

# 溫裏藥인 附子, 乾薑, 肉桂, 吳茱萸의 면역조절효과 비교

손길현 · 신상우 · 권영규<sup>1</sup> · 김상찬<sup>2</sup> · 박종현\*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실,  
1: 대구한의대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

## Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Aconiti lateralis Preparata Radix*, *Zingiberis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex* and *Evodiae Fructus*

Gil Hyun Son, Sang Woo Shin, Young Kyu Kwon<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>2</sup>, Jong Hyun Park\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,  
1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,  
2: Department of Prescription, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

This study was carried out to investigate the comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Aconiti lateralis Preparata Radix*(PR), *Zingiberis Rhizoma*(ZR), *Cinnamomi Cortex*(CC) and *Evodiae Fructus*(EF). The parameter examined to assess apparent immunomodulatory effect of the water-extracted PR, ZR, CC and EF included the regulation of Nitric oxide (NO). Also, ZR and EF represent the expression of Th1/Th2 type cytokine, the change of B cell phenotype. The water-extracted PR, ZR, CC and EF inhibited NO production and iNOS protein expression in LPS stimulated RAW 264.7 macrophage cells. In the Th1 and Th2 cytokine expression, the water-extracted ZR and EF induced IL-2, IFN $\gamma$  and IL-10 mRNA gene expression. Therefore, it seems that the water-extracted ZR and EF have a inducing effect of Th1 and Th2 type cytokines. In the Flow cytometry analysis, the water-extracted ZR and EF changed B cell phenotype (CD45R/B220), did NOT in PR and CC. The water-extracted PR, ZR, CC and EF have a reducing effect of immune suppression cause by Methotrexate (MTX), an agent of immune suppression. These results suggest that the immunomodulatory effects of the water-extracted ZR and EF may be, in part, associated with the inducing IL-2 and IFN $\gamma$  mRNA gene expression in and regulation of NO production in macrophage cells.

Key words : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, *Zingiberis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Evodiae Fructus*, Th1/Th2 cytokine, NO, Methotrexate

### 서론

免疫이란 생체가自己和非自己를 식별하는 기구이며, 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 비자기인 항원으로 인식하고 특이하게 반응하여 항체를 만들어 이를 배제함으로써 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이다<sup>1,2)</sup>.

이러한 면역의 개념은 한의학에 있어서 질병의 발생 및 발

전은 일정한 조건하에서의 邪正抗爭의 표현<sup>3)</sup>이라고 본 正邪論에서 찾아 볼 수 있다. 正은 正氣를 지칭하며 正氣는 인체의 일체 抗病力을 통칭하고, 邪는 邪氣로서 邪氣는 인체 내외의 각종 발병인자를 총칭한다<sup>3,4)</sup>. 그러므로 正氣는 질병발생에 있어서 內的 근거가 되므로 인체의 正氣가 왕성하면 邪氣가 쉽게 침범하지 못하고, 邪氣는 正氣의 허한 틈을 타서 침범하여 비로소 질병이 발생한다<sup>5)</sup>. 따라서 正氣虛弱은 질병발생의 근본적 요인이 되므로, 최근에는 正氣를 회복시키므로써 신체내 면역력을 조절하고 신체 방어기전에 효과적인 한약재 탐색연구가 활발히 진행되고 있다<sup>6-10)</sup>.

正氣를 補益하고 虛弱을 扶持하여 虛證을 치료하는 補益藥

\* 교신저자 : 박종현, 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교

· E-mail : mojuri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248

· 접수 : 2005/05/31 · 수정 : 2005/07/02 · 채택 : 2005/08/05

의 종류는 氣血陰陽의 네 방면으로 나누어 補氣藥, 補陽藥, 補血藥, 補陰藥으로 분류되며<sup>11)</sup>, 溫裏藥은 溫裏祛寒하는 효능을 가지고 裏寒 證候를 치료하며 또한 陽虛로 陰寒이 内生한 諸症에 대하여 補陽하는 효능이 있어<sup>12)</sup> 신체내 면역력을 조절하는 효능이 있을 것으로 생각된다.

溫裏藥의 대표 약물로는 附子, 乾薑, 吳茱萸, 肉桂 등이 있는데, 이들 약물에 대한 기존의 연구보고로는 柳 등<sup>12)</sup>의 附子 煎湯液이 家兔의 부신피질 및 腎臟 기능과 血漿 Renin 활성도에 미치는 영향, 鄭 등<sup>13)</sup>의 附子藥鍼이 鎮痛 및 消炎作用에 미치는 影響, 李 등<sup>14)</sup>의 附子 經口投與 및 足三里 藥鍼이 정상 白鼠의 體重, 血清 變化, 尹 등<sup>15)</sup>의 乾薑, 桂皮가 妊娠에 미치는 影響, 柳 등<sup>16)</sup>의 黃連 및 乾薑이 胃液分泌 腸管運動 心臟搏動에 미치는 影響, 金 등<sup>17)</sup>의 修治에 따른 乾薑 중의 6-Gingerol 含量 分析, 金 등<sup>18)</sup>의 肉桂의 煎湯方法이 成分流出과 藥效에 미치는 影響-劑型 改變, 白 등<sup>19)</sup>의 肉桂로부터 抽出된 Cinnamaldehyde가 F9 畸形 癌腫細胞株에 미치는 抗癌效果, 南 등<sup>20)</sup>의 培養細胞 Cytokine 分泌에 대한 肉桂 메타놀 抽出物의 效果, 姜<sup>21)</sup>의 吳茱萸가 先天性 高血壓흰쥐의 血壓에 미치는 영향, 李<sup>22)</sup>의 吳茱萸 분획물의 항우울증 효과, 朴 등<sup>23)</sup>의 足三里에 시술한 吳茱萸藥鍼이 抗癌 및 免疫기능에 미치는 영향 등이 있으나, 이들 약물의 면역조절 효과에 대한 연구보고는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 溫裏藥의 대표약물인 附子, 乾薑, 吳茱萸 및 肉桂의 면역조절 작용을 비교하고자 RAW264.7 마우스 대식세포주의 증식능과 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포와 인체 말초혈구세포의 사이토카인 발현, 마우스 비장세포의 B 세포에 미치는 영향 및 인체 면역세포주의 T 세포에 미치는 영향을 연구한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 검액의 준비

본 실험에 사용된 溫裏藥은 Table 1과 같다. 實驗에 使用된 藥材는 대구한의대학교 附屬 韓方病院에서 구입하였고, 良質의 것을 精選하여 사용하였다.

