

동충하초 추출물이 생쥐 비장세포에 미치는 영향

이제영^{#1}, 노성수¹, 서영배^{1*}

대전대학교 한의과대학 본초학교실

Research on Effects of Cordyceps Sinensis in Spleen Cells of Mouse.

Jey-Young Lee^{#1}, Seong-Soo Roh¹, Young-Bae Seo^{1*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University
Daejeon 300-716, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to know the effect of Cordyceps sinensis(CS) on the immune inflammatory responses of spleen cells and function or immunocytes of the normal mouse.

Methodes : We investigated effects of Cordyceps sinensis(CS) on normal immunocytes, gene expression of IL-12, IFN- γ and surface-receptor expression of CD3 ϵ +, CD4+, CD8+ and CD19+ cells were measured by PCR and FACS.

Results : CS activated adhesive splenic cells morphologically as compared with the control group in the normal spleen cells of BALB/C mice. CS enhanced gene expression of interleukin-12 and interferon-gamma in a dose-dependent manner in the normal spleen cells of BALB/C mice. CS reduced the number of activating cells and surface-receptor expression of CD4+, CD8+ and CD19+.

Conclusion : Cordyceps sinensis will be used as a stable remedium in the auto-immune diseases.

Keywords : Cordyceps sinensis, Spleen, Arthritis

* 교신저자 : 서영배, 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2625 · E-mail : genin@dju.ac.kr

제 1저자 : 이제영, 대전대학교 한의과대학
· Tel : 042-280-2640 · E-mail : ddede@dju.ac.kr

· 접수 : 2007년 8월 23일 · 수정 : 2007년 9월 19일 · 채택 : 2007년 9월 21일

서론

류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis : RA)은 교원성 질환 (connective tissue disease)의 일종으로 주로 다발성 관절염을 일으키는 전신 염증성 자가질환이며, 활액막의 만성 비대 및 염증반응이 나타나 관절연골과 그 주위조직이 파괴되어 초기에는 관절의 부종과 동통이 초래되나, 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발된다^{1,2)}.

RA의 병인적 가설은 감염설 (streptococcus, diphtheroid, mycoplasma, virus 등), 비타민 결핍, 호르몬의 부족화 및 면역학적 인체반응 등이 제기되어 있는데, 면역학과 분자생물학의 발전으로 현재 RA의 병인으로 가장 지지를 받는 이론은 자가면역반응이다^{3,4)}.

冬蟲夏草에는 免疫器官에 대한 작용, 중추신경계 작용, 抗腫瘤작용, 腎機能에 대한 작용, 心血管작용, 抗衰老작용, 鎮靜催眠작용 등 다양한 藥理作用이 있으며^{5,6)}, 이 중 면역증강 효과에 대하여 Liu⁷⁾ 등, Chen 등⁸⁾은 冬蟲夏草가 면역증강제로써 면역결핍이나 면역이 억제된 환자에게 매우 유용하게 사용될 수 있음을 보고 하였고, 이와는 반대로 면역억제 효과에 대하여 Zhu⁹⁾, Zhang 등¹⁰⁾은 冬蟲夏草가 기관이식에 있어서 유용한 면역억제제로써 사용될 수 있음을 보고 하였다.

이와 같이 冬蟲夏草가 면역증강과 면역억제에 대하여 다양한 면역조절작용이 있는 藥材임에도 불구하고, 단순한 면역증강제로써 인식되고 있으며 국내에는 분자생물학적 방법을 통한 면역과 관련된 특별한 연구보고가 없는 실정이다.

이에 冬蟲夏草에 면역억제 작용이 있다는 점에 착안하여, 자가면역질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 冬蟲夏草의 가능성을 살펴보고자, in vitro 에서 BALB/C 생쥐의 배양된 비장세포의 활성화 측정, IL-12와 IFN- γ 유전자 발현 측정, CD3e+, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 수 변화 측정 등을 한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 한국화학연구소에서 구입한 BALB/C

4주령 숫컷 생쥐를 분양 받아 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물사육실의 조건은 22±2℃에서 1일중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고행사료 (조단백질 22.1%, 조지방 8.0%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 약물

실험에 사용된 冬蟲夏草 (Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc.)는 1997년 8월 中國 安國市 약제시장에서 구입 한 것을 질소 충전 진공포장하고, 온도 4℃ 저온창고에서 보관 후 실험전 다시 정선한 것만을 사용하였다.

