

補氣藥物인 人參, 黃芪, 白朮, 甘草의 물 추출액이 생쥐 면역세포의 Cytokine분비에 미치는 영향

배 항 · 명유진 · 강 희 · 심범상 · 김성훈¹ · 최승훈 · 안규석*

경희대학교 한의과대학 병리학 교실, 1: 경희대학교 동서의학대학원

Effect of Qi Tonifying herbs, Ginseng, Astragali, Atractylodis, Glycyrrhizae on Mouse Cytokine Secretion

Hang Bae, Eu gene Myung, Hee Kang, Bum Sang Shim, Sung Hoon Kim¹, Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,

1: Lab of Angiogenesis and Chemoprevention, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

In Oriental medicine the primordial Qi and the defensive Qi are considered as important for immunity. Therefore it is anticipated that the improvement of the primordial Qi and the defensive Qi can enhance the ability of immune cells. This experiment was conducted to investigate how Ginseng Radix, Astragali Radix, Atractylodis Rhizoma Alba, Glycyrrhizae Radix, representative of Qi tonifying herbs, affect the immune system in terms of controlling and balancing immune cells. Using the MTS assay, increased proliferations were observed from herbal treated cells, among which Ginseng showed the highest proliferation. When splenocytes were activated with anti-CD3 plus herbal extracts, levels of IFN-g and IL-4 were increased but those of IL-2 showed little change compared with the control cells. Levels of IL-2, IFN-g and IL-4 were increased in purified CD4 T cells when activated with anti-CD3/anti-CD28 but at 100 µg/ml of Astragali and Atractylodis, levels of IL-2 were decreased by 11% and 42%, respectively and those of IFN-g were decreased by 55% and 12%, respectively. Under Th1/Th2 polarizing conditions, levels of IFN-g in Th1 cells treated with herbal extracts were all decreased but when it comes to IL-4, its levels were increased in Ginseng and Glycyrrhizae treated cells but decreased in Astragali and Atractylodis treated cells. Taken together, the data show that compared with other qi tonifying herbs, Ginseng and Glycyrrhizae have a tendency to favor Th2 cell differentiation *in vitro*.

Key words : Ginseng Radix, Astragali Radix, Atractylodis Rhizoma Alba, Glycyrrhizae Radix, Th1/Th2, CD4 T cell, IFN-γ, IL-2, IL-4

서 론

人體는 外部環境과 獨立인 存在가 아니라, 外部環境과 끊임없이 영향을 주고받으면서 恒常性을 유지하는 存在이다. 免疫이란 이러한 능동적 움직임을 말하는 것으로, 生命體가 다른 個體細胞의 組織이나 體內에서 불필요한 生成物, 變異細胞 등을 非自己인 抗原으로 認識, 排除함으로써 個體의 恒常性을 유지하는 현상¹⁾을 말한다. 면역은 꽃가루나 집먼지, 음식물 allergy로부터 아토피

피부염, 기관지 천식, 알러지 비염과 같은 allergy질환, 류마티스양 관절염이나 루푸스 같은 자가면역질환, 최근 증가추세에 있는 기생충감염, AIDS나 SARS같은 感染性, 流行性 疾患, 豫防接種이나 臟器移植, 癌의 치료에 이르기까지 수많은 질병과 관계된다.

한의학에서는 질병의 발생에 관해, 『靈樞 百病始生』에서 “風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人”²⁾, 『素問 刺法論』에서 “正氣存內 邪不可干”³⁾, 『素問 評熱病論』에서 “邪之所湊 其氣必虛”⁴⁾라 하여, 질병의 근본원인을 外邪의 侵入보다는 內部正氣의 虛弱으로 설명하고 있다. 이에 劉 등⁵⁾은 한의학과 면역학의 결합을 위한 이론적 토대로서 衛氣와 免疫, 肺脾腎과 免疫, 經絡氣血과 免疫, 先天稟賦, 體質과 免疫, 扶正祛邪와 免疫 등의 방면에 대한

* 교신저자 : 안규석, 서울시 회기동 1, 경희대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2004/11/25 · 수정 : 2004/12/23 · 채택 : 2005/01/27

闡發을 하였고, 章⁹⁾은 正氣가 虛弱한 患者에서 免疫機能이 低下되었다고 報告하였다. 이러한 점으로 미루어 보아 한의학에서의 正氣와 衛氣의 성쇠가 免疫기능의 강약을 결정짓는 요소라 할 수 있다. 이에 저자는 補氣藥物에 의한 正氣虛, 衛氣虛의 개선이 免疫力를 향상시킬 것이라 예상하고, 이를 확인하기 위하여, 대표적 補氣藥物인 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草를 實驗에 이용하여 그 결과를 觀察해보았다.

