

## 법제 부자와 감초의 배합 비율에 대한 HPLC 분석 및 면역 활성 비교 연구

이진아, 하혜경, 정다영, 서창섭, 이호영, 신현규\*

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

### Comparison of immune response and HPLC analysis for combination of Aconiti Lateralis Radix Preparata and Glycyrrhizae Radix

Jin-Ah Lee, Hyekyung Ha, Da-Young Jung, Chang-Seob Seo,  
Hoyoung Lee, Hyeun-Kyoo Shin\*

Herbal Medicine EBM Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives :** To investigate the immunological activities, we evaluated the combination ratio of Aconiti Lateralis Radix Preparata and Glycyrrhizae Radix (AG) on murine macrophage cell line (RAW 264.7) and ovalbumin/aluminium (OVA/Alum)-immunized mice.

**Methods :** The cellular proliferation and the production of nitric oxide were examined in a macrophage cell line, RAW 264.7 cells, in the presence of the combination ratio of Aconiti Lateralis Radix Preparata and Glycyrrhizae Radix. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with ovalbumin/aluminium (100  $\mu$ g/200  $\mu$ g) on day 1, 8, and 15. The combination ratio of Aconiti Lateralis Radix Preparata and Glycyrrhizae Radix (1 g/kg/day) was orally administrated for 3 weeks. On day 22, splenocyte and plasma were collected for mitogen-induced proliferation, lymphocyte subpopulation by flow cytometry and measurement of AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), and antibodies (OVA-specific antibodies of the IgG, IgG1, and total IgM classes)

**Results :** Aconiti Lateralis Radix Preparata treatment had no influence on immune responses. The proliferation and NO production of macrophage and proliferation of splenocyte were increased as the higher ratio of Glycyrrhizae Radix. The proliferation of splenocyte, lymphocyte subpopulation and production of antibody (total IgM, OVA-specific IgG and OVA-specific IgG1) were increased as the higher ratio of Glycyrrhizae Radix on OVA-immunized mice.

**Conclusions :** These results suggest that the higher ratio of Glycyrrhizae Radix can increase immunological activities such as NO production in RAW264.7 cells, splenocyte proliferation and immunoglobulin production in OVA-immunized mice.

**Key words :** Aconiti Lateralis Radix Preparata, Glycyrrhizae Radix, immune response, HPLC

#### 서론

한의학에서 한약의 배합은 무작위로 조합하는 것이 아니라 本草 이론에 입각하여 조합된 것으로, 배합을 통해 약효를 강화시키거나 완화시키기도 하고, 독성이 생성되거나 약화되기도 한다. 이에 대한 이론이 한약의 七情 理論<sup>1)</sup>으로, 두 가지 이상의 약재를 七情 원리에 따라 배합하여 약재간의 상호작용을 발생시켜 최적의 약효를 발휘하도록 한다.

附子は 辛熱하고 毒이 있다. 氣味가 강력하고 峻烈하며, 走而不守, 十二經脈을 통행하고, 腎臟을 補益하여 陽氣를 도우고, 散寒止痛한다<sup>2)</sup>. 甘草는 대표적 약재로서 方劑의 약 70% 이상에 첨가되며 모든 약을 화합시키는 성질이 있어 오래전부터 사용되어 온 약재로<sup>3)</sup> 맛이甘하고 성질이 平하여 緩할 수 있으며, 脾臟을 補益하여 기운을 더하는 것이 있고, 藥性的 힘을 조화시킨다.<sup>2)</sup> 문헌에서는 附子가 甘草를 얻으면, 陽氣를 도우고 散寒하지만 辛熱함이 지나치지 않아, 陽氣를 傷하고

\*교신저자 : 신현규. 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약EBM연구센터.  
· Tel : +82-42-868-9464. · Fax : +82-42-864-2120. · E-mail : hkshin@kiom.re.kr  
· 접수 : 2010년 8월 19일 · 수정 : 2010년 12월 3일 · 채택 : 2010년 12월 15일

기운을 소모하게 하는 잘못됨이 없게하고, 독성은 매우 감소한다. 또,甘草가 附子를 얻으면 中焦를 따뜻하게 하고 기운을 더하여 壅滯되는 걱정이 없어, 溫陽散寒止痛하는 효과가 더욱 발휘될 수 있다<sup>2)</sup>고 하였다.