Table 1. Oriental Crude Drugs for 溫裏藥

Oriental Crude Drug	Crude Drug	Scientific name	Dose (g)
附子	Aconitum carmichaeli	<i>Aconitii lateralis Preparata Radix</i>	40
乾薑	Zingiberis officinale	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	40
肉桂	Cinnamomum cassia	<i>Cinnamomi Cortex</i>	40
吳茱萸	Evodia rutaecarpa	<i>Evodiae Fructus</i>	40

상기 약물 40g씩을 증류수 1200ml를 첨가하여 2시간 동안 중탕하여 검액 700ml를 각각 추출하였고, 추출한 검액들은 멸균 거여즈를 이용하여 1次 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15分間 遠心分離를 실시하여 상층액만을 채취한 다음 이를 1.2 $\mu$ m와 0.45 $\mu$ m

의 membrane filter(Milipore Co., USA)로 除菌하여 사용하였다.

#### 2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)대한바이오파마(충북 음성, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55 $\pm$ 2%를 유지하였다.

#### 3) 면역억제제 준비

Methotrexate (MTX : C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>, Sigma, U.S.A)를 RPMI1640배지에 20mg/ml로 만든 후 실험에 따라 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 비장세포 분리

에테르 마취 후 마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출 하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장 세포로 만든 후 4 $^{\circ}$ C, HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-paque를 이용하여 임파구층을 모은 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A.) 배지로 한번 더 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켰다. 일정액을 취하여 0.4% trypan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 살아 있는 비장 세포 수를 측정하여 사용하였다.

#### 2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포주와 인체 면역세포주인 Jurkat T 세포주를 ATCC로부터 분양 받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 5% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin를 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 비장세포 증식능 실험

마우스 비장세포를 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/100 $\mu$ l 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 100  $\mu$ l가 되게 조정하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 48시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면 배양액 100  $\mu$ l에 시약을 20  $\mu$ l첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 1시간 30분 배양한 후 ELISA reader 490 nm에서 측정하였다. 임파구 증식 결과는 실험군의 [(평균 O.D.) - (평균background O.D.) $\pm$ S.D] 값으로 표시하였다.

#### 4) Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를

측정하여 표준 곡선을 얻었다.

5) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 및 cytokine 발현 측정

RNA분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 TRIzol 900  $\mu$ l를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100  $\mu$ l를 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5× RT buffer 2  $\mu$ l, 10 mM dATP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dGTP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dTTP 0.25  $\mu$ l, 10 mM dCTP 0.25  $\mu$ l, MMLV reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, RNase inhibitor (28 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, 50  $\mu$ M oligo dT primer 0.5  $\mu$ l, DEPC-DW 4  $\mu$ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controllar; MJResearch, Inc.)에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10× PCR buffer 3  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8  $\mu$ l, 10 mM dATP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dGTP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dTTP 0.3  $\mu$ l, 10 mM dCTP 0.3  $\mu$ l, 50  $\mu$ M sense 및 antisense primer 0.25  $\mu$ l, Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l, Promega Co.) 0.25  $\mu$ l를 혼합하고, 여기에 D.W.를 넣어 최종 용액량이 20  $\mu$ l되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5  $\mu$ l를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에 3분간 1 cycle 반응 후, 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간 35 cycles 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

6) 인체 말초혈액 채혈 및 단핵구 분리와 cytokine 발현 측정

신체 건강한 20대 남성들에게서 말초혈액을 채혈하고, 채혈한 말초혈은 Heparin으로 처리한 tube에 넣고 Ficoll-Hypague (Amersham Bioscience, Sweden)을 이용하여 1600rpm에서 30분간 원심분리하여 말초혈단핵구를 분리하였다. 분리한 세포는 RPMI 1640 media (Hyclon, USA)로 3회 washing한 후, 10% fetal bovine serum(Hyclon, USA), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco, USA)이 첨가된 RPMI 1640 media 에 부유시킨 뒤 60 $\mu$ l dish에 2×10<sup>6</sup> (n=6) 의 농도로 세포를 넣고 LPS(Sigma, USA)와 한약재를 바로 처리한 후 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양시켰다. 이후 上記와 동일한 방법으로 TRIzol을 이용하여 RNA를 분리하고 RT-PCR을 거쳐 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co. Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 3.과 같다.

7) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현

세포에서의 단백질 분리는 lysis buffer( 50mM Tris-Cl, 25mM EDTA, 650mM NaCl, 5% Triton X-100, 100X PMSE, 100X protease inhibitor cocktail, 5X lysis buffer)를 이용하여 분리하였다. 추출된 단백질을 95°C에서 5분간 가열한 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후 Protran<sup>®</sup> nitrocellulose membrane 에 전이시켰다. 10% skim milk를 함유한 PBST(0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 incubation하면서 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, anti-iNOS 항체와 함께 incubation 후 ECL 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 iNOS 단백질 발현을 조사하였다. 대조 단백질 밴드로 HSP70을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 관찰하였다.

8) Flow cytometer를 이용한 마우스 비장세포의 B세포 Phenotypic analysis

각 실험군의 비장세포의 B 세포 phenotype의 변화를 조사하기 위하여 마우스 비장세포에 각각의 한약재를 처리하고 48시간 배양한 후 배양된 비장세포를 수거하여 cold wash buffer로 세척한 후 10 $\mu$ l의 R-phycoerythrin(R-PE)-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 mAb를 제조회사의 설명에 따라 염색한 후 4°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan(Becton Dickinson, BD biosciences, USA)을 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

9) Flow cytometer를 이용한 인체 면역세포(Jurkat)의 T 세포 Phenotypic analysis

각 실험군의 인체 면역세포인 Jurkat cell의 T 세포 phenotype의 변화를 조사하기 위하여 Jurkat 세포에 각각의 한약재를 처리하고 48시간 배양한 후 배양된 Jurkat 세포를 수거하여 cold wash buffer로 세척한 후 각각 10 $\mu$ l씩의 anti-human CD3, anti-human CD4 및 anti-human CD8 $\alpha$ 를 제조회사의 설명에 따라 염색한 후 4°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan(Becton Dickinson, BD biosciences, USA)을 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

Table 2. Primer sequence used for detection of Th1/Th2 type cytokine and iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-2	5'-GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' 5'-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IFN $\gamma$	5'-CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3' 5'-GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'
IL-4	5'-ACA AAA ATC ACT TGA GAG AGA TCA T-3' 5'-AGT AAT CCA TTT GCA TGA TGC TCT T-3'
IL-6	5'-CTC GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A-3' 5'-ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T-3'
IL-10	5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA-3' 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A-3'
iNOS	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

Table 3. Primer sequence used for detection of Th1/Th2 type cytokine

	Oligonucleotide sequence
$\beta$ -actin	5'-TCA TGC CAT CCT GCG TCT GGA CCT-3' 5'-COG GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG-3'
IFN $\gamma$	5'-GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' 5'-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IL-2	5'-ACA AAA ATC ACT TGA GAG AGA TCA T-3' 5'-AGT AAT CCA TTT GCA TGA TGC TCT T-3'
IL-4	5'-CTC GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A-3' 5'-ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T-3'
IL-6	5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA-3' 5'-CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A-3'
IL-10	5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3' 5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