本 實驗에서는 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草의 免疫調節作用을 檢證하기 위하여, mitogen의 자극을 받은 비장림프구의 增殖能을 測定하고, 비장림프구 및 CD4 T cell의 cytokine 發顯量 및 CD4 T cell을 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향을 測定한 結果, 有意한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 8주된 BALB/c 웅성 마우스이며 오리엔트(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였다. 사료와 물은 무제한으로 제공하여 사육하였다.

2) 약재

각 약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. Qi Supplementing Herbs.

Chinese name	Latin name
人蔘	Ginseng Radix
黃芪	Astragali Radix
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba
甘草	Glycyrrhizae Radix

3) 시약

anti-CD3e(clone:145-2C11), anti-CD28(clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12(C17.8), recombinant mouse IL-12(rIL-12), rIL-4, rIFN-g는 BD Bioscience PharMingen(San Diego, U.S.A.)에서 구입하였으며, Lipopolysaccharide(LPS), rIL-2는 Sigma(U.S.A)에서 구입하였다. Magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads는 Miltenyi Biotec(Ber-gisch Gladbach, Germany)에서 구입하였다. Mouse IL-2, IFN-g, IL-4 OPT EIA set, RBC lysis buffer, Assay diluent, TMB는 BD Bioscience PharMingen(San Diego, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 배지는 10 % Fetal Bovine Serum(Sigma)와 1 % anti-biotic/anti-mycotic(Invitrogen Life Technology)이 함유된 RPMI-1640(Invitrogen Life Technology)를 사용하였다.

2. 방법

1) 약제 추출물 제조

人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草 각 200 g을 분쇄기로 파쇄한 후 1 l

의 증류수를 첨가하고 1시간 동안 초음파를 가한 후 실온에 방치하여 침전시킨 후 여과액을 얻고 감압농축기로 농축하였다. 농축액을 동결건조기로 건조한 후, -20 °C에 보관하였다. 실험에 사용하기 전에 PBS에 녹여 0.22- μ m syringe filter로 여과하였다.

2) 비장 임파구 부유액 준비

BALB/c 마우스의 비장을 micro slide glass(Matsunami, Japan)로 grinding한 후 cell strainer(BD Pharmingen)로 걸러내었다. 원심분리 후 2 ml의 RBC lysis buffer를 넣고 적혈구를 제거하였다. 다시 원심분리한 후 배양액에 세포를 suspension하였다. seeding하기 전에 세포 수는 trypan blue staining에 의해 결정되었다.

3) CD4 T cell 분리

비장임파구를 10^7 cells/90 μ l의 농도에 10 μ l의 MACS CD4(L3T4) micro-beads를 첨가하여 15분간 4 °C에 incubation하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 나서 500 μ l의 배지에 cell pellet을 resuspension한다. Positive selection column을 MACS separator(Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 삽입한 후 세포부유액을 column안으로 통과시켰다. column안에 부착된 CD4⁺ T cell은 플러저로 elution하여 분리하였다.

4) 증식능 측정

Mitogen으로 자극받은 세포의 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM non-radioactive cell proliferation assay(Promega, U.S.A.)의 protocol에 준하되 4×10^5 cells/200 μ l의 농도로 anti-CD3e(10 μ g/ml)가 coating된 96-well plate에 seeding하였다. 여기에 anti-CD28(2 μ g/ml)를 넣고 co-stimulation하였다. 한약은 0, 50, 100, 200, 500 μ g/ml의 농도로 48시간 37 °C, 5 % CO₂ incubator에 배양하였다.

5) Cell culture 및 Th1/Th2 cell polarization

anti-CD3e(10 μ g/ml)가 coating된 24-well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 splenocyte 또는 CD4 T cell을 seeding 하고 여기에 한약을 넣고 배양하였다. CD4 T cell을 배양할 때는 anti-CD28을 추가하였다. 48시간 후 cell harvest를 하여 상층액을 분리한 후 cytokine 측정에 사용하였다. Th1/Th2 cell polarization을 위해서는 anti-CD3e(10 μ g/ml)가 coating된 12-well plate에 1×10^6 cells/ml의 농도로 CD4 T cell을 seeding하고 anti-CD28 및 rIL-2(5 ng/ml)를 첨가하였다. Th1 polarizing condition을 만들기 위해서는 rIL-12(5 ng/ml)과 anti-IL-4(10 μ g/ml)를 넣었으며 Th2 polarizing condition을 위해서는 rIL-4(5 ng/ml)과 anti-IL-12(10 μ g/ml)를 추가하였다.

