

# 소양인 荊防敗毒散의 마우스 T 세포 활성화에 대한 실험적 연구

김중배<sup>1</sup> · 강 희<sup>2</sup> · 안광석<sup>1</sup> · 심범상<sup>1</sup> · 김성훈<sup>3</sup> · 최승훈<sup>1</sup> · 안규석<sup>1,4\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실 & 경희대학교 한의학 연구소, 2: 경희대학교 동서의학대학원 동서의과학,  
3: 암예방소재개발연구센터, 4: BK21 경희대학교 한의과학사업단

## Effect of Soyangin-Hyeongbangpaedok-san on Anti-CD3 Stimulated Mouse T Cells In Vivo and In Vitro

Joong Bae Kim<sup>1</sup>, Hee Kang<sup>2</sup>, Kwang Seok Ahn<sup>1</sup>, Bumsang Shim<sup>1</sup>,  
Sung Hoon Kim<sup>3</sup>, Seung Hoon Choi<sup>1</sup>, Kyoo Seok Ahn<sup>1,4\*</sup>

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine & Institute of Oriental Medicine.

2: Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science.

3: Cancer Preventive Material Development Research Center, 4: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center, Kyunghee University

Soyangin-Hyeongbangpaedok-san(SHBPDS) is a herbal formula used for the common cold or upper respiratory illness. In order to investigate the effect of SHBPDS, mice were orally administered with SHBPDS alcohol extract for 7 days followed by intravenous anti-CD3 injection. In addition, splenocytes and CD4 T cells were cultured with SHBPDS in response to anti-CD3 in vitro and cytokines and transcription factors were evaluated. In vivo treatment with SHBPDS significantly augmented the expressions of the percentage of CD4 T cells and CD 69, an indicator of early T cell activation. Serum levels of IL-4 were significantly increased but those of IFN- $\gamma$  and IL-2 did not reach statistical significance. The expressions of IFN- $\gamma$  and T-bet mRNA were significantly downregulated in SHBPDS treated mice while those of IL-4 and C-Maf were significantly upregulated. In vitro stimulation of splenocytes and CD4 T cells by SHBPDS resulted in a reduction in IFN- $\gamma$  secretion and STAT4 activity. The IL-4 releases from both cells were slightly reduced, but STAT6 activity was rather increased. In conclusion, SHBPDS exerted an inhibition in the expression of IFN- $\gamma$ , T-bet and STAT4 while IL-4, C-Maf and STAT6 were increased. Further studies are required to examine its pharmacological effects using more appropriate animal experiments.

Key words : Soyangin-Hyeongbangpaedok-san, IFN-gamma, IL-4, Th cell

### 서 론

감기는 가장 빈번하게 발생하는 호흡기 질환인데, 일반적으로 respiratory syncytial virus, influenza virus, coronavirus, parainfluenza virus, adenovirus에 의한 경우가 대부분이다<sup>1)</sup>. 상기도 호흡기 감염에 해당되는 감기는 중이염, 부비동염 및 다른 만성기관지질환을 악화시키는 요인이 되기도 한다. 바이러스에 의해 호흡기상피세포에 감염되면 이 부위로 중성구와 림프구가 증가하면서 여러 가지 염증성 케모카인 및 사이토카인을 합성하기 시작하고 상기도 부위의 국소 림프절에 위치한 특이면역계는

바이러스 제거를 위한 면역반응을 전개한다<sup>2-4)</sup>. 면역반응은 일반적으로 체액성 면역반응과 세포매개형 면역반응으로 분류되는데, 이 두가지 면역반응에 의해 바이러스 감염을 예방하거나 바이러스 증식을 조절하고 재감염으로부터 보호할 수 있다<sup>5)</sup>.

특이면역의 중추적 역할을 하는 T helper 세포는 분비하는 사이토카인에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 분류된다<sup>6)</sup>. Th1 세포는 주위 환경에 interleukin (IL)-12나 IL-18이 있을 때 interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )을 분비하는데, 바이러스 등 세포에 기생하는 미생물에 효과적인 세포 매개형 면역 반응과 염증성 반응에 관여하며 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13을 주로 분비하고 세포 외 미생물을 제거하거나 알러지반응을 담당하는 체액성 반응에 주로 관여한다. Th1 세포와 Th2 세포가 분비하는 사이토카인들의 균형은 여러 가지 많은 인자에 의해 영향을 받지만 최근에 확

\* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2009/05/14 · 수정 : 2009/05/26 · 채택 : 2009/06/13

인된 다양한 전사인자들이 이들의 발현에 영향을 준다. 대표적으로 T-bet이라고 불리는 전사인자는 Th1 세포에 주로 발현되는데 IFN- $\gamma$ 의 promoter에 결합하거나 Th1 세포의 IL-12 receptor  $\beta$  2 chain의 발현을 촉진함으로써 IFN- $\gamma$ 의 발현량을 증가시킨다<sup>7-9)</sup>. STAT4는 주위로부터 IL-12의 자극을 받으면 인산화되어 핵내로 이동하여 IFN- $\gamma$ 의 promoter에 결합한다<sup>10-12)</sup>. 한편 GATA-3와 c-Maf은 Th2 세포에서 발현되어 IL-4의 promoter나 enhancer에 결합하여 IL-4 mRNA 발현을 자극하며 STAT6 역시 인산화되어 IL-4의 promoter에 결합함으로써 같은 작용을 한다<sup>3,14-16)</sup>.

少陽人 荊防敗毒散은 《攝生衆墓方》의 傷寒時氣發熱 頭痛 項強 肢體煩疼症을 치료하기 위하여 입방된 荊防敗毒散을 東武 이제마가 枳殼 桔梗 川芎 甘草를 빼고, 生地黃 地骨皮 車前子를 더하여 만든 처방이다<sup>17)</sup>. 이 처방의 적응증은 發熱, 頭痛이 있으나 惡寒이 심하지 않은 傷寒時氣의 증후를 보일 때이며 특히 少陽人의 체질적 특성을 고려하여 正氣를 해치지 않으면서 邪氣를 涼散시킬 목적으로 이용된다<sup>18)</sup>. 현대의학적으로는 發熱을 동반하는 상기도감염질환에 응용되며, 이 처방에 대한 연구로는 진통·해열·항경련 및 진정작용, 항노화효과와 항염증 효과가 보고된 바 있다<sup>19,20)</sup>. 본 연구에서는 마우스에 少陽人 荊防敗毒散 알콜추출물을 경구투여한 후 T 세포 활성을 유도했을 때 일어나는 사이토카인 분비량과 발현 및 전사인자들의 변화, 그리고 림프구의 비율을 분석하여 몇 가지 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 약재