성 적

1. RAW264.7 마우스 대식세포의 세포증식능의 변화

대표적인 溫裏藥인 附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸 물추출액이 RAW264.7 마우스 대식세포주의 세포증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 약재별 물추출액을 농도별(10, 100 $\mu$ g/ml)로 처리하여 대식세포증식에 미치는 영향을 관찰하였다. RAW 264.7 대식세포의 증식능은 乾薑 물추출액의 경우 10 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml 모두에서 유의성 있게 증가하였으며, 肉桂와 吳茱萸 물추출액의 경우는 100 $\mu$ g/ml에서 유의성 있게 증가하였다. 반면, 附子 추출물은 세포증식능의 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

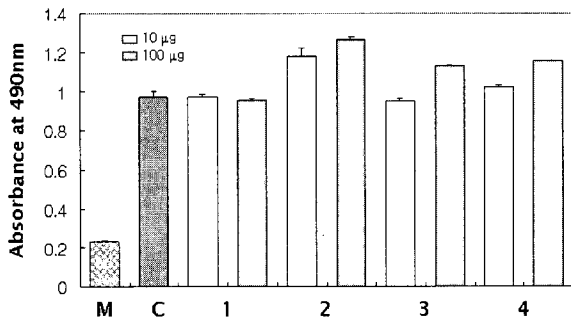


Fig. 1. Effect of on the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with 10 or 100 mg/ml of *Aconiti lateralis Preparata Radix*, *Zingiberis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Evodiae Fructus* for 24hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean + S.D in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates significant difference ( $p < 0.05$ ). M : Media only, C : Cell only, 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

2. 면역억제제에 의한 RAW264.7 세포증식능의 변화

면역억제제에 의해 저하된 세포증식능의 변화를 알아보기 위하여, Methotrexate 면역억제제를 이용하여 RAW264.7 마우스 대식세포주에서 세포증식능이 50% 억제되는 MTX 농도(100 $\mu$ g/ml)에 附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸의 물추출액 100 $\mu$ g/ml를 처리하여 MTX에 의한 세포증식억제에 미치는 효과를 살펴 보았다. MTX 면역억제제와 병용처리시 乾薑, 吳茱萸 물추출액의 경우 세포증식 억제가 현저하게 감소되었으며, 附子, 肉桂 물추출액

처리에 의해 세포증식 억제가 다소 감소되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2).

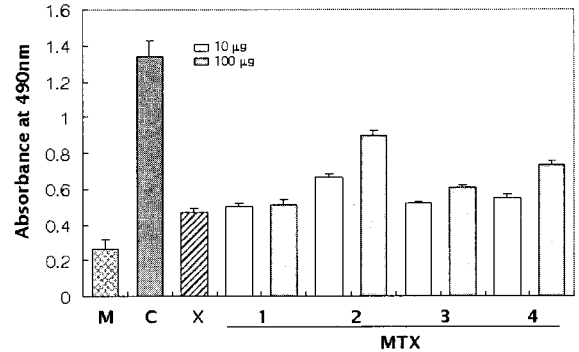


Fig. 2. Effect of on the cell proliferation in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with 10 or 100 mg/ml of *Aconiti lateralis Preparata Radix*, *Zingiberis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Evodiae Fructus* for 24hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean + S.D in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates significant difference ( $p < 0.05$ ). M : Media only, C : Cell only, X : MTX, 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*.

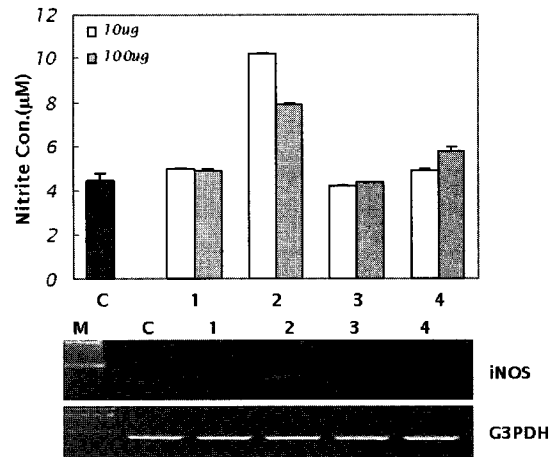


Fig. 3. Effect of Various Herbal Extracts on NO production and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with Various Herbal Extracts for 24hr. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Total RNA was prepared, and iNOS mRNA was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

3. RAW264.7 대식세포주에서 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현

대표적인 溫裏藥들의 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성능에 관한 효과를 살펴보기 위하여 附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸를 10 및 100 $\mu$ g/ml의 용량으로 24시간 배양하여 대식세포에서 NO 생성능에 관하여 조사하였다. 乾薑 물추출액의 경우 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군과 다른 溫裏藥에 비해 2배 이상으로 NO 생성능이 크게 증가하고 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 약간 감소되는 것이 관찰되었으며, 吳茱萸 물추출액의 경우 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 NO 생성능이 유의하게 증가하였다. 반면, 附子和 肉桂의 경우는 10 및 100 $\mu$ g/ml의 농도 모두에서 NO 생성능의 차이가 관찰되지

않았다 (Fig. 3). NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 큰 쪽으로 증가하였던 乾薑 물추출액의 경우만 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었으며, NO 생성능이 乾薑에 비하여 미약하거나 변화가 없었던 附子, 肉桂 및 吳茱萸 물추출물에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 없었다 (Fig. 3).

4. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포주에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제효과

附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸의 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 LPS와 이들 약재를 동시에 처리하고 NO 생성능의 조절 및 Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리시, 附子 물추출액의 경우 LPS 단독 처리군에 비해 다소 감소하였으나 큰 차이를 보이지 않았고, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 4). NO 생성 조절과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, LPS 자극에 의해 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸에서는 iNOS 단백질 발현을 관찰할 수 없었고, 附子(100 $\mu$ g/ml)의 경우만 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 단백질 발현이 관찰되었다 (Fig. 4).

