

# 인삼과 人蔘胡桃湯의 면역반응에 대한 비교 연구

공두균 · 박 훈 · 이일화 · 전 훈 · 권 진<sup>1</sup> · 안문생<sup>2</sup> · 은재순\*

우석대학교 약학대학, 1: 한국재활복지대학, 2: 한국약선연구소

## Comparative Study of Ginseng Radix and *Insamhodo-tang* on Immune Reaction

Du Kyun Kong, Hoon Park, Ri Hua Li, Hoon Jeon, Jin Kwon<sup>1</sup>, Mun Saeng Ahn<sup>2</sup>, Jae Soon Eun\*

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: Korea National College of Rehabilitation & Welfare, 2: Institute of Korea Medicated-Diets

Immunological activities of Ginseng Radix water extract (GE) were compared with theirs of *Insamhodo-tang* water extract (IHT). GE and IHT (500 mg/kg) were administered *p.o.* twice a day for 5 days to C57BL/6 mice, respectively. IHT decreased the cell viability of murine thymocytes and splenocytes, but increased the population of CD4<sup>+</sup> cells in thymocytes, and the population of Thy1<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup> cells in splenocytes in contrast to GE. In addition, IHT decreased the phagocytic activity of peritoneal macrophages, but increased the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in contrast to GE. These results suggest that IHT decrease a specific- and nonspecific immune reaction in comparison with GE.

Key words : *Insamhodo-tang*(人蔘胡桃湯), thymocytes, splenocytes, macrophages

### 서 론

胡桃 (Juglandis Semen)는 鎮咳, 補腎固精, 溫肺, 鎮喘, 潤腸의 효능이 있어 腎虛喘嗽, 腰痛, 陽萎, 大便燥結 등을 치료하는데 사용되어 왔으며, 종자에 함유된 성분의 40~50%는 지방으로 linoleic acid가 많이 함유되어 있다<sup>1,2)</sup>.

한방에서 호도를 약용으로 사용할 때는 속껍질이 있는 채로 사용하는 경우와 속껍질을 벗기고 사용하는 경우가 있다. 호도를 천식에 사용할 때는 속껍질을 벗기지 않고 그대로 둔 채 사용하며, 유아의 천식에 人蔘胡桃湯을 사용하는 경우 속껍질이 있는 호도를 사용할 때는 천식이 가라앉았다가, 속껍질을 벗긴 호도를 사용하였더니 천식이 재발하였고 이어서 껍질을 벗기지 않는 것을 사용하였더니 천식에 효과가 있었다. 호두의 속껍질을 그대로 둔 채 복용하면 腎, 命門에 들어간다 하였고, “連皮則能固能補, 去皮則止於能行能潤耳 (껍질까지 쓰면 튼튼하게 하기도 하고 보양하기도 하는데 껍질을 제거한 것은 다만 소통하게 하고 윤희하게 할 수 있을 뿐이다)”라고 하였다<sup>3)</sup>.

人蔘胡桃湯은 人蔘定喘, 胡桃斂肺하며<sup>4)</sup>, 구성 약재 중 인삼

은 肺氣가 부족하여 발생하는 천식을 가라앉히고, 호도는 斂肺할 뿐만 아니라 補腎하여 腎의 納氣 기능을 원활하게 한다<sup>5)</sup>. 斂肺란 肺氣를 收斂한다는 말인데, 한의학적으로 肺氣의 고유한 욕구는 收斂하고자 하는 것이므로, 이 욕구를 강화하여 폐의 호흡작용을 원활하게 한다는 의미가 담겨있다. 腎이 納氣를 주관한다는 말은 호흡기능 특히 吸氣가 腎과 관련이 있는 것을 말하며, 肺와 腎은 氣의 생성에 관여할 뿐만 아니라 호흡운동에 대해서도 협조적으로 작용하고 있고, 호르몬계를 통한 腎의 수분대사 기능과 순환계를 통한 폐의 수분대사 기능에는 밀접한 관련이 있다<sup>6)</sup>.