3) 冬蟲夏草 추출물 (Cordyceps sinensis extract : CSE) 제조

冬蟲夏草 200g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Buchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기 (Eyela FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조된 冬蟲夏草 추출물 (14 g)을 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

4) 시약 및 기기

Cordycepin, diethyl pyrocarbonate (DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma (USA)사 제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa (Japan)사 제품을, 역전사효소 (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase : M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega (USA)사 제품을, RNAzolB는 Tel-Test (USA)사 제품을, 우태아 혈청은 Hyclone (Logan, USA)사 제품, 그리고 Agarose (FMC, USA) 등을 사용하였고, 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-CD3e, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD19, FITC-anti-CD28, Propidium Iodide (PI) 및 RNase는 Pharmingen

(USA)사 제품을, rIL-6는 R&D system (USA)사 제품을, 3H-thymidine은 Amersham (USA)에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 spectrophotometer (Shimadzu, Japan), 원심분리기 (Sigma, USA), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Turbo Thermalcycler™ (Bioneer Co., Korea), ice-maker (Vision과학) 및 homogenizer (OMNI, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) Spleen 세포의 RT-PCR

(1) 세포배양

BALB/C 생쥐의 비장에서 비장세포 (spleen cells)를 채취하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구 용혈액 2 ml를 넣고 4°C 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. synovial 세포를 4 well plate, 각 well에 1×10^7 세포씩 분주하고 우태아혈청 결핍 RPMI-1640 배양액에 rIL-6 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 冬蟲夏草 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 함께 3시간 동안 배양하였다.

(2) RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 synovial 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(3) 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT (200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를

합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

(4) cDNA PCR

PCR은 항온수조 방식의 Turbo Thermalcycler™ M (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (p35, IL-12), interleukin-12 (p40, IL-12), 그리고 interferon- γ (IFN- γ)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ μl)와 antisense primer (20 pmole/ μl)를 혼합하여 1 μl 를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3 μl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μl Taq polymerase (5 U/ μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation : 95°C, 5분, denaturation : 95°C, 1분, annealing : 55°C, 1분, elongation : 72°C, 1분씩 25 cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다;

IL-12(p35)는, sense oligonucleotide, 5'-GTCCTTCAGGAATCTGTTC-3' ; antisense oligonucleotide, 5'-GGCTCATGTACTTTCATGAG-3'. IL-12(p40)은, sense oligonucleotide, 5'-ATCTGCTGCTCCACAAGAAG-3' ; antisense oligonucleotide, 5'-TGATGAAGAAGCTGGTGCTG-3'. IFN- γ 는, sense oligonucleotide, 5'-AACGCTACACACTGCATCTTGG-3' ; antisense oligonucleotide, 5'-CTCGGATGAGCTCATTGAATGC-3'.

β -actin은, sense oligonucleotide, 5'-TGGAATCTGTGGCATCCATGAAAC-3' ; antisense oligonucleotide, 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCG-3'.

PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 측정하였다.

2) 유세포 형광분석기 (flow cytometer)를 이용한 비장세포 측정

(1) 세포배양

BALB/C 생쥐의 비장에서 비장세포 (spleen cells)를 채취하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 2 ml를 넣고 37°C 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다.

3) 유세포 형광분석기 (flow cytometer)를 이용한 면역세포 측정

생쥐에서 분리한 비장세포에 적혈구용혈액을 처리하여 적혈구를 제거하고 24 well plate를 이용 각 well에 5×10^5 세포의 冬蟲夏草 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가하여 72시간 배양하였다. 배양 후 세포들을 인산완충생리식염수 (3% 우태아혈청, 0.1% NaN_3)로 2회 세척하였다. 4°C에서 면역형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD4, PE-anti-CD8, FITC-anti-CD19를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 씻은 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton dickinson, USA)로 면역활성세포를 분석하였다. 골수세포와 비장세포 분석은 CellQuest 프로그램을 이용하여 CD4+, CD8+ 과 CD19+ 세포의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

4) 비장세포의 활성화 측정

생쥐에서 분리한 비장세포를 각 well에 5×10^5 세포와 冬蟲夏草 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가하여 7일간 배양한 후에 비장부착세포의 형태변화를 inverted microscope (x100)로 관찰하였다.

5) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정 하였다.