少陽人 荊防敗毒散(Soyangin-Hyeongbangpaedok-san : SHPBDS)의 구성약물과 용량은 東醫壽世保元<sup>21)</sup>에 준하였으며 (Table 1) 이들 약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. Constituents of Soyangin-Hyeongbangpaedok-san(SHPBDS)

Scientific name	Chinese name	Source of Plant	Dose
<i>Notopterygium incisum Ting</i>	羌活	China	3.75 g
<i>Angelica pubescens Maxim.</i>	獨活	Korea	3.75 g
<i>Bupleurum falcatum L.</i>	柴胡	China	3.75 g
<i>Peucedanum decursivum Maxim</i>	前胡	China	3.75 g
<i>Poria cocos</i>	赤茯苓	China	3.75 g
<i>Schizonepetae tenuifolia Briq</i>	荊芥	Korea	3.75 g
<i>Ledebouriellae divaricata Hiroe</i>	防風	China	3.75 g
<i>Lycium chinense Mill.</i>	地骨皮	China	3.75 g
<i>Rehmannia glutinosa Libosch.</i>	生地黃	Korea	3.75 g
<i>Plantago asiatica L.</i>	車前子	China	3.75 g
Total amount			37.5 g

### 2. 동물

본 연구에 사용한 실험용 쥐는 생후 7주령의 BALB/c 암컷 마우스(SCL Japan)를 사용하였으며, 항은 항습 상태에서 일주일 간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사료는 방사선 처리가 된 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 사용하였으며, 음용수는 멸균처리된 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수

는 무제한으로 제공하여 사육하였다.

### 3. 배지 및 시약

Fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic는 GIBCO에서 구입하였고 RPMI-1640는 WelGene에서 구입하였다. MACS mouse CD4(L3T4) microbeads, MACS 세포분리 컬럼(LS column) 그리고 MACS Midi-separator는 Miltenyi Biotec에서 구입하였다. ELISA에 사용한 모든 EIA kit, anti-mouse CD3 $\epsilon$  항체 그리고 anti mouse CD28 항체, recombinant mouse interleukin-12(rmIL-12), phycoerythrin(PE) -anti-mouse CD69 Ab (H1.2F3), PE-anti-mouse CD4 Ab(L3T4)(GK1.5), Fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse-CD8a Ab (Ly-2)(53-6.7), FITC-anti-mouse CD3 Ab (145-2C11)는 BD PharMingen (USA)에서 구입하였다. Superscript Reverse Transcriptase는 Invitrogen (USA)에서 구입하였으며 Power SYBR Green PCR Master Mix는 Applied Biosystems (USA)에서 구입하였다. RNeasy Mini kit는 Qiagen (Germany)에서 구입하였다. Phospho-STAT4, phospho-STAT6,  $\beta$ -actin은 Santa Cruz Technology (USA)에서 구입하였다.

### 4. 약재 추출물 제조

약재 추출은 少陽人 荊防敗毒散 약재를 유리로 된 추출용기에 넣고 85% methanol을 충분히 잠기도록 넣은 후 하루 동안 상온에서 浸出한 후 sonicator(Elmasonic, Germany)를 사용, 50°C에서 1시간씩 2회 물리적 자극을 가하여 浸出을 촉진하여 시행하였다. 이 용액을 여과지로 여과한 후 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압증류농축한 결과 얻은 농축액을 freezing dryer(Eyela, Japan)로 24시간 동결건조하여 분말 상태의 시료를 얻고 이것을 실험에 사용하였다(수율은 7.96%).

### 5. 한약 경구투여와 미정맥을 통한 anti-CD3 자극

실험동물은 각각 정상군, 대조군, 한약투여군으로 분류하였다. 한약 경구투여를 위해 생리식염수에 녹인 한약을 7일동안 매일 1.0 g/kg의 농도로 경구투여하였으며 정상군과 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. 경구 투여를 시작한 지 7일이 되는 날 대조군과 한약투여군의 미정맥에 PBS 0.1 ml에 녹인 4  $\mu$ g의 anti-CD3를 주사하였다. 정상군은 동량의 PBS를 주사하였다. 90분후에 마우스를 마취시켜 심장채혈을 하고 동시에 비장을 채취하였다.

### 6. 비장세포 부유액의 준비

비장을 마우스로부터 적출하여 10% FBS와 1% 항생제(antibiotic- antimycotic)가 함유된 RPMI-1640 배지로 세척한 후 micro slide glass의 거친 면을 이용하여 비장을 grinding한 뒤 0.40  $\mu$ m nylon cell strainer로 여과하여 15 ml tube에 세포를 옮겼다. 세포 부유액은 300 g에서 10분간 원심분리한 후 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer를 처리하였다. 파괴된 적혈구를 비장 세포 부유액으로부터 완전히 제거하기 위하여

RPMI-1640 배지로 2회 세척하였다. 원심분리에 의해 최종적으로 얻은 비장 세포를 적당량의 RPMI-1640 배지에 현탁한 후 trypan blue exclusion assay를 통해 생존을 확인과 함께 cell 수를 측정하였다.

### 7. 유세포형광분석

비장세포의 CD69, CD3, CD4, CD8, NK 세포의 발현을 분석하기 위하여 유세포형광분석방법(flow cytometry)을 사용하였다. 마우스의 비장세포를 완충액 (1% FBS-0.1% NaN<sub>3</sub>-PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하고 각각 해당되는 형광물질로 염색하였다. CD69의 경우 PE-anti-mouse CD69, CD3는 FITC-anti-mouse-CD3, CD4는 PE-anti-mouse CD4, CD8은 FITC-anti-mouse-CD8a로 염색하였다. 모든 염색 반응은 상온에서 30분간 시행후 완충액으로 2회 세척하여 유세포형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 측정하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램을 사용하였으며 결과는 CD69(+)/CD3(+), CD4(+)/CD8(-), CD8(+)/CD4(-)의 백분율(%)로 산출하였다.