6) ELISA 방법을 이용한 cytokine 측정

IL-2, IL-4, IL-12, IFN-g의 측정은 Pharmingen의 OPT EIA set를 이용하였다. 96 well plate의 각 well에 capture antibody를 4 °C에서 overnight으로 coating하였다. 3회 washing을 한 후 Assay diluent를 200 μ l/well씩 넣고 1시간 상온에 둔채 blocking 하였다. 3회 washing하여 blocking buffer를 완전히 제거한 후 standard cytokine과 샘플을 100 μ l씩 분주하여 2시간 상온에 두었다. 5회 washing 후 biotinylated detection antibody와 avidin을 100 μ l씩 분주한 후 1시간 상온에 두었다. 7회 washing후 TMB

substrate reagent 100 μ l를 가한 후 30분 후에 1M H₂SO₄ 50 μ l를 첨가하였다. Micro-plate reader(Molecular Devices, U.S.A)로 파장 450-570 nm에서 optical density를 측정하였다.

실험성적

1. 보기약물의 proliferation activity

人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草의 물 추출물을 넣고 CD4 T cell을 anti-CD3 및 anti-CD28로 48시간 자극하여 세포 증식을 유발했을 때의 차이를 비교해 보았다. 네 가지 약재 중 人蔘이 기준용액에 비해 38 % 증가, 가장 높은 증식률을 보여 주었으며 그 다음으로 白朮, 黃芪, 甘草 순이었다. 특히 甘草는 500 μ g/ml의 고농도에서 다른 약재와 달리 약 40 %의 억제율을 보여주었다.

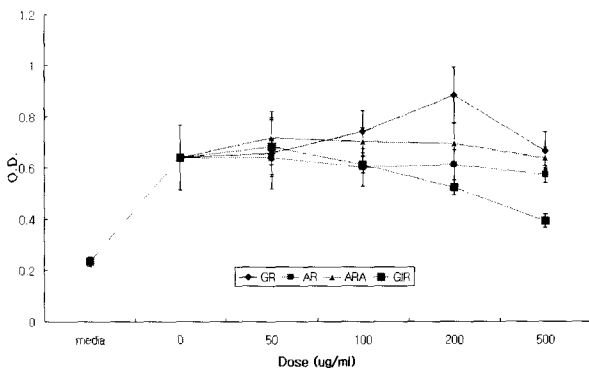


Fig. 1. Proliferation activity of CD4 T cells in medium containing various concentrations of herbs extracts after 48 h incubation. Sorted CD4 T cells were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies. Cell proliferation was quantified by the MTS assay. Results were expressed as the means±S.D. of optical density. * GR : Ginseng Radix, AR : Astragal Radix, ARA : Atractylodis Rhizoma Alba, GIR : Glycyrrhizae Radix

2. 보기약물이 Spleenocyte의 cytokine 분비에 미치는 영향

비장세포에서 적혈구만을 제거한 후 48 시간 anti-CD3만을 넣고 여기에 補氣藥物을 50, 100 μ g/ml을 넣고 배양하였다. 48시간 후 배양액을 분리하여 T cell의 성장에 매우 중요한 IL-2와 항체형성에 중요한 IL-4, 염증성 cyto-kine인 IL-12, IFN-g의 분비량을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 50, 100 μ g/ml은 proliferation assay에서 보여주듯이 人蔘을 제외하고 최적의 증식능을 나타내는 농도 범위였다. 그러나 IL-2 분비량은 모두 대조군에 비해 감소하였다. 가장 감소량이 큰 약재는 白朮로서 50, 100 μ g/ml에서 각각 20%, 31% 감소하였고, 그 다음으로 人蔘, 甘草, 黃芪 순이었다. IL-4는 人蔘과 白朮 투여군이 50 μ g/ml에서 각각 54 %, 30 %이었고 100 μ g/ml에서 각각 55 %, 59 % 높게 나타났으며 黃芪는 대조군보다 더 낮게 나타났다. IFN-g은 白朮을 넣었을 때 50, 100 μ g/ml에서 각각 105 %, 117 %가 증가하여 가장 높았으며 黃芪가 가장 낮았다. IL-12는 白朮을 제외하고는 모두 대조군보다 낮았다.