결 과

1. 冬蟲夏草에 의한 비장세포 활성화 분석

BALB/C 생쥐의 비장을 적출하여 7일동안 PWM, CSE와 동시배양한 후 비장세포의 형태적인 변화를

inverted 현미경(x100)으로 관찰하였다.

그 결과 대조군(A)은 부착세포들이 약간의 활성화가 보였고, PWM 처리군(B)은 부유세포의 활성화(✓)가 나타났다. CSE를 처리한 후 4일째(C)에는 부유세포의 감소와 부착세포의 활성화(✓)가 대조군에 비하여 증가되었고, 7일째(D)에는 부유세포의 급격한 감소와 부착세포의 현저한 활성화(✓)가 대조군에 비하여 크게 증가되었다(Fig. 1).

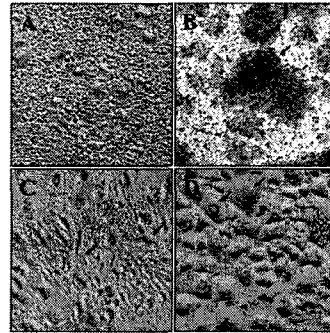


Fig. 1. Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) on the Activation of Spleen Cells

Spleen cells were cultured in 24 well plate for 7days. Spleen cells divided into :A, non-treatment ; B, PWM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ; C, CSE treatment 4 days ; D, CSE treatment 7 days. They show activation spleen cells (arrow).

2. 비장세포에서 IL-12 유전자 발현 분석

IL-12(p35) 유전자발현에서 media 대조군 (lane M)의 Ht값은 23이었으나 CSE 처리군에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 1)의 Ht값은 90이었고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 2)의 Ht값은 85이었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 3)의 Ht값은 49이었고, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 4)의 Ht값은 62로 대조군에 비하여 74.5%에서 63.0%까지 IL-12(p35)의 유전자발현이 농도 의존적으로 증가 되었다(Fig. 2).

IL-12 (p40) 유전자발현에서 media 대조군 (lane M)의 Ht값은 41이었으나 CSE 처리군에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 1)의 Ht값은 121이었고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 2)의 Ht값은 114이었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 3)의 Ht값은 48이었고, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 4)의 Ht값은 75로 대조군에 비하여 66.2%에서 45.4%까지 IL-12 (p40)의 유전자발현이 농도 의존적으로 증가 되었다(Fig. 3).

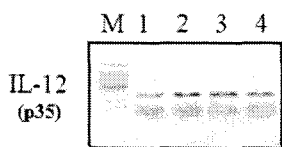


Fig. 2. Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) on IL-12 (p35) Gene Expression in Spleen Cells

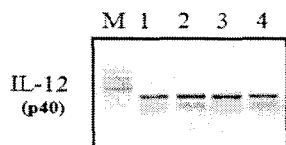


Fig. 3. Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) on IL-12 (p40) Gene Expression in Spleen Cells

Mouse spleen cells were cultured with CSE and rIL-6 for 3 hrs. RT-PCR was performed by cytoplasmic RNA isolated. Lane M, 100bp DNA marker; lane 1, RPMI-1640 media control; lane 2, CSE (100); lane 3, CSE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); lane 4, CSE (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and internal control (β -actin).

3. 비장세포에서 IFN- γ 유전자 발현 분석

IFN- γ 유전자 발현에서 대조군 (lane 1)의 Ht값은 47이었으나 CSE 처리군에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 2)의 Ht값은 169이었고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 3)의 Ht값은 101이었으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 (lane 4)의 Ht값은 45로 농도 의존적으로 증가 되었다(Fig. 4).

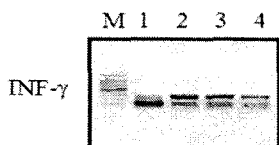


Fig. 4. Effects of Cordyceps Sinensis Extract (CSE) on IFN- γ Gene Expression in Spleen Cells

Mouse spleen cells were cultured with CSE and rIL-6 for 3 hrs. RT-PCR was performed by cytoplasmic RNA isolated. Lane M, 100bp DNA marker; lane 1, RPMI-1640 media control; lane 2, CSE (100); lane 3, CSE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); lane 4, CSE (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and internal control (β -actin).

4. 비장세포 배양에 대한 면역세포의 변화 분석

1) CD4+ 세포 수의 변화

비장세포에서 대조군 (B)의 CD3 ϵ +CD4+는 25.8%이었으나 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군 (C)의 CD3 ϵ +CD4+ 세포 수는 23.4%로 대조군에 비하여 감소 되었다.

