 well plate에 200 µl 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500 rpm, 2분, 4℃) 한 다음, 상등액 50 µl를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 즉 sample 50 µl에 assay diluent 50 µl를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 µl를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 µl를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 µl를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후,

미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

6. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 측정

동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 2 x 10⁶ cells을 분주한 후 macrophage로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess법¹⁰⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

7. 복강 macrophage로부터 phagocytic activity 측정

동일한 방법으로 분리한 macrophage를 2 x 10⁶ cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다^{11,12)}. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 µl와 lucigenin 용액 50 µl 및 zymosan 용액 30 µl를 첨가하여 최종 volume이 200 µl가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

8. 복강 macrophage의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated E. coli particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 µg/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 1 x 10⁵ cells/ml 되도록 조정한 후, 100 µl를 96 well에 분주하고 E. coli 현탁액 25 µl를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 µl를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다¹³⁾.

9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험 성적

1. 복강 macrophage로부터 tumor necrosis factor-α의 분비에 미치는 효과

대조군의 복강 macrophage에서 분비되는 TNF-α의 양은 371.4 ± 10.2 pg/ml 이었으며, KDT 50 mg/kg을 투여한 군은

402.5±13.1 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었으나, KDT 250 mg/kg을 투여한 군은 497.8±12.5 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of Kamidaebo-tang (KDT) on the production of tumor necrosis factor- α from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose (mg/kg)	Tumor necrosis factor- α (pg/ml)
Control	-	371.4±10.2
KDT	50	402.5±13.1
KDT	250	497.8±12.5*

KDT (50 or 250 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured for 72 h in RPMI1640 media. The secretion of tumor necrosis factor- α was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p<0.01$).

2. 복강 macrophage로부터 interleukin-1 β 의 분비에 미치는 효과
대조군의 IL-1 β 의 양은 125.9±9.5 pg/ml 이었으며, KDT 50 mg/kg을 투여한 군은 115.6±8.6 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었으나, KDT 250 mg/kg을 투여한 군은 95.9±7.8 pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of KDT on the production of interleukin-1 β from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose (mg/kg)	Interleukin-1 β (pg/ml)
Control	-	125.9±9.5
KDT	50	115.6±8.6
KDT	250	95.9±7.8*

KDT (50 or 250 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured for 72 h in RPMI1640 media. The secretion of interleukin-1 β was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p<0.05$).

3. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 분비에 미치는 효과
대조군의 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 양은 48 시간 후에 3.2±0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 양은 25.4±2.3 μ M로 증가하였다. KDT 50 mg/kg을 투여하였을 때 30.6±2.7 μ M로 대조군과 별 차이가 없었으나, KDT 250 mg/kg을 투여하였을 때는 45.3±2.8 μ M로 대조군에 비해 증가하였다 (Table 4).

Table 4. Effect of KDT on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages

Samples	Dose (mg/kg)	Nitric oxide (μ M)
Normal	-	3.2±0.1
Control	Saline	25.4±2.3
KDT	50	30.6±2.7
KDT	250	45.3±2.8*

KDT (50 or 250 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured for 48 h in the presence of LPS and γ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean±SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p<0.001$). Normal: Non-treated LPS and γ -IFN.

4. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. KDT 50 mg/kg을 투여한 macrophages로부터 생성되는 CL의 양은 대조군과 별 차이가 없었으나, KDT 250 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL 양은 대조군에 비해 증가하였다 (Fig. 1). 또한 KDT 250 mg/kg을 투여시 FITC-conjugated *E. coli* particle의 탐식도 현저히 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 2).

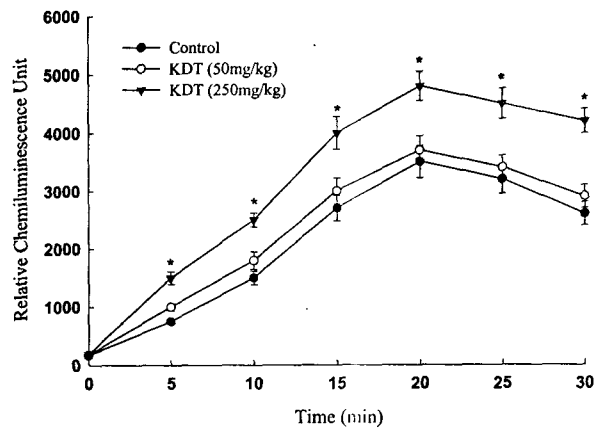


Fig. 1. Effect of KDT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. KDT (50 or 250 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured in DME media (without phenol red) with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min. with luminometer. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. *Significantly different from control group ($p<0.001$).