본 연구에서는 본초학의 배합이론인 七情 理論에 따른 효과를 검증하기 위해 七情 理論 중 相須에 해당하는 法製된 附子和 甘草의 배합 비율에 대한 法製 附子和 甘草의 지표 물질 변화 추이를 HPLC로 살펴보고, 실험에서 면역의 활성 효과를 비교 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재 추출

부자 (이미 법제된 鹽附子)와 감초는 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 구입하였다. 부자와 감초의 배합 비율은 10:0, 8:2, 5:5, 2:8, 0:10으로 하였다 (Table 1). 부자와 감초를 비율별로 배합하고 10배의 증류수를 가한 후 100℃에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (Glas-Col® Combo Mantle, Terre Haute, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 sieve를 사용하여 거르고 동결건조기 (일신 동결건조기 PVTFD100R)를 사용하여 AG-1~AG-5의 분말을 얻었으며 수득율은 Table 1과 같다. 약재별로 추출물의 수율이 다르게 나타나므로 모든 실험에서 동일량의 건조약재에 대한 활성을 검색하기 위하여 수율을 적용하여 건조약재의 양으로 환산하여 사용하였다.

Table 1. The Combination Ratio of Crude Drugs

Crude drug	Combination Ratio of Crude Drug				
	AG <sup>#</sup> -1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5
부자 Aconiti Radix Lateralis Preparata	10	8	5	2	0
감초 Glycyrrhizae Radix	0	2	5	8	10
Yield (%)	15,6	15,8	18,4	24,2	25,8

<sup>#</sup> : AG = Mixing of Aconiti Radix Lateralis Preparata and Glycyrrhizae Radix

### 2. 실험 방법

#### 1) HPLC를 이용한 성분 분석

##### (1) 시약 및 표준 물질

HPLC 분석을 위한 water, acetonitrile 및 methanol은 J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC급 용매를 사용하였으며, ammonium bicarbonate는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)의 특급시약을 사용하였다. 지표물질인 aconitine (순도 95% 이상)은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 hyaconitine, mesaconitine, liquiritin 및 glycyrrhizin (순도 98.0% 이상)은 Wako (Osaka, Japan)에서 각각 구입하여 사용하였다 (Fig. 1).

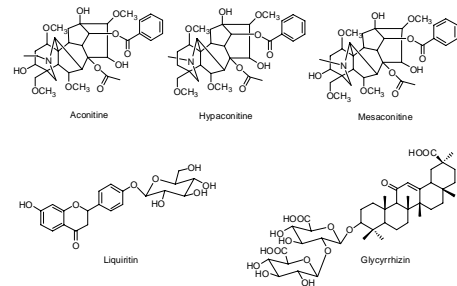


Figure 1. Chemical structures of five compounds in AG.

#### (2) 표준 용액 및 검액의 조제

Aconitine, hyaconitine, mesaconitine, liquiritin 및 glycyrrhizin 표준품을 메탄올을 이용하여 1,000 µg/mL로 제조한 후 단계적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 부자와 감초의 배합 비율별 시료인 AG-1~AG-5를 각각 100 mg을 취하여 methanol 10 mL로 녹여 검액으로 하였다.

#### (3) 기기 및 분석 조건

HPLC는 solvent delivery unit, on-line degasser, column oven, autosampler 및 PDA detector로 구성된 Shimadzu사의 LC-20A (Kyoto, Japan) 시스템을 사용하였으며, data 처리는 LCsolution software (Version 1.24)를 사용하였다. Column은 Gemini C18 column (250×4.6 mm; particle size 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, column temperature는 40℃를 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min로 하였으며, detector는 254 nm와 280 nm에서 분석하였다. 이동상은 Table 2와 같이 gradient system을 사용하였으며, 모든 시료는 0.20 µm syringe filter로 여과한 후 10 µl를 주입하여 분석하였다.