CSE 투여군 (D)의 CD3 ϵ +CD4+ 세포 수는 19.3%로 대조군에 비하여 25.2%의 면역세포 감소효과가 나타났다(Fig. 5).

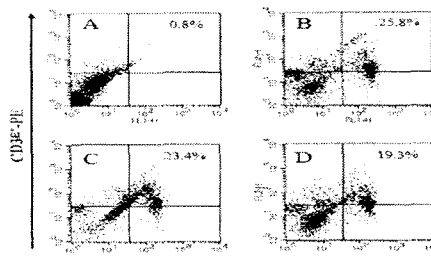


Fig. 5. Effects of Cordyceps Sinensis extract (CSE) on the Expression of CD3 ϵ + and CD4+ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (A) Not stain; B, Control; C, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS; D, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CSE were stained with CD3 ϵ +PE/CD4+-FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD4+ cells.

2) CD8+ 세포 수의 변화

비장세포에서 대조군 (B)의 CD3 ϵ +CD8+는 31.4%이었으나 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리군 (C)의 CD3 ϵ +CD8+ 세포 수는 36.1%로 14.1%의 증가가 나타났다.

CSE 투여군 (D)의 CD3 ϵ +CD8+ 세포 수는 21.6%로 대조군에 비하여 31.3%의 현저한 면역세포 감소가 관찰되었다(Fig. 6).

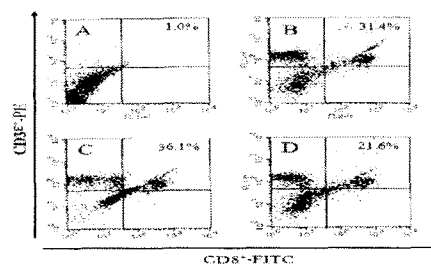


Fig. 6. Effects of Cordyceps sinensis extract (CSE) on the Expression of CD3 ϵ + and CD8+ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Events in panel (A) Not stain; B, Control; C, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS; D, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CSE were stained with CD3 ϵ

+PE/CD8+-FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD8+ cells.

3) CD19+ 세포 수의 변화

비장세포에서 대조군 (I)의 CD19+는 38.4%이였으나 LPS (10 μ g/ml) 처리군 (II)의 CD19+ 세포 수는 67.3%로 대조군에 비하여 44%의 증가가 나타났다.

CSE 투여군 (III)의 CD19+ 세포 수는 30.5%로 대조군에 비하여 20.6%의 감소가 나타났다(Fig. 7).

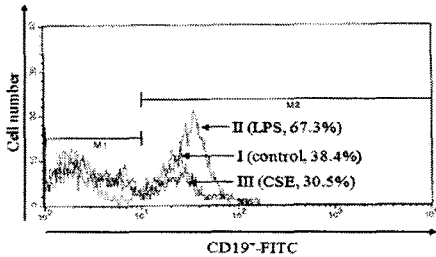


Fig. 7. Effects of Cordyceps sinensis extract (CSE) on the Expression of CD19+ in Spleen Cells Culture

The spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Control : I, 10 μ g/ml LPS : II, 100 μ g/ml CSE were stained with CD19+-FITC. Two group treated with CSE showed increased number of CD19+ cells.

고찰

冬蟲夏草에 관한 記錄은 《本草備要》¹¹⁾에서 볼 수 있는데 《證類本草》¹²⁾蟲蟲部에 수록되어 있는 “蟬花”도 冬蟲夏草屬 菌類 (Cordyceps sobolifera)인 것으로 보아 冬蟲夏草類 藥材가 매우 오래전부터 藥材로 사용되어 왔음을 알 수 있다.

冬蟲夏草는 산지에 따라 爐蟲草, 灌蟲草, 瀆蟲草 등으로 구분 되는데 爐蟲草는 四川 西部의 雪山 일대에서 생산되는 것으로 康定이 집산지이며 품질이 가장 좋은 것으로 취급 되고 있다. 灌蟲草는 四川 北 松潘에서 생산 되는 것으로 灌縣이 집산지이며 爐蟲草 다음으로 취급되고, 瀆蟲草는 瀆西 德欽, 中甸, 麗江 및 四川 昭覺, 西昌 등에서 생산 되는 것으로 집산지는 昆明이며 품질은 灌蟲草 다음으로 취급 되는데, 크기에 따라서 蟲草王, 散蟲草, 把蟲草 등으로 구분되고 있다^{13,14)}.