3. 보기약물이 CD4 T cell의 cytokine 분비에 미치는 영향

마우스의 비장세포 중 CD4 T helper cell만을 분리하여

anti-CD3와 anti-CD28을 넣고 한약재와 함께 48시간 자극하였다. IL-2의 경우 비장세포 배양과 달리 한약재를 첨가하였을 때 분비량이 모두 증가하였다. 가장 많은 증가를 보인 것은 白朮로서 50 μ g/ml에서 132 % 증가하였고, 다음으로 人蔘, 甘草, 黃芪 순이었는데 이것은 비장세포와 정반대였다. IFN-g은 50 μ g/ml에서 모두 비슷한 증가율을 보였으나 100 μ g/ml에서는 黃芪와 白朮을 투여했을 때 55%, 12% 감소하였고 人蔘과 甘草는 여전히 17%, 39%의 증가율을 보여 주었다. IL-4는 한약재를 투여했을 때 비장세포에 비해 모든 약물에서 더 현저한 증가율을 나타내었다.

Table 2. Cytokine Secretion from Splenocyte Treated with Herbs (Gin-seng Radix, Astragal Radix, Atractylodis Rhizoma Alba, Glycyrrhizae Radix)

Herb (μ g/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IFN-g (ng/ml)	IL-12 (pg/ml)
Media	20.70±1.2	29.7±0.7	0.8 ± 0.2	not detectable
Control	472.0±4.8	741.5±35.1	17.8 ± 0.8	7734.89±282.82
Ginseng 50	416.5±4.8*	1149.5±14.8*	27.3 ± 0.3*	4860.21±66.24*
Radix 100	332.7±11.6*	1145.1±18.5*	18.2 ± 0.3	5732.80±122.32*
Astragal 50	432.0±6.8*	672.6±15.5*	14.9 ± 0.8*	6158.67±351.94*
Radix 100	425.5±4.8*	572.8±15.8*	19.8 ± 1.6	6350.78±667.98*
Atractylodis 50	377.4±7.3*	965.7±30.3*	36.4 ± 0.9*	8975.49±271.54*
Rhizoma Alba 100	325.0±6.1*	1176.8±25.3*	38.6 ± 1.0*	7797.38±332.49
Glycyrrhizae 50	458.1±7.8	928.0±7.2*	23.8 ± 1.8*	3892.73±70.24
Radix 100	408.3±10.8*	991.0±25.7*	29.2 ± 1.2*	6373.93±243.59*

Splenocytes were treated with anti-CD3 ab plus herbal extracts for 48 h. For IL-12 production, LPS and rIFN-g were added. Cytokine secretion was quantified by ELISA. Results were expressed as the means±S.D. * P < 0.05

Table 3. Cytokine Secretion from CD4 T cell Treated with Herbs (Gin-seng Radix, Astragal Radix, Atractylodis Rhizoma Alba, Glycyrrhizae Radix)

Herb (μ g/ml)	IL-2 (ng/ml)	IFN-g (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)
Control	26.6 ± 2.8	28.9 ± 0.7	4.3 ± 0.4
Ginseng 50	49.2 ± 2.0*	42.3 ± 1.0*	15.6 ± 0.1*
Radix 100	43.8 ± 1.0*	33.7 ± 6.1	10.7 ± 0.3*
Astragal 50	42.4 ± 1.7*	42.9 ± 0.4*	14.1 ± 0.2*
Radix 100	23.8 ± 1.2	13.0 ± 11.2	5.2 ± 0.2*
Atractylodis 50	61.5 ± 0.5*	41.5 ± 0.6*	15.9 ± 0.2*
Rhizoma Alba 100	15.4 ± 1.9*	25.4 ± 0.3*	8.8 ± 0.3*
Glycyrrhizae 50	39.9 ± 2.1*	44.0 ± 0.4*	15.2 ± 0.2*
Radix 100	41.8 ± 2.1*	40.3 ± 0.7*	10.8 ± 0.3*

CD4 T cells were treated with anti-CD3e/CD28 ab plus herbal extracts for 48 h. Cytokine secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as the means ±S.D. * P<0.05

4. 補氣藥물이 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향

마우스 CD4 T cell을 Th1 cell과 Th2 cell로 1주일간 배양하여 그 상층액의 IFN-g와 IL-4를 비교해보았다. IFN-g의 경우 黃芪(100 μg/ml)를 제외하고는 모든 한약처리군이 대조군에 비해 감소하였고 IL-4는 증가하였다. 이를 보건대 in vitro에서는 한약이 Th2 cell로 분화하는 것을 촉진하는 경향이 있음을 알 수 있었다. Th1 cytokine 억제제가 가장 뚜렷한 약물은 甘草였으며 Th2 cytokine 분비를 가장 촉진한 약물은 人蔘이었다.

