

## 알코올 섭취한 생쥐에서 황금(黃芩) 열수추출물이 생쥐의 면역기능에 미치는 영향

이인석<sup>1</sup> · 강경란<sup>2</sup> · 조여원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

<sup>2</sup>경희대학교 임상영양연구소

### Beneficial Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* on Immune Function in Mice Fed Alcohol

In Seok Lee<sup>1</sup>, Kyounglan Kang<sup>2</sup> and Ryo Won Choue<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,

<sup>2</sup>Research Institute of Clinical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

#### Abstract

High fat diet and chronic alcohol consumption cause hyperlipidemia, steatohepatitis and in some cases, cirrhosis. But the detailed mechanisms are not known. *Scutellariae Radix* (SR) has been known to have hepatoprotective effects. The aim of this study was, therefore, to determine whether SR water extract (100 mg/kg) could affect immune function in mice abused by long-term alcohol consumption (feed 25% ethanol in water for 1 month, *ad libitum*) with high fat diet (40% fat of total calorie). Mice received either a regular diet (RD, AIN 93) or a high fat diet (HD); high fat diet group were divided into ethanol group (HED) or ethanol with SR water extract group (HEDS). Food consumption was measured daily and body weights recorded weekly throughout the experiment. Immunological parameters (Ig A, Ig E, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) were measured from the serum and the supernatant of spleen lymphocytes from the all groups. The concentration of serum Ig A, Ig E and cytokines were significantly higher in the alcohol consumed groups. Also the concentration of supernatant of spleen lymphocytes, Ig A, Ig E, cytokines were significantly higher in the ethanol consumption groups. Otherwise, HEDS group were significantly lower than HED group. These results suggest that SR water extract may improve the haptic immune function in mice fed high fat diet with alcohol.

**Key words:** *Scutellariae Radix*, alcohol, high fat diet, immunoglobulin, cytokine

#### 서 론

알코올을 만성적으로 과량 섭취하면 고지혈증, 지방간과 같은 만성질환을 초래 할뿐만 아니라 면역계의 변화를 초래하여 면역기능이 감소하고 감염에 대한 감수성이 증가한다(1,2). McClain 등(3)의 연구에서 알코올 섭취에 의해 hepatic cytokine(IL-1, IL-6, IL-10) 농도의 변화가 유발되었음을 보고하였고, Dominguez-Santalla 등(4)의 연구에서는 생쥐를 대상으로 immunoglobulin의 변화를 보고하였다(4-6). Immunoglobulin A(Ig A)는 염증성 질환에서 점액에서 높게 측정되는 항체인데 Latvala 등(7)의 연구에서 알코올성 질환을 가지고 있는 환자가 그렇지 않은 환자보다 혈청 Ig A가 높았다(4). Ig E는 아토피 질환이나 알레르기 비염과 같이 외부의 자극에 의하여 감염이 되었을 때 만들어지는 항체이며 알코올성 질환을 가진 환자의 혈청에서 Ig E의 농도가 높게 측정이 되었다(7). Hepatic cytokine의 한 종류인 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 같은 proinflammatory cytokine

은 염증초기 단계에서 염증 발생에 중추적인 역할을 하며 알코올을 만성적으로 섭취한 생쥐에서 증가함을 보였으며(8,9), 그 이외에도 IFN- $\gamma$ (10)와 IL-1 $\beta$ 의 분비가 증가함을 보였다(11). IL-1 $\beta$ 는 염증반응의 중간 매개체로 TNF- $\alpha$ 로 인해 더욱 더 자극된다(6). 알코올 섭취가 hepatic cytokine 과 면역관련 cytokine에 미치는 영향에 관하여 많은 연구가 진행되었으나 그 메커니즘은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았다(12-17).

황금(*Scutellariae Radix*)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것이다. 황금은 식품으로 분류된 한약재료 독성이 적고 간 보호에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이것의 주성분은 플라보노이드계 화합물로서 지금까지 30여종이 분리되었다. 황금의 약리작용으로는 담즙배설 촉진작용, 항균작용, 소염작용, 항알러지작용, 진정작용, 항산화작용 및 지질대사개선작용 등이 이미 보고되었다(18-24).

본 연구에서는 황금의 열수추출물이 고지방식사와 알코

\*Corresponding author. E-mail: rwcho@khu.ac.kr  
Phone: 82-2-961-0769, Fax: 82-2-961-0934

을 섭취한 생쥐의 혈청에서 알코올 질환에서 염증발생을 이끄는 proinflammatory cytokine이며, 또한 hepatic cytokine인 cytokine(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )과 immunoglobulin(Ig A, Ig E)농도에 미치는 영향을 조사하였고, 또한 면역기능의 중추적인 역할을 하는 비장임파구 T세포 집단을 분리하여 배양한 후 이들 농도를 측정함으로써 황금의 간 보호기능을 면역학적 측면에서 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 황금은 전라남도 여수산으로 천수당 한약재상(전라남도, 영암)에서 구입하였다. 황금 뿌리 100 g을 절편하여 둥근 플라스크에 넣고 20배(2 L)의 증류수를 가한 후 120°C에서 2시간씩 2번 진탕기로 열수 추출한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 감압농축한 후 농축액을 동결 건조하여 사용하였다. 열수추출물 수득률은 64.7%이었다.

