

보기익혈 복합방, 바이오 큐의 면역조절 효과

이효정 · 길재호¹ · 백남인² · 라정찬³ · 김성훈*

경희대학교 동서의학 대학원, 1: 경희대학교 체육대학 스포츠의학과, 2: 경희대학교 생명과학대학, 3: RNL 생명과학(주)

Immunomodulatory Effect of Bio-Q, Bokiikhyul Prescription

Hyo Jung Lee, Jae Ho Khil¹, Nam In Baek², Jeong Chan Ra³, Sung Hoon Kim*

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, 1: Department of Sports Medicine, 2: School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University, 3: RNL Co.

Bio-Q is a modified prescription with the activities of supplementing Qi and blood in human body. In the present study, immunomodulatory effect of Bio-Q was examined. After oral administration of Bio-Q for 7 days to Balb/c mice, splenocytes were isolated and immunological experiments were performed. Bio-Q significantly increased the proliferation of splenocytes exposed to concanavalin A (Con A), while it did not in case of lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Bio-Q also significantly increased CD3/CD19, CD4/CD8 and NK cells by flow cytometric analysis. In addition, Bio-Q significantly enhanced the level of INF- γ in splenocytes, but not TNF- α by ELISA. These results strongly suggest that Bio-Q has immunomodulatory activity through the regulation of T cell mediated immune pathway.

Key words : Bio-Q, immunomodulatory, Con-A, LPS, Flow cytometer

서 론

면역의 초기개념은 단지 어떤 전염성 질환의 재감염에 대한 방어기능으로 인식되었지만¹⁾ 오늘날에 와서는 “외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에서 불필요한 산물 등을 비자극적인 항원으로 인지하고 특이하게 반응하여 항체를 만들어 이것들을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상”으로 정의됨으로써 자연저항성과 획득저항성을 포괄한 생체방어기구로 그 개념이 확대되었고²⁾, 최근에는 면역요법의 하나인 종양면역이 각광을 받게 되었는데 여기서는 암의 생성을 Gross(1943)와 Foley (1953)가 밝힌 TSTA (tumor specific transplantation:종양 특이항원)에 의해 Burnet이 주장한 면역감시기능의 통제를 벗어나 체내의 면역계에서 이상세포를 “비자기”로 인식하지 못하고 초기에는 보호하여 암성장을 돕게 되어 암세포를 비자기로 인식할 때는 이미 늦다고 보고 있다. 이에 면역학적 치료기전은 주로 T 임파구에 의한 세포성면역반응, K 세포에 의한 항체의존성세포 독성반응(ADCC)과 NK 세포에 의한 비특이적 자연살해 세포반응 등에 의해 암세포를 표적세포로 인식하고 작용하여 파괴시키

는 것으로 보고 있다³⁾.

한편 동양의학에서는 질병의 발생원리에 대하여 “正氣存內 邪不可干”, “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人” 및 “邪氣所湊 其氣必虛” 등의 내용⁴⁾을 바탕으로 질병의 발생에는 인체의 저항력(정기)의 허약이 주인이 되는 것으로 인식하고 이의 치료에는 부정법을 위주로 하면서 거시법을 겸하는 것이 타당하다고 인식하고 있는데 이는 곧 면역의 이론과 일맥상통하다고 인식되고 있다⁵⁾. 따라서 최근에는 주로 보기익혈하는 생약과 한방처방을 이용하여 주로 T cell, NK cell 및 macrophage 등의 활성도를 살펴보는 연구가 활발히 진행되었다⁶⁻¹⁰⁾.