Table 2. Gradient Composition of the Mobile Phase for HPLC Analysis

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1.0	95	5
40	1.0	25	75
45	1.0	0	100
50	1.0	0	100
55	1.0	95	5
70	1.0	95	5

A: 30 mM ammonium bicarbonate; B: acetonitrile

#### 2) 대식세포의 활성화 검색

##### (1) 대식세포 배양

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 5.5% fetal bovine serum (FBS; Gibco Inc., NY, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco Inc., NY, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Gibco Inc., NY, USA) 배지에 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

##### (2) 대식세포의 증식능 검색

부자와 감초 배합에 따른 대식세포주의 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 RAW 264.7 세포를 3×10<sup>3</sup> cells/well (96 well plate)로 분주하고 부자와 감초 배합 추출물을 PBS

에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 비교물질로 lipopolysaccharide (LPS; Sigma Chemical Co, MO, USA)를 사용하였다. 48시간 배양한 후 tetrazolium salt인 CCK-8 kit (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 ELISA reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포 증식능 (% of control)을 계산하였다.

(3) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를  $2.5 \times 10^5$  cells/well (48 well plate)로 분주하고 약재의 독성이 없는 범위 내에서 농도별로 (20~1000  $\mu\text{g/mL}$ ) 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양을 측정하기 위해 배양 상층액의 nitrite 양을 Griess reagent (Promega, WI, USA)를 사용하여 제조사의 사용법에 따라 측정하였으며 양성대조군으로 LPS (10, 100 ng/mL)를 사용하였다.

3) 비장세포의 면역활성 효과 검색

(1) 비장세포 배양

6주령의 수컷 ICR 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma-Aldrich Co, MO, USA)로 세척하고 주사기를 이용하여 비장세포를 분리한 후 RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co, MO, USA)로 적혈구를 제거하였다. 분리된 비장세포는 10% FBS와 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco Inc., NY, USA) 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

(2) 비장세포의 증식능 검색

부자와 감초 배합에 따른 비장세포 증식을 검색하기 위하여 분리한 비장세포를  $5 \times 10^5$  cells/well (96 well plate)로 분주하고 부자와 감초 배합 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 비교물질로 Concanavalin A (Con A; Sigma Chemical Co, MO, USA)를 사용하였다. 48시간 배양한 후 CCK-8 solution을 사용하여 상대적인 세포 증식능 (% of control)을 검색하였다.

4) OVA 감작 생쥐에서 면역 활성화 검색

(1) 실험동물 및 항원물질 투여

5주령의 수컷 C57BL/6 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 12시간 간격으로 명암이 조절되는 사육실에서 1주일간 환경에 적응하도록 순화시킨 후 대조군 (NC), Ovalbumine (OVA; Thermo, IL, USA)/Aluminium (Alum; Sigma-Aldrich Co, MO, USA)/Saline 투여군 (OVA), OVA 및 부자와 감초 배합 투여군 (AG)으로 분리하여 실험에 사용하였다. OVA는 생쥐 당 100  $\mu\text{g}/200 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  용량을 1일, 8일, 15일에 복강투여하여 항체 생성을 유도하였으며 NC군은 동일량의 saline을 복강 투여하였다. NC군과 OVA군은 증류수를, AG 투여군은

각 배합 추출물을 건조약재량 1 g/kg/day로 OVA 감작과 동시에 21일간 경구 투여하였다. 22일에 생쥐를 희생하여 후대 정맥에서 채혈한 후 비장을 적출하였다.

(2) OVA 감작된 생쥐 비장세포의 증식능 검색 (mitogen effect)

적출한 비장에서 앞서와 같은 방법으로 비장세포를 분리하여  $5 \times 10^5$  cells/well (96 well plate)로 분주하고 control (1% PBS), OVA (10  $\mu\text{g/mL}$ ), LPS (2  $\mu\text{g/mL}$ )와 Con A (4  $\mu\text{g/mL}$ )를 각각 첨가하였다. 48시간 동안 배양한 후 CCK-8 solution을 사용하여 상대적인 세포 증식능 (% of control)을 검색하였다.

