

五加皮 · 地骨皮 병용투여가 면역반응에 미치는 영향

은재순* · 이경아 · 박 훈 · 권 진¹

우석대학교 약학대학, 1:한국재활복지대학

Effects of the Combined-administration of Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex Radicis on Immune Response

Jae-Soon Eun*, Kyung-A Lee, Hoon Park, Jin Kwon¹

College of Pharmacy, Woosuk University, 1:Korea National College of Rehabilitation & Welfare

Immunological activities of the combined-administration of Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex Radicis were examined in BALB/c mice. The 40% ethyl alcohol extract of Acanthopanax Cortex (AE) or the 40% ethyl alcohol extract of Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex Radicis (ALE) were administered *p.o.* once a day for 7 days, respectively. AE did not affect the viability of thymocytes, but ALE decreased the viability of thymocytes. ALE enhanced the viability of splenocytes increased by AE. Also, AE enhanced the population of cytotoxic T cell in thymocytes, and ALE enhanced the population of helper T cell compared with AE. Furthermore, AE increased the population of Thy1⁺ cells in splenocytes, and increased the population of splenic CD4⁺ cells. In addition, ALE enhanced the phagocytic activity which was decreased by AE. ALE decreased the production of nitric oxide increased by AE in peritoneal macrophages. These results suggest that ALE enhance an immune-regulative action of AE.

Key words : Acanthopanax Cortex, Lycii Cortex Radicis, thymocytes, splenocytes, phagocytic activity, nitric oxide

서 론

오가피 (*Acanthopanax Cortex*)는 오가피나무과에 속한 낙엽소관목인 오가피나무 (*Acanthopanax sessiliflorus*)의 근피로서去風濕, 强筋骨, 利水消腫등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 우리나라에 약 18종 이상의 다양한 품종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며²⁾, 악리작용으로는 고지혈증 억제작용³⁾, 혈당저하작용⁴⁾, 항산화작용⁵⁾, 면역증강작용^{6~8)}, 정자운동 증강작용⁹⁾, 항암작용¹⁰⁾ 등이 보고되었다. 지골피는 가지과 (*Solanaceae*)에 속하는 구기자나무 (*Lycium chinense Miller*)의 근피를 말린 것으로清熱涼血, 清肺熱, 退骨蒸勞熱 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 악리작용으로는 간보호효과¹²⁾, 항산화효과¹³⁾, 혈당강하작용¹⁴⁾이 있음이 보고되었다.

그러나 오가피와 지골피를 병용투여한 실험결과는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 실험에서는 오가피를 단독 투여하였을 때와 오가피와 지골피를 병용투여 하였을 때 면역능에 미치는

차이점을 규명하여 보고자, 특이적 면역반응을 주도하는 흥선세포 및 비장세포와 비특이적 면역반응을 주도하는 복강 대식세포에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 6주령 BALB/c계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, dark/light 12시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640, lipopolysaccharide, γ -interferon, lucigenin, MTT, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, zymosan은 Sigma Co., bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4 antibody, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220 antibody, FITC-conjugated

* 교신저자 : 은재순, 전북 원주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2006/04/07 · 수정 : 2006/05/25 · 채택 : 2006/06/14

anti-Thy1 antibody는 Dainippon seiyaku Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 오가피 (*Acanthopanax sessiliflorus*)는 산지에서 구입하여 사용하였으며, 지골피 (*Lycii Cortex Radicis*)는 건재상에서 구입하여 사용하였다. 오가피 투여군은 오가피 100g을 40% ethyl alcohol로 50 °C water bath에서 가끔 진탕하면서 48시간씩 2회 추출한 다음, 추출액을 여과 농축한 후, freeze dryer로 동결건조하여 4.2g (수득률; 4.2%)을 얻어 사용하였다 (이하 AE라함). 오가피와 지골피 병용투여군은 오가피 100g과 지골피 100g을 합하여 40% ethyl alcohol로 50 °C water bath에서 가끔 진탕하면서 48시간씩 2회 추출한 다음, 추출액을 여과 농축한 후, freeze dryer로 동결건조하여 14.1g (수득률; 7.1%)을 얻어 실험에 사용하였다 (이하 ALE라함).

4. Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki¹⁵⁾ 및 Mizel¹⁶⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 약물을 투여하지 않은 대조군, AE 투여군 및 ALE 투여군으로 분리하여 각각 300 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10분간 원심분리) thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다.

Macrophage의 분리는 약물을 투여하지 않은 대조군, AE 투여군 및 ALE 투여군으로 분리하여 각각 300 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 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 분리하여 사용하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage의 배양시에는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

5. 세포증식능 측정

분리한 생쥐의 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 각 sample의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann¹⁷⁾이 개발하여 Kotnik 등¹⁸⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 thymocytes 및 splenocytes를 각

각 RPMI 1640 배지로 희석하고 각 well에 1 × 10⁷ cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes에는 concanavalin A (Con A) 5 µg/ml를, splenocytes에는 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하고 은박지로 각 well을 덮어서 차광하였다. 배양 종료시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도를 100%로 환산하여 실험군의 흡광도를 백분율로 표시하였다.

6. Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다¹⁹⁾.

7. 복강 macrophage로부터 phagocytic activity 측정

분리한 복강 macrophage를 2 × 10⁶ cells/ml가 되도록 DME 배지(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 사용하였으며, 보관된 lucigenin 용액을 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. 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 되도록한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다^{20,21)}.

8. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 복강 macrophage를 24 well plate에 well당 2 × 10⁶ cells를 분주한 후 macrophage로 부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법²²⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylenediamine · 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.

9. 통계처리

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

실험성적

1. Thymocytes의 증식에 미치는 효과

대조군의 thymocytes에 mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, AE를 투여한 군은 $101.5 \pm 2.1\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, ALE를 투여한 군은 $89.7 \pm 1.5\%$ 로 AE를 투여한 군에 비해 감소하였다 (Fig. 1).

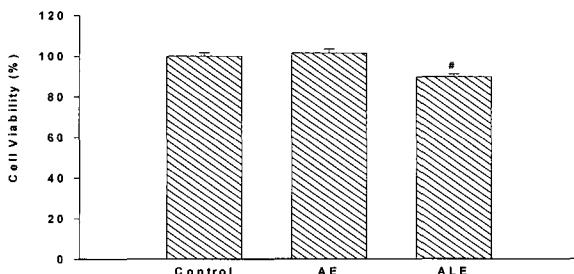


Fig. 1. Effects of the administration of *Acanthopanaxis Cortex* extract (AE) or the combined-administration of *Acanthopanaxis Cortex* extract and *Lycii Cortex Radicis* extract (ALE) on the cell viability of concanavalin A treated-thymocytes in mice. Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with concanavalin A (Con A), an activating mitogen of thymocytes. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from AE-treated group ($p<0.05$).

2. Splenocytes의 증식에 미치는 효과

대조군의 splenocytes에 mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, AE를 투여한 군은 $119.3 \pm 2.4\%$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, ALE를 투여한 군은 $130.5 \pm 2.1\%$ 로 AE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 2).

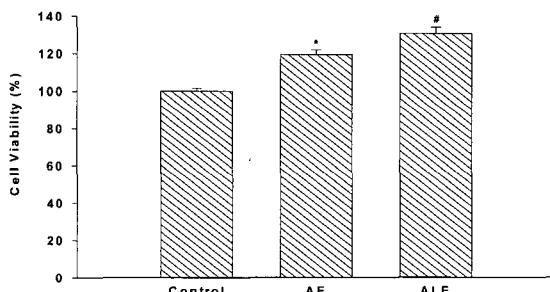


Fig. 2. Effects of the administration of AE or ALE on the cell viability of lipopolysaccharide treated-splenocytes in mice. Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with lipopolysaccharide (LPS), an activating mitogen of splenocytes. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. : Significantly different from control group ($p<0.001$). #: Significantly different from AE-treated group ($p<0.05$).

3. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4⁺) 세포의

population은 $12.3 \pm 0.3\%$ 이었으며, CD8 single positive (CD8⁺) 세포의 population은 $3.2 \pm 0.2\%$ 이었다. AE를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4⁺ 세포는 $12.6 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, CD8⁺ 세포는 $4.0 \pm 0.2\%$ 로 대조군에 비해 population이 증가하였다. ALE를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4⁺ 세포는 $15.3 \pm 0.4\%$ 로 AE 투여군에 비해 population이 증가하였으나, CD8⁺ 세포는 $4.5 \pm 0.3\%$ 로 AE 투여 군에 비해 별 차이가 없었다 (Table 1).

Table 1. Effects of the administration of AE or ALE on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Thymocytes Subpopulation (%)	
	CD4 ⁺ CD8 ⁻ cell	CD4 ⁺ CD8 ⁺ cell
Control	12.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
AE	12.6 ± 0.3	$4.0 \pm 0.2^*$
ALE	$15.3 \pm 0.4^*$	4.5 ± 0.3

Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. ; Significantly different from control group ($p<0.05$). *: Significantly different from AE-treated group ($p<0.001$).

4. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220 positive 세포 (B220⁺)의 population은 $32.4 \pm 1.0\%$ 이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1⁺)의 population은 $19.9 \pm 1.2\%$ 이었다. AE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220⁺ 세포의 population은 $33.5 \pm 1.8\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1⁺ 세포의 population은 $23.2 \pm 1.1\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다. ALE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220⁺ 세포의 population은 $34.3 \pm 1.5\%$ 로 Thy1⁺ 세포의 population은 $24.4 \pm 0.8\%$ 로 AE 투여군에 비해 별 차이가 없었다. 대조군의 splenocytes 중 CD4⁺의 population은 $15.8 \pm 0.5\%$ 이었으며, CD8⁺의 population은 $9.6 \pm 0.3\%$ 이었다. AE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 CD4⁺ 세포의 population은 $17.6 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으나, CD8⁺ 세포의 population은 $10.3 \pm 0.5\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. ALE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 CD4⁺ 세포의 population은 $18.9 \pm 0.5\%$ 로, CD8⁺ 세포의 population은 $10.2 \pm 0.4\%$ 로 AE 투여군과 별 차이가 없었다 (Table 2).

Table 2. Effects of the administration of AE or ALE on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Splenocytes Subpopulation (%)			
	B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁺
Control	32.4 ± 1.0	19.9 ± 1.2	15.8 ± 0.5	9.6 ± 0.3
AE	33.5 ± 1.8	$23.2 \pm 1.1^*$	$17.6 \pm 0.6^*$	10.3 ± 0.5
ALE	34.3 ± 1.5	24.4 ± 0.8	18.9 ± 0.5	10.2 ± 0.4

Samples (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. ; Significantly different from control group ($p<0.05$).

5. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안

생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 복강 macrophages로부터 생성되는 CL 양은 AE 투여군은 대조군에 비해 감소하였으며, ALE를 투여한 군은 AE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 3).

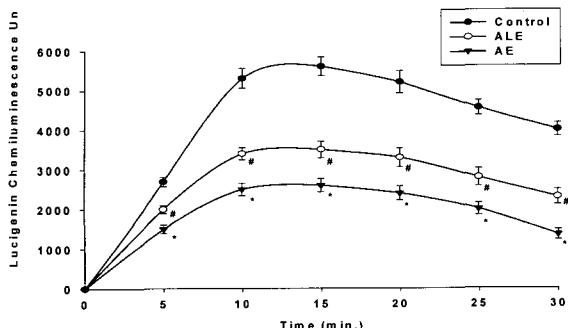


Fig. 3. Effects of the administration of AE or ALE on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. Samples (300 mg/kg) were administered p.o. once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. ; Significantly different from control group ($p<0.01$). #: Significantly different from AE group ($p<0.001$).