### 8. Real-time RT-PCR

마우스 비장세포의 RNA는 RNeasy mini kit의 protocol에 준하여 분리하였다. 분리한 RNA는 증류수에 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. USA)를 이용하여 정량하였다. cDNA 합성을 위해 2.0 µg의 RNA를 먼저 1 µl의 oligo(dT) primer와 1 µl의 dNTP mix를 tube에 증류수와 섞은 후 65°C에 5분간 넣고 반응한 후 4°C에 바로 냉각하였다. 이어서 반응액에 4 µl의 5X First-Strand buffer, 2 µl의 0.1M DTT, 0.25 µl SuperScrip II RT를 증류수에 넣어 최종 부피를 20 µl로 만들고 50분간 42°C에서 반응한 후 70°C에서 15분간 가열하여 효소들을 inactivation하였다. 각각의 유전자 발현량을 측정하기 위해 cDNA를 이용하여 real-time RT PCR를 실시하였다. 적당량 희석된 cDNA에 10 µl의 SYBR Green PCR Master Mix와 각각의 10 pM forward, reward primer를 1.2 µl씩 증류수를 넣어 20 µl가 되게 한 후 ABI 7300 equence detector (Applied Biosystems, USA)에서 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 denaturation한 후 95°C 15초, 60°C 60초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3, c-Maf의 primer sequence는 고 22)등의 논문에서 준하여 제작하였다. 각 유전자의 threshold of cycle (Ct)값에 대한 standard curve는 한약을 처리하지 않은 cDNA를 각각 1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000로 희석하여 얻은 Ct값으로 구하였고 이 공식을 통해 샘플의 Ct를 정량화하였다. 모든 유전자의 발현량은 GAPDH 발현량을 이용하여 normalization하였다.

### 9. CD4 T 세포 분리

비장세포 중에서 CD4+ T 세포를 분리하기 위하여 비장세포 1×10<sup>7</sup>개 당 90 µl의 완충용액(0.5% BSA, 2 mM EDTA-PBS, pH 7.2)과 10 µl의 MACS mouse CD4(L3T4) microbeads를 첨가하

여 4°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액에 10~20배 부피의 완충용액을 넣고 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 얻은 침전물에 500 µl의 완충용액을 첨가하여 재현탁하였다. CD4 T 세포 분리를 위해 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator에 장착하여 준비한 뒤 앞서 준비된 세포 현탁액을 column 안으로 통과시켰다. 그 상태에서 3회 완충용액으로 컬럼을 세척하여 컬럼에 결합하지 않은 분획을 제거한 후 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator로부터 분리시킨 뒤 컬럼 안에 남아있는 CD4 T 세포 분획은 피스톤을 사용하여 밖으로 밀어내어 분리하였다.

### 10. 사이토카인 합성 유도

비장세포나 CD4 T 세포의 사이토카인 합성을 유도하기 위해 비장세포의 경우 24-well plate에 1×10<sup>6</sup> 개의 세포를 분주하고 1 µg/ml의 anti-CD3와 한약을 농도별로 첨가하였고 CD4 T 세포의 경우 5 µg/ml의 anti-CD3를 well에 coating한 후 2 µg/ml의 anti-CD28을 첨가하였다. 48시간 배양후 상등액을 회수하였다.

### 11. 사이토카인 ELISA 측정

Cytokines의 생산량은 sandwich ELISA 방법으로 측정하였으며 각 시료는 duplicate로 시행하였다. 측정 대상에 따라 각 1차 항체 원액을 coating 완충용액에 해당 농도가 되도록 희석하여 96-well micro plate에 well 당 100 µl씩 분주한 후 4°C에서 overnight 반응하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 well 당 200 µl씩 넣고 1시간 동안 상온에 두어 blocking하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 3회 세척한 후 시료 및 스탠더드를 적당량 희석하여 100 µl씩 분주하였다. 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 5회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 10% FBS가 함유된 PBS에 희석하여 well 당 100 µl씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척후에 Streptavidin-HRP 용액으로 30분간 상온에서 반응시킨 후 세척하였다. TMB 용액을 well 당 100 µl씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 well 당 50 µl씩 첨가함으로써 완료하였으며 흡광도는 450-570 nm 파장에서 microplate reader (Biorad Model 680)기를 사용하여 측정하였다.

### 12. Western blotting

비장세포의 STAT4, STAT6의 활성을 측정하기 위해 비장세포를 6 well plate에 1×10<sup>7</sup> 개의 세포를 분주하고 phospho-stat4를 확인하기 위해서는 2.5 µg/ml의 anti-CD3와 1 ng/ml의 rIL-12 및 한약을 첨가하였고 15분, 30분, 60분, 120분 단위로 세포를 회수하였으며 phospho-stat6를 확인하기 위해서는 2 µg/ml의 anti-CD3와 한약을 첨가하였고 30분, 60분, 2시간, 3시간 짜 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 phosphatase inhibitor cocktail 0.5%가 함유된 cold PBS로 2회 세척하고 lysis solution (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100)으로 파괴하였다. Bradford 방법에 준하여 단백질 농도를 정량화하여 20 µg의 단백질을 10%

SDS-PAGE을 이용하여 분리한 후에 젤을 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane으로 transfer하였다. 이어서 ponceau S로 젤을 염색하여 단백질양 및 단백질의 크기를 확인한 후 ponceau S가 깨끗이 없어질 때까지 TBST(0.1% Tween in Tris-buffered saline)로 세척하였다. 멤브레인은 5% skim milk가 함유된 TBST으로 blocking을 상온에서 한 시간 반응한 후, 1000배로 희석한 phospho-STAT4, phospho-STAT6,  $\beta$ -actin 으로 4°C에 overnight 반응하였다. TBST로 세척후 2000배로 희석한 HRP-conjugated anti-IgG Ab로 상온에서 한 시간 반응하였다. TBST로 세척후 chemiluminescent substrate (ECL, Amersham Biosciences, UK)로 검출하였다.

13. 통계분석

모든 결과는 SPSS 12.0 버전을 이용하여 분석하였다. 동물실험의 경우 ANOVA로 분석후 Dunnet's post-hoc test로 사후분석하였고 평균의 차이는 non-paired T test로 분석하였다.