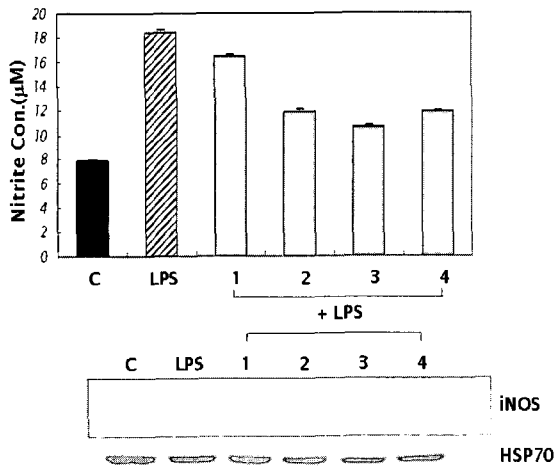


Fig. 4. Effect of Various Herbal Extracts on NO production and iNOS protein expressions in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 $\mu$ g/ml LPS in the presence of Various Herbal Extracts for 24h. The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. The protein extracts were prepared, and then the samples analyzed for iNOS expression by Western blotting as described in the method. HSP70 was used as control protein. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

5. 마우스 비장세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향

附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸의 T 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 약재를

처리한 후 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조약물로는 T 세포 특이 mitogen인 Concanavalin A (Con. A)를 사용하였다. 마우스 비장세포에 각 추출액을 100 $\mu$ g/ml 농도로 처리한 후 IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자 발현을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 IL-2, IFN $\gamma$  및 IL-10 유전자 발현이 관찰되었으며, 附子의 경우는 IL-2와 IFN $\gamma$  유전자가 약하게 발현되었고, 肉桂의 경우에는 관찰대상 유전자가 모두 발현되지 않았다 (Fig. 5).

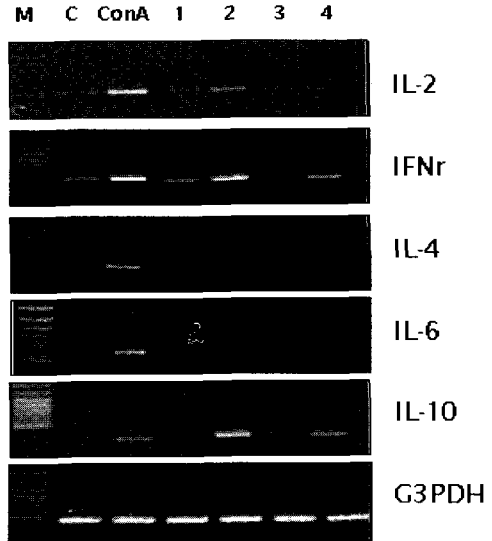


Fig. 5. Effect of Th1/Th2 Cytokine Gene Expressions on Various Herbal Extracts in Mouse Spleen Cells. RAW 264.7 cells were incubated with various herbal medicines in RAW 264.7 cells for 24h. Total RNA was prepared, and IL-2 cytokine gene expressions were analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control genes. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

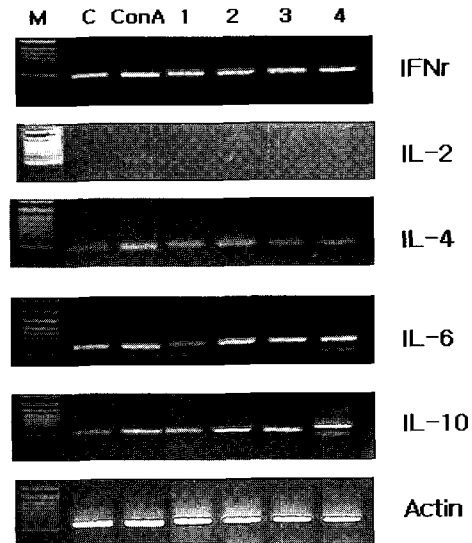


Fig. 6. Effect of Th1/Th2 Cytokine Gene Expressions on Various Herbal Extracts in Human peripheral blood mononuclear cells. Human peripheral blood mononuclear cells were incubated with various herbal medicines for 24h. Total RNA was prepared, and IL-2 cytokine gene expressions were analyzed by RT-PCR. Actin was used as control genes. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

6. 인체 말초혈구세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향

附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸의 T 세포에서의 작용에 미치는 효과를 다시 한번 확인하기 위하여 인체 말초혈액에서 단핵구를 분리하여 각 약재를 처리한 후 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조약물로는 T 세포 특이 mitogen인 Actin을 사용하였다. 인체 말초혈액 단핵구에 각 추출액을 100µg/ml 농도로 처리한 후 IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자 발현을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 IFN $\gamma$ , IL-6 및 IL-10 유전자가 강하게 발현되었으며, 附子和 肉桂의 경우는 IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자가 약하게 발현되었다 (Fig. 6).

7. FACs를 이용한 마우스 비장세포의 B 세포 Phenotypic analysis

附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸의 B 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포를 분리하여 각 추출액을 100µg/ml 농도로 처리한 후 PE-anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody를 이용해서 표현형을 분석하였다. 대조약물로는 B세포 특이 mitogen인 LPS를 처리하여 비교하였다. FACs를 이용한 분석 결과, 乾薑과 吳茱萸에서는 CD45R/B220의 변화가 관찰되었으나, 附子和 肉桂에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다 (Fig. 7).

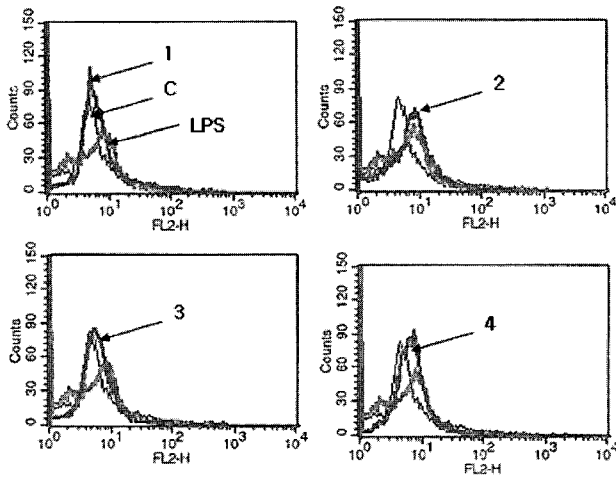


Fig. 7. Flow cytometry analysis of various herbal extracts-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells ( $4 \times 10^6$ /ml) were incubated with various herbal extracts or LPS for 48hr. The cultured spleen cells were stained with R-phycoerythrin(R-PE)-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 and analyzed by flow cytometry. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

8. FACs를 이용한 인체 면역세포의 T 세포 Phenotypic analysis

附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸가 인체 면역세포주인 Jurkat T cell에서 T 세포표면항원에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 각 추출액을 100µg/ml 농도로 처리한 후 anti-human CD3, CD4, CD8a를 이용해서 표현형을 분석하였다. 대조약물로는 T세포 특이 mitogen인 PHA를 처리하여 비교하였다. FACs를 이용한 분석 결과, 乾薑, 吳茱萸의 경우 CD3, CD4, CD8a에서 모두 큰 폭의 변화를 관찰 할 수 있었고, 附子の 경우 CD4, CD8a에서 유의

한 결과를 관찰 할 수 있었다. 肉桂의 경우는 CD3, CD4, CD8a에서 모두 별다른 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 8).