알코올은 발효주정(덕산)을 사용하였고 농도는 95%이었으며 증류수로 25%로 희석한 후 무열량 감미료 사카린을 0.1%로 첨가하여 사용하였다.

실험에 사용된 시약 중 concanavalin A(Con A)는 생쥐의 T임파구의 분화(25)를 자극하는 것으로 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 monoclonal antibody와 cytokine은 ID Labs Inc.(Ontario, Canada)에서 구입하였다. Ig A와 관련된 항체는 Zymed Laboratory Inc.에서 구입하였고, Ig E와 관련된 항체들은 Biosource International(Comarillo, CA)에서 구입하였다. 기타 시약은 Sigma에서 구입하였다.

### 실험동물 및 실험식이

본 실험은 체중이 28~30 g(약 6주령)인 ICR종 수컷 흰쥐를 7일간 환경에 적응시킨 후 제조된 식이에 적응시켰다. 적응기간을 거친 쥐들을 난괴법에 의해 10마리씩 4군으로 분류하고, 각기 일반식이(regular fat diet, RD), 고지방식이(high fat diet, HD), 고지방식이+알코올(ethanol, HED) 그리고 고지방식이+알코올+황금 열수추출물(Scutellariae Radix, HESD)로 4주간 사육하였다. 일반식이의 경우, 총열량의 20%를 단백질로, 16%를 지방 그리고 나머지 64%를 당질로 제공하였으며, 고지방식의 경우는 총열량의 20%를 단백질로, 40%를 지방 그리고 나머지 40%를 당질로 제공하였다. 25% 알코올을 식수통을 이용하여 자유공급 시켰으며 공급 시 손실되는 양은 평균 손실될 때 드롭 수를 고려하여 섭취량에서 제외하였다. 황금 열수추출물(100 mg/BW)은 매일 같은 시간에 경구투여하였다. 황금 열수추출물군은 섭취하지 않는 다른 군은 식염수로 동일하게 스트레스를 주었다. 기타 실험식이의 조성 및 열량구성 비율은 Table 1에

**Table 1. Composition of experimental diets** (g/kg)

Ingredients	Regular diet	High fat diet
Casein	200	200
Corn starch	450	345
Methionine	3	3
Sucrose	50	50
Cellulose	100	100
Corn oil	50	50
Beef tallow	0	155
Salt mix <sup>1)</sup>	35	35
Vitamin mix <sup>2)</sup>	10	10
Choline bitartrate	2	2
% of energy		
Protein	20	20
Fat	16	40
Carbohydrate	64	40

AIN-93G diet purified rodent diet #110700 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)

<sup>1)</sup>Salt mix composition: AIN-93G salt mix #210025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA); calcium carbonate 357 g/kg, potassium phosphate (monobasic) 196 g/kg, potassium citrate H<sub>2</sub>O 70.78 g/kg, sodium chloride 74 g/kg, potassium sulfate 46.6 g/kg, magnesium oxide 24 g/kg, ferric citrate U.S.P 6.06 g/kg, zinc carbonate 1.65 g/kg, manganous carbonate 0.63 g/kg, cupric carbonate 0.3 g/kg, potassium iodate 0.01 g/kg, sodium selenate 0.01025 g/kg, ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O 0.00795 g/kg, sodium metasilicate 9H<sub>2</sub>O 1.45 g/kg, chromium potassium sulfate 12H<sub>2</sub>O 0.275 g/kg, lithium chloride 0.0174 g/kg, boric acid 0.0815 g/kg, sodium flouride 0.0635 g/kg, nickel carbonate 0.0318 g/kg, ammonium vanadate 0.066 g/kg, sucrose finely powdered 221.026 g/kg.

<sup>2)</sup>Vitamin mix composition: AIN-93G vitamin mix #310025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA); niacin 3 g/kg, calcium pantothenate 1.6 g/kg, pyridoxine HCl 0.07 g/kg, thiamine HCl 0.6 g/kg, riboflavin 0.6 g/kg, folic acid 0.2 g/kg, biotin 0.2 g/kg, vitamin E acetate (500 IU/g) 15 g/kg, vitamin B12 (0.1%) 2.5 g/kg, vitamin A palmitate (500,000 IU/g) 0.8 g/kg, vitamin D3 (400,000 IU/g) 0.25 g/kg, vitamin K1/dextrose mix (10 mg/g) 7.5 g/kg, sucrose 967.23 g/kg.