결 과

1. 少陽人荊防敗毒散이 anti-CD3로 자극한 마우스의 비장세포 비율에 미치는 영향

少陽人荊防敗毒散 추출액을 Balb/c 마우스에 7일간 경구투여한 후에 T 세포에 대한 polyclonal activator인 anti-CD3로 미정맥에 자극하고 나서 90분후 비장세포를 분리하였다. anti-CD3는 T 세포의 T cell receptor complex를 자극하여 1시간안에 T 세포의 사이토카인 합성을 유도하는 것으로 알려져있다<sup>23)</sup>. 본 연구에서는 먼저 少陽人荊防敗毒散 경구투여가 CD4 세포와 CD8 T 세포의 비율 및 T 세포의 초기 activation을 나타내는 CD69의 발현에 미치는 영향을 유세포측정기로 분석하였다. 정상군이나 대조군 사이는 CD4 T 세포나 CD8 T 세포의 비율에 차이가 없었으나 少陽人荊防敗毒散 투여군은 CD4 T 세포가 유의성있게 증가하였다(Fig. 1). 정상군에 비해 anti-CD3을 주사한 대조군과 少陽人荊防敗毒散 투여군은 모두 CD 69 발현이 증가하였는데 少陽人荊防敗毒散투여군은 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 증가하였다.

2. 少陽人荊防敗毒散이 anti-CD3로 자극한 마우스의 혈청 사이토카인에 미치는 영향

Balb/c 마우스를 7일간 少陽人荊防敗毒散 추출액을 경구투여한 후에 T 세포에 대한 polyclonal activator인 anti-CD3로 미정맥에 자극하고 나서 90분후에 심장체혈을 하였다. anti-CD3의 자극에 의한 T 세포 사이토카인 중 IL-2, IL-4, IFN-g의 양의 혈중 농도를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 정상군에서는 세가지 사이토카인이 검출범위에 미달되어 표시되지 않았다. 少陽人荊防敗毒散투여군은 대조군에 비해 IFN- $\gamma$ 의 경우 10% 증가하였으나 유의성이 있지 않았고 IL-4는 23% 증가하여 통계적으로 유의성이 있었다. IL-2는 13% 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

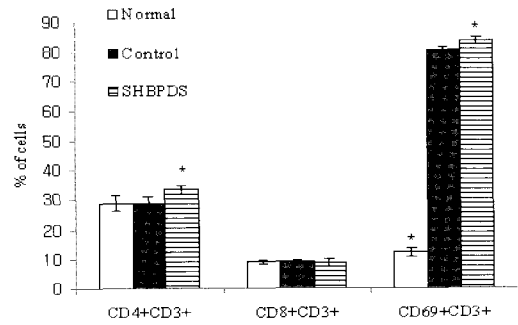


Fig. 1. Effects of oral administration of SHBPDS on splenocytes subsets in Balb/c mice injected with anti-CD3 Ab. Balb/c mice were orally given SHBPDS or saline for 7 days and i.v. injected with anti-CD3. Splenocytes were obtained 90 min after anti-CD injection and analyzed for the frequencies of CD69, CD4, and CD8 using flow cytometry. Bars represent the mean percentage of cells  $\pm$  SD of two independent experiments. \* : P <0.05 versus control.

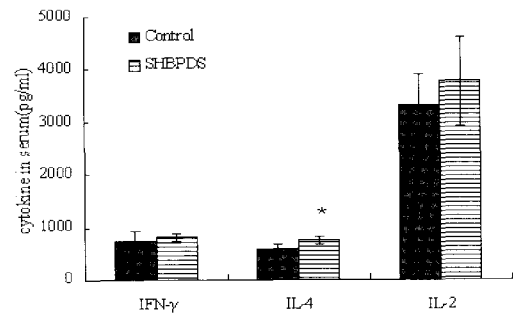


Fig. 2. Effects of oral administration of SHBPDS on serum cytokine levels in Balb/c mice injected with anti-CD3 Ab. Balb/c mice were orally given SHBPDS or saline for 7 days and i.v. injected with anti-CD3. Serum was obtained 90 min after anti-CD injection and cytokine levels were analyzed using ELISA. Data are the means  $\pm$  SD of two independent experiments. N.D: not detectable. \* : P <0.05 versus control.

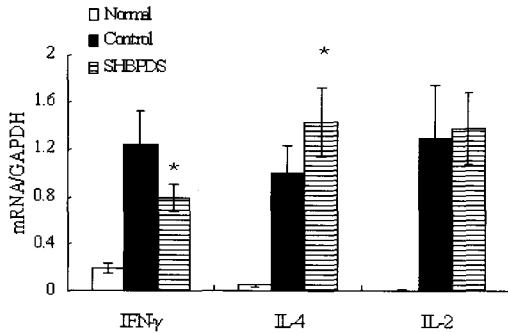
3. 少陽人荊防敗毒散이 anti-CD3로 자극한 마우스의 T 세포 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

少陽人荊防敗毒散 경구투여가 anti-CD3로 자극한 마우스의 T 세포의 사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 비장세포를 분리하여 real-time RT PCR로 측정하였다. 정상군에 비해 anti-CD3로 자극한 대조군과 한약처리군은 모두 발현량이 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 3). 少陽人荊防敗毒散 투여군은 대조군에 비해 IFN-g가 36% 감소하였으며 통계적으로 유의성이 있었다. 이에 반해 IL-4는 少陽人荊防敗毒散 투여군이 43% 증가하였으며 통계적으로 유의성이 있었다. IL-2의 발현량에는 별 다른 차이가 없었다.

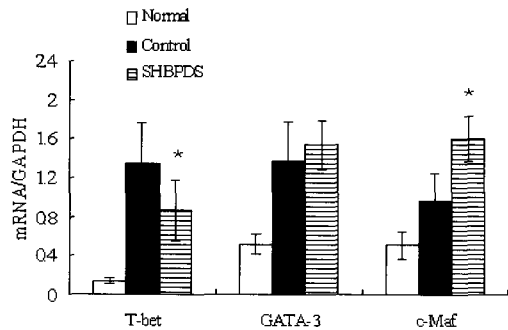
4. 少陽人荊防敗毒散이 anti-CD3로 자극한 마우스의 Th1 및 Th2 전사인자 mRNA 발현에 미치는 영향

다음으로 少陽人荊防敗毒散 경구투여가 Th1 세포 및 Th2 세포 분화에 관여하는 전사인자 T-bet, GATA-3, c-Maf의 mRNA 발현에 미치는 영향을 real-time RT PCR로 측정하였다. Th1 특이적 전사인자인 T-bet은 IFN- $\gamma$ 과 마찬가지로 少陽人荊防敗毒散 투여군이 대조군에 비해 36% 감소하였으며 통계적으로 유의성

이 있었다. Th2 특이적 전사인자로 알려진 GATA-3는 대조군에 비해 12% 증가하였으나 유의성은 없었으며 c-Maf은 65%가 증가하였고 통계적으로 유의성이 있었다(Fig. 4).