Table 4. Cytokine Secretion from Th1 and Th2 cells Treated with Herbs(Ginseng Radix, Astragali Radix, Atractylodis Rhizoma Alba, Glycyrrhizae Radix)

Herbs (μg/ml)	IFN-g (ng/ml)	IL-4(ng/ml)
Control	1733.0 ± 145.6	18.8 ± 0.7
Ginseng 50	925.5 ± 146.3*	71.4 ± 1.5*
Astragali 50	775.6 ± 115.0*	3.2 ± 2.0*
Atractylodis 50	410.9 ± 95.1*	11.0 ± 1.6*
Glycyrrhizae 50	289.5 ± 57.4*	22.5 ± 7.2

CD4 T cells were treated with anti-CD3ε/CD28 plus herbal extracts for 7 days. Cells were added with rIL-2 & rIL-12 for Th1 polarization and rIL-2 & rIL-4 for Th2 polarization. Cytokine secretion was quantified by ELISA. Results are expressed as the means±S.D. *. P < 0.05

고찰

免疫이란 個體가自己和非自己를 鑑別하여 疾病에 대해 적절한 耐性を 갖는 상태를 말하는 것으로, 다른 個體細胞의 組織이나 體內 불필요한 生成物, 變異細胞 등을 非自己인 抗原으로 認識, 排除함으로써 個體의 恒常性を 유지하는 현상^{1,8)}을 意味한다. 이는 크게 體液性 免疫(humoral immunity)과 細胞性 免疫(cellular immunity)으로 구분된다. 體液性 免疫은 抗原特異性 分子인 抗體에 의하여 이루어지고, 細胞보다는 血清 내에 存在하며, 抗體는 T cell의 도움을 받은 B cell에 의해 生産되는 반면⁷⁻⁹⁾, 細胞性 免疫은 주로 T cell에 의하여 이루어지며 경우에 따라서는 淋巴球, 多形白血球, 大食細胞 등도 관계한다^{10,11)}.

T cell progenitor는 未成熟 胸腺細胞로서 胸腺(thymus gland)에 들어가서 mature, antigen-specific, immunocompetent T cell이 되어 나온다¹²⁾. 이때, 胸腺에서 나온 T cell은 APC의 MHC에 붙어있는 抗原과 接觸하느냐의 여부에 따라 機能과 壽命이 정해진다¹³⁾. T cell은 細胞膜에 存在하는 蛋白質 種類에 따라 두 가지로 나뉘는데, 하나는 CD4라는 蛋白質을 갖는 CD4 T cell이고, 다른 하나는 CD8이라는 蛋白質을 갖는 CD8 T cell이다. CD4 T cell은 cytokine 합성유형에 따라 Th1 cell과 Th2 cell로 分化한다. Th1 cell은 IL-2, IFN-g, TNF-α와 TNF-β를 分泌하고 IL-12에 의해 分化하며, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13을 生産하여 免疫 및 炎症反應에 있어서 lymphokine communication network를 形成한다. Th1 cell이 生産한 IFN-g는 Th2 cell의 cytokine 生産을 抑制하고, Th2 cell이 生産하는 IL-4은 Th1 cell의 cytokine 生産을 抑制하며, Th1과 Th2 cell이 Th1 免疫반응과 Th2 免疫반응을 교차조절(cross regulation)하여^{14,16)},

宿主의 免疫反應을 調節한다고 알려져 있다. Th1 cell은 Ig-G 抗體合成을 돕고, cytotoxic T cell의 CD8 T cell 分化에 관여하며, 氣道の 炎症反應을 調節하는 중요한 역할을 한다. Th2 cell은 即時型 過敏反應, 氣管支 喘息과 같은 알려지지 않은 疾患, 寄生蟲 感染에 대한 防禦作用에 관여한다.