6. 복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과 대조군의 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 $17.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 이었으며, AE를 투여한 군은 NO 생성양이 $31.5 \pm 2.8 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, ALE를 투여한 군은 $21.8 \pm 3.4 \mu\text{M}$ 로 AE 투여군에 비해 감소하였다 (Fig. 4).

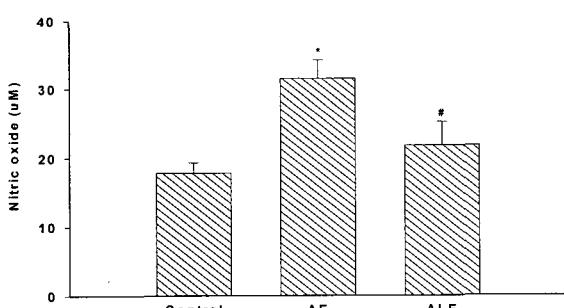


Fig. 4. Effects of the administration of AE or ALE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophage induced by γ -interferon and lipopolysaccharide. Samples (300 mg/kg) were administered p.o. once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hr in the presence of LPS and γ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. ; Significantly different from control group ($p<0.001$). #: Significantly different from AE group ($p<0.001$). The production of nitric oxide is $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ in the absence of γ -interferon and lipopolysaccharide.

고 칠

오가피는 風濕侵襲에 의한 關節疼痛, 屈伸不利, 腫痛拘攣을 주치하고, 肝腎陽虛의 陽痿, 陰濕, 腰背冷痛, 小兒行遲의 요약이

며, 肝腎不足의 風濕庫에 매우 효과적이고, 술로 양조하여 복용하면 風庫와 四肢攀急을 치료한다고 알려져 있다. 또한, 지골피는 陰虛發熱, 有汗骨蒸 및 肺熱咳嗽, 血熱出血에 사용하고, 虛火妄動, 血熱妄行의 吐血 血尿에도 효과가 있다고 알려져 있다²³⁾.

본 실험에서는 오가피와 지골피를 병용하였을 때의 면역능에 미치는 영향을 비교하고자 오가피와 오가피 및 지골피를 혼합하여 40% ethyl alcohol로 각각 추출하여 생쥐에 병용투여한 후 면역반응에 미치는 영향을 관찰하였다.

Thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A를 처리하였을 때 AE를 투여하고 분리한 thymocytes의 세포생존율은 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, ALE를 투여하였을 때는 AE를 투여한 군에 비해 감소하였다. 오가피는 thymocytes의 생존율에는 영향을 주지 않았으나, 오가피와 지골피를 병용하였을 때는 thymocytes의 생존율이 감소하였다는 실험결과는 오가피와 지골피를 병용하였을 때 오가피 단독 투여하였을 때에 비해 T 세포에 의해 주도되는 면역능이 감소할 수 있음을 의미하는 것이다.

Splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하였을 때, AE를 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 대조군에 비해 증가하였으며, ALE를 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 AE 투여군에 비해 더 증가하였다. 이 결과는 오가피가 B 세포에 의해 주도되는 면역능을 증가시키며, 오가피와 지골피를 병용하였을 때는 오가피 단독 투여군에 비해 B 세포에 의해 주도되는 면역능이 더욱 증가될 수 있음을 시사하는 것이다.

Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T (Th) lymphocyte 및 cytotoxic T lymphocyte로 분화되며, Th 세포로 분화된 세포들은 각종 cytokine을 분비하여 다른 T, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophages를 활성화시키는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 대조군의 thymocytes 중 CD4⁺ cells은 12.3%, CD8⁺ cells은 3.2%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4⁺CD8⁻ cells은 약 12%, CD4⁺CD8⁺ cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며²⁵⁾, AE를 투여하였을 때 CD8⁺ 세포의 population이 대조군에 비해 증가하였다. ALE를 투여하였을 때는 CD4⁺ 세포의 population이 AE 투여군에 비해 증가하였다. 이러한 결과는 오가피가 immature T 세포가 mature T 세포로 분화되는 것을 촉진하고 있으며, 오가피와 지골피를 병용하였을 때 mature T 세포로의 분화를 더욱 촉진하고 있음을 시사하는 것이다.