(3) 유세포 분석을 통한 면역세포 발현 유형 검색

분리한 비장세포를  $1 \times 10^6$  cells로 FACS tube (BD biosciences, USA)에 넣어 원심분리하여 상층액을 버리고 anti-B220, CD3, CD4, CD8 항체를 (BD biosciences, USA) 첨가한 후 4°C에 30분간 반응시켰다. 2% FBS가 첨가된 PBS로 2회 세척한 후에 FACS Calibur (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 세포 유형을 분석하였다.

(4) 혈액 및 생화학 분석

생쥐에서 채혈한 혈액은 Hemavet 950 FS (Drew Scientific Inc., CT, USA)을 사용하여 WBC (White blood cell, 백혈구), RBC (Red blood cell, 적혈구), Hb (Hemoglobin, 혈색소), Hct (Hematocrit, 적혈구용적), lymphocyte (림프구), monocyte (단핵구) 등 전 혈구 수 (complete blood cell count, CBC)를 측정하였다. 혈장성분 분석을 위하여 분리한 혈장으로 AST (Aspartate aminotransferase)와 ALT (Alanine aminotransferase)의 활성을 측정하였다.

(5) 혈중 항체 생성량 측정

생쥐에서 채혈한 혈액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 수집한 혈장에서 항체 생성량을 측정하였다. 비특이적 (total) IgM 또는 감작 항원으로 사용한 OVA에 대한 특이적 (OVA-specific) Immunoglobulin (Ig)G, IgG1 및 IgG2a를 enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA; Bethyl Laboratory, Inc., Texas, USA)를 사용하여 측정하였고 방법은 다음과 같다. Total IgM을 측정하기 위하여 IgM antibody (Ab)를 carbonate buffer에 1:100으로 희석하여 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 Ab를 부착시켰다. OVA-specific IgG, IgG1 및 IgG2a를 측정하기 위하여 OVA (10  $\mu\text{g/mL}$  in carbonate buffer, pH 9.6) 용액을 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 OVA를 부착시켰다. 각각 wash buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 3번 세척한 후 blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)를 200  $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 비특이적인 결합부위를 차단하였다. Wash buffer로 세척한 후 1:10,000 (total IgM) 또는 1:1000 (OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1), 1:5 (OVA-specific IgG2a)으로 희석한 혈장을 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 반

응시켰다. 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Ab를 1:100,000으로 희석하여 100  $\mu$ l/well씩 가하고 상온에서 1시간 반응 후 세척하였다. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB)용액을 100  $\mu$ l/well로 가하여 빛을 차단하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 100  $\mu$ l/well로 가하여 발색 반응을 종결시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계적 분석

모든 실험결과의 자료는 mean  $\pm$  S.E.M.으로 나타냈으며 SYSTAT 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. 각 군 간의 차이를 검증하기 위하여 bonferroni multiple comparison test를 이용하여 사후분석을 실시하였고,  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. HPLC를 이용한 성분 분석

부자의 주요 성분인 aconitine, hypaconitine, mesaconitine과 감초의 주요 성분인 liquiritin 및 glycyrrhizin 등 5종 성분의 동시 분석을 위한 HPLC 분석 조건을 확립하였다. 이동상은 30 mM ammonium bicarbonate (A)와 acetonitrile (B)를 이용하여 기울기용매 조건으로 분석하였다. PDA 분석 파장은 aconitine, hypaconitine, mesaconitine 및 glycyrrhizin은 254 nm, liquiritin은 280 nm로 설정하여 각 성분의 peak 면적을 측정하였다. 최종 확립된 분석조건에 의하여 각 성분의 peak area를 이용하여 작성한 calibration curve 결과는 Table 3 과 같다. 또한 확립된 분석법에 의한 AG의 분석결과 aconitine, mesaconitine 및 hypaconitine 등 3가지 부자성분은 검출되지 않았으며, 감초의 성분인 liquiritin과 glycyrrhizin은 감초의 비율이 높을수록 많이 검출되었다 (Fig. 2, Table 4).

Table 3. Regression Data, Linear Range, and Correlation Coefficient for Marker Compounds (n=3).