**Fig. 3. Effects of oral administration of SHBPDS on cytokine transcription in splenocytes from Balb/c mice injected with anti-CD3 Ab.** Balb/c mice were orally given SHBPDS or saline for 7 days and i.v. injected with anti-CD3. Spleen was obtained 90 min after anti-CD injection and mRNA expression was analyzed real-time RT PCR. Data are the means  $\pm$  SD of two independent experiments. N.D.: not detectable. \* : P < 0.05 versus control.

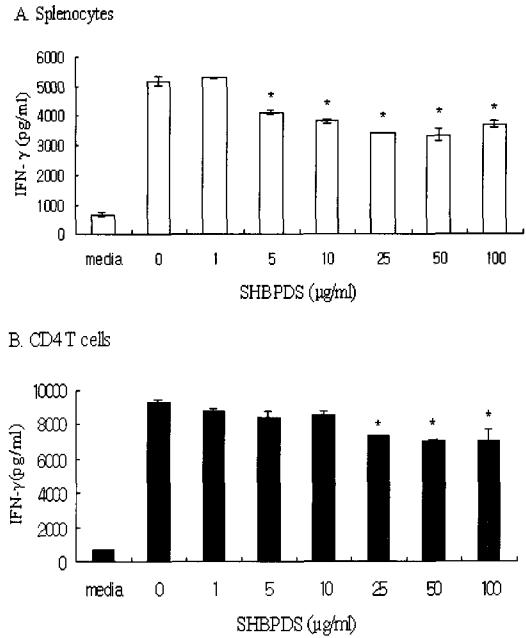


**Fig. 4. Effects of oral administration of SHBPDS on the transcription of Th1/Th2 specific transcription factors in splenocytes from Balb/c mice injected with anti-CD3 Ab.** Balb/c mice were orally given SHBPDS or saline for 7 days and i.v. injected with anti-CD3. Spleen was obtained 90 min after anti-CD injection and mRNA expression was analyzed using real-time RT PCR. Data are the means  $\pm$  SD of two independent experiments. N.D.: not detectable. \* : P < 0.05 versus control.

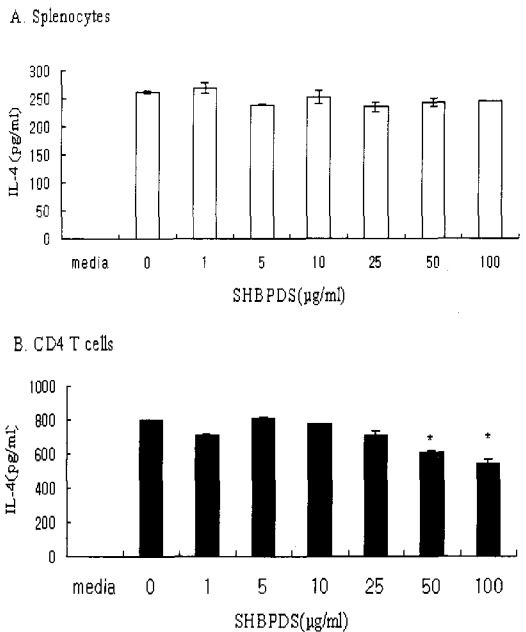
5. 少陽人荊防敗毒散이 마우스 비장세포와 CD4 T 세포의 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2 생성에 미치는 영향

少陽人荊防敗毒散 추출물이 세포 수준에서 사이토카인 분비에 미치는 영향을 측정하기 위해 비장세포와 CD4 T 세포를 분리하여 한약과 함께 48시간 배양하였다. 적혈구가 제거된 비장세포는 T 세포와 T 세포에 신호를 보내는 항원제시세포로 나올 수 있는데 이러한 항원제시세포는 T 세포의 CD28에 보조신호를 보내는 B7분자를 발현하고 있다. 따라서 비장세포의 자극을 위해서는 anti-CD3만을 사용하였고 CD4 T 세포를 배양할 때는 anti-CD3 이외에 anti-CD28을 추가적으로 첨가하였다. IFN-g의 경우 비장세포와 CD4 T 세포 모두 少陽人荊防敗毒散 추출액을 배양한 세포에서 농도의존적으로 감소되었으며 최고 농도인 100  $\mu$ g/ml를 기준으로 했을 때 비장세포는 대조군에 비해 29% 감소하였고 CD4 T 세포는 21%의 감소를 보여주었다(Fig. 5A, B). IL-4는 비장세포 배양보다 CD4 T 세포를 배양했을 때 더 뚜렷한 감소를 보여주었

으며 이것은 동물실험에서의 mRNA 발현이나 혈청의 IL-4 농도 증가와 일치하지 않았다(Fig. 6A, B). IL-2는 대조군에 비해 두 세포 모두 큰 차이는 없었다(Fig. 7A, B). 종합해 보면 대 세 가지 사이토카인 중에서 IFN- $\gamma$ 가 少陽人荊防敗毒散 추출액의 영향을 가장 많이 보여 주었으며 이러한 감소는 항원제시세포가 아닌 CD4 T 세포에 직접적으로 작용함을 알 수 있었다.



**Fig. 5. Effects of SHBPDS on IFN- $\gamma$  production in splenocytes and CD4 T cells.** Cells were activated with anti-CD3 (A) or with anti-CD3 plus anti-CD28 (B) in the presence of SHBPDS for 48 h. Cytokine levels are determined using ELISA. \* : P < 0.05 versus control (0  $\mu$ g/ml).



**Fig. 6. Effects of SHBPDS on IL-4 production in splenocytes and CD4 T cells.** Cells were activated with anti-CD3 (A) or with anti-CD3 plus anti-CD28 (B) in the presence of SHBPDS for 48 h. Cytokine levels are determined using ELISA. \* : P < 0.05 versus control (0  $\mu$ g/ml).