冬蟲夏草에 관한 실험적 연구에 의하면 腎機能에 대하여 Bao 등¹⁵⁾은 冬蟲夏草가 aminoglycoside로 유발된 노년기 신독성 환자에 보호효과가 있다 하였

고, Zhen 등¹⁶⁾은 Gentamycin과 Kanamycin으로 유발된 급성 신부전에 冬蟲夏草의 투여로 신사구체 세포의 신속한 회복이 유도 되었다고 보고 하였고, Zhao 등¹⁷⁾은 冬蟲夏草가 cyclosporine A로 유발된 신독성에 대하여 신사구체와 간질의 손상을 개선한다 하였고, Lin 등¹⁸⁾은 冬蟲夏草 메탄을 추출 분획 중 F-2에 의하여 IL-1과 IL-6로 자극된 human mesangial cells (HMC) 증식이 현저하게 억제 되고, H1-A분획에 의하여 HMC가 억제되며, immunoglobulin A nephropathy (IgAN)를 완화하여 임상적 및 조직학적으로 개선 한다 하였다.

免疫系統에 관한 연구보고는 면역증강작용과 면역억제작용으로 나누어 볼 수 있다. 免疫增強과 관련된 보고로 Chen 등¹⁹⁾은 蟲草多糖이 혈중 단백질의 IFN- γ , TNF- α , IL-1 등을 증가 시키고, 사람 백혈병 세포주 U937에 대하여 78~83%의 증식 억제 효과가 있음을 보고 하였고, Liu 등⁷⁾은 冬蟲夏草가 흰쥐의 Kupffer 세포에 의해 생성된 IL-1, IFN 및 TNF를 증가 시킨다고 하였으며, Liu 등²⁰⁾은 冬蟲夏草가 백혈병 (lukemia) 환자에서 채취된 말초 NK 세포를 활성화시키고, lymphocytes의 CD16 marker 를 개선하며, K562 세포주에 대한 결합율을 개선시켜 백혈병치료에 이용될 수 있음을 보고하였다.

또한 Xu 등²¹⁾은 冬蟲夏草 에탄올 추출물 (CS-II) 은 in vitro 와 in vivo 에서 생쥐의 NK 세포 활성을 뚜렷하게 증가 시키고, cyclophosphamide에 의한 생쥐의 NK 세포 활성억제를 방지 한다고 보고 하였고, Chen 등¹⁹⁾은 冬蟲夏草 추출물 (Cs-Cr)이 말초혈액과 생쥐의 비장에서 T helper 세포의 수와 Lyt-1/Lyt-2 (T helper to T suppressor cell) 비율을 유의성 있게 증가시키고, 비장무게(spleen weight), phagocyte counts 및 식세포 활성을 증가시키며, prednisolone acetate와 cyclophosphamide에 의한 면역억제에 대하여 T helper 세포를 보호한다고 보고 하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면 동충하초의 약리작용은 매우 다양한 약리활성 성분에 의하여 나타나며, 특히 면역과 관련된 약리작용에서 면역증강 및 면역억제 등 서로 다른 약리효과를 보이고 있다. 따라서 면역결핍과 면역억제 환자에게 있어 면역증강제로 사용될 수 있으며, 피부이식과 장기이식 등의 이식요법과 면역계의 과잉반응으로 나타나는 자가면역질환에 있어 면역억제제로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

이에 冬蟲夏草에 면역억제 작용이 있다는 점에

착안하여, 자가면역질환의 하나인 류마티스 관절염 치료제로써 冬蟲夏草의 가능성을 살펴보고자, in vitro 에서 BALB/C 생쥐의 배양된 비장세포의 활성화 분석, IL-12와 IFN- γ 유전자 발현 분석, CD3e+, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 수 변화 분석 등을 시행하였다.