즉, 인삼호도탕은 肺腎의 기능을 향상시켜, 허약체질자의 천식을 다스리는 처방이라 할 수 있다. 肺와 腎의 대사과정은 한의학에서 체액과 기가 온 몸을 돌면서 항상성을 유지하는데 매우 중요한 순환계이다. 한의학에서 폐순환계는 자연계와 인체가 조절되는 과정이라 할 수 있고, 한방병리학적으로 천식과 신, 명문은 밀접한 관계가 있어, 인체의 장기 중에서 腎이 면역조절 작용에 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 저자는 전보<sup>8)</sup>에서 호도 속껍질이 있는 것이, 없는 것보다 면역능을 활성화하는 작용이 강력함을 보고한 바 있다.

면역계는 B-lymphocyte에 의해 주도되는 항체의 합성 및 분비에 의한 체액성면역과 T-lymphocyte에 의해 주도되는 세포성면역으로 분류하며, 또한 T- 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

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

· 접수 : 2007/08/10 · 채택 : 2007/09/21

면역과 macrophage가 관련된 비특이적면역으로도 분류한다<sup>9)</sup>.

인삼<sup>10-13)</sup>과 그 함유 성분인 ginsenosides<sup>14,15)</sup> 및 홍삼<sup>16,17)</sup>이 면역능을 조절한다는 보고와 호도에 간보호작용<sup>18)</sup> 및 항산화작용<sup>19)</sup>이 있다는 보고는 많이 있었으나, 인삼과 호도로 구성된 인삼호도탕에 대한 실험 연구보고는 없었다. 따라서 본 실험에서는 면역능을 증강시킬 수 있는 기능성식품을 개발하고자, 인삼과 속껍질이 있는 호도로 처방된 인삼호도탕을 물로 추출하여, 특이적 면역 및 비특이적면역에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 C57BL/6계 수컷 6주령을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20±3℃, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), lucigenin, zymosan, MTT, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, lipopolysaccharide (LPS),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN)는 Sigma Co., RPMI 1640, FBS는 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), white multi-well plate (96-well, Nunc), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (TECAN, Infinite F200) 등을 사용하였다.

### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 인삼 (Ginseng Radix)은 농협중앙회 인삼 검사소에서 검사된 고려인삼 6년근을 시중에서 구입하여 사용하였으며, 호도 (Juglandis semen)는 전라북도 무주에서 구입하여 속껍질이 있는 상태로 사용하였다. 인삼은 50 g을 증류수 1,000 ml로 2회 가열추출 하였으며, 인삼호도탕은 이남과 호도 동량 (인삼 50 g 및 호도 50 g)을 혼합하여 증류수 1,000 ml로 2회 가열추출 하였다. 추출 후, 여과하여 여액을 Rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 인삼분말 15.2 g (이하 GE라 함, 수득율; 30.4%) 및 인삼호도음 17.6 g (이하 IHT라 함, 수득율; 17.6%)을 얻어 실험에 사용하였다.

### 4. 홍선세포, 비장세포 및 복강대식세포의 분리

생쥐의 홍선세포 및 비장세포의 분리는 Wysocki<sup>20)</sup> 및 Mizel<sup>21)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 적출한 홍선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여

세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 홍선 및 비장세포를 분리하였다. 복강대식세포의 분리는 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 3일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집한 후, 수집한 세포를 4℃에서 1,500 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척하였다. 복강세포를 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 2 시간 배양한 후, 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포에 DPBS를 넣어 20분간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치한 후 복강대식세포를 분리하였다. 세포를 배양할 때 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### 5. 홍선세포 및 비장세포의 증식능 측정

세포증식능 측정은 Mosmann<sup>22)</sup>이 개발하여 Kotnic 등<sup>23)</sup>이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 홍선세포 및 비장세포를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 분주하였다. 세포에 GE 및 IHT를 각각 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 다음, 홍선세포에는 concanavalin A (Con A) 5  $\mu$ g/ml을 비장세포에는 lipopolysaccharide (LPS) 10  $\mu$ g/ml을 첨가하여 37℃의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다. In vivo 실험에서는 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 GE 또는 IHT 500 mg/kg을 1일 2회씩 (09시, 18시) 5일간 경구투여한 다음, 생쥐를 경추탈골하여 도살한 후, 동일한 방법으로 세포를 분리하여 실험하였다.

### 6. 홍선세포 및 비장세포의 subpopulation 측정

생쥐 5 마리를 1군으로 하여 GE 또는 IHT 500 mg/kg을 1일 2회씩 (09시, 18시) 5일간 경구투여한 다음, 생쥐를 경추탈골하여 도살한 후, 동일한 방법으로 세포를 분리하여, 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로, T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4℃에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>24)</sup>.