제시하였다. 실험기간동안 사육실의 온도는 22~24°C, 습도는 60% 전후로 유지하였으며, 광주기와 암주기를 12시간으로 조절하였다. 실험기간동안 매일 일정시간에 사료 잔량을 측정하여 일일 식이섭취량을 산정하였으며, 체중은 1주일에 1회 측정하였다. 사료섭취에 따른 갑작스런 체중변화를 막기 위해 사료통을 제거하고 2시간 후 체중을 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio: FER)은 실험식이 공급일로부터 희생일까지 총 실험기간 동안의 체중 증가량을 실험기간 동안의 식이섭취량으로 나누어 산출하였다.

### 혈청 Ig A, Ig E 농도 측정

실험 종료 시 실험동물의 안와 동맥으로부터 혈액을 채취하여 3000×g, 4°C에서 30분간 원심분리한 후 얻어진 혈청을 sandwich ELISA method를 이용하여 405 nm의 흡광도에서 Ig A와 Ig E를 측정하였다(26-28). Ig A는 PBS로 50배 희석하여 측정하였고, Ig E는 검출감도가 낮아 avidin-biotin법을 사용하여 측정하였다. Avidin-biotin 방법은 biotin 표시

항체에 avidin 표식항체를 결합시키는 방법으로 검출감도를 높일 수 있었다.

**혈청 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  농도 측정**

Anti-mouse cytokine의 항체를 coating한 96 well plate에 혈청을 50  $\mu$ L씩을 첨가하여, 2차 항체에 biotin화시킨 anti-cytokine의 항체를 반응시켰다. 1시간동안 37°C에서 배양한 후 기질용액을 100  $\mu$ L 첨가한 후 1시간 실온에 방치하였다. 각 단계마다 0.05% PBST로 세척하였으며 마지막으로, 1.5% oxalic acid를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA로 405 nm의 흡광도에서 측정하였다. 동일한 과정을 통하여 purified cytokine을 표준으로 하여 비교 정량하였다.

**임파구의 분리와 배양(Primary culture)**

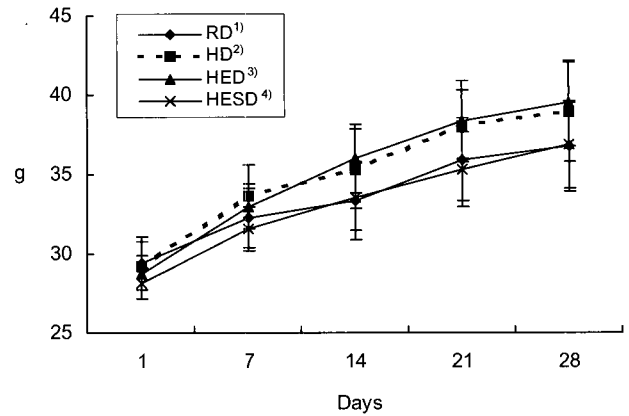
실험동물을 경추탈골로 희생시켜 비장을 적출하고 임파구는 1640 medium(Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.) 내에서 cell strainer로 분리하였다. 임파구 세포에 RPMI 1640 medium을 첨가하여 300 $\times$ g, 4°C에서 5분씩 3번 원심분리하였다. 임파구를 분리한 후 RPMI 10% FBS(Invitrogen Corporation, Grand island, N.Y.)가 함유된 RPMI 1640 medium에 부유시켜 24 well plate에 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/well의 농도로 분주하고, 임파구의 증식을 촉진시키기 위하여 125  $\mu$ g/mL의 농도로 PBS에 용해시킨 Con A를 10% 첨가한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C incubator에서 48시간 배양하였다.

**비장 임파구의 Ig A, Ig E 측정:** 배양한 임파구 상층액에서 Ig A와 Ig E 함량을 sandwich ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 총 항체 양의 측정으로는 항체의 F(ab)<sup>2</sup> 단편을, 항원 특이적 정량법으로는 항원을 ELISA plate에 고정한다음 배양상층(supernatant)을 반응시켰다. 항체는 ELISA plate 표면에 비특이적으로 결합하는 경향이 있기 때문에, 고정항체로 고정시킨 후 고정항체에 결합한 항체에 효소 표식한 항체를 결합시켜, 기질용액을 첨가하여 발색시켰다. Ig A는 직접법으로 쉽게 정량할 수 있었으나, Ig E는 검출감도를 높일 필요가 있기 때문에 avidin-biotin법을 사용해 ELISA 방법으로 검출하였다.

**비장 임파구의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  측정:** Anti-mouse cytokine의 항체를 coating한 96 well plate에 임파구의 배양상층을 50  $\mu$ L씩을 첨가하여, 2차 항체에 biotin화시킨 anti-cytokine의 항체를 반응시켰다. 그 후의 과정은 혈청 농도 측정과정과 동일하게 하였다.