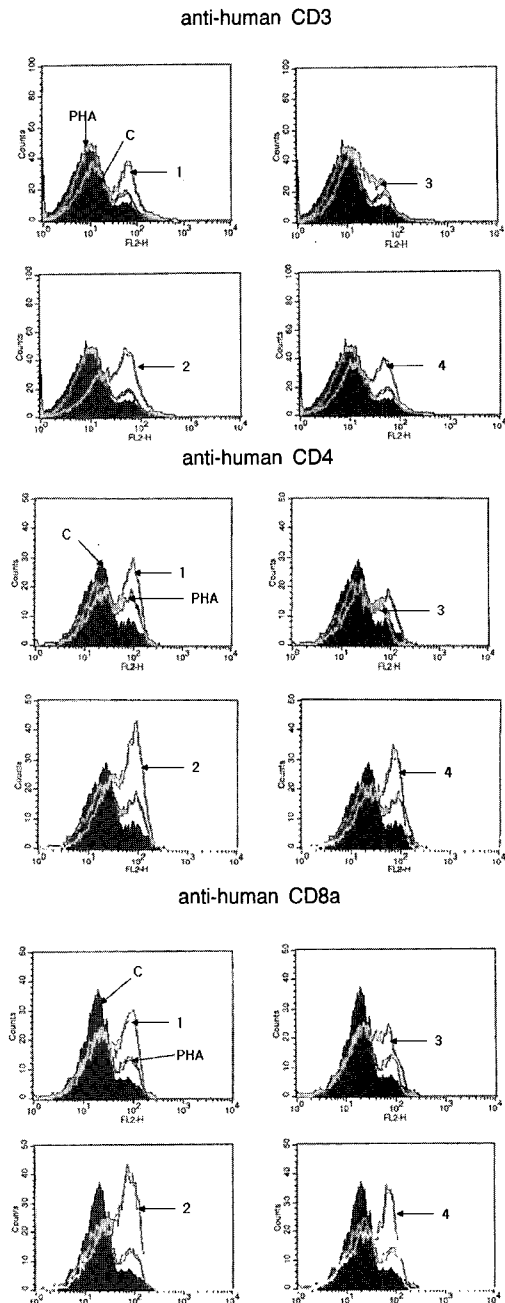


Fig. 8. Flow cytometry analysis of various herbal extracts-treated Jurkat T cells. Jurkat T cell ( $4 \times 10^6$ /ml) were incubated with various herbal extracts or PHA for 48hr. The cultured Jurkat T cells were stained with R-phycoerythrin(R-PE)-conjugated anti-human CD3, CD4, CD8a and analyzed by flow cytometry. 1 : *Aconiti lateralis Preparata Radix*, 2 : *Zingiberis Rhizoma*, 3 : *Cinnamomi Cortex*, 4 : *Evodiae Fructus*

고찰

한의학은 正氣 위주의 질병관을 가지고 있는데, 正氣虛는 모든 질병을 일으키는 내적(內的) 조건이므로, 正氣는 인체의 생리 활동을 정상적으로 유지시키고 내외의 병인으로부터 인체를 방

어하며 질병으로부터 회복시키므로 疾病因子에 관한 것보다는 인체의 생활능력과 疾病에 대한 抵抗能力을 중시하여 치료방법이 대부분 인체의 氣의 보존과 배양을 목표로 하고 있다<sup>9)</sup>.

이러한 관점은 서양의학 중에서 생체의 방어기능에 관련된 면역학적 관점과 많은 유사성을 가지고 있어 현대 의학에서 다루는 면역학적 개념과 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다. 면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나눌 수 있으며, 생체내에는 혈액, 임파절, 비장 및 위장관 등 여러 조직 및 기관에 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재한다. 면역에 관여하는 세포로는 T 세포, B세포, 대식세포 및 NK 세포 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 T 세포, B세포 및 대식세포로 알려져 있다<sup>12)</sup>.

溫裏藥은 溫裏祛寒하는 효능으로 裏寒證候를 치료하는 약물로서 附子, 烏頭, 乾薑, 肉桂, 吳茱萸, 蜀椒, 葶藶, 蕪澄茄, 丁香, 高良薑, 小茴香, 胡椒 등이 이에 속하는데<sup>11)</sup>, 임상상 多用되는 대표적인 약물로는 附子, 乾薑, 肉桂, 吳茱萸 등을 들 수 있다. 附子は 毛茛科(미나리아재비과)에 속한 다년생 초본인 附子의 子根을 加工한 것으로, 性은 熱 有毒하고 味는 辛甘하며 心·脾·腎經에 入하여 回陽補火, 散寒除濕의 효능으로 陰盛格陽, 大汗亡陽, 吐利厥逆, 心腹冷痛, 脾泄冷痢, 脚氣水腫, 小兒慢驚, 風寒濕痺 등을 치료한다<sup>11)</sup>. 乾薑은 生薑科(생강과)에 속한 다년생 초본인 生薑의 根莖을 乾燥한 것으로, 性은 熱 有毒하고 味는 辛하며 脾·胃·肺經에 入하여 溫中逐寒, 回陽通脈의 효능으로 心腹冷痛, 吐瀉, 肢冷脈微, 寒飲喘咳, 風寒濕痺, 陽虛吐衄, 下血 등을 치료하는데 多用된다<sup>11)</sup>. 肉桂는 樟科(녹나무과)에 속한 常綠喬木인 肉桂의 樹皮를 乾燥한 것으로, 性은 熱 無毒하고 味는 辛甘하며 腎·脾·膀胱經에 入하여 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈하는 효능으로 命門火衰, 肢冷脈微, 亡陽虛脫, 腹痛泄瀉, 寒疝奔豚, 腰膝冷痛, 經閉癥瘕, 陰疽, 虛陽浮越, 上熱下寒 등을 치료한다<sup>11)</sup>. 吳茱萸는 芸香科(우향과)에 속한 落葉灌木인 吳茱萸의 未成熟果實을 微火로 炕乾한 것으로, 性은 溫 有毒하고 味는 辛苦하며 肝·胃經에 入하여 溫中止痛, 理氣燥濕의 효능으로 嘔逆吞酸, 厥陰頭痛, 臟寒吐瀉, 脘腹脹痛, 脚氣, 疝氣, 口瘡潰瘍, 齒痛, 濕疹 등을 치료한다<sup>11)</sup>.