Compound	Linear range (ug/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R <sup>2</sup> )
Liquiritin	15.63-500.00	4376.1	10104	0.9999
Glycyrrhizin	6.25-200.00	9478.7	8019.4	0.9999
Mesaconitine	3.13-100.00	928.8	1307.6	0.9999
Aconitine	3.13-100.00	972.4	4744.4	0.9993
Hypaconitine	3.13-100.00	910.3	425.7	0.9998

Table 4. Contents of 5 compounds in the AG by HPLC (n=3).

Sample	Content (Mean $\pm$ SD; mg/g ext)				
	Liquiritin	Glycyrrhizin	Mesaconitine	Aconitine	Hypaconitine
AG-1	ND <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
AG-2	6.08 $\pm$ 0.06	4.85 $\pm$ 0.22	ND	ND	ND
AG-3	16.27 $\pm$ 1.18	11.49 $\pm$ 0.62	ND	ND	ND
AG-4	13.09 $\pm$ 0.42	13.80 $\pm$ 0.19	ND	ND	ND
AG-5	23.12 $\pm$ 1.07	35.83 $\pm$ 0.39	ND	ND	ND

<sup>a</sup>ND: Not detected

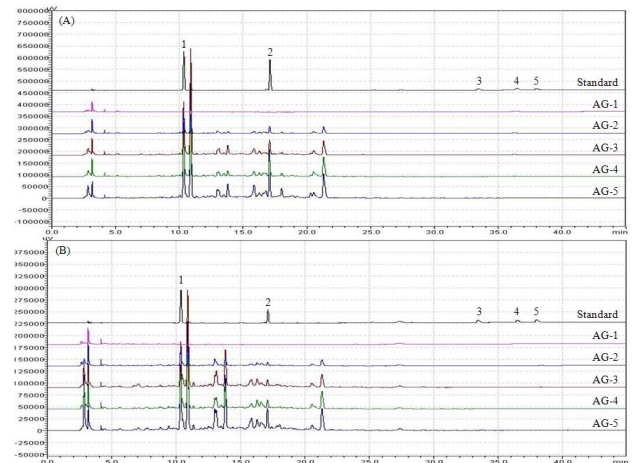


Figure 2. HPLC chromatogram of a standard mixture and sample at 254 nm (A) and 280 nm (B). Liquiritin (1), glycyrrhizin (2), mesaconitine (3), aconitine (4), and hypaconitine (5).

2. 대식세포 증식 및 활성화에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 부자와 감초 배합 추출물을 처리하고, 48시간 동안 배양하여 대식세포의 증식을 확인한 결과 감초의 비율이 높을수록, 같은 배합 내에서는 농도의존적으로 대식세포에 대한 증식효과를 나타냈다 (Fig. 3A). 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군에서는 NO 생성이 유발되지 않았으나 감초의 비율이 높을수록 NO 생성을 유발하였다 (Fig. 3B).

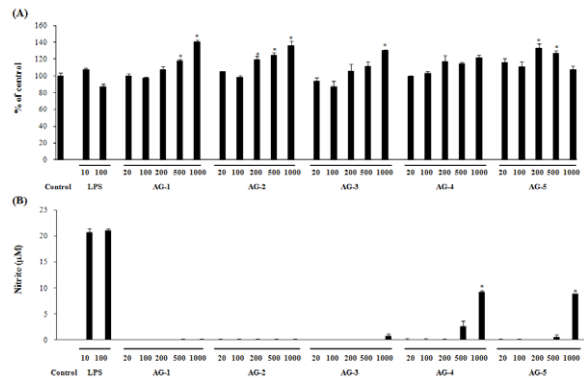


Figure 3. The Effect of AG in RAW 264.7 murin macrophages. (A) Cells were treated with LPS or AG for 48 h, and cell proliferation was determined using the CCK-8 reagent. (B) Cells were treated with LPS or AG for 18 h and nitrite accumulation was measured as described in Materials and Methods. The units of concentrations of LPS and AG are ng/mL and  $\mu$ g/mL, respectively. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M., and are representative of triplicate experiments. \* $p < 0.05$  compared with control.