### 7. 복강대식세포로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $2 \times 10^6$  cells을 분주한 후 macrophage로 부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법<sup>25)</sup>으로 측정하였다. 각 well에 GE 및 IHT를 각각 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 다음, LPS 1  $\mu$ g/ml과  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100  $\mu$ l와 Griess

시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylenediamine 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37°C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하였다. In vivo 실험에서는 GE 및 IHT 500 mg/kg을 1일 2회씩 5일간 경구투여 하였다. 약물 투여 2일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 5일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 생쥐를 경추탈골하여 도살하여 동일한 방법으로 세포를 분리하여 실험하였다.

8. 복강 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 측정  
분리한 macrophage를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Chemiluminescence 측정용 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다<sup>26,27</sup>. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50  $\mu$ l, lucigenin 용액 50  $\mu$ l 및 zymosan 용액 30  $\mu$ l를 첨가하여, 37°C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

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

### 실험성적

1. GE 및 IHT가 흉선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 효과  
In vitro 실험에서 대조군의 흉선세포에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 135.7 $\pm$ 1.2%로 증가하였다. GE를 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml를 처리하고 Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 10  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 mitogen 처리군에 비해 증가하였다. IHT 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml를 처리하고 Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 10  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 GE 처리군에 비해 감소하였다. 대조군의 비장세포에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 128.3 $\pm$ 1.4%로 증가하였다. GE를 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml를 처리하고 LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 2  $\mu$ g/ml 농도에서 mitogen 처리군에 비해 증가하였다. IHT 50, 10 및 2  $\mu$ g/ml를 처리하고 LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 10  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 GE 처리군에 비해 감소하였다(Table 1).  
In vivo 실험에서 대조군의 흉선세포에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 124.9 $\pm$ 3.1%로 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 129.6 $\pm$ 2.5%로 mitogen 처리군과 별 차이가 없었으나, IHT를 투여한 군은 116.2 $\pm$ 3.3% GE를 투여한 군에 비해 감소하였다. 대조군의 비장세포

포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 132.6 $\pm$ 2.7%로 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 148.5 $\pm$ 2.5%로 mitogen 처리군에 비해 증가하였으나, IHT를 투여한 군은 139.2 $\pm$ 2.3% GE를 투여한 군에 비해 감소하였다(Table 2).

Table 1. Effects of the treatment of Gingseng Radix water extract (GE) and Insamhodoeum water extract (IHT) on the cell viability of murine thymocytes and splenocytes in vitro system.

Samples	Cell viability (%)	
	Thymocytes	Splenocytes
Control	100.0 $\pm$ 1.3	100.0 $\pm$ 1.1
Mitogen-treated group	135.7 $\pm$ 1.2	128.3 $\pm$ 1.4
GE 50 $\mu$ g/ml	139.9 $\pm$ 1.5	131.7 $\pm$ 1.2
GE 10 $\mu$ g/ml	141.8 $\pm$ 1.1*	132.5 $\pm$ 1.3
GE 2 $\mu$ g/ml	146.1 $\pm$ 1.5**	136.7 $\pm$ 1.1**
IHT 50 $\mu$ g/ml	137.8 $\pm$ 1.3	129.5 $\pm$ 1.3
IHT 10 $\mu$ g/ml	135.2 $\pm$ 1.7#	125.6 $\pm$ 1.5#
IHT 2 $\mu$ g/ml	133.3 $\pm$ 1.2**	121.5 $\pm$ 1.6**

The separated cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured with several concentration of GE or IHT for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen, concanavalin A in thymocytes or lipopolysaccharide in splenocytes. The data represents the mean $\pm$ SE of 3 experiments. ; Significantly different from mitogen-treated group (; p<0.05, \*; p<0.01). #; Significantly different from GE-treated group (#; p<0.05, \*\*; p<0.001).

Table 2. Effects of the administration of GE and IHT on the cell viability of murine thymocytes and splenocytes ex vivo system.