고찰

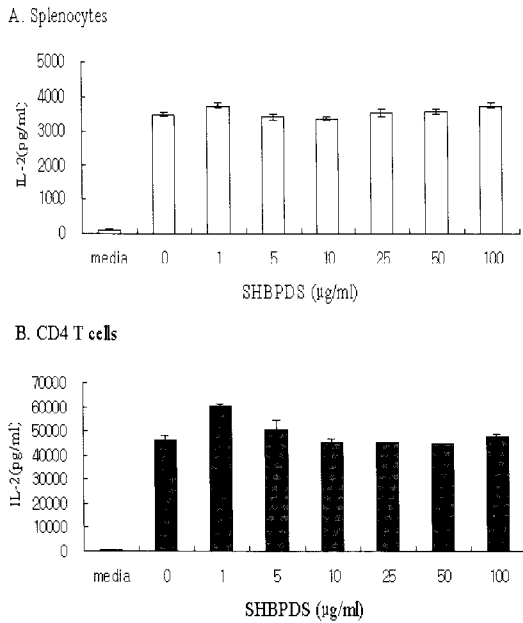


Fig. 7. Effects of SHBPDS on IL-2 production in splenocytes and CD4 T cells. Cells were activated with anti-CD3 (A) or with anti-CD3 plus anti-CD28 (B) in the presence of SHBPDS for 48 h. Cytokine levels are determined using ELISA.

6. 少陽人荊防敗毒散이 STAT4와 STAT6 활성화에 미치는 영향

STAT4는 IFN- $\gamma$  발현에 미치는 전사인자로 IL-12가 T 세포의 IL-12 수용체와 결합하면 STAT4가 인산화되어 핵내로 이동하여 IFN- $\gamma$ 의 mRNA 발현을 촉진한다. STAT4 활성을 확인하기 위해 비장세포를 분리한 후 anti-CD3와 IL-12를 첨가하여 60분, 120분에 세포를 회수하여 Western blotting을 수행하였다. 그 결과 少陽人荊防敗毒散을 처리한 세포는 대조군에 비해 60분에서 STAT4의 인산화가 약하게 확인됨을 알 수 있었다(Fig. 8). 이로 보건대 少陽人荊防敗毒散은 STAT4의 인산화 과정을 늦춤으로써 IFN- $\gamma$  발현을 억제하는데 기여함을 알 수 있었다. STAT6는 IL-4 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 인산화된 STAT6가 핵내로 이동하여 IL-4 mRNA 발현의 증가에 기여한다. STAT6의 인산화는 anti-CD3만으로도 유도됨이 증명되었으며 본 연구에서도 같은 방법을 사용하였다. 少陽人荊防敗毒散을 처리한 세포에서 대조군에 비해 180분에서 phospho-STAT6가 뚜렷하게 발현됨을 확인할 수 있었으며 이를 통해 少陽人荊防敗毒散의 IL-4 mRNA 증가에는 STAT6 활성을 동반하는 것을 알 수 있었다(Fig. 8).

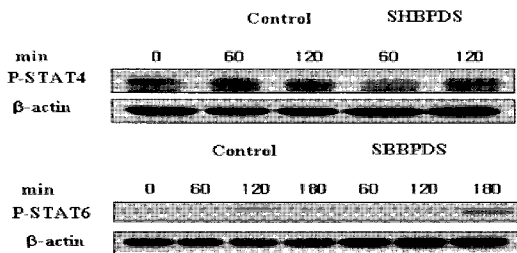


Fig. 8. Effects of SHBPDS on STAT4 and STAT6 in activated splenocytes. Splenocytes were activated with anti-CD3 plus IL-12 for STAT4 activation or with anti-CD3 for STAT6 activation. SHBPDS was treated for the indicated time periods. Phospho-STAT4 and phospho-STAT6 were detected using Western blotting.

少陽人荊防敗毒散은 東醫壽世保元の 「少陽人 脾受寒表寒病論」에 나오는 처방이다. 羌活 獨活 柴胡 前胡 荊芥 防風 赤茯苓 生地黃 地骨皮 車前子 각 3.75 g 으로 구성되었으며 發熱 惡寒 脈浮緊 身痛 不汗出而煩躁하는 大靑龍湯證과 口苦 咽乾 目眩 耳鳴 胸脇苦滿 寒熱往來 嘔逆의 小柴胡湯證에 이용된다. 그 주요 증상인 頭痛寒熱往來는 현대의학적으로 감기, 몸살, 급성 기관지염, 급성 인후염, 급성 후두염, 급성 폐렴으로 인한 발열에 해당된다. 본 연구에서는 少陽人荊防敗毒散의 邪氣에 대한 正氣의 방어기능을 해석하고자 감기를 포함한 상기도 호흡기 질환에서 보이는 면역반응의 조절을 관찰하였다.

상기도 호흡기 감염을 병인에 따라 한의학적으로 분류하면 風寒型, 風熱型, 挾濕型, 挾暑型, 時行感冒, 老人 혹 久病患感冒로 나누어 볼 수 있다<sup>11)</sup>. 이 중에서 風寒型 감도와 일부 風熱型 감도 및 감기에 의한 합병증의 초기증상에 少陽人 荊防敗毒散이 이용될 수 있다.

면역반응은 자연면역과 특이면역으로 구분되는데 그중 특이면역을 구성하는 T 세포는 자연면역계를 활성화하는 사이토카인을 분비하고 B 세포가 항체를 만들어내는데 보조적 신호를 전달하기 때문에 면역계에서 중추적인 역할을 하고 있다<sup>9)</sup>. T 세포는 T helper cell과 T cytotoxic cell로 나누어지는데 T helper cell의 표면에는 CD4 단백질이 발현되므로 CD4 T cell로 구분되기도 하고 이에 반해 T cytotoxic cell 또는 T cytolytic cell이라고 불리우는 이 세포들은 세포막 표면에 CD8 단백질이 발현되어 CD8 T cell이라고 한다. 이중 CD4 T helper cell이 전체 T 세포의 대다수를 차지하는데 이들이 분비하는 사이토카인에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 분류되며 이러한 분류는 최근 급증하는 알러지 질환과 자가면역질환의 특징을 설명하는데 도움이 되고 있다. Th1 세포는 IFN- $\gamma$ 를 주로 분비하며 이 사이토카인은 바이러스 증식을 억제하고 수지상세포나 대식세포인 항원제시세포들이 항원제시를 효과적으로 잘하기 위해 필요한 MHC 분자 발현을 증가시키고 아울러 대식세포의 활성화에 필요한 신호를 보내기 때문에 세포매개 면역반응을 주도하게 된다. 한편 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13을 주로 분비하는데 이중 IL-4는 B 세포의 분화와 성숙을 보조하여 B 세포가 항체를 만드는데 중요한 역할을 하기 때문에 체액면역반응을 담당한다. 세포 매개 면역반응은 세포안으로 침입하는 바이러스나 결핵균에 효과적이며 체액 면역반응은 세포외에 존재하는 세균을 신속하게 공격하는데 적합하다.