본 연구에 활용된 바이오큐는 백화사설초, 홍삼, 당귀 등 10종으로 구성된 한방 복합제로 기초실험을 통해 선정되어 배합된 처방이다. 본 실험실에서는 바이오큐가 항전이효과가 있음을 확인하였고, 그 기전을 밝히는 일환으로 면역조절과 관련된 실험을 in vitro와 in vivo에서 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출

본 실험에서 사용한 바이오 큐(Bio-Q)의 구성 한약재는 총

* 교신저자: 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대 동서의학대학원

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2005/05/30 · 수정 : 2005/07/01 · 채택 : 2005/08/03

10종으로 Table 1에 기재되어 있다. 국산 백화사설초는 부산의 대도농산에서, 아가리쿠스는 부여 아가리쿠스 영농조합에서, 매실농축액은 지리산 서재골 농원에서, 홍삼농축액은 라이프 트래컴에서, 나머지 약재는 대효제약에서 구입하여 Bio-Q를 제조하였다. 추출 방법은 바이오 큐 60 g에 증류수 1500 ml을 넣고 2시간 열탕 추출 하였으며, 두 번 반복하였다. 추출액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하고, 동결 건조하여 19.05 g (yield= 31.75%) 의 분말을 얻어 실험 시에는 분말을 증류수에 용해하여 사용하였다.

Table 1. Constituent herbs of Bio-Q

약명	학명	산지	용량 (g)
백화사설초	<i>Oldenlandia diffusa (WILLD) ROXB</i>	한국	20
홍삼	<i>Panax ginseng C. A. Meyer.</i>	한국	4
저령	<i>Polyporus umbellatus</i>	중국	4
백복령	<i>Poria cocos(SCHW)</i>	중국	4
진피	<i>Citrus unshiu MARKOVICH</i>	한국	4
당귀	<i>Angelica gigas NAKAI</i>	한국	4
산약	<i>Dioscorea japonica THUNB.</i>	한국	4
백출	<i>Atractylodes macrocephala KOIDZ</i>	중국	4
아가리쿠스	<i>Agaricus blazei Murill</i>	한국	10
매실	<i>Prunus mume SIEB. et ZUCC.</i>	한국	2
총량			60

2. 실험동물

면역실험을 위하여 대한바이오링크 부터 4주령의 Balb/C 생쥐 수컷을 공급받아 실험당일까지 고품사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃, 습도 60±5 %를 유지하였으며, 밤과 낮의 12시간의 주기를 유지하는 전통적 실험 조건을 유지하였다

3. 비장세포 증식능 측정

비장세포를 2X10⁵/50µl 로 RPMI 배지에 희석한 다음 96 well-plate에 가하고 mitogen으로 Con A (2 µg/ml)와 LPS (10 µg/ml)를 넣고, 다양한 농도 (62.5µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml)의 Bio-Q를 spleen cell 이 들어있는 plate에 가했다. 72시간동안 37 °C incubator에서 배양한 다음 XTT (1mg/ml) 1ml에 PMS(1.53mg/ml) 10µl를 가한 혼합액 30µl를 가하고 2시간 정도 37 °C에 방치한 후 . microplate reader 기에서 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

4. 바이오 큐의 투여 및 비장 적출

바이오큐를 Balb/C 생쥐에게 7 일간 10, 50 및 100 mg/kg 등의 용량으로 경구투여 하였으며, 경구투여 후 9 일째 비장세포를 적출하였다.

1) 비장 백혈구 현탁액 조제

BALB/C를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하고 Scheme 1과 같이 비장 백혈구 현탁액을 제조한다. 세포

처리 및 형광염색용 완충액으로는 Ca²⁺과 Mg²⁺이 들어 있지 않은 Satining buffer를 사용하였다. 적출한 비장을 100 mesh (sigma,U.S.A)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson, U.S.A)에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직덩어리를 침전시킨 후 상층액을 취해 2회 세척하고 0.83 % NH₄Cl 용액을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 용혈시킨다. 다시 2회 세척하고 RPMI 1640-10% FBS (sigma, U.S.A)로 1x10⁶ cells/ml가 되도록 희석하였다.

5. Flow cytometric analysis

1) 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)

면역 형광염색은 전과정을 0-4 °C에서 실시하였고, 배양한 비장 세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한 후 5ml FACS tube(Becton Dickinson,U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300rpm,5min)한다. 각각의 1차항체 Culture sup.을 100µl 씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 ice에서 반응시킨다. 사용한 1차항체는 3회 세척 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat Ig F(ab)2 fragment 1:100(Tago,U.S.A) 희석액 50µl를 가하고 40분간 반응시켜 후 300회 세척 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex 한 후 FACScan(Becton dickinson,U.S.A)으로 분석한다.