CIA와 관련된 면역학적 연구보고로 Kageyama 등²²⁾은 IFN- γ R가 결여된 DBA/1 생쥐의 CIA에서 IFN- γ 가 Th1/Th2 세포의 분글형이라기보다는 C II 특이적 IgG Ab 수치저하를 통하여 CIA가 악화된다고 하였고, Butler 등²³⁾은 CIA DBA/1 생쥐 모델에서 anti-IL-12 와 anti-TNF의 복합 처리에 의하여 C II 에 특징적인 임파절 세포인 IFN- γ 의 생성과 증식이 감소되고, in vitro 에서 관절염 생쥐의 synovial 세포와 골수의 macrophage에 항원이 처리되었을 때, anti-TNF에 의하여 IL-12 생성이 감소되었으나, anti-IL-12는 TNF 생성에 관한 효과가 없음을 보고 하면서, CIA에 있어서 anti-TNF 와 anti-IL-12의 상보적인 작용은 RA 치료에 새로운 치료법의 접근이 제공 될 수 있다고 하였다.

Triantaphyllopoulos 등²⁴⁾은 in vitro 에서 섬유아 세포의 上淸液이 림프구로부터의 교원질 유발 IFN- γ 의 분비를 억제하고, lipopolysaccharide/IFN- γ 처리된 골수 대식세포에서 생산된 중앙괴사인자와 IL-12의 지수를 감소시키므로, IFN- β 가 CIA에 있어서 유용한 면역조절물질이자 항염증 cytokine 으로써, 류마티스성 관절염의 치료에 응용될 수 있다고 하였다.

Cytokine은 수용성의 단백질 또는 당단백질이며 세포표면의 수용체에 결합해서 매우 소량으로 세포의 분화, 증식과 작용에 영향을 주는데, 이 중에서 백혈구와 백혈구 사이에서 signal을 전달하는 인자를 interleukine (IL)이라 한다^{25, 27)}.

T 림프구는 표면 marker와 작용의 차이에 의해 두가지 아집단 즉, 다른 림프구의 활성화를 촉진하는 CD4+CD8-의 TH 림프구와 표적세포를 파괴하는 CD4-CD8+의 TC 림프구로 나누어지며 이들은 각각 MHC class II 항원, class I 항원에 구속되어 항원을 식별하는 T 세포 수용체를 가진다^{25, 27)}.

Th 림프구는 생성하는 lymphokine 종류의 차이에 의해 다시 TH1과 TH2의 2가지 아집단으로 구분되며, TH 임파구에서 생성되는 interleukine은 지금까지 연구된 보고에 의하면 IL-2, IFN- γ , lymphotoxin 등은 TH1 세포에서 생산되고 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등은 TH2 세포에서 생산되며, IL-3,

TNF- α 및 GM-CSF 등은 TH1 및 TH2 모두에서 생산되는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁷⁾.

IL-12는 NK 세포 뿐 아니라 T 임파구로 하여금 IFN- γ 를 분비하게 하는 작용이 있는데, p35와 p40 이 이항화결합으로 연결된 이형이량체로 구성되어 있다²⁸⁾.

IL-12의 여러 가지 생물학적 작용은 NK 세포 및 T 임파구 집단에서 관찰되는데, CD4+ T 임파구의 분화인자로의 작용 하고, 활성화된 NK 세포와 CD8+ T 임파구의 세포용해능을 증진 시키는 등의 활성으로, 미생물에 의한 대식세포의 활성화를 NK 세포 작용기능의 발달로 연결하기 때문에 자연면역의 매개자로 분류 되고 있다²⁸⁾.

IFN- γ 는 활성화된 T임파구에서 생성되며^{25, 27)}, 면역계에서 가장 강하게 작용하는 것은 IFN- γ 이며 이 IFN- γ 에 특징적으로 나타나는 활성에는 MHC class II 항원과 면역 globulin FC 수용체의 발현 유도, macrophage의 활성화 등이 있다^{25, 27)}.

IFN- γ 는 외부침입자와 후천성 면역등에 대한 숙주의 방어에 중심적 역할을 가진다. IFN- γ 는 T 세포와 NK 세포로부터 분비되고 IL-12에 의하여 생성이 유도된다는 주장과 IL-2, TNF, IL-1에 의하여 NK 세포에서 유도된다는 주장이 있다^{25, 27)}.