앞서 살펴본 면역개념과 가장 유사한 韓醫學的 概念으로는 衛氣와 正氣를 들 수 있다. '衛氣'에서 '衛'는 身體를 保衛하는 氣라는 뜻으로, 外部에서 侵入하는 病邪를 防禦하므로, 그 氣는 強해야 하고, 嚴해야 하며, 果敢해야 한다. 또 皮膚體表를 돌아다니므로 氣의 性質이 標疾滑利하여 病邪와 鬪爭을 하기 쉽다¹⁷⁾. 한편, 『素問 上古天眞論』에서 "眞氣從之, 情神內守 病安從來"¹⁸⁾, 『素問 刺法論』에서 "正氣存內, 邪不可干"¹⁹⁾, 『素問 評熱病論』에서 "邪之所湊 其氣必虛"²⁰⁾라 하여, 正氣가 부족하면 病邪의 侵入를 받게 되고, 正氣가 충분하면 病邪가 감히 侵犯하지 못한다 하여, 正氣가 疾病의 豫防에 중요함을 강조하였다. 以上으로부터 正氣와 衛氣가 西洋의 免疫概念과 유사하다는 점을 確認할 수 있다. 이에 저자는 衛氣虛나 正氣虛로 인한 各種의 疾患에 益氣益衛하는 補氣藥物을 투여하면 免疫系統을 強化하는 效果가 있을 것으로 생각되고, 이를 確認하기 위하여 本 實驗을 실시하였다.

本 實驗에 사용된 藥物은 대표적 補氣藥物로 알려진 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草이다. 人蔘의 性は 微溫無毒하고, 味는 甘微苦하며, 大補元氣, 固脫生津, 安神의 效能이 있어, 勞傷虛損, 食少, 倦怠 등 一切氣血津液不足을 主治한다²¹⁾. 약리학적으로는 중추신경계에 대한 흥분과 억제작용, 학습과 관련된 益智作用, 면역증강 작용, 心血管系에 대한 強心, 抗心筋虛血 작용, 물질대사에 대한 작용, 항스트레스 및 항 쇼크, 항노화, 항암작용 등이 알려져 있다²²⁾.

黃芪는 性이 溫無毒하고, 味는 甘하다. 生用하면 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌의 效能이 있어, 自汗, 盜汗, 血痺, 浮腫, 癰疽不潰, 潰久不斂 등을 치료하며, 炙用하면 補中益氣의 效能이 있어, 內傷勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 氣虛血脫, 崩漏 등 一切氣衰血虛의 證을 主治한다²¹⁾. 또한 방사선요법, 화학요법으로 야기된 백혈구감소를 치료하며^{23,24)}, 黃芪水煎劑는 마우스에서 IL-2의 증가와 함께 NK cell activity를 증강시키는데 10~100μg/ml의 농도에서 가장 강한 효과가 나온다고 알려져 있다²⁵⁾.

白朮은 性이 溫無毒하고 味는 苦甘하며, 補脾 益胃 燥濕 和中하는 效能이 있어, 脾胃氣弱, 不思飲食, 倦怠少氣, 虛脹, 泄瀉, 痰飲, 水腫, 黃疸, 濕痺, 小便不利, 頭暈自汗, 胎氣不安을 治療한다²¹⁾. 세망내피계의 탐식작용 증강, 백혈구수 증가, rosette형성률 증가 등 면역증강효과가 있으며, 白朮 중의 중성 휘발유는 식도암세포에 대한 억제작용이 있고, sarcoma 180에 대한 억제효과가 있다고 알려져 있다²⁵⁾.

甘草는 性이 平無毒하고, 味는 甘하며, 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 效能이 있고, 生用時 咽喉腫痛, 消化性潰瘍, 癰疽瘡瘍, 解藥毒, 食物中毒을 治療하고, 炙用時 脾胃虛弱, 食少, 腹痛便滿, 勞倦發熱, 肺痿咳嗽, 心悸, 驚癇을 治療한다²¹⁾.

本 實驗은 補氣藥物로 多用되는 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草가 活性化된 免疫細胞의 cytokine 分泌에 미치는 影響을 觀察하고, 이

를 통해 4種의 補氣藥物이 免疫細胞의 어떤 機轉에 作用하는지를 確認하고자 시행되었다. Mitogen으로 刺戟받은 비장림프구의 增殖能을 測定하기 위해 檢液을 농도별로 投與한 후 48시간 培養하여 MTS assay 시행결과, 人蔘이 기준용액에 비해 38 % 높은 增殖率을 보였으며, 이 때의 농도는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 그 다음으로 白朮, 黃芪 甘草 순으로 增殖率의 增加가 있었고, 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최대수치를 보였다. 반면 甘草는 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 고농도에서 40 %의 抑制率을 보였다. 이는 甘草가 다른 補氣藥物들에 비해, 고농도에서 어느 정도의 細胞毒性이 있었다는 것을 의미한다.