2) 유세포 분석

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACS tcan(Becton dickinson,U.S.A)를 이용하여 분석한다. 시료 당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며 Consort 30 프로그램을 이용, 분석한다. data의 분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 위에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 CD3,CD19,CD4, CD8, NK cell의 비율을 산출 하였다.

6. 사이토카인 생산능 측정

비장임파구 현탁액에 Con A (2 µg/ml)와 LPS(10 µg/ml)을 각각 처리하여 배양후 24시간에 soup을 모아 cytokine을 정량하였다, ELISA 는 Becton Dickinson 사의 Mouse ELISA kit를 사용하였으며 manufacturer protocol에 의해 실시하였다. 사용한 cytokine assay antibody의 종류는 IFN-γ(cat# 550582), TNF-α (cat# 551502) 였으며 microplate reader를 사용하여 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

7.통계처리

모든 데이터는 Mean ± SE로 표시하였고, Student's test 로 대조군과 비교하여 P value를 구하였다.

결과 및 고찰

1. Bio-Q의 비장세포 증식능에 대한 효과

Fig. 1에 나타난 바와 같이 비장세포에 T 및 B 세포의

mitogen으로 알려진 Con A (2 µg/ml) 및 LPS(10 µg/ml)를 Bio-Q와 함께 농도별로 처리하여 mitogen에 대한 반응성을 조사하였던 결과, Con A와 Bio-Q를 비장세포에 처리한 농도 (62.5, 125, 250 µg/ml)에서 단독 Con A만 처리한 대조군에 비해 T 림프구를 유의적으로 증식하는 효과를 보여 주었다. 그러나 Bio-Q를 정상군에 투여한 경우와 B세포 증식에 관여하는 LPS를 병용 처리 할 경우에도 유의적인 변화를 인정할 수 없었다. 따라서 주로 보기하는 본초효능이 강한 약재로 구성된 Bio-Q는 주로 체액성 면역 보다는 세포성 면역과 보다 밀접한 상관성이 있는 것으로 볼 수 있었다.

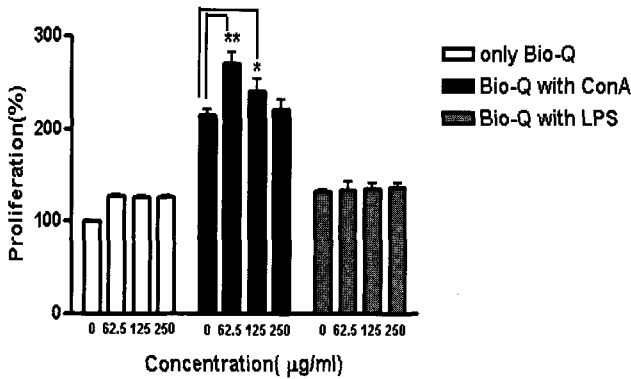


Fig. 1. Effect of Bio-Q on proliferative activity of spleen cells exposed to mitogens *: Statistically significant value compared with untreated control (* p<0.05, ** p<0.01)