Samples	Cell viability (%)	
	Thymocytes	Splenocytes
Control	100.0 $\pm$ 2.8	100.0 $\pm$ 3.4
Mitogen-treated group	124.9 $\pm$ 3.1	132.6 $\pm$ 2.7
GE	129.6 $\pm$ 2.5	148.5 $\pm$ 2.5*
IHT	116.2 $\pm$ 3.3#	139.2 $\pm$ 2.3#

The samples (500 mg/kg) were administered orally twice a day for 5 days, and then the separated thymocytes or splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen, concanavalin A in thymocytes or lipopolysaccharide in splenocytes. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. ; Significantly different from mitogen-treated group (p<0.05). #; Significantly different from GE-administered group (p<0.05).

2. GE 및 IHT가 흉선세포의 subpopulation에 미치는 효과  
흉선세포 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 9.3 $\pm$ 0.3%, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.8 $\pm$ 0.2로 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 2.4이었으며, GE 투여군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 12.2 $\pm$ 0.6%, CD8<sup>+</sup> 세포는 5.5 $\pm$ 0.5%로 대조군에 비해 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였고, 이때 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 2.2 이었다. IHT 투여군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 15.3 $\pm$ 0.2%, CD8<sup>+</sup> 세포는 6.3 $\pm$ 0.2%로 GE 투여군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였고, 이때 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 2.4 이었다(Table 3).

Table 3. Effects of the administration of GE and IHT on the subpopulation of murine thymocytes ex vivo system.

Samples	Thymocytes subpopulation (%)		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ratio
	CD4 <sup>+</sup> cells	CD8 <sup>+</sup> cells	
Control	9.3 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.2	2.4
GE	12.2 $\pm$ 0.6**	5.5 $\pm$ 0.5*	2.2
IHT	15.3 $\pm$ 0.2#	6.3 $\pm$ 0.2	2.4

The samples (500 mg/kg) were administered orally twice a day for 5 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 mitogen-treated group (; p<0.05, \*; p<0.01). #; Significantly different from GE-administered group (p<0.01).

3. GE 및 IHT가 비장세포의 subpopulation에 미치는 효과

비장세포의 B220<sup>+</sup> 세포는 38.9±1.5% 이었으며, Thy1<sup>+</sup> 세포는 18.7±0.6% 이었다. GE를 투여하고 분리한 B220<sup>+</sup> 세포는 37.9±1.3%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 21.9±0.4%로 대조군에 비해 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다. IHT를 투여하고 분리한 B220<sup>+</sup> 세포는 38.7±1.3%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.2±0.3%로 GE 투여군에 비해 Thy1<sup>+</sup> 세포가 증가하였다. 비장세포 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 15.6±0.2% 이었으며, CD8<sup>+</sup> 세포는 7.9±0.2% 이었다. GE 투여군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 16.8±0.3%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 8.1±0.3%로 대조군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다. IHT 투여군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 17.9±0.2%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 8.3±0.2%로 GE 투여군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다(Table 4).

Table 4. Effects of the administration of GE and IHT on the subpopulation on murine splenocytes ex vivo system.

Samples	Splenocytes subpopulation (%)			
	B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	38.9±1.5	18.7±0.6	15.6±0.2	7.9±0.2
GE	37.9±1.3	21.9±0.4 <sup>‡</sup>	16.8±0.3 <sup>‡</sup>	8.1±0.3
IHT	38.7±1.3	24.2±0.3 <sup>‡</sup>	17.9±0.2 <sup>‡</sup>	8.3±0.2

The samples (500 mg/kg) were administered orally twice a day for 5 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±SE of 5 mice. <sup>‡</sup>: Significantly different from mitogen-treated group (p<0.05). <sup>‡</sup>: Significantly different from GE-administered group (#; p<0.05).

4. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>. In vitro 실험에서 GE 50, 10 및 2 µg/ml를 각각 처리하였을 때 복강 macrophages로부터 생성되는 CL 양은 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하였으며, IHT 50, 10 및 2 µg/ml를 각각 처리하였을 때 복강 macrophages로부터 생성되는 CL 양은 GE 처리군에 비해 감소하였다(Fig. 1). In vivo 실험에서 GE 투여군은 복강 macrophages로부터 생성되는 CL 양이 대조군에 비해 증가하였으며, IHT 투여군은 GE 투여군에 비해 CL 양이 감소하였다(Fig. 2).