3. 비장세포 증식능에 미치는 영향

비장세포에 부자와 감초 배합 추출물을 처리하여 비장세포의 증식을 확인하였다. 그 결과 양성대조군으로 사용한 Con A는 농도의존적으로 비장세포를 증식시켰고, 부자와 감초 배합 추출물에서는 500  $\mu$ g/mL에서 AG-1 100.37  $\pm$  1.85%, AG-2 109.46  $\pm$  2.35%, AG-3 112.06  $\pm$  1.57%, AG-4 115.21  $\pm$  2.17%, AG-5 117.87  $\pm$  1.86% ( $p < 0.05$ )로 감초의 비율이 높을수록 비장세포에 대한 증식효과를 나타냈다 (Fig. 4A).

부자와 감초 배합 추출물이 생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 검색하기 위하여 부자와 감초 배합 추출물을 투여한 생쥐의 비장세포를 분리하여 항원으로 사용한 OVA, B 림프구 증식을 유도하는 LPS, T 림프구 증식을 유도하는 Con A에 대한 증식효과를 검색하였다. NC군과 OVA군은 OVA, LPS, Con A에 의한 증식은 차이가 없었다. AG군은 OVA 처리 시 AG-1 176.66%, AG-2 187.33%, AG-3 228.68% ( $p<0.05$ ), AG-4 173.54%, AG-5 179.49%로 AG-3에서 가장 높게 나타났다. LPS 처리 시 AG-1 267.64% ( $p<0.05$ ), AG-2 320.48% ( $p<0.05$ ), AG-3 370.48% ( $p<0.05$ ), AG-4 266.92%, AG-5 244.69%로 역시 AG-3에서 가장 높게 나타났다. Con A 처리 시 AG-1 272.04%, AG-2 423.57%, AG-3 412.87%, AG-4 380.49%, AG-5 514.29% ( $p<0.05$ )로 감초의 비율이 높을수록 비장세포에 대한 증식효과를 나타냈다 (Fig. 4B).

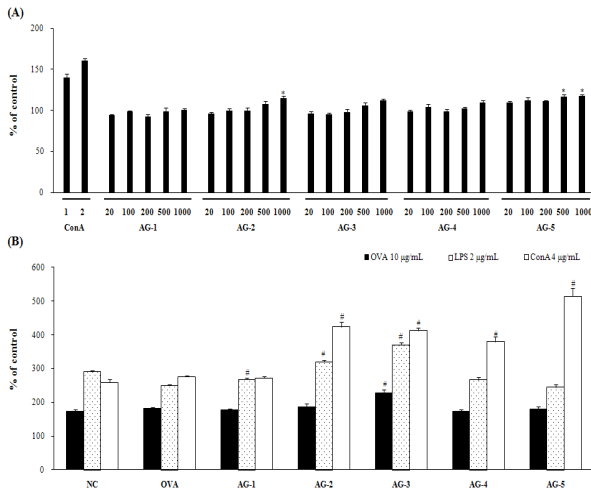


Figure 4. The effects of proliferation on AG in splenocyte. (A) Cells were treated with Con A or AG for 48 h, and cell proliferation was determined using the CCK-8 reagent. The units of concentrations of LPS and AG are ng/mL and µg/mL, respectively. Data are given as mean±S.E.M., and are representative of triplicate experiments. \* $p<0.05$  compared with control. (B) Mice were immunized intraperitoneally with ovalbumin/aluminium (OVA; 100 µg/200 µg) on day 1, 8, and 15. The AG mixtures were orally administered for 3 weeks. Splenocytes were prepared from NC, OVA or AG mice on day 22 and cultured with OVA, LPS or Con A for 48 h. Cell proliferation was shown as a percentage of the control (vehicle) using the CCK-8 reagent. Data are given as mean±S.E.M. # $p<0.05$  compared with OVA. Abbreviations: NC, normal control mice; OVA, OVA-immunized mice; AG, mixture of Aconiti Radix Lateralis Preparata and Glycyrrhizae Radix-treated and OVA-immunized mice.