2. Bio-Q의 면역세포 유형에 대한 효과

Bio-Q를 7일간 경구투여 한 Balb/c 생쥐를 9일째에 비장을 적출하여 면역세포에 대한 작용을 평가하기 위하여 FACS 분석법에 의해 CD3, CD19, CD4, CD8, NK 세포유형에 대한 특이적 효과를 분석하였다. 동물실험시에 투여한 Bio-Q의 용량은 10, 50 및 100 mg/kg이었다. CD3 (total T-cell)/CD19(Total B-cell) 생성능 실험에서 Bio-Q를 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 10 mg/kg에서부터 2배이상 total T-cell을 유의성있게 증가시켰으나, CD19은 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 부터 대조군에 비하여 1.5배가량 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2). CD4(Helper T-cell)/CD8(Cytotoxic T-cell) 생성능 실험에서는 CD4가 대조군에 비하여 50 mg/kg에서 유의성 있는 증가를 보여주었으며, CD8도 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성있는 증가를 보여 주었다 (Fig. 3). NK cell 생성능 실험에서는 대조군에 비하여 10 mg/kg, 50 mg/kg에서 2배가량의 유의성있는 증가를 보여 주었다(Fig. 4). 이 결과는 Bio-Q가 체액성과 세포성 면역을 모두 자극하여 면역체계를 활성화 시키는 면역조절 물질로서 작용을 하는 것으로 볼 수 있는데, in vitro면역 증식능에서는 Bio-Q가 주로 세포성 면역과 상관성이 많은 것으로 나타난 점으로 보아 동물실험에서 체액성 면역기능을 조절하게된 것은 세포성 면역 활성을 통한 체액성 면역조절효과로 추정된다. 특히 항암효과와 밀접한 관련성이 있는 면역유형인 NK세포에 대한 효과에서도 Bio-Q가 유의성을 보였던 점은Bio-Q가 본 실험실에서 항암 및 항전이 효과를 보였던(data not shown) 결과와 미루어, Bio-Q가

면 주로 T세포 및 NK 세포 등을 활성화시켜 면역력을 회복시켜 암의 증식을 억제할수 있음을 보여 주고 있다^{11,12)}.

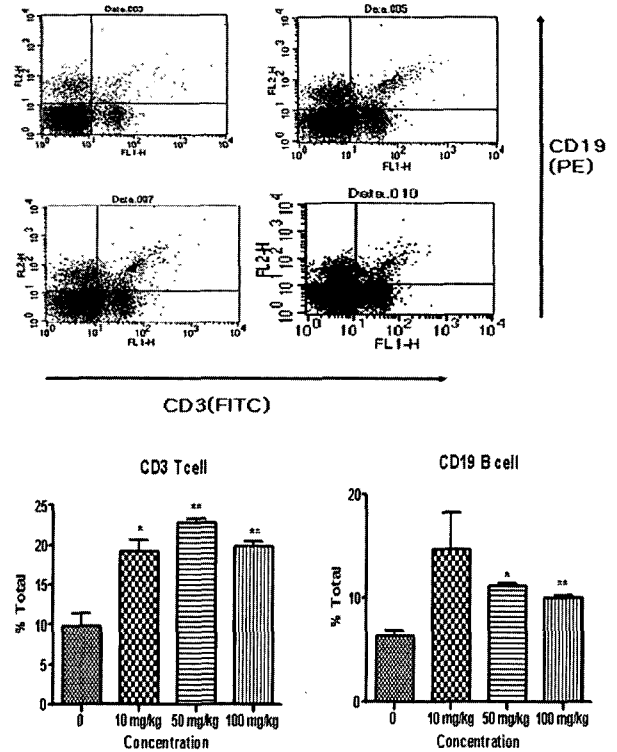


Fig. 2. Effect of Bio-Q on CD3/CD19 phenotypes of spleen cells of Balb/C *: Statistically significant value compared with untreated control(* p<0.05, ** p<0.01)

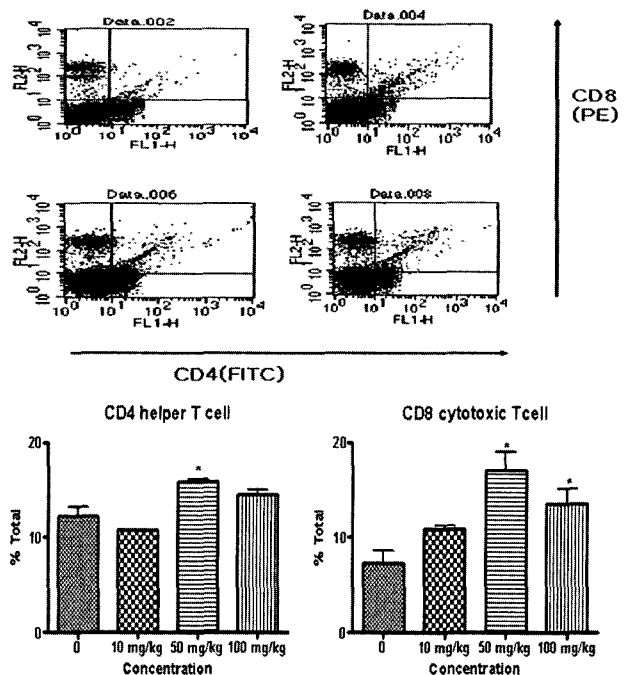


Fig. 3. Effects of Bio-Q on CD4/CD8 phenotypes of spleen cells of Balb/C *: Statistically significant value compared with untreated control(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