**통계분석**

모든 실험 결과는 Statistical Analysis System(SAS/STAT version 8.2 SAS Institute Inc., USA) PC package를 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 실험군의 평균의 차이는 one-way ANOVA를 사용하여 p<0.05 수준에서 유의성 여부를 검증하였다.



**Fig. 1. Changes of body weight of the experimental groups.**

- <sup>1)</sup>RD: Regular diet.
- <sup>2)</sup>HD: High fat diet.
- <sup>3)</sup>HED: High fat diet+ethanol.
- <sup>4)</sup>HESD: High fat diet+ethanol+SR water extract (100 mg/kg).

**결과 및 고찰**

**황금 열수추출물이 체중, 식이효율에 미치는 영향**

실험동물의 체중변화는 사육기간이 지남에 따라 증가하였으나 각 군 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 섭취한 1일 총칼로리는 RD(일반식이), HD(고지방식이), HED(고지방식이+알코올), HESD(고지방식이+알코올+황금 열수추출물)군에서 각각 15.2 $\pm$ 1.6, 17.5 $\pm$ 1.8, 24.4 $\pm$ 2.5, 23.8 $\pm$ 2.9 kcal/day로 측정되었으며, HED군과 HESD군에서 RD군과 HD군보다 유의적으로 높았다(Table 2). 알코올 섭취비율은 HED군과 HESD군에서 1일 총 섭취열량의 35.9 $\pm$ 3.7%, 38.7 $\pm$ 3.8%이었다. 각 군의 식이효율을 비교한 결과 RD, HD, HED, HESD군에서 각각 0.067 $\pm$ 0.002, 0.090 $\pm$ 0.002, 0.113 $\pm$ 0.004, 0.097 $\pm$ 0.004로 측정되어 HED군에서 가장 높았으며, HESD, HD, RD군 순서로 높았다(p<0.05). 이는 알코올 섭취로 인한 체중 증가가 고지방식이만을 섭취한 경우보다 높음을 의미하는 것으로 해석된다.

Taieb 등(29) 및 Robinson과 Seelig(30)는 고지방식이 체중을 증가시키는 것으로 보고하였으며 알코올을 함께 섭취하면 체중이 더욱 증가함을 관찰하였다. 그러나 Kim 등(5)의 일반인을 대상으로 한 연구에서는 만성적인 알코올 섭취는 체중감소를 유발하였는데, 이는 만성 알코올 섭취로 인한 총 섭취열량의 부족에 기인하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 총 섭취열량 부족이 없이 알코올과 고지방을 섭취하여 체중이 증가한 것으로 사료된다.

**황금 열수추출물이 혈청 Ig A, Ig E, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  농도에 미치는 영향**

혈청 Ig A와 Ig E 농도를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 혈청 Ig A 농도는 RD, HD, HED, HESD군에서 각각 61.0 $\pm$ 11.6, 116.2 $\pm$ 17.5, 185.7 $\pm$ 60.5, 127.7 $\pm$ 22.5 ng/mL로 측정되

Table 2. Total calorie intake and food efficiency ratio

	RD <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>	HED <sup>3)</sup>	HEDS <sup>4)</sup>
Total calorie intake (kcal/day)	15.2±1.6 <sup>7)c8)</sup>	17.5±1.8 <sup>b</sup>	24.4±2.5 <sup>a</sup>	23.8±2.9 <sup>a</sup>
Kcal from ethanol (%)	—	—	35.9±3.7	38.7±3.8
Food efficiency ratio <sup>6)</sup>	0.067±0.002 <sup>d</sup>	0.090±0.002 <sup>c</sup>	0.113±0.004 <sup>a</sup>	0.097±0.004 <sup>b</sup>

<sup>1)~4)</sup> Abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>5)</sup> Food efficiency ratio (FER)=The gains of body weight (g) / The amounts of food intake (g).

<sup>6)</sup> All values are mean±SD.

<sup>7)</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) among the groups by Duncan's multiple range tests.

Table 3. Serum levels of Ig A and Ig E

	RD <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>	HED <sup>3)</sup>	HEDS <sup>4)</sup>
Ig A	61.0±11.6 <sup>5)b6)</sup>	116.2±17.5 <sup>b</sup>	185.7±60.5 <sup>a</sup>	127.7±22.5 <sup>ab</sup>
Ig E	3.90±0.63 <sup>b</sup>	6.46±2.26 <sup>b</sup>	20.56±5.33 <sup>a</sup>	8.22±2.21 <sup>b</sup>

<sup>1)~4)</sup> Abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>5)</sup> All values are mean±SD.

<sup>6)</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) among the groups by Duncan's multiple range tests.