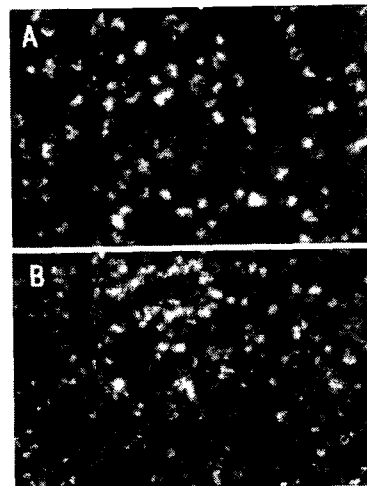


Fig. 2. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from KDT-administered mice. Photographs (taken at 200X magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in normal (A) and KDT (250 mg/kg)-administered mice (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

고찰

면역반응은 T 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역 (specific immunity)과 macrophage가 관련된 비특이적면역 (non-specific immunity)으로 분류된다. 본 실험에서는 생쥐의 면역반응에 미치는 KDT의 비특이적면역반응의 영향을 관찰하기 위해, 생쥐의 복강 macrophage를 분리하여 면역능의 변화를 관찰하였다. KDT를 50 및 250 mg/kg을 경구로 각각 투여하고 분리한 복강 macrophages로부터 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)의 양을 측정할 결과 KDT 250 mg/kg 투여시 TNF- α 의 양은 대조군에 비해 증가하였으나, IL-1 β 의 양은 감소하였다. Nitric oxide (NO)는 caspase-1을 억제하여 macrophages로부터 IL-1 β 의 생성을 억제하나, TNF- α 에는 영향을 주지 않으며¹⁵⁾, NO는 T-lymphocyte가 생성하는 cytokine을 조절하고, in vivo에서 T-lymphocyte의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다¹⁶⁾. 본 실험에서는 IL-1 β 가 억제된 것이 NO에 의한 것인가를 확인하기 위하여 NO양을 측정하였다. 복강 macrophages로부터 NO 생성에 미치는 KDT의 영향을 관찰한 결과, KDT 250 mg/kg을 투여시 NO 생성이 대조군에 비해 증가하였다. 이는 KDT가 macrophages로부터 NO 생성을 촉진하여 IL-1 β 의 생성을 억제한 것이 아닌가 추정되나, 자세한 기전은 추후 연구되어야 한다. 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 이러한 phagocytosis는 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. Phagocytosis는 면역적인 측면에서 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다¹⁷⁾. Macrophage로부터 생성되는 chemiluminescence(CL)를 측정할 결과 KDT 250 mg/kg을 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL 양이 증가하였다. 이는 KDT가 macrophages의 phagocytic activity를 증가시킴을 의미하는 것이다. TNF는 phagocytic activity를 촉진하고¹⁸⁾, NO는 활성화된 macrophages의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 본 실험에서 KDT를 투여하였을 때 TNF 및 NO 양이 모두 증가하였다는 것은, KDT가 macrophages의 phagocytic activity를 촉진하는데 NO보다는 TNF가 관여하고 있음을 강력히 시사하고 있으나 생성된 cytokine의 농도 등 다양한 factor들이 작용할 수 있기 때문에 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

결론

가미대보탕 (KDT) 250 mg/kg을 생쥐에 경구투여 하였을 때 복강 macrophages의 면역능에 미치는 영향은 복강

macrophages로부터 tumor necrosis factor- α 의 생성을 증가시켰고, interleukin-1 β 의 생성을 억제하였으며, nitric oxide의 생성을 증가시켰다. 또 복강 macrophage의 phagocytic activity를 증가시켰다.

이상의 실험결과 가미대보탕은 복강 macrophages로부터 tumor necrosis factor- α 와 nitric oxide의 생성을 촉진시키고 phagocytic activity를 증강시킴으로써 비특이적 면역반응을 증강시킬 수 있는 탕제라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구됨.

참고문헌

1. 陳師文: 太平惠民和劑局方, 慶熙大學校韓醫學科, 卷5, p.152, 1965.
2. 大田大學校 韓方病院: 韓方病院 處方集, 韓國出版社, p.376, 2001.
3. 李尙仁: 本草學, 서울, 學林社, p.85-436, 1986.
4. 李尙仁: 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.208-543, 1982
5. 李南九 外: 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK 細胞의 細胞毒性에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌, 10(2), 115-122, 1989.
6. 河智容: 八物湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 영향, 大韓東醫病理學會誌, 9(2), 295-316, 1995.
7. 河智容 外: 人蔘養榮湯의 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 영향, 大韓東醫病理學會誌, 12(1), 60-71, 1996.
8. Eun, J.S., Kim, D.K., Choi, H. and Oh, C.H.: Effect of Insamyangyoung-tang on the specific immune response in BALB/c mice. Kor. J. Oriental Physiology & Pathology, 16(4), in print, 2002.
9. 李鍾年: 加味大補湯이 생쥐의 免疫調節作用에 미치는 영향, 大田大學校大學院, 博士學位論文, 2002.
10. Rockett, K.A., Auburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immunity, 59(9), 3280-3283, 1991.
11. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.: Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259-268, 1994.
12. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112, 163-168, 1988.
13. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.: A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immunol. Methods, 162, 1, 1993.
14. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr. R. B.:

- Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.*, 41, 450-455, 1987
15. Kim, Y.M., Talanian, R.V., Li, J. and Billiar, T.R.: Nitric oxide prevents IL-1 β and IFN- γ -inducing gactor(IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1(IL-1 β -converting enzyme). *J. Immunology*, 161(8), 4122-4128, 1998.
 16. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W.: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Instit.*, 84(11), 828-831, 1992.
 17. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45, 1-8, 1984.
 18. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.245-247 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.
 19. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.*, 18, 635-644, 1996.