Splencyte에 anti-CD3만을 넣고 檢液을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投與한 후 48시간 培養하여 cytokine분비를 측정한 결과 IL-2 분비량은 대조군에 비해 비슷하거나 약간 감소하였다. IFN-g와 IL-4 분비는 黃芪를 제외하고는 대조군에 비하여 비슷하거나 증가하였는데 IFN-g의 경우는 白朮이 가장 높았고 IL-4는 人蔘 처리군이 가장 높았다. T cell의 성장 인자라 할 수 있는 IL-2가 증가하지 않은 걸 고려할 때 이 두 가지 사이토카인의 증가는 세포수의 절대적 증가로 인한 결과는 아님을 유추할 수 있다. 한편 IL-12는 白朮을 제외하고는 모두 대조군에 비해 낮았다. 대식세포 및 기타 APC 들이 분비하는 IL-12는 염증과정을 유도하지만 아울러 Th1형 세포의 분화를 촉진하는데 이 결과로 보건대 한약 추출물이 IL-12 생산을 유도하여 IFN-g분비를 자극하지는 않았음을 알 수 있었다.

CD4 T cell에 anti-CD3와 anti-CD28을 넣고 檢液을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投與한 후 48시간 培養하여 cytokine 分泌를 測定한 결과, IL-2의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 黃芪와 白朮이 각각 11 %, 42 % 감소하였으나 나머지 한약처리군에서는 分泌量이 증가하였다. 分泌量의 增加는 CD4 T cell이 활성화되었다는 뜻이며, 補氣藥物이 비장세포의 IL-2 분비에 별다른 영향을 주지 못한 것과는 달리 anti-CD28로 인한 signaling pathway를 強化시킨 結果로 思料된다. 增加量은 白朮, 人蔘, 甘草, 黃芪의 순이었다. IFN-g는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 모두 비슷한 증가율을 보였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 黃芪와 白朮이 각각 55 %, 12 % 減少하였다. 黃芪와 白朮이 농도에 따라 增加과 抑制의 兩面을 보여주는 현상은, 농도조절을 통해 이들 藥物을 cytokine 분비조절에 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것이라 하겠다. IL-4는 모든 藥物에서 현저한 증가율을 보였다. CD4 T cell을 Th1/Th2 polarization시킨 후, 그 상층액의 IFN-g와 IL-4를 비교한 결과, IFN-g는 모든 藥物 처리군이 대조군에 비해 減少하였고, IL-4는 人蔘과 甘草 처리군에서 增加하였다. Th1 cytokine 分泌抑制가 가장 뚜렷한 藥物은 甘草였고, Th2 cytokine 分泌促進이 가장 뚜렷한 약물은 人蔘이었다. IL-4가 增加하였다는 것은 Th2에 選擇적으로 作用하여 Th2 response를 增強하였다는 意味이고, IFN-g가 減少하였다는 것은 Th1에 選擇적으로 作用하여 Th1 response를 抑制하였다는 것을 意味한다. 따라서 이 결과는 人蔘, 甘草가 in vitro 상에서 Th1 cell 分化를 抑制하고, Th2 cell 分化를 促進하는 효과가 있음을 밝혀주고 있다. 또한 보기약물이 IFN-g의 면역조절작용이 있음을 이 실험을 통해 확인할 수 있었는데 polarization을 하지 않은 neutral 상태에서는 IFN-g분비가 증가했으나 인위적으로 IFN-g를 많이 나오

게 만든 Th1 cell 환경에서는 오히려 감소하였기 때문이다.

본 실험으로 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草의 補氣藥物이 CD4 T cell에 作用하여, cytokine 分泌量에 영향을 미쳐 免疫機能을 조절하였고 특히 人蔘과 甘草는 Th2 cell을 選擇적으로 活性化하고, Th1 cell을 選擇적으로 抑制시킴으로써, 免疫機能 異常亢進으로 나타나는 자가면역질환에 免疫細胞의 活性低下의 誘發없이, 使用할 수 있을 것으로 추정된다.