이러한 이론적 기반을 토대로 CIA를 중심으로 冬蟲夏草의 면역억제 효과를 실험적으로 입증 하고자 하였으며 유세포 형광분석기를 사용하여 비장세포의 활성화, IL-12 유전자 발현, IFN- γ 유전자 발현, CD4+, CD8+, CD19+ 등의 면역세포 변화를 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

비장세포의 활성화는 BALB/C 생쥐의 적출된 비장을 7일간 배양하여 관찰 되었는데, 대조군에서는 부착세포들이 약간 활성화 되었고, PWM 처리군에서는 부유세포의 활성화가 나타났으며, 冬蟲夏草 처리군에서는 4일째에 부유세포의 감소와 부착세포의 활성화가 대조군에 비하여 증가되고, 7일째에는 부유세포의 급격한 감소와 부착세포의 현저한 활성화가 대조군에 비하여 크게 증가되었다(Fig. 1).

IL-12 유전자 발현에서 IL-12 (p35) 유전자발현은 대조군의 Ht값 23에 비하여 冬蟲夏草 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 처리군의 Ht값은 각각 62, 49, 85, 90 등으로 63.0%에서 74.5%까지 IL-12 (p35)의 유전자발현이 증가 되었다(Fig. 2).

IL-12 (p40) 유전자발현은 대조군의 Ht값 41에 비하여 冬蟲夏草 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 처리군의 Ht값은 각각 75, 48, 114, 121 등으

로 45.4%에서 66.2%까지 IL-12 (p35)의 유전자발현이 증가 되었다(Fig. 3).

IFN- γ 유전자발현은 대조군의 Ht값 47에 비하여 冬蟲夏草 처리군은 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Ht 값이 각각 45, 101, 169로 측정되어 농도 의존적으로 증가 되었는데, 이는 IL-12의 발현에 의하여 IFN- γ 가 증가된다는 경향과 일치되는 것이다(Fig. 4).

CD4+ 세포 수 변화에서 대조군의 비장세포 CD3e+CD4+ 세포 수는 25.8%이었으나, LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 23.4%로 대조군에 비하여 감소 되었으며, 冬蟲夏草 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 19.3%로 대조군에 비하여 25.2%의 면역세포 감소효과가 나타났(Fig. 5).

CD8+ 세포 수 변화에서 대조군의 비장세포 CD3e+CD8+ 세포 수는 31.4%이었으나 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 36.1%로 14.1%의 증가가 나타났으며, 冬蟲夏草 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 21.6%로 대조군에 비하여 31.3%의 현저한 면역세포 감소가 관찰되었다(Fig. 6).

CD19+ 세포 수 변화에서 대조군의 CD19+는 38.4%이었으나 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 67.3%로 대조군에 비하여 44%의 증가가 나타났으며, 冬蟲夏草 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군은 30.5%로 대조군에 비하여 20.6%의 감소가 나타났(Fig. 7).

이상의 결과는 冬蟲夏草가 정상 생쥐의 비장세포를 활성화 시키는 면역증강작용이 있음을 나타내는 것으로, IL-12와 IFN- γ 의 발현이 모두 증가 되는 경향은 이를 뒷받침하는 것으로 볼 수 있다. 다만 CD4+, CD8+, CD19+ 세포 수가 감소되는 결과는 상기의 결과와 다른 양상을 나타내는 것인데, 이는 배양기간 중에 볼 수 있는 증가와 감소경향을 시간대 별로 측정하여 본다면 보다 정확한 변화양상이 측정될 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 in vivo 에서 일치되는 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

冬蟲夏草의 면역억제기능을 관찰하고자 in vitro

에서 BALB/C 생쥐의 배양된 비장세포의 활성화 분석, IL-12와 IFN- γ 유전자 발현 분석, CD3e+, CD4+, CD8+, CD19+ 세포 분석 등을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. BALB/C 생쥐의 정상 비장세포는 冬蟲夏草 투여로 대조군에 비하여 부유세포가 감소되고 부착세포의 현저한 활성도가 관찰되었다.
2. BALB/C 생쥐의 정상 비장세포는 冬蟲夏草 투여로 대조군에 비하여 IL-12 유전자 발현이 증가되었다.
3. BALB/C 생쥐의 정상 비장세포는 冬蟲夏草 투여로 IFN- γ 유전자 발현이 대조군에 비하여 농도 의존적으로 증가 되었다.
4. BALB/C 생쥐의 정상 비장세포는 冬蟲夏草 투여로 대조군에 비하여 CD4+, CD8+, CD19+ 활성세포수와 표면수용체 발현이 억제되었다.