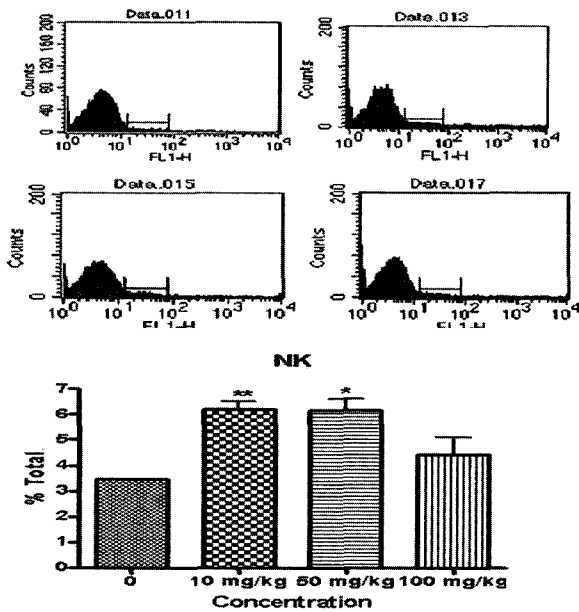


Fig. 4. Effect of Bio-Q on NK cells in the spleen of Balb/C *. Statistically significant value compared with untreated control(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

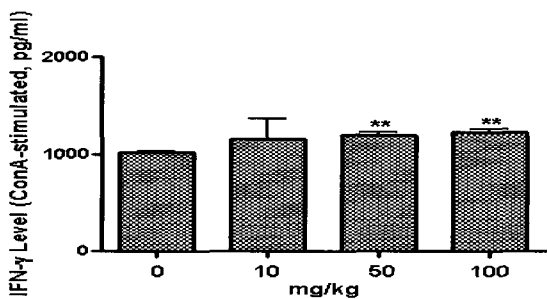


Fig. 5. Effect of Bio-Q on the level of IFN-γ in spleen cells. *. Statistically significant value compared with untreated control(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

3. Bio-Q의 cytokine 생산

Mitogen인 Con A와 LPS에 의해 자극을 받아 분비되는 cytokine중 주로 T helper cell에서 분비되는 INF-γ와 염증 및 B cell과 상관성이 많은 TNF-α cytokine이 Bio-Q에 의하여 조절되는지를 ELISA 법을 이용하여 측정하였다. Con A에 자극을 받은 INF-γ는 단독 Con A에 비하여 Bio-Q를 50mg/kg과 100 mg/kg를 투여한 용량에서 유의적으로 INF-γ의 생성을 촉진함을 알 수 있었다(Fig. 5). 또한 INF-γ의 다량의 발현은 세포로 하여금 2'-5'-oligoadenylate synthetase와 같은 효소를 합성하게 하는데, 이들 효소는 바이러스의 RNA 혹은 DNA의 복제를 방해하여 바이러스의 복제를 억제하는 역할을 할 뿐만 아니라, NK 세포가 특이 면역반응을 통해 항암 및 항바이러스 효과를 보이는 것으로 보인다^{13-14,16}. 그러나 LPS에서 자극을 받은 TNF-α는 투여 용량별로 증가되는 경향은 보였지만 유의적인 효과는 인정되지 않았다 (Fig. 6). 이러한 결과는 Bio-Q가 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 cytokine인 interleukin,

interferon 등의 생산을 조절함으로써, T 면역세포에 활동을 지원하여 세포조직 기능을 활성화시켜, 면역담당 세포의 신생을 촉진시키는 것을 사료된다¹³).