이상의 대표적인 溫裏藥들은 모두 溫熱한 性으로 溫中祛寒하고 益火助陽하는 효능이 있어서 인체의 면역력을 조절하는 작용과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되나, 아직 이에 대한 구체적인 연구는 접하지 못하였다. 따라서, 본 연구에서는 溫裏藥의 대표약물인 附子, 乾薑, 吳茱萸 및 肉桂의 면역조절 작용을 관찰하고자 실험하였는데, 대식세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 마우스 대식세포주의 세포증식능과 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현을, T세포에 미치는 효과를 비교하기 위하여 마우스 비장세포와 인체 말초혈구세포의 Th1/Th2 type cytokine의 발현 및 인체 면역세포주의 T세포 표현형의 변화를, B세포에 미치는 효과를 비교하기 위하여 마우스 비장세포의 B세포 표현형의 변화를 관찰 하였다. 대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증 등의 반응

에 중요한 역할을 하는데, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 reactive oxygen species(ROS) 와 IL-1, TNF $\alpha$  및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다<sup>24-26)</sup>.

본 실험에서는 대표적인 溫裏藥인 附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸 물추출액이 RAW264.7 마우스 대식세포주의 세포증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 약재별 물추출액을 농도별(10, 100 $\mu$ g/ml)로 처리하여 대식세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 乾薑 물추출액의 경우 10 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml 모두에서 유의성 있게 증가하였으며, 肉桂와 吳茱萸 물추출액의 경우는 100 $\mu$ g/ml에서 유의성 있게 증가한 반면, 附子 추출물은 세포증식능의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1). Methotrexate (MTX)는 면역억제제로서 생체에 투여하게 되면 DNA 합성을 저해하고 세포 독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소 현상을 초래하는 것으로 알려져 있다<sup>27-30)</sup>. 면역억제제에 의해 저하된 세포증식능의 변화를 알아보기 위하여, 대표적인 溫裏藥들이 MTX 처리에 의한 세포증식억제에 미치는 효과를 살펴 본 결과, MTX 면역억제제와 병용처리시 乾薑, 吳茱萸 물추출액의 경우 세포증식 억제 현저하게 감소되었으며, 附子, 肉桂 물추출액 처리에 의해 세포증식 억제가 다소 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 농도에 비례하여 마우스 대식세포의 증식이 유의하게 증가하였고, 면역억제제로 면역이 억제된 상황에서도 농도에 비례하여 세포증식이 증가한 것으로 볼 때, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸는 대식세포 증식능이 있음을 알 수 있다. 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 반응산소 중간 물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1, TNF $\alpha$  및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다.

산화질소(nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 nitric oxide synthetase (NOSs)에 의해 합성되며 신체의 다양한 생리적 과정에 관여하는데, NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 나눌 수 있다. cNOS는 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin 의존성으로 단시간 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리기능을 담당하며, 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS) 등이 있는데, 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 반면, iNOS는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도에 비의존성이며, lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다<sup>31-36)</sup>.

NO는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로, T 세포에서 유래된 사이토카인이나 외부 항원의 자극에 의해 활성화되어 생성되며 leishmaniasis, listeriosis 및 tularemia 등 세포 내 감염을 일으키는 미생물에 방어능, tuberculosis, leprosy 및 암 등에 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있고, 또한 대식세

포가 생성하는 NO가 필요 이상으로 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있어 대식세포의 면역반응 조절 연구에 많이 이용되고 있다<sup>37</sup>. NO는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저 농도의 NO는 신경전달 물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고되고 있다<sup>31-36</sup>. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키던가 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>33-36</sup>.

본 실험에서 대표적인 溫裏藥들의 RAW 264.7 대식세포의 NO 생성능에 관한 효과를 살펴본 결과, 乾薑 물추출액의 경우 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 2배 이상으로 NO 생성능이 크게 증가하고 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 약간 감소되는 것이 관찰되었으며, 吳茱萸의 경우 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 NO 생성능이 유의하게 증가한 반면, 附子和 肉桂의 경우는 10 및 100 $\mu$ g/ml의 농도 모두에서 NO 생성능의 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 3). NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 큰 쪽으로 증가하였던 乾薑 물추출액의 경우만 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다(Fig. 3).

대표적인 溫裏藥들이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능에 미치는 효과를 살펴본 결과, LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리시, 附子 물추출액의 경우 LPS 단독 처리군에 비해 다소 감소하였으나 큰 차이를 보이지 않았고, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 4). NO 생성 조절과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과, LPS 자극에 의해 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸에서는 iNOS 단백질 발현을 관찰할 수 없었고, 附子(100 $\mu$ g/ml)의 경우만 RAW 264.7 대식세포에 처리시 iNOS 단백질 발현이 관찰되었다(Fig. 4). 上記의 결과로 볼 때, 대표적인 溫裏藥들 중 乾薑은 NO 생성능과 과도한 NO 억제능이 가장 우수하고, 吳茱萸도 NO 생성능과 과도한 NO 억제능이 나타났으나, 肉桂는 과도한 NO 억제능만 관찰되었고, 附子의 경우는 NO 생성능이나 과도한 NO 억제능이 모두 없음을 알 수 있었다.

사이토카인(cytokine)은 선천 및 적응면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 선천면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 적응면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>38-39</sup>. 세포성 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응으로 T 세포는 Th1 림프구나 Th2 림프구로 분화되며, 이들 두 림프구는 상호길항작용에 의해 면역

체계를 유지하는 것으로 알려져 있다. 주로 Th1 림프구는 지연형 과민반응, 항미생물반응 및 종양에 관한 숙주면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며, Th2의 경우 즉시형과민반응, 천식 및 알러지 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 많은 연구에서 한 약재의 이러한 Th1 type 관여 면역반응과 Th2 type 면역반응을 조사하기 Th1세포와 Th2 type에서 분비되는 사이토카인 발현에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다<sup>38-40</sup>. IFN $\gamma$ 는 보조 T세포의 Th1 아집단의 특징 사이토카인으로, T 림프구와 NK 세포가 대식세포를 활성화하여 포식된 미생물을 죽이도록 하는 방법을 제공하며, 미감작 CD4<sup>+</sup> T 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진시키고 Th2 세포의 증식을 억제하며, 마우스의 B 세포에 작용하여 IgG2a으로의 전환을 촉진시키고 IgG1과 IgE 같은 IL-4 의존성 동형 전환을 저해한다<sup>40,41</sup>.