항원제시세포에 의해 처리된 미생물 산물들은 T 세포의 표면에 있는 T cell receptor/CD3 복합체에 자극을 주고 NFAT, AP-1 등의 전사인자를 활성화하여 여러 가지 사이토카인의 유전자 발현을 시작한다<sup>7-10)</sup>. 이때 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 등의 사이토카인이 신속하게 만들어지나 세포외 주위에 어떠한 사이토카인이 존재하느냐에 따라 이들 사이토카인의 균형이 깨지면서 Th1세포나 Th2 세포의 분화가 일어난다. 미생물과 같은 항원이 침입하면 항원제시세포는 IL-12를 만들어내기 때문에 활성화된 Th 세포가 IFN- $\gamma$ 를 더 많이 만들도록 신호를 보낼 수 있으나 이런 자극이 없

으면 길항적으로 작용할 수 있는 신호가 부족하기 때문에 Th2 세포가 지배적으로 존재하여 알러지와 같은 질병이 발생할 수 있다. Th1 세포로 분화하도록 돕는 요소로는 이러한 주위 환경의 단백질 이외에도 핵내 또는 세포질내에 존재하는 전사인자들이 있는데 T-bet이나 STAT4 등은 바로 그런 역할을 담당한다. 이에 반해 Th2 세포는 GATA-3, c-Maf 등의 전사인자가 IL-4 유전자의 promoter나 enhancer에 결합하고 STAT6 또한 IL-4 유전자 발현에 영향을 줌으로써 Th2 세포 분화에 중요한 역할을 맡고 있다.

少陽人荊防敗毒散은 in vitro 실험에서 B 세포의 증식능과 CD4 T 세포의 증식능을 증가시켰고 아울러 Th1, Th2 polarization 조건에서 Th1 세포로 분화하는 것을 억제하는 것으로 보고된 바 있다. 바이러스에 의한 상기도감염은 IL-12와 IFN- $\gamma$ 를 과잉으로 생산하는 Th1 반응이 지배적이다<sup>24,25</sup>). 따라서 少陽人荊防敗毒散이 Th1 반응 조절효과를 동물실험을 통해 확인하고자 마우스에게 저용량의 anti-CD3를 주사하였다. 이 자극은 마우스 T 세포로 하여금 한 시간안에 다량의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4, IL-2 mRNA 발현을 유도함으로써 급성 감염과 유사한 면역반응이 일어나게 한다. 少陽人荊防敗毒散을 경구투여한 마우스에게 CD4 T 세포의 비율 및 T 세포의 활성을 나타내는 CD69 발현을 유세포분석기로 측정된 결과 유의성 있게 증가함으로써 세포내 실험에서 보여준 증식능과 일치한 경향을 나타내었다. 또한 혈청의 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2 양을 측정된 결과 IL-4만이 유의성있게 증가하였다. 비장세포를 분리하여 real-time RT PCR을 수행한 결과 anti-CD3로 자극한지 90분후에 측정된 mRNA 발현에서는 少陽人荊防敗毒散이 IFN- $\gamma$ 를 감소하고 IL-4는 증가시켰음을 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 이를 통해 少陽人荊防敗毒散의 발열과 기타 감기에 수반되는 증상을 완화하는 기전은 부분적으로 IFN- $\gamma$ 를 감소함으로써 나타나는 것으로 볼 수 있다. 아울러 IL-4의 증가를 통해 감기바이러스에 대한 항체형성을 촉진할 수 있음을 유추할 수 있었다. IFN- $\gamma$ 를 감소하는 점은 스테로이드의 기전과 비슷하며 아울러 아스피린과는 정반대의 경우인데, 아스피린은 사람의 CD4 T 세포를 자극했을 때 IL-4를 감소하되 IFN- $\gamma$ 에는 증가시키는 것으로 보고된 바 있다<sup>26-29</sup>). 그러나 본 실험 결과에 의하면 항바이러스를 상기도감염이 아닌 다른 질환에 응용할 때, 예를 들어 알러지 질환에 사용될 때는 IL-4 분비촉진을 고려해야 할 사항으로 여겨진다.

IFN- $\gamma$ 와 IL-4의 발현에 영향을 주는 전사인자를 확인한 결과, 少陽人荊防敗毒散은 IFN- $\gamma$ 에 영향을 주는 T-bet의 mRNA 발현을 감소하거나 STAT4의 인산화를 늦추는 것을 확인할 수 있었다. 이 두 전사인자는 IFN- $\gamma$ 의 promoter에 결합하므로 少陽人荊防敗毒散은 적어도 이 두 전사인자의 억제나 활동 지연에 의해 IFN- $\gamma$ 를 mRNA 차원에서 억제함을 알 수 있었다. 한편 少陽人荊防敗毒散을 투여받은 마우스나 세포에서는 C-maf과 STAT6의 활성이 증가했는데 이것은 IL-4 mRNA 발현증가나 혈청에서의 농도증가를 설명해준다. 그러나 비장세포나 CD4 T 세포를 少陽人荊防敗毒散과 함께 48시간 배양해서 분리한 IL-4양은 오히려 감소하였다. 이러한 현상은 IL-4가 IL-2와 마찬가지로 T 세포가 만들어내는 성장인자이기 때문에 주변 세포에 의해 바로 소

모되는 in vitro 실험의 특성이라는 사실과 무관하지 않다<sup>23</sup>). 특히 본 연구에서는 anti-CD3나 anti-CD28과 같은 mitogen이외에는 별 다른 성장인자를 배양액에 첨가하지 않았기 때문에 T 세포가 만들어내는 사이토카인을 바로 소모하는 조건이고 아울러 少陽人荊防敗毒散이 B 세포나 CD4 T 세포의 증식능을 증가시켰다는 보고를 고려할 때 더욱 그러하다.