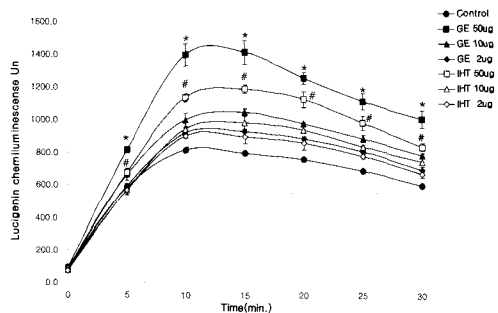


Fig. 1. Effects of GE and IHT on the level of lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages in vitro system. The collected peritoneal macrophages were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan treated with several concentration of GE or IHT for 30 min. The data represents the mean±SE of 3 experiments. <sup>‡</sup>: Significantly different from control group (p<0.001). <sup>#</sup>: Significantly different from GE-treated group (p<0.001).

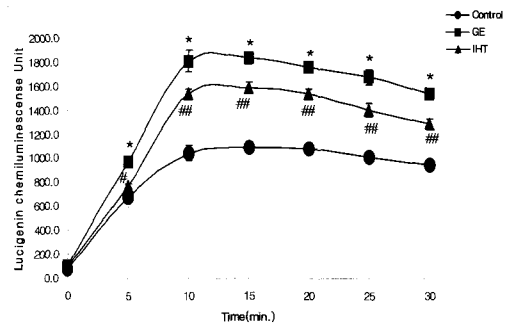


Fig. 2. Effects of GE and IHT on the level of lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. GE or IHT (500 mg/kg) was administered orally twice a day for 5 days and the separated peritoneal macrophages (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The level of chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. <sup>‡</sup>: Significantly different from control group (p<0.001). <sup>#</sup>: Significantly different from GE-administered group (<sup>#</sup>; p<0.01, <sup>##</sup>; p<0.001).

5. 복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 macrophage에 LPS와 γ-IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 2.8±0.2 µM 이었으나, LPS와 γ-IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 48.1±1.1 µM로 증가하였다. In vitro 실험에서 GE 50, 10 및 2 µg/ml를 각각 처리하였을 때 복강 macrophages로부터 생성되는 NO 양은 48.9±1.4, 55.2±1.3 및 60.2±1.1 µM로 대조군에 비해 10 µg/ml 이하의 농도에서 증가하였으며, IHT 50, 10 및 2 µg/ml를 각각 처리하였을 때 복강 macrophages로부터 생성되는 NO 양은 49.3±0.8, 62.6±1.1 및 69.2±1.6 µM로 GE 처리군에 비해 10 µg/ml 이하의 농도에서 증가하였다(Table 5). In vivo 실험에서 대조군의 macrophage에 LPS와 γ-IFN을 처리하지 않았을 때 NO 생성량은 48 시간 후에 2.2±0.1 µM 이었으나, LPS와 γ-IFN을 처리하였을 때는 NO 생성량은 51.5±1.8 µM로 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO 양은 58.4±1.3 µM로 대조군에 비해 증가하였으며, IHT를 투여하고 분리한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO 양은 66.2±1.4 µM로 GE 처리군에 비해 증가하였다(Table 6).

Table 5. Effects of the treatment of GE and IHT on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages treated with LPS and γ-IFN in vitro system.

Samples	Nitric oxide (µM)
Control	2.8±0.2
LPS and γ-IFN treated group	48.1±1.1
GE 50 µg/ml	48.9±1.4
GE 10 µg/ml	55.2±1.3 <sup>‡</sup>
GE 2 µg/ml	60.2±1.1 <sup>‡</sup>
IHT 50 µg/ml	49.3±0.8
IHT 10 µg/ml	62.6±1.1 <sup>#</sup>
IHT 2 µg/ml	69.2±1.6 <sup>#</sup>

The collected peritoneal macrophages were cultured with several concentration of GE or IHT for 48 h in the presence of LPS and γ-IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean±SE of 3 experiments. <sup>‡</sup>: Significantly different from control group (<sup>‡</sup>; p<0.05, <sup>‡</sup>; p<0.01). <sup>#</sup>: Significantly different from GE-treated group (p<0.05).

**Table 6. Effects of the administration of GE and IHT on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages *in vivo* system.**

Samples	Nitric oxide (μM)
Control	2.2±0.1
LPS and γ-IFN treated group	51.5±1.8
GE	58.4±1.3 <sup>*</sup>
IHT	66.2±1.4 <sup>*</sup>

SE (500 mg/kg) was administered orally twice a day for 5 days, and the collected peritoneal macrophages were cultured for 48 h in the presence of LPS and γ-IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean±SE from 5 mice. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (p<0.05). <sup>\*</sup> Significantly different from GE-administered group (p<0.05).