결 론

人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草의 抽出物이 마우스 免疫細胞의 cytokine분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여, mitogen으로 자극받은 비장림프구의 增殖能을 測定하고, 비장림프구 및 CD4⁺ T cell에 4種의 補氣藥物을 投與한 후, cyto- kine 發顯量 및, CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 polarization하여, cytokine 發顯量을 測定한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

Mitogen의 자극을 받은 비장림프구는 한약을 처리하였을 때 대조군에 비해 증가하였다. 증가율은 人蔘이 대조군보다 38% 증가하여 가장 높았고, 이때의 檢液濃度는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. Splencyte에 檢液을 投與, 培養 後, IFN-g와 IL-4 分泌는 增加하였고, IL-2와 IL-12는 다소 減少하였으나 유의성은 없었다. CD4⁺ T cell에 檢液을 投與, 培養 後, IL-2, IFN-g, IL-4는 전반적으로 增加하였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 黃芪와 白朮의 IL-2는 각각 11 %, 42 % 減少하였고, IFN-g는 각각 55 %, 12 % 減少하였다. CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 polarization하였을 때 한약을 처리한 경우 Th1 세포는 모두 IFN-g가 減少하였고, Th2 세포의 경우 IL-4는 人蔘과 甘草 처리군에서 增加하였다.

以上的 結果로 볼 때, 人蔘과 甘草는 Th2 cell을 選擇적으로 活性化하여 免疫機能을 強化시키면서, Th1 cell을 選擇적으로 抑制시킨다. 따라서 人蔘과 甘草가 Th1 cell의 과도한 성장으로 나타나는 자가면역질환에 免疫細胞의 活性低下를 誘發하지 않는 치료제로 使用될 수 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

1. 김우호. 면역-기묘한 생체방어와 생명유지의 기구-. 춘천: 강원대학교출판부; p2, 3, 1993.
2. 裴秉哲 譯. 今釋 黃帝內經 靈樞. 서울: 成輔社; p489, 1995.
3. 王冰 編撰, 李元起 懸吐. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社; p327, 1994.
4. 王冰 編撰, 李元起 懸吐. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社; p105, 1994.
5. 劉正才, 尤煥文. 中醫免疫. 中廣: 中廣出版社; 1983.
6. 章育正. 虛證和實證病因의 免疫狀態. 上海: 上海中醫藥雜誌 6; p44, 45, 1984.
7. 傳方. 中醫 免疫思想 及成就. 中醫雜誌; 25(11): 56, 1984.
8. 李淵台 譯. 最新 免疫學. 서울: 集文堂; p34, 1985.
9. 閔昌弘, 柳在根. 最新微生物學. 서울: 高文社; p79-137, 1978.

10. 李東炫. 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 항알레르기와 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사논문 1990.
11. 裴延擇. 小兒補血湯, 加味小兒補血湯 및 加減小兒補血湯이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사논문 1989.
12. Saimah Arif, Arjmand Mufti. CRASH COURSE Immune, Blood, and Lymphatic system. 서울: 한우리; p7-9, 2000.
13. Tough DF, Sun S, Zhang X, Sprent J. Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. Immunol Rev. 170: p39-47, 1999.
14. 하대유. lymphokine을 중심으로 면역조절에 대하여. 녹십자 의보; 19: p232-246, 1991.
15. Lydyard P, Grossi C. Cells involved in the immune response. In Immunology edited by Roitt I, Brostoff J and Male D 4th ed. Mosby; p22-218, 1996.
16. 황우석, 정희재, 주창엽, 이재성, 이경기, 이형구 외. 소청룡탕 치료 기관지천식 환자의 혈액내 호산구 수와 혈청 Ig E 및 T 림프구 이형의 변화. 대한한방내과학회지;23(1): p83-90.
17. 대한동의생리학회 편. 동의생리학. 서울: 경희대학교 출판국; p90-91, 1993.
18. 王冰 編撰, 李元起 懸吐. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社; p1, 1994.
19. 王冰 編撰, 李元起 懸吐. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社; p327, 1994.
20. 王冰 編撰, 李元起 懸吐. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社; p105, 1994.
21. 全國韓醫科大學 本草學教室 編. 本草學. 서울: 永林社; 1994.
22. 김호철, 한약약리학, 서울: 집문당, p422-427, 2001.
23. 黔南三十二醫院上海醫療院: 貴州藥訊 (2): 34, 1976.
24. 中國醫學技術員基礎醫學研究所等: 中華醫學雜誌(1): 23, 1979.
25. 陰健, 郭力弓. 中藥現代研究與臨床應用 I, 北京: 學苑出版社: 1994.