이상의 결과를 통하여 冬蟲夏草가 in vivo 에서 일치되는 면역억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 冬蟲夏草가 자가면역질환에 있어서 매우 안정적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 면역조절작용이라는 관점에서 冬蟲夏草에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김호연. 류머티스관절염의 병인. 대한의학협회지. 1992;35(10):1198.
2. 金穆鉉. 류머티양 관절염의 역학. 대한의학협회지. 1986;29(1):7~10.
3. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 1992:109~20.
4. James. B, Wyngaarden Cecil. Textbook of Medicine, Philadelphia: WA Saunders company. 1992:1508~15.
5. 中藥大辭典編纂委員會編. 中藥大辭典(券上). 臺北: 新文豐出版公司. 1982: 497~8.
6. 周金黃. 主編. 中藥免疫藥理學. 北京: 人民軍醫出版社. 1994:349~53.
7. Liu P. Zhu J, Huang Y and Liu C. Influence of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. and rat serum containing same medicine on IL-1, IFN and TNF produced by rat Kupffer cells. Chung Kuo Chung

Yao Tsa Chih. 1996;21(6) : 367~9, 384.

8. Chen GZ, Chen GL, Sun T, Hsieh GC and Henshall JM. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J (Engl)*. 1991;104(1):4~8.
9. Zhu XY and Yu HY. Immunosuppressive effect of cultured *Cordyceps sinensis* on cellular immune response. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1990;10(8):454, 485~7.
10. Zhang Z and Xia SS. *Cordyceps Sinensis*-I as an immunosuppressant in heterotopic heart allograft model in rats. *J Tongji Med Univ*. 1990;10(2):100~3.
11. 汪昂. 增補本草備要. 서울: 高文社. 1974:101.
12. 唐慎微. 重修政和經史證類備用本草. 臺北: 南天書局有限公司. 1976:427.
13. 張貴君 主編. 常用中藥鑑定大全. 上海: 黑龍江科學技術出版社. 1993:286~8.
14. 王國棟 主編. 冬蟲夏草類(生態·培植·應用). 北京: 科學技術文獻出版社. 1995:9~11,13,26,102~116.
15. Bao ZD, Wu ZG and Zheng F. Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in old patients. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1994;14(5):271~273, 259.
16. Zhen F, Tian J and Li LS. Mechanisms and therapeutic effect of *Cordyceps sinensis* (CS) on aminoglycoside induced acute renal failure (ARF) in rats. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1992;12(5):288~91, 262.
17. Zhao X, Li L. *Cordyceps sinensis* in protection of the kidney from cyclosporine A nephrotoxicity. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*. 1993;73(7):410~2, 447.
18. Lin CY, Ku FM, Kuo YC, Chen CF, Chen WP, Chen A and Shiao MS. Inhibition of activated human mesangial cell proliferation by the natural product of *Cordyceps sinensis* (HI-A): an implication for treatment of IgA mesangial nephropathy. *J Lab Clin Med* 1999;133(1):55~63.
19. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS and Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*. 1997;60(25):2349~59.
20. Liu C, Lu S and Ji MR. Effects of

Cordyceps sinensis on in vitro natural killer cells. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1992;12(5):267~9, 259.

21. Xu RH, Peng XE, Chen, GZ and Chen GL. Effects of *cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J (Engl)*. 1992;105(2):97~101.
22. Kageyama Y, Koide Y, Yoshida A, Uchijima M, Arai T, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyoshi M, Kushida K and Inoue T. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. *J Immunol*. 1998;161(3):1542~8.
23. Butler DM, Malfait AM, Maini RN, Brennan FM and Feldmann M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 1999;29(7):2205~12.
24. Triantaphyllopoulos KA, Williams RO, Taylor H and Chernajovsky Y. Amelioration of collagen-induced arthritis and suppression of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha production by interferon-beta gene therapy. *Arthritis Rheum*. 1999;42(1):90~9.
25. 中島 泉 著·吳贊鎬 譯. 신면역학입문. 서울: 지구문화사. 1997: 63,118,120,123~4,127~8,175~6,185~7,234,258~9
26. 서울대학교 의과대학편. 면역학. 서울: 서울대학교출판부. 1997: 100,114,117,122~31,179~80,253,255,262,266~9.
27. 서울대학교 의과대학편. 종양학. 서울: 서울대학교출판부. 1992: 188~9,228~9.
28. 김광혁 외 譯. 세포·분자 면역학. 서울: 정문각. 1998:306~7.