## 고찰

인삼의 약리작용은 매우 다양하며 특히, 면역증강작용<sup>29,35)</sup>, 항산화작용<sup>36)</sup> 등에 대한 연구가 많이 보고되었으며, 호도는 항산화작용<sup>48)</sup> 및 간보호작용<sup>19)</sup> 등에 대한 연구가 보고되었다.

본 실험에서는 면역능을 조절하는 기능성식품을 개발하고자, 인삼호도탕을 물로 추출하여 생쥐에 투여한 후 흉선세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 영향을 관찰하였다.

흉선세포에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하였을 때, Con A를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. GE를 처리하고 Con A를 처리하였을 때 GE 10 μg/ml 이하의 농도에서 Con A를 처리한 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. 이는 인삼이 lymphocytes의 증식촉진 작용이 있다는 Wilasrusmee의 보고<sup>32)</sup>와 세포성면역기능을 증가시킨다는 See의 보고<sup>30)</sup>와도 동일한 결과이다. IHT를 처리하고 Con A를 처리하였을 때 IHT 10 μg/ml 이하의 농도에서 GE를 처리한 군에 비해 세포생존율이 감소하였다. 비장세포에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하였을 때, LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. GE를 처리하고 LPS를 처리하였을 때 GE 2 μg/ml 농도에서 LPS를 처리한 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, IHT를 처리하고 LPS를 처리하였을 때 IHT 10 μg/ml 이하의 농도에서 GE를 처리한 군에 비해 세포생존율이 감소하였다.

*In vivo* 실험에서 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때 Con A를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 흉선세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, IHT를 투여하고 분리한 흉선세포는 GE 투여군에 비해 감소하였다. 비장세포에 LPS를 처리하였을 때 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 비장세포는 대조군에 비해 증가하였으나, IHT를 투여하고 분리한 비장세포는 GE 투여군에 비해 감소하였다. 이러한 실험결과는 *in vitro* 실험의 결과와도 유사한 결과로서 GE는 면역세포의 생존율을 증가시켜 세포성면역을 증강시킬 수 있으나, IHT는 면역세포의 증식을 억제하여 세포성면역을 감소시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

흉선세포는 흉선에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, Th 세포로 분화된 세포들은 각종 cytokine을 분비하여 다른 T, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, Tc 세포는 tumor

cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시킨다<sup>37)</sup>. 대조군의 흉선세포 중 Th (CD4<sup>+</sup> 세포) 세포는 9.3%, Tc (CD8<sup>+</sup> 세포) 세포는 3.8% 이었다. GE를 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비해 증가하였으며, IHT를 투여한 군은 GE 투여군보다 더 증가하였다. GE를 투여하였을 때 CD8<sup>+</sup> 세포는 대조군에 비해 증가하였으나, IHT를 투여한 군은 GE 투여군에 비해 별 차이가 없었다. 그러나 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 세포의 비율은 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 인삼의 성분인 Rg1이 helper T 세포의 비율을 증가시킨다는 Lee의 보고<sup>15)</sup>와도 유사한 결과이며, IHT는 인삼의 helper T 세포에 대한 작용을 더욱 증강시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

B220<sup>+</sup> 세포는 GE를 투여하였을 때 대조군과 별 차이가 없었으며, IHT를 투여하였을 때도 GE 투여군에 비해 별 차이가 없었다. Thy1<sup>+</sup> 세포는 GE를 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였으며, IHT를 투여하였을 때 GE 투여군보다 더 증가하였다. 이 결과는 IHT가 GE에 의해 증가되는 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population을 더욱 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 시사하는 것이다. 비장세포의 CD4<sup>+</sup> 세포는 GE를 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였으며, IHT를 투여하였을 때 GE 투여군보다 더 증가하였다. 비장세포의 CD8<sup>+</sup> 세포는 GE를 투여하였을 때 대조군에 비해 별 차이가 없었으며, IHT를 투여하였을 때 GE 투여군에 비해 차이가 없었다. 이는 인삼이 비장세포의 helper T 세포 population을 증가시킨다는 Han 등의 보고<sup>38)</sup>와도 동일한 결과이다. 이러한 결과는 IHT가 인삼에 의해 증가되는 splenic T 세포 중 주로 Th 세포의 population을 더욱 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 시사하는 것이다.