있으며 고지방 식이와 알코올을 함께 섭취한 HED군에서 다른 군에 비하여 유의적으로 높았다. 혈청 Ig E 농도는 RD, HD, HED, HEDS군에서 각각 3.90±0.63, 6.46±2.26, 20.56±5.33, 8.22±2.21 ng/mL로 고지방 식이와 알코올을 함께 섭취한 HED군에서 다른 군보다 유의적으로 높았으며 황금 열수추출물을 함께 섭취한 HEDS군에서 황금을 섭취하지 않은 HED군보다 유의적으로 낮았다.

본 연구에서도 알코올 섭취시 혈청에서 Ig A의 농도가 높았다는 선행연구(6,7)와 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 정상식이군과 고지방식이 섭취군에서는 차이가 없었으며 황금 열수추출물의 섭취가 알코올 섭취로 인한 Ig A 농도에 미치는 영향도 관찰되지 않았다. 혈청 Ig E 농도는 선행 연구(9-11)에서 알코올 섭취 시에 증가함을 보였고 본 실험에서도 알코올 섭취한 군에서 유의적으로 높았다. 이는 알코올 섭취로 인해 증가된 혈청 Ig E 농도가 황금 열수추출물에 의해 감소되었다고 사료된다.

Immunoglobulin 분비는 T helper 1 lymphocyte(Th1)와 Th 2 lymphocyte의 균형에 의해서 조절되며 Ig E 합성은 Th 2에서 분비된 cytokine(IL-4, IL-13 등)에 의해 조절된다(4). 본 실험에서 알코올 섭취는 Th 1/Th 2의 불균형을 야기시키며, Th 2에서 분비되는 cytokine의 증가로 인해 혈청 Ig E가 증가되는 것으로 사료된다. 황금 열수추출물을 알코올과 함

께 섭취한 군에서 알코올만 섭취한 군에서보다 유의적으로 Ig E가 낮은 것은 황금 열수추출물이 알코올에 의한 Th 1/Th 2의 불균형을 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

혈청 cytokine 농도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 혈청 TNF- $\alpha$ 는 RD, HD, HED, HEDS군에서 각각 0.72±0.02, 0.71±0.03, 0.71±0.03, 0.76±0.07 ng/mL로 측정되어 각 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 IFN- $\gamma$  농도는 각각 0.15±0.01, 0.17±0.02, 0.15±0.01, 0.16±0.01 ng/mL로 이 또한 각 군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 혈청 IL-1 $\beta$  농도는 각각 2.26±0.06, 2.42±0.31, 2.24±0.06, 2.34±0.09 ng/mL로 측정되었으며 군 간의 유의적인 차이는 없었다 (Table 4).

혈청 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 가 알코올을 섭취시킨 동물 연구(3-5,11,31-35)와 임상연구(30)에서 모두 증가하였다는 보고와 본 연구결과와는 차이가 있었다. 이는 선행연구에서 알코올 섭취기간이 20주(11)에서 40주(31)로 본 실험 4주보다 알코올 섭취기간이 길었으며 감염바이러스 주입(32)을 통해 유발시킨 결과로 사료된다. 본 실험에서는 단순히 고지방 식이와 단기간의 알코올 섭취로 인한 질환이 유발되지 않은 초기단계로 혈청 내 cytokine의 농도에 변화를 미치지 않는 것으로 사료되며, 또한 간질환으로 발전되지 않았기 때문에 hepatic cytokine의 분비가 활성화되지 않았을 것이

Table 4. Serum levels of cytokines

	RD <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>	HED <sup>3)</sup>	HEDS <sup>4)</sup>
TNF- $\alpha$	0.72±0.02 <sup>5)</sup>	0.71±0.03	0.71±0.03	0.76±0.07
IFN- $\gamma$	0.15±0.01	0.17±0.02	0.15±0.01	0.16±0.01
IL-1 $\beta$	2.26±0.06	2.42±0.31	2.24±0.06	2.34±0.09

<sup>1)~4)</sup> Abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>5)</sup> All values are mean±SD.

라고 사료된다.

황금 열수추출물이 비장 임파구 배양 상층 immunoglobulin 및 cytokine 농도에 미치는 영향

비장 임파구 배양 상층에 Ig A은 RD, HD, HED, HEDS군에서 각각  $34.3 \pm 1.1$ ,  $32.2 \pm 0.4$ ,  $34.3 \pm 1.3$ ,  $36.0 \pm 2.9$  ng/mL로 측정되었다. HD군과 HEDS군은 유의적인 차이를 보였지만 HEDS군은 RD군과 HEDS군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 비장 임파구 배양 상층의 이 결과는 혈청의 결과와 유사한 양상을 보이지 않았다.

비장 임파구 배양 상층에 Ig E는 각각  $2.98 \pm 0.30$ ,  $2.46 \pm 0.30$ ,  $2.32 \pm 0.07$ ,  $2.54 \pm 0.21$  ng/mL로 측정되었다. RD군이 HD군과 HEDS군에서 유의적으로 높았지만 HEDS군과는 유의적인 차이가 없었다. 이는 혈액과 유사한 양상은 보이지 않았다(Table 5).