대조군의 splenocytes 중 B220⁺ 세포의 population은 32.4%, Thy1⁺ 세포의 population은 19.9% 이었으나, AE를 투여하였을 때 B220⁺ 세포의 population은 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1⁺ 세포의 population은 대조군에 비해 증가하였다. ALE를 투여하였을 때 B220⁺ 세포 및 Thy1⁺ 세포의 population은 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 대조군의 splenocytes 중 CD4⁺ cells은 15.8%, CD8⁺ cells은 9.6% 이었으며, AE를 투여하였을 때 CD4⁺ 세포의 population은 대조군에 비해 증가하였으나, CD8⁺

세포의 population은 대조군과 별 차이가 없었다. 또한, ALE를 투여하였을 때 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ 세포의 population은 AE 투여군에 비해 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 오가피가 splenocytes의 T 세포의 population을 증가시키며, 이러한 오가피에 의한 splenic T 세포의 population 증가는 주로 helper T 세포에 기인된 것임을 의미하는 것이다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진 된다²⁶⁾. 본 실험에서 사용한 phagocytic activity를 측정하는 방법은 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정하는 것이다²¹⁾. Macrophage로부터 생성되는 chemiluminescence양을 측정한 결과 AE를 투여하였을 때 대조군에 비해 감소하였으나, ALE를 투여하였을 때 증가하였다. 오가피가 macrophages의 탐식능을 억제하며, 오가피와 지골피를 병용하면 증가하였다는 결과는 지골피가 오가피에 의해 억제되는 비특이적 면역반응을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다. Han 등⁷⁾은 오가피에 함유된 polysaccharide가 *In vitro*에서 macrophages의 phagocytosis를 촉진시킨다고 보고하였다. 본 실험에서는 오가피에 의해 macrophages의 phagocytosis가 감소하였는데, 이는 *In vivo* 실험의 결과이기 때문에 차이가 나타났다고 생각되며, phagocytosis를 촉진시킨 성분이 polysaccharide이기 때문에 경구로 투여하였을 때 흡수되지 않았기 때문이 아닌가 추정된다.

Nitric oxide (NO)는 *in vivo*에서 T-lymphocyte의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다²⁷⁾. 본 실험에서 LPS와 γ -interferone을 처리하지 않은 대조군에서 분비되는 NO 양은 2.2 μ M 이었으며, LPS와 γ -interferone을 처리하였을 때는 17.8 μ M로 증가하였다. NO 생성은 AE를 투여하였을 때는 대조군에 비해 증가하였으나, ALE를 투여하였을 때는 AE를 투여하였을 때에 비해 감소하였다. NO는 활성화된 macrophages의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. AE에 의한 macrophages의 phagocytic activity가 감소된 것이 NO에 의한 것이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

오가피와 지골피를 병용투여하였을 때 생쥐의 면역능에 미치는 영향은 다음과 같다.

흉선세포의 생존율은 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 감소되었다. 비장세포의 생존율은 오가피를 투여하면 대조군에 비해 증가되었으며, 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 더욱 증가되었다. 흉선세포 중 CD8⁺ 세포의 population은 오가피를 투여하면 대조군에 비해 증가되었으며, 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 CD4⁺ 세포의 population이 증가되었다. 비장세포 중 B220⁺ 세포의 population은 오가피를 투여하면 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1⁺ 세포의 population은 대조

군에 비해 증가되었다. 비장세포 중 CD4⁺ 세포의 population은 오가피를 투여하면 대조군에 비해 증가되었으나, 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 비장세포 중 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ 세포의 population이 오가피 단독 투여군에 비해 별 차이가 없었다. 복강 macrophages의 phagocytic activity는 오가피를 투여하면 감소되며, 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 증가되었다. 복강 macrophages에서 생성되는 nitric oxide는 오가피를 투여하면 증가되며, 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 감소되었다.