Macrophages는 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 활성화되어 phagocytosis가 촉진 된다<sup>39)</sup>. *In vitro* 실험에서 GE 처리하였을 때 chemiluminescence (CL)양은 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하였다. IHT를 처리 하였을 때 GE 처리하였을 때에 비해 CL양이 감소하였다. *In vivo* 실험에서도 GE를 투여한 군은 대조군에 비해 CL양이 증가하였으나, IHT 투여군은 GE 투여군에 비해 감소하였다. 이는 인삼 추출물이 phagocytosis를 증가시킨다는 Song 등의 보고<sup>40)</sup>와도 동일한 결과이나, IHT는 GE 투여군에 비해 phagocytic activity를 감소시켜 비특이적면역반응을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

Nitric oxide (NO)는 T-lymphocyte의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다<sup>40)</sup>. *In vitro* 실험에서 LPS와 γ-interferone을 처리하였을 때 LPS와 γ-interferone을 처리하지 않은 대조군에 비해 NO 생성이 증가하였다. GE를 처리하였을 때 NO양은 10 μg/ml 이하의 농도에서 대조군에 비해 증가하였으며, IHT를 처리하였을 때 10 μg/ml 이하의 농도에서 GE 처리군보다 NO 생성이 더 증가하였다. *In vivo* 실험에서도 GE 투여군은 LPS와 γ-interferone을 처리한 대조군에 비해 NO 생성이 증가하였으며, IHT를 투여한 군은 GE 투여군보다 더 증가하였다. 이는 인삼이 NO 생성을 촉진한다는 Friedl 등의 보고<sup>31)</sup>와 Gillis의 보고<sup>36)</sup>와도 동일한 결과이며, IHT는 GE보다 NO 생성을 더 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과 인삼을 투여하였을 때에 비해 인삼호도탕

을 투여하였을 때 대체적으로 특이적 및 비특이적 면역반응이 저하되었으나, 인삼호도탕을 투여하였을 때 인삼을 투여하였을 때에 비해 흉선세포와 비장세포에 있는 helper T 세포를 증가시켰다는 것은 매우 흥미로운 결과이다. 생체에서 일어나는 면역반응은 매우 다양하기 때문에, 이러한 실험결과는 인삼호도탕이 본 실험에서 관찰한 면역 경로가 아닌 또 다른 경로를 통하여 면역반응을 조절할 수 있음을 강력히 시사하는 것이며 이에 대한 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 과제이다.

## 결 론

인삼호도탕은 흉선세포 및 비장세포의 생존율을 인삼에 비해 감소시켰으며, 흉선세포의 CD4<sup>+</sup> 세포, 비장세포의 Thy1<sup>+</sup> 세포 및 비장세포의 CD4<sup>+</sup> 세포 population을 인삼에 비해 증가시켰고, 복강 macrophages의 phagocytic activity를 인삼에 비해 감소시켰으며, nitric oxide의 생성을 인삼에 비해 증가시켰다.

이상의 실험결과 인삼호도탕은 인삼에 비해 특이적 및 비특이적 면역반응을 약화시킬 수 있는 탕제라 사료된다.

## 감사의 글

“이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임”(지방연구중심대학 육성사업/헬스케어기술개발사업단)

## 참고문헌

1. 배기환. 한국의 약용식물학. 교학사, p 49, 2001.
2. 한국약용식물학연구회저. 종합약용식물학. 학창사, p 137, 2000.
3. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海, 上海科學技術出版社, p 1546, 1978.
4. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 成輔社, p 1546, 1982.
5. 譚興貴. 中醫藥膳學. 中國中醫藥出版社, p 370, 2003.
6. 鄭進機 外. 中醫學概論. 癸丑文化社, pp 45-48, 2003.
7. 劉正才 外. 中醫免疫. 重慶, 重慶出版社, pp 15-20, 1983.
8. Eun, J.S., Park, H., Lee, K.A., Kwon, J. and Ahn, M.S. Effects of the administration of water extract of Juglandis Semen without inner cortex and with inner cortex on activity of splenocytes and macrophages in mice. Kor. J. Oriental Physiology & Pathology 20(5):1217-1222, 2006.
9. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 2ed. p 5, Saunders, 1994.
10. Kim, J.Y., Germolec, D.R. and Luster, M.I. Panax ginseng as a potential immunomodulator: studies in mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 12(2):257-276, 1990.
11. Wang, H., Actor, J.K., Indrigo, J., Oslén, M. and Dasgupta, A. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: an in vitro cytokine study using mouse