Ig A와 Ig E의 이러한 양상에 대한 원인은 혈청과 달리 본 실험에서 사용한 Con A는 생쥐 T lymphocyte의 세포분화 자극하는 역할을 하는데(7), immunoglobulin의 생성에는 B lymphocyte가 필요한데 본 실험에서 B lymphocyte의 자극이 없었기 때문에 immunoglobulin의 생성이 적었을 것이라고 사료된다. 이와 달리 혈청내 immunoglobulin의 생성의 증가는 Con A로 T lymphocyte로 자극을 준 것도 아니며 혈청내의 B lymphocyte가 충분히 존재하기 때문에 Ig A와 Ig E를 충분히 분비할 수 있다고 사료된다.

비장 임파구 배양 상층의 cytokine 농도는 Table 6과 같다. TNF- $\alpha$ 는 RD, HD, HED, HEDS군에서 각각  $0.71 \pm 0.02$ ,  $0.75 \pm 0.06$ ,  $0.91 \pm 0.09$ ,  $0.73 \pm 0.02$  ng/mL로 측정되었다. HED군에서 유의적으로 높았으며 황금 열수추출물을 투여한 군은 고지방 식이와 일반 식이를 섭취한 군들과 유사하게 낮았다. 이는 황금열수추출물이 알코올 섭취에 대한 영향을 경감하는 것이라고 사료된다. McClain 등(36)에 의한 연

구에서 알코올 섭취는 TNF- $\alpha$ 의 수치를 증가하는데 본 실험과 일치하였다. 이는 본 실험에서 Th 2의 자극에 의해 혈청 Ig E가 증가하였기 때문에 Th 2의 cytokine의 분비가 증가되었다고 사료된다.

IFN- $\gamma$ 는 각각  $0.16 \pm 0.01$ ,  $0.21 \pm 0.09$ ,  $0.38 \pm 0.12$ ,  $0.16 \pm 0.04$  ng/mL로 측정되었다. HED군에서 IFN- $\gamma$ 이 유의적으로 높았으며 황금 열수추출물을 투여한 군은 고지방 식이와 일반 식이를 섭취한 군들과 유사하게 낮았다. IFN- $\gamma$  선행 연구에서와 같이 증가됨을 보였으며(6,7) 황금 열수추출물이 이를 경감시키는 효과를 보이는 것으로 사료된다.

IL-1 $\beta$ 는 각각  $2.24 \pm 0.05$ ,  $2.28 \pm 0.08$ ,  $2.08 \pm 0.064$ ,  $2.17 \pm 0.10$  ng/mL로 측정되었다. 다른 cytokine인 달리 HED군에서 낮게 측정되었으며, 황금 열수추출물에 대한 영향은 보이지 않았다.

혈청과 달리 비장 임파구를 배양 상층은 T 임파구의 밀도가 높으며, Con A로 자극을 주었기 때문에 나타났다고 사료되며, 간의 kupffer cell의 cytokine 농도를 측정하는 것이 보다 정확할 것이라고 사료된다.

이와 같은 결과는 알코올이 proinflammatory hepatic cytokine인 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 의 수치를 상승시키며(6,7), Ig E와 A의 농도도 상승시키는 것으로 사료된다. 이와 같이 알코올에 의한 효과로 인해 상승된 물질들을 황금 열수추출물이 경감시키는 것도 사료된다. 선행된 임상실험에서도 proinflammatory cytokine이 알코올성 간질환 환자에서 높게 측정되었다(12). Alexander(37)와 Faist(38)의 실험에서도 proinflammatory cytokine이 증가함은 알코올성 간질환으로 이행할 가능성이 높은 것으로 보고하였다. 따라서 생쥐에서 만성 알코올 섭취는 proinflammatory cytokine과 immunoglobulin의 수치를 상승시켜 간에 부정적인 영향을 주며 본 실험에 사용된 황금 열수추출물이 이를 개선시키는 효과가 있는 것으로 사료된다. 그러나 보다 장기간 알코올 투여

Table 5. Levels of Ig A and Ig E in supernatant of spleen lymphocytes isolated (ng/mL)

	RD <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>	HED <sup>3)</sup>	HEDS <sup>4)</sup>
Ig A	$34.3 \pm 1.1^{5ab6)}$	$32.2 \pm 0.4^b$	$34.30 \pm 1.3^{ab}$	$36.0 \pm 2.9^a$
Ig E	$2.98 \pm 0.30^a$	$2.46 \pm 0.30^b$	$2.32 \pm 0.07^b$	$2.54 \pm 0.21^{ab}$

<sup>1)-4)</sup> Abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>5)</sup> All values are mean  $\pm$  SD.