IL-2는 항원 인식으로 T 세포에 의해 생성되며 항원 특이세포를 증식시키고, NK 세포 등 다른 면역세포의 증식과 분화를 촉진시키며, 항원으로 활성화된 T 세포의 세포사멸을 가능케 한다<sup>40,41</sup>. IL-4는 IgE 항체의 생성과 미감작 CD4<sup>+</sup> 보조 T 세포로부터 Th2 세포 발생을 위한 주요 자극제로서, B 세포의 Ig 중쇄를 IgE 동형으로 전환하도록 자극하며 미감작 CD4<sup>+</sup> T 세포로부터 Th2 세포의 발생을 자극하고 분화된 Th2 세포에 대한 자가분비적 성장 인자로서 기능한다<sup>40,41</sup>. IL-6는 선천면역과 적응면역 모두에서 기능하는 사이토카인으로, 선천면역에서는 간세포의 급성단계 단백질 합성을 자극하여 염증의 전신적 효과를 야기하며, 적응면역에서는 항체 생성자로 분화되어 가는 B 림프구의 성장을 자극한다<sup>40,41</sup>. IL-10은 활성화된 대식세포와 수지상세포를 저해하여 선천면역과 세포매개면역의 항상성 조절에 관여한다. 즉 IL-10은 활성화된 대식세포에 작용하여 반응을 종결시키고 면역계를 미생물 감염이 제거된 후지 상태로 되돌리는 작용을 하는데, IFN $\gamma$  생성을 방해하며 T 세포 활성화를 저해하고 세포매개 면역반응을 종결시킨다<sup>40,41</sup>. 본 실험에서 대표적인 溫裏藥들이 T 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포의 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 IL-2, IFN $\gamma$  및 IL-10 유전자 발현이 관찰되었으며, 附子의 경우는 IL-2와 IFN $\gamma$  유전자가 약하게 발현되었고, 肉桂의 경우에는 관찰대상 유전자가 모두 발현되지 않았다(Fig. 5). 대표적인 溫裏藥들이 T 세포에서의 작용에 미치는 효과를 다시 한번 확인하기 위하여 인체 말초혈구세포의 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 IFN $\gamma$ , IL-6 및 IL-10 유전자가 강하게 발현되었으며, 附子和 肉桂의 경우는 IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자가 약하게 발현되었다(Fig. 6). 上記의 결과로 볼 때, 대표적인 溫裏藥들 중 乾薑과 吳茱萸는 Th1 type인 IFN $\gamma$ 과 IL-2 및 Th2 type인 IL-10 유전자 발현이 나타났고, 附子의 경우 주로 Th1 type의 유전자 발현이 나타났으므로, 각 약재들의 면역반응 조절에 이들 사이토카인이 관여 할 것으로 생각된다.

모든 혈액세포와 면역세포는 조혈간세포라는 단일한 원시적인 세포에서 분화되어 생긴다. 조혈간세포가 분화됨에 따라 면역세포의 표면에는 각기 독특한 유형의 세포 표면 단백질을 발현



하는데, 이를 CD(Cluster of Differentiation)라고 하며, 림프구 분화의 다양한 표식자에 대해 특이적인 단일클론 항체의 군을 의미한다<sup>42,43</sup>). CD45RB는 백혈구 공통 항원으로 주로 조혈세포에서 발현되며 T 세포 및 B 세포의 항원 수용체 매개적 신호전달에 중요한 역할을 하는 티로신 인산 분해 효소인 CD45의 이형이다<sup>40,41</sup>). CD3는 모든 T 세포에 있으며 몇 종류의 단백질로 구성된다. T 세포 항원 수용체(TCR)에 결합하여 항원 인식에 의한 신호를 세포핵에 전달하는 역할을 담당하며 TCR의 세포 표면에 발현된다<sup>40,41</sup>). CD4는 보조 T 세포의 표지가 되는 세포 표면 단백질로, T 세포 수용체가 제2형 주조직적합성 복합체(Class II MHC)에 결합된 항원성 펩티드를 인지하는데 중요한 역할을 하며, 제2형 주조직적합성 복합체의 측면에 결합하여 공동수용체로 작용한다<sup>40,41</sup>). CD8은 킬러 T 세포와 서프레스 T 세포의 일부가 가지고 있는 세포 표면 단백질로, T 세포 수용체가 제1형 주조직적합성 복합체(Class I MHC)에 결합된 항원성 펩티드를 인지하는데 중요한 역할을 하며, 제1형 주조직적합성 복합체의 측면에 결합하여 공동수용체로 작용한다<sup>40,41</sup>).

본 실험에서 대표적 溫裏藥들이 체액성 면역반응에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포에 B 세포 특이 표현형의 항체를 이용하여 표현형의 변화를 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸에서는 CD45R/B220의 변화가 관찰되었으나, 附子和 肉桂에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 7). 대표적인 溫裏藥들이 인체 면역세포주인 Jurkat T cell에서 T 세포표면항원에 미치는 효과를 관찰한 결과, 乾薑, 吳茱萸의 경우 CD3, CD4, CD8a에서 모두 큰 폭의 변화를 관찰할 수 있었고, 附子の 경우 CD4, CD8a에서 유의한 결과를 관찰할 수 있었던 반면, 肉桂의 경우는 CD3, CD4, CD8a에서 모두 별다른 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 8). 上記의 결과로 볼 때, 乾薑과 吳茱萸는 체액성 면역반응과 세포성 면역반응 모두에 관여하고, 附子는 세포성 면역반응에만 관여함을 알 수 있다.

이상의 결과로 보아 대표적인 溫裏藥들 중 乾薑과 吳茱萸가 생체에 면역반응 조절과 같은 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 생물 활성 조절자(BMR)로 작용할 수 있으리라 생각된다.

## 결 론

溫裏藥의 대표약물인 附子, 乾薑, 肉桂 및 吳茱萸 물추출물의 면역조절 작용을 관찰하고자 RAW264.7 마우스 대식세포의 증식능과 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포와 인체 말초혈구세포의 사이토카인 발현, 마우스 비장세포의 B세포 표면항원에 미치는 영향 및 인체 면역세포의 T세포 표면항원에 미치는 영향을 실험한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

마우스 대식세포의 세포증식능은 乾薑의 경우 10 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml 모두에서, 肉桂와 吳茱萸의 경우는 100 $\mu$ g/ml에서 유의성 있게 증가한 반면, 附子 추출물은 세포증식능에 별다른 변화가 없었다. 면역억제제에 의한 마우스 대식세포의 세포증식능은 乾薑, 吳茱萸의 경우 세포증식 억제제가 현저하게 감소되었으