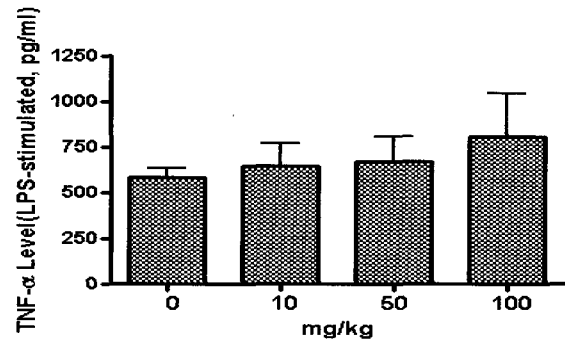


Fig. 6. Effect of Bio-Q on the level of TNF-α in spleen cells.

결론

보이기혈하는 구성약물로 구성된 Bio-Q의 면역활성을 실험적으로 평가하기 위하여, Balb/c 생쥐의 비장세포를 분리하여, 비장세포의 증식능 효과와 면역세포 유형에 따른 면역 효과, 비장세포에서의 cytokine 발현양상에 미치는 효과를 평가하였다. 비장세포의 증식능 실험에서 Bio-Q는 단독 Con A만 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 보여 주었지만, 정상군에 투여한 경우나 LPS를 처리한 투여군에서는 유의성 있는 변화가 없었다. 또한 이를 확인하기 위해 Bio-Q를 경구 투여하고 FACS를 이용한 면역유형 평가에서도, Bio-Q는 T 림프구인 CD3, B 림프구인 CD19, helper T helper 림프구인 CD4, T cytotoxic 림프구인 CD8 및 NK cell 들을 모두 증가시켜 세포성 및 체액성면역에 관여함을 확인할 수 있었다. 사이토카인중 Con A로 활성화 시킨 INF-γ의 발현양상은 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성 있는 증가를 보였지만, TNF-α의 발현에서는 유의적인 변화가 없었다. 이러한 결과를 종합하면 보이기혈하는 한약으로 구성된 Bio-Q는 면역조절을 통해 질병의 예방과 치료에 널리 활용 가능할 것으로 된다.

감사의 글

본 과제는 농림기술관리센터의 연구비(202055-03-3-CG000) 지원에 의해 수행되었는 바 감사드립니다.

참고문헌

1. 梁學道. 臨床微生物學 및 免疫學. 新學社, 서울, p 67, 1979.
2. 菊地浩吉會. 最新免疫學(李淵臺譯). 集文堂, 서울, p 33, 315, 1985.
3. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울대학교출판부, p 265, 272, 1989.
4. 洪元植編. 精校黃帝內經東洋醫學研究院, 서울, p 13, 69, 318, 1981.
5. 劉正才. 中醫免疫,中國, 重慶出版社, p 8-13, 1983,

6. 金光湖 外. 數種韓藥劑가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生
産抑制作用에 미치는 影響, 조영식, 博士華甲論文集, p
1041-1051, 1981.
7. 嚴宗正. 正邪論新釋, 新中醫, 6:5-6, 1984.
8. 沈承抗. 中醫與免疫, 浙江中醫學院報 14(2):22-24, 1990.
9. 金德鎬. 歸茸湯이 免疫機能에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫
學會誌, 6(2):55-63, 1985.
10. 河大有 外. 人蔘에 關한 細菌學 및 免疫學的 研究, 第II報, 人
蔘抽出物投與가 細菌感染에 對한 抵抗에 미치는 影響, 全北
大學校論文集, 45, 1979.
11. Arttrsson, P., Edman, P. and Ericsson, J.L. E.: Macrophage
stimulation with some structurally related polysaccharides.
Scand. J. Immunol. 25, 245, 1987.
12. Petersen, R.D., Reinhold, W. and Tyborczyk, J. Cytokines in
cosmetology. cosmetic and Toietries Magazine. 112, 165, 1997.
13. Goldsby, R.A., Kindt, T.J. and Osborne, B.A. Kuby
immunology 4th ed., W. Freeman and Company, New
York, 303, 2000.