<sup>6)</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) among the groups by Duncan's multiple range tests.

Table 6. Levels of cytokines in supernatant of spleen lymphocytes isolated (ng/mL)

	RD <sup>1)</sup>	HD <sup>2)</sup>	HED <sup>3)</sup>	HEDS <sup>4)</sup>
TNF- $\alpha$	$0.71 \pm 0.02^{5b6)}$	$0.75 \pm 0.06^b$	$0.91 \pm 0.09^a$	$0.73 \pm 0.02^b$
IFN- $\gamma$	$0.16 \pm 0.01^b$	$0.21 \pm 0.09^b$	$0.38 \pm 0.12^a$	$0.16 \pm 0.04^b$
IL- $\beta$	$2.24 \pm 0.05^a$	$2.28 \pm 0.08^a$	$2.08 \pm 0.06^b$	$2.17 \pm 0.10^{ab}$

<sup>1)-4)</sup> Abbreviations are the same as in Fig. 1.

<sup>5)</sup> All values are mean  $\pm$  SD.

<sup>6)</sup> Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) among the groups by Duncan's multiple range tests.

로 인해 질환을 유발시킨 후 질환을 확인하고, 비장세포보다는 간세포의 primary culture를 통한 cytokine과 immunoglobulin의 농도 변화를 통한 연구가 더 필요할 것이라고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 생쥐(ICR)에서 고지방식이 및 만성알코올 섭취 시 황금 열수추출물이 면역지표에 미치는 영향을 관찰한 결과를 요약하면 다음과 같다. 실험동물의 체중은 사육기간이 지남에 따라 증가하였으며 각 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 섭취한 총칼로리와 식이효율은 고지방식이와 알코올 섭취군에서 유의적으로 높았다. 혈청 Ig A 농도는 고지방식이와 알코올 섭취군에서 가장 높았으며 황금 열수추출물에 의한 효과는 볼 수 없었다. 혈청 Ig E 농도는 고지방식이와 알코올 섭취군에서 유의적으로 높았으며 황금 열수추출물이 알코올의 영향을 경감시켰다. 그러나 식이에 따른 차이는 보이지 않았다. 혈청 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 는 군 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 비장 임파구 배양 상층액 중 Ig A는 고지방식이+알코올+황금 열수추출물 섭취군과 고지방식이+알코올 섭취군에서 유의적으로 높았다. 비장 임파구 배양 상층액 Ig E 농도는 일반식이군과 고지방식이+알코올+황금 열수추출물 섭취군에서 유의적으로 높았다. 비장 임파구 배양 상층액의 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 는 고지방식이+알코올 섭취군에서 유의적으로 높았다. IL-1 $\beta$ 는 고지방식이+알코올 섭취군과 고지방식이+알코올+황금 열수추출물 섭취군에서 유의적으로 낮았다. 혈청 cytokine과 달리 Con A로 자극한 비장 임파구 배양 상층액에서 cytokine의 분비 변화는 알코올과 고지방식이 섭취가 잠재적인 영향을 주는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하면 생쥐에서 알코올 및 고지방 섭취가 immunoglobulin(Ig A, Ig E)과 proinflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )을 증가시키는 부정적인 역할 하는 것을 확인할 수 있었으며 황금 열수추출물이 이를 개선하는 효과를 보였다.