- macrophages. Clin. Chim. Acta. 327(1-2):123-128, 2003.
12. Larsen, M.W., Moser, C., Hoiby, N., Song, Z. and Kharazmi, A. Ginseng modulates the immune response by induction of interleukin-12 production. APMIS, 112(6):369-373, 2004.
13. Liou, C.J., Huang, W.C. and Tseng, J. Long-term oral administration of ginseng extract modulates humoral immune response and spleen cell functions. Am. J. Chin. Med. 33(4):651-661, 2005.
14. Kenarova, B., Neychev, H., Hadjiivanova, C. and Petkov, V.D. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from Panax ginseng. Jpn. J. Pharmacol. 54(4):447-454, 1990.
15. Lee, E.J., Ko, E., Lee, J., Rho, S., Ko, S., Shin, M.K., Min, B.I., Hong, M.C., Kim, S.Y. and Bae, H. Ginsenoside Rg1 enhances CD4(+) T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation. Int. Immunopharmacol. 4(2):235-244, 2004.
16. Xiaoguang, C., Hongyan, L., Xiaohong, L., Zhaodi, F., Yan, L., Lihua, T. and Rui, H. Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. J. Ethnopharmacol. 60(1):71-78, 1998.
17. Kaneko, H. and Nakanishi, K. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. J. Pharmacol. Sci. 95(2):158-162, 2004.
18. An, R.B., Kim, H.C., Tian, Y.H. and Kim, Y.C. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of Juglans sinensis. Arch. Pharm. Res. 28(5):529-533, 2005.
19. Ahn, C.B., Song, C.H., Kim, W.H. and Kim, Y.K. Effects of Juglans sinensis Dode extract and antioxidant on mercury chloride-induced acute renal failure in rabbits. J. Ethnopharmacology. 82: 45-49, 2002.
20. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2844, 1978.
21. 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.
22. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65: 55, 1983.
23. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R. Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129: 23, 1990.
24. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179: 873-879, 1994.

25. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of *Plasmodium faciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*. 59(9):3280, 1991.
26. 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.
27. 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.
28. Channon, J.Y., Leslie, C.C. and Johnston, Jr. B. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol*. 41: 450, 1987.
29. Scaglione, F., Ferrara, F., Dugnani, S., Falchi, M., Santoro, G. and Frascini, F. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp. Clin. Res*. 16(10):537, 1990.
30. See, D.M., Broumand, N., Sahl, L. and Tilles, J.G. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35(3):229, 1997.
31. Friedl, R., Moeslinger, T., Kopp, B. and Spieckermann, P.G. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Panax ginseng* root in RAW 264.7 cells. *Br. J. Pharmacol*. 134(8):1663, 2001.
32. Wilasrusmee, C., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., Kittur, S. and Kittur, D.S. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am. Surg*. 68(10):860, 2002.
33. Liu, J., Wang, S., Liu, H., Yang, L. and Nan, G. Stimulatory effect of saponin from *Panax ginseng* on immune function of lymphocytes in the elderly. *Mech. Ageing Dev*. 83(1):43, 1995.
34. Luo, Y.M., Cheng, X.J. and Yuan, W.X. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb1 on immunity in cold water swim stress mice and rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 14(5):401, 1993.
35. Soares, D.M.R., Costa, V.F.S., Souza, M.A., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmao, C.M.L. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J. Pharm. Pharmacol*. 54(11):1515, 2002.
36. Gillis, C.N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem. Pharmacol*. 54(1):1, 1997.
37. 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.
38. Han, S.K., Song, J.Y., Yun, Y.S. and Yi, S.Y. Ginsan improved Th1 immune response inhibited by gamma radiation. *Arch. Pharm. Res*. 28(3):343, 2005.
39. Song, Z., Moser, C., Wu, H., Larsen, M.W., Johansen, H.K., Faber, V., Kharazmi, A. and Hoiby, N. Ginseng modulates the immune response via its effect on cytokine production-secondary publication. *Ugeskr. Laeger*. 167(33):3054, 2005.