며, 附子, 肉桂의 경우에는 세포증식 억제가 다소 감소되었다. 마우스 대식세포의 NO 생성능은 乾薑은 큰 폭으로, 吳茱萸는 유의하게 증가하였으나, 附子和 肉桂의 경우에는 별다른 차이가 나타나지 않았으며, NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사한 결과, 乾薑의 경우 마우스 대식세포에 처리시 iNOS 유전자 발현이 관찰되었다. LPS로 자극된 마우스 대식세포에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제효과를 관찰한 결과, 오수유의 경우는 10 $\mu$ g/ml의 농도에서는 LPS 단독 처리군과 차이가 없었으나, 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 유의하게 감소하였다. 마우스 비장세포의 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 IL-2, IFN $\gamma$  및 IL-10 유전자 발현이 관찰되었고, 附子の 경우는 IL-2와 IFN $\gamma$  유전자가 약하게 발현되었으며, 肉桂의 경우에는 관찰대상 유전자가 모두 발현되지 않았다. 인체 말초혈구세포의 Th1/Th2 type 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸의 경우 INF $\gamma$ , IL-6, IL-10 유전자가 강하게 발현되었고, 附子和 肉桂의 경우는 INF $\gamma$ , IL-4, IL-6 및 IL-10 유전자가 약하게 발현되었다. 마우스 면역세포의 B 세포 표현형을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸에서는 CD45R/B220의 변화가 관찰되었으나, 附子和 肉桂에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다. 인체 면역세포의 T 세포 표현형을 관찰한 결과, 乾薑과 吳茱萸에서는 CD3, CD4, CD8a에서 큰 폭의 변화를 관찰할 수 있었고, 附子の 경우 CD4, CD8a에서 유의한 결과를 관찰할 수 있었으며, 肉桂의 경우는 CD3, CD4, CD8a에서 모두 별다른 변화를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로 보아 대표적인 溫裏藥들 중 乾薑과 吳茱萸가 생체에 면역반응 조절과 같은 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 생물 활성 조절자(BMR)로 작용할 수 있으리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울. 서울대학교 출판부, 1-3, 1986.
2. 김세종. 면역학. 서울. 고려의학, 1-21, 1994.
3. 전국한의과대학병리학교실. 한방병리학. 서울. 한의문화사. 128-132, 2004.
4. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫. 6(5), 1984.
5. 上海中醫學院. 中醫學基礎. 香港. 商務印書館, 1977.
6. 김기환, 이인란, 정인성, 정희용, 윤연숙. 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현. 고려인삼학회지, 22:324-330, 1998.
7. 표명윤, 양기숙, 현수미. 상항버섯 추출물이 정상 마우스와

- cyclophosphamide 로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. 응용약물학회지, 9:194-200, 2001.
8. 백남인, 김영숙, 경종수, 박기현. 황기(黃耆)의 간기능 보호 성분. 생약학회지, 27:111-116, 1996.
  9. 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향. 대한면역학회지, 12:113-118, 1990.
  10. 길영성, 정승기, 이형구. 어성초 및 상국음이 면역기능에 미치는 영향. 대한한의학회지, 16:295-318, 1995.
  11. 전국한의과대학 본초학교수. 本草學. 서울. 영림사. 331-346, 544, 1991.
  12. 류도곤, 강순수. 附子 煎湯液이 家兔의 부신피질 및 腎臟 기능과 血漿 Renin 활성도에 미치는 영향. 대한동의생리학회지, 3(2):25-48, 1998.
  13. 정선희, 박동석. 附子藥鍼이 鎮痛 및 消炎作用에 미치는影響. 대한침구학회지, 14(1):334-346, 1997.
  14. 이견목, 김경식, 장종덕, 김기영. 附子 經口投與 및 足三里 藥鍼이 정상 白鼠의 體重, 血淸 變化에 관한 研究. 대한침구학회지, 16(1):269-282, 1999.
  15. 윤정미, 이경섭, 송병기. 乾薑, 桂皮가 妊娠에 미치는影響. 경희한의대논문집, 19(1):1-12, 1996.
  16. 류기원, 박동원, 유봉하, 각기환. 黃連 및 乾薑이 胃液分泌 腸管運動 心臟搏動에 미치는影響에 관한 연구. 대한한방내과학회지, 3(1):23-32, 1986.
  17. 김호경, 김영아, 황성원, 고병섭. 修治에 따른 乾薑 중의 6-Gingerol 含量 分析. 한국생약학회지, 33(4):291-295, 2002.
  18. 김윤경, 이상인, 안규석, 김호철. 肉桂의 煎湯方法이 成分流出과 藥效에 미치는影響-劑型改變에 관한 研究. 경희한의대논문집, 23(1):185-207, 2000.
  19. 백은경, 김대근, 이진우, 김원신, 전병훈, 우원홍, 정우열. 肉桂로부터 抽出된 Cinnamaldehyde가 F9 畸形癌腫細胞株에 미치는 抗癌效果. 대한동의병리학회지, 13(2):99-107, 1999.
  20. 남우열, 전병훈, 우원홍, 문형배. 培養細胞 Cytokine 分泌에 대한 肉桂 메타놀 抽出物의 效果. 대한동의병리학회지, 12(2):11211-11216, 1998.
  21. 강신인. 吳茱萸가 先天性高血壓흰쥐의 血壓에 미치는 영향. 대한한의학회지, 19(2):50-58, 1998.
  22. 이태희. 吳茱萸 분획물의 항우울증 효과에 대한 연구. 대한본초학회지, 13(1):139-145, 1998.
  23. 박기홍, 이병렬, 임윤경. 足三里에 시술한 吳茱萸藥鍼이 抗癌 및 免疫기능에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지, 20(3):115-128, 2003.
  24. 박재승, 이정호, 하대유. Capsaicin 전처치가 마우스 대식세포의 기능에 미치는 영향. 대한면역학회지, 22:39-49, 2000.
  25. Haslberger, A., Romanin, C., Koerber, R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. Mol Biol Cell. 3:451-460, 1992.
  26. Shacter, E., Arzadon, G.K., Williams, J.A. Stimulation of interleukin-6 and prostaglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. Blood, 82:2853-2864, 1993.
  27. 김창환, 고희균, 배원영. 황기수침(黃耆水鍼)이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 대한침구학회지, 11:49-66, 1994.
  28. 김일영, 이상재, 김광호. 하수오가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 대한예방한의학회지, 4:152-169, 2000.
  29. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 동국대학교대학원 박사학위논문, 1996.
  30. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Suh, S.I., Shin, S.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Lee, E.S., Kim, K.J., Kim, H.J. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J Ethnopharmacol, 84:193-198, 2003.
  31. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지, 39:52-63, 1993.
  32. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol, 35:21-28, 2000.
  33. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci, 69:625-635, 2001.
  34. Ishihara, T., Okura, T., Kohno, K., Tanimoto, T., Ikegami, H., Kurimoto, M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J Ethnopharmacol, 72:141-150, 2000.
  35. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol, 406:301-309, 2000.
  36. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of Rhodiola sachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacol, 76:119-123, 2001.
  37. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med, 28:217-226, 2000.

38. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211:24-32, 1996.
39. Shacter, E., Arzadon, G.K., Williams, J.A. Stimulation of interleukin-6 and prostaglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. *Blood*, 82:2853-2864, 1993.
40. Abbas, Lichtman. 강재성 외역. 세포분자면역학. 서울, 범문사. pp 243-274, 2004.
41. Janeway. 김태규 외역. 면역생물학. 서울, 라이프사이언스. pp 307-356, 2002.
42. 타다 토미오. 황상익 역. 면역의 의미론. 서울, 한울. pp 75-87, 100-103, 1998.
43. Roitt. 김주덕 외역. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사. pp 35-62, 1991.