요컨대 少陽人荊防敗毒散은 동물경구 실험에서 CD4 T 세포의 비율과 활성을 증가시키며 IL-4양을 증가시키고 IFN- $\gamma$ 를 감소시킴으로써 면역반응을 조절하는 것으로 확인되었다. 아울러 이들 사이토카인 합성에 영향을 주는 전사인자중에서 T-bet, STAT4는 감소하여 IFN- $\gamma$ 의 발현을 조절하고 GATA-3와 STAT6 활성을 증가시켜 IL-4 발현을 조절함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 실험적 특이면역계 활성화 모델을 통해 少陽人荊防敗毒散이 T 세포가 분비하는 사이토카인 조절에 미치는 영향을 관찰함으로써 면역학적 근거를 축적하는데 기여했으며 향후 구체적인 질병모델을 통한 검증효과가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

少陽人荊防敗毒散 알코올 추출물의 T 세포 활성을 확인하기 위해 마우스에 경구투여한 후 anti-CD3로 자극하거나 비장세포를 분리하여 자극한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

少陽人荊防敗毒散은 anti-CD3로 자극한 마우스의 CD4 T 세포와 CD69 발현을 유의성있게 증가시켰다. 少陽人荊防敗毒散은 anti-CD3로 자극한 마우스의 혈청 IL-4를 유의성있게 증가시켰으나 IL-2나 IFN- $\gamma$ 에는 통계적으로 유의성있는 차이가 나타나지 않았다. 少陽人荊防敗毒散은 anti-CD3로 자극한 마우스의 비장세포에서 IFN- $\gamma$ 를 감소시켰고 IL-4는 증가하였다. 이들에 대한 Th1, Th2 특이적 전사인자를 살펴본 결과 T-bet은 감소하였으며 C-Maf은 증가하였으며 GATA-3에는 별 차이가 없었다. 少陽人荊防敗毒散을 마우스 비장세포와 CD4 T 세포를 분리하여 anti-CD3 또는 anti-CD3와 anti-CD28로 자극하여 48시간 배양한 결과 모두 IFN- $\gamma$ 는 감소하였으며 IL-2나 IL-4는 약간 감소하거나 별 차이가 없었다. 少陽人荊防敗毒散은 anti-CD3와 IL-12로 자극한 비장세포에서 STAT4 활성을 억제하였고 anti-CD3로 자극한 STAT6 활성은 증가시켰다.

따라서 少陽人荊防敗毒散은 동물실험에서 직접적으로 CD4 T 세포의 활성을 증가시키되 IFN- $\gamma$ 는 감소시키고 IL-4는 증가시키는 반응을 보여주었으며 IFN- $\gamma$ 에 관여하는 전사인자인 T-bet과 STAT4를 억제하되 IL-4에 관여하는 전사인자인 C-Maf과 STAT6은 촉진함을 알 수 있었다. 향후 적절한 병태모델을 통해 荊防敗毒散의 사이토카인 조절을 확인하는 연구가 필요하다.

## 참고문헌

1. Makela, M.J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimaki, M., et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. J Clin Microbiol 36:

- 539-542, 1998.
2. Levandowski, R.A., Weaver, C.W., Jackson, G.G. Nasal-secretion leukocyte populations determined by flow cytometry during acute rhinovirus infection. *J Med Virol* 25: 423-432, 1988.
  3. Naclerio, R.M., Proud, D., Lichtenstein, L.M., Kagey-Sobotka, A., Hendley, J.O., Sorrentino, J., et al. Kinins are generated during experimental rhinovirus colds. *J Infect Dis* 157: 133-142, 1988.
  4. Olszewska, W., Zambon, M., Openshaw, P.J. Development of vaccines against common colds. *Br Med Bull* 62: 99-111, 2002.
  5. Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F., Pantaleo, G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103: 966-972, 2004.
  6. Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173, 1989.
  7. Kitamura, N., Kaminuma, O., Mori, A., Hashimoto, T., Kitamura, F., Miyagishi, M., et al. Correlation between mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and their specific transcription factors in human helper T-cell clones. *Immunol Cell Biol* 83: 536-541, 2005.
  8. Lighvani, A., Frucht, D., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B., et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 18: 15137-15142, 2001.
  9. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669, 2000.
  10. Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., Rao, A. Th cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 3: 643-651, 2002.
  11. Leonard, W.J., O'Shea, J.J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322, 1998.
  12. Rao, A., Avni, O. Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br Med Bull* 56: 969-984, 2000.
  13. Kim, J.L., Ho, I.C., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10: 745-751, 1999.
  14. Glimcher, L.H., Murphy, K.M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14: 1693-1711, 2000.
  15. Rengarajan, J., Szabo, S.J., Glimcher, L.H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21: 479-483, 2000.
  16. Szabo, S.J., Glimcher, L.H., Ho, I.C. Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. *Curr Opin Immunol* 9: 776-781, 1997.
  17. 전국 한의과대학 사상의학교실. *사상의학*. 서울, 집문당, pp 193-194, 561, 1997.
  18. 허정원. 少陽人 荊防敗毒散의 항염증효과에 대한 실험적 연구, 경희대학교, 2008.02.
  19. 김대성. 少陽人(少陽人) 荊防敗毒散(荊防敗毒散)의 효능에 관한 실험적 연구. *사상의학회지* 1(1):171-181, 1989.
  20. 이수영, 안택원. 荊防敗毒散과 독활지황탕이 Wistar rat의 노화에 미치는 영향. *사상의학회지* 17(3):91-102, 2005.
  21. 이재마. *동의수세보원*. 서울, 여강출판사, 592:227.
  22. 고은정. 봉등추출액이 helper T cell 분화에 미치는 영향. 경희대학교, 2004.02.
  23. Scott, D.E., Gause, W.C., Finkelman, F.D., Steinberg, A.D. Anti-CD antibody induces rapid expression of cytokine genes in vivo. *J Immunol* 145: 2183-2188, 1990.
  24. Openshaw, P.J.M. Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 559-562, 1995.
  25. Van Schaik, S.M., Welliver, R.S., Kimpen, J.L.L. Novel pathways in the pathogenesis of respiratory syncytial virus disease. *Pediatric Pulmonol* 30: 131-138, 2000.
  26. Hu, X., Li, W.P., Meng, C., Ivashkiv, L.B. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 170: 4833-4839, 2003.
  27. Blotta, M.H., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 158: 5589-5595, 1997.
  28. Hsia, J., Sarin, N., Oliver, J.H., Goldstein, A.L. Aspirin and thymosin increase interleukin-2 and interferon-gamma production by human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology* 17: 167-173, 1989.
  29. Cianferoni, A., Schroeder, J.T., Kim, J., Schmidt, J.W., Lichtenstein, L.M., Georas, S.N., et al. Selective inhibition of interleukin-4 gene in human T cells by aspirin. *Blood* 97: 1742-1749, 2001.