이상의 실험결과 오가피와 지골피를 병용 투여하면 오가피 단독 투여군에 비해 면역능이 증가되는 경향을 나타내었다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 김동현 외. 한방약리학, 신일상사, pp 727-732, 2005.
2. 육창수. Medicinal herbs of Acanthopanax in Asia. Kyeong-Won Media, Seoul, 2001.
3. Shi, Z., Liu, C. and Li, R. Effect of a mixture of Acanthopanax senticosus and Elsholtzia splendens on serum lipids in patients with hyperlipidemia. Chung-Hsi-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih, 10, 155, 1990.
4. Shi, D.Y., Lu, Z.Z., Li, S.H. and Cai, Y. Hypoglycemic effect of saponin isolated from leaves of Acanthopanax senticosus. J. Chin. Mate. Med., 19, 683, 1994.
5. Kim, J.Y. and Yang, K.S. Screening of antioxidant activity of Acanthopanax species in vitro. Yakhak Hoeji, 47(5):361, 2003.
6. Han S.B., Park, S.K., Ahn, H.J., Yoon, Y.D., Kim, Y.H., Lee, J.J., Lee, K.H., Moon, J.S., Kim, H.C., Kim, H.M. Characterization of B cell membrane receptors of polysaccharide isolated from the root of Acanthopanax koreanum. Int. Immunopharmacol., 3(5):683, 2003.
7. Han S.B., Yoon, Y.D., Ahn, H.J., Lee, S.H., Lee, C.W., Yoon, W.K., Park, S.K., Kim, H.M. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of Acanthopanax senticosus. Int. Immunopharmacol. 3(9):1301, 2003.
8. Hwang, S.H., Ha, E.S., Yu, K.W., Shin, K.S., Lee, S.H., Lee, J.K., Lee, K.H., Yoon, T.J. and Park, W.M. Effect of the crude polysaccharides fraction from Eleutherococcus senticosus as a immunoadjuvant to soluble antigens. Yakhak Hoeji, 47(3):167, 2003.
9. Liu, J., Liang, P., Yin, C., Wang, T., Li, H., Li, Y. and Ye,

- Z. Effects of several chinese herbal aqueous extracts on human sperm motility in vitro. *Andrologia*, 36(2), 78, 2004.
10. Shan, B.E., Li, Q.X. and Liang, W.J. Experimental study on anti-tumor effects of cortex Acanthopanax senticosus in vivo and in vitro. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie Za Zhi*, 24(1), 55, 2004.
11. 김동현 외. 한방약리학, 신일상사, pp 687-688, 2005.
12. 김성훈, 조영주: 지글피 EA 분획의 CCl₄ 손상 간에 대한 보호작용. *동의병리학회지*, 11(2), 63, 1997.
13. 박성해, 한종현, 최동성, 안병용, 민갑순, 류승희, 곽준수: 자외선 B에 노출된 쥐 표피의 지질과산화에 대한 지글피 물추출물의 보호효과. *한국농화학회지*, 45(4), 218, 2002.
14. Kim, K.S., Shim, S.H., Jeong, G.H., Cheong, C.S., Ko, K.H., Park, J.H., Huh, H., Lee, B.J. and Kim, B.K. Anti-diabetic activity of constituents of Lycii Fructus. *The Journal of Applied Pharmacology*, 6, 378, 1992.
15. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2844, 1978.
16. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.*, 120, 1497, 1979.
17. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65, 55, 1983.
18. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 129, 23, 1990.
19. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873, 1994.
20. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174, 259, 1994.
21. 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, 1988.
22. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infec. Immunity*, 59(9), 3280, 1991.
23. 한국생약학교수협의회편: 본초학, (사)대한약사회, pp 305-308, 240-242, 2001.
24. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59, 1993.
25. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). U.S.A., pp 177-178 1994.
26. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45, 1, 1984.
27. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W.: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84(11), 828, 1992.
28. 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, 1996.