## 감사의 글

이 연구는 2004년도 경희대학교 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee HJ. 1994. Alcohol and Dyslipidemia. *Kor J Lipidol* 4: 119-122.
- Ha TY, Park YM, Chun SN, Lee JH, Lee HK, Kim JS. 1990. Effect of alcohol on immune response in mice. *Korea Soc Microbiol* 23: 265-281.
- McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. 2004. Recent advance in alcoholic liver disease IV. dysregulated cytokine metabolism in alcohol liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: 497-502.
- Dominguez-Santalla MJ, Vidal C, Vinuela J, Perez LF, Gonzalez-Quintela A. 2001. Increased serum IgE in alcoholics: Relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. *Alcoh Clin Exp Res* 25: 1198-1205.
- Kim DJ, Kim W, Yoon SJ, Cho BM, Kim JS, Jeong JS. 2003. Effect of alcohol hangover on cytokine production in healthy subjects. *Alcohol* 31: 167-170.
- Dinareello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508.
- Latvala J, Hietala J, Koivisto H, Jarvi K, Anttila P, Niemela O. 2005. Immune responses to ethanol metabolites and cytokine profiles differentiate alcoholics with or without liver disease. *Am J Gastroenterol* 100: 1303-1310.
- Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ. 2003. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-production. *Am J Pathol* 163: 1137-1146.
- Viitala K, Israel Y, Blake JE, Niemela O. 1997. Serum Ig A, Ig G, and Ig M antibodies directed against acetaldehyde-derived epitopes: relationship to liver disease severity and alcohol consumption. *Hepatolgy* 25: 1418-1424.
- Kevin W, Graeme A. 2000. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J* 76: 280-286.
- Valles SL, Blanco AM, Azorin I, Guasch R, Pascual M, Gomez-Lechon MJ, Renau-Piqueras J, Guerric C. 2003. Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. *Alcohol Clin Exper Res* 27: 1979-1986.
- Bai J, Odin JA. 2003. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmunity Rev* 2: 36-42.
- Park JW, Yoo BC. 2001. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: Role of lipid peroxidation mitochondrial dysfunction and cytokines. *Kor J Gastroenterol* 38: 1-8.
- Taylor AN, Tio DL, Yirmiya R. 1999. Fetal alcohol exposure attenuates interleukin-1 $\beta$ -induced fever: neuroimmune mechanisms. *J Neuro* 99: 44-52.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. 1999. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 19: 205-219.
- Akerman PA, Cote PM, Yang SQ, McClain CJ, Nelson S, Bagby G, Diehl AM. 1993. Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Hepatology* 17: 1066-1073.
- Arteel G, Marsano L, Mendez C, Bentley F, McClain CJ. 2003. Advances in alcoholic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 625-647.
- Hoek JB, Pastorino JG. 2002. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 27: 63-68.
- Kim HC. 2001. *Textbook of herbal pharmacology*. Jipmundang. p 129-133.
- Abe K, Inoue O, Yumioka E. 1990. Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats. *Chem Pharm Bull* 38: 208-211.
- Moon YH, Lee YH, Min BS, Bae KH. 1997. Antibacterial Constituents from *Scutellariae Radix* against *Streptococcus mutans* OMZ176. *Kor J Pharmacogen* 28: 99-103.
- Koda A. 1982. Anti-allergic actions of traditional oriental medicine--actions against types I and IV hypersensitivity reactions. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 80: 31-41.
- Kubo M, Matsuda H, Tanaka M, Kimura Y, Okuda H,

- Higashino M, Tani T, Namba K, Arichi S. 1984. Studies on *Scutellariae radix*: VII. Anti-arthritis and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoid components from *Scutellariae radix*. *Chem Pharm Bull* 32: 2724-2729.
24. Liaw J, Gau YY, Chao YC. 1999. Effect of baicalein on tracheal permeability in ovalbumin (OA)-sensitized guinea pigs. *Pharmaceutical Research* 16: 1653-1657.
25. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. 1992. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 90: 196-203.
26. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-506.
27. Lim BO, Yamada K, Yoshimura K, Watanabe T, Pham H, Taniguchi S, Sugano M. 1995. Free bile acids inhibit IgE production by mouse spleen lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide and interleukins. *Biosci Biotech Biochem* 59: 624-627.
28. Lim BO, Jolly CA, Zaman K, Fernandes G. 2000. Dietary (n-6) and (n-3) fatty acids and energy restriction modulate mesenteric lymph node lymphocyte function in autoimmune-prone (NZBxNZW)F1 mice. *J Nutr* 130: 1657-1664.
29. Taieb J, Delarche C, Ethuin F, Selloum S, Poynard T, Gougerot-Pocidalo MA, Chollet-Martin S. 2002. Ethanol-induced inhibition of cytokine release and protein degranulation in human neutrophils. *J Leukocyte Biology* 72: 1142-1147.
30. Robinson RS, Seelig LL Jr. 2002. Effects of maternal ethanol consumption on hematopoietic cells in the rat fetal liver. *Alcohol* 28: 151-156.
31. Perlemuter G, Letteron P, Carnot F, Zavala F, Pessayre D, Nalpas B, Brechot C. 2003. Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 39: 1020-1027.
32. Cabré E, Rodríguez-Iglesias P, Caballería J, Quer JC, Sánchez-Lombraña JL, Parés A, Papo M, Planas R, Gassull MA. 2000. The Spanish group for the study of alcoholic hepatitis. Short- and long-term outcome of severe alcohol-induced hepatitis treated with steroids or enteral nutrition: a multicenter randomized trial. *Hepatology* 32: 36-42.
33. Colell A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernandez-Checa J. 1998. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 115: 1541-1551.
34. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. 1999. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 19: 205-219.
35. Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SM, Waxman DJ. 1994. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate in vivo cytokine gene expression in rats fed ethanol for long periods. *Hepatology* 19: 1483-1487.
36. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill DB. 1998. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 22(5 Suppl): 248S-252S.
37. Alexander JW. 1990. Mechanism of immunologic suppression in burn injury. *J Trauma* 30: 70-75.
38. Faist E. 1996. The mechanism of host defense dysfunction following shock and trauma. *Curr Top Microbiol Immunol* 216: 259-274.

(2006년 1월 27일 접수; 2006년 6월 2일 채택)