#### 4. 면역세포 유형에 미치는 효과

비장세포에서 부자와 감초 배합 추출물에 의해 면역세포 비율 변화를 확인하기 위해 세포 표면에 결합하는 항체를 염색한 후 유세포 분석을 하였다. 비장세포 중 B 림프구의 비율은 AG-1 22.15±0.64%, AG-2 22.2±0.43%, AG-3 21.36±1.82%, AG-4 19.84±0.78%, AG-5 8.59±0.66%으로 감초의 비율이 높을수록 감소하였다. T 림프구의 비율은 AG-1 40.83±0.914%, AG-2 41.51±0.89%, AG-3 41.91±1.81%, AG-4 46.04±0.51%, AG-5 60.64±1.09%으로 감초의 비율이 높을수록 증가하였다. 또한 Th의 비율은 AG-1 17.97%, AG-2 23.33%, AG-3 22.07%, AG-4 26.44%, AG-5 36.34%로 감초의 비율이 높을수록 증가하였다. 그러나 CTL의 비율은 부자와 감초 배합에 대해서는 유의한 차이가 없으나 감초만 투여한 그룹 (AG-5)에서 OVA 그룹보다 증가하였다 ( $p<0.05$ ) (Table 5).

Table 5. Effects of AG on the Percentage of Lymphocyte Subsets in Mouse Spleen

Lymphocyte subsets	Combination Ratio of Crude Drug						
	NC	OVA	AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5
B220 <sup>+</sup>	18.83±0.80	20.97±0.72	21.39±0.91	18.55±1.42	22.43±1.77	22.56±0.49	8.59±0.66*
CD3 <sup>+</sup>	44.93±1.86	44.30±1.09	40.83±0.91	41.51±0.89	41.91±1.81	46.04±0.51*	60.64±1.09*
CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	16.65±0.54	21.66±0.48	17.97±1.62	23.33±1.13	22.07±0.99	26.44±0.89*	36.34±1.05*
CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	32.31±0.78	31.95±0.12	33.62±1.10	34.96±0.46	33.56±0.86	35.52±0.84	48.31±1.68*

Mice were immunized intraperitoneally with ovalbumin/aluminium (OVA; 100 µg/200 µg) on day 1, 8, and 15. The AG mixtures were orally administered for 3 weeks. Each value represents a mean±S.E.M. Abbreviations: NC, OVA-unimmunized mice; OVA, OVA-immunized mice; AG, mixture of Aconiti Radix Lateralis Preparata and Glycyrrhizae Radix-treated and OVA-immunized mice: \* $p<0.05$  compared with respective OVA values.

#### 5. 혈액학적 분석

CBC, AST 및 ALT를 검사한 결과, 모든 실험군에서 정상적인 범위 내 수치를 나타냈으며 NC군과 비교했을 때 유의한 차이가 나타나지 않았다 (do not shown).

#### 6. 생체 내에서 항체 생성능에 미치는 영향

생체 내 항체 생성능을 검색한 결과, total IgM level은 AG-1 418.6 µg/mL, AG-2 422.5 µg/mL, AG-3 671.1 µg/mL ( $p<0.05$ ), AG-4 824 µg/mL ( $p<0.05$ ), AG-5 696.4 µg/mL ( $p<0.05$ )로 감초의 비율이 높을수록 증가하여

AG-4가 가장 높게 나타났다 (Fig. 5A). OVA-specific IgG level은 AG-1 10.4 µg/mL, AG-2 11.2 µg/mL, AG-3 21.6 µg/mL, AG-4 25.7 µg/mL, AG-5 22.2 µg/mL로 감초의 비율이 높을수록 증가하여 AG-4가 가장 높았으나 OVA군과 비교하여 통계적으로 유의하지 않았다 (Fig. 5B). OVA-specific IgG1도 AG-1 64.5 µg/mL, AG-2 63.2 µg/mL, AG-3 117.3 µg/mL, AG-4 107 µg/mL, AG-5 100.2 µg/mL로 감초의 비율이 높을수록 증가하여 AG-3이 가장 높았으나 OVA군과 비교하여 통계적으로 유의하지 않았다 (Fig. 5C). 그러나 OVA-specific IgG2a level은 항체 생성에 대해 detection limit이하로 측정할 수 없었다. 따라서 부자와 감초 배합 추출물은 시너지 작용을 하여 total IgM,

OVA-specific IgG 및 IgG1 level을 높여 체액성 면역을 증진시키는 것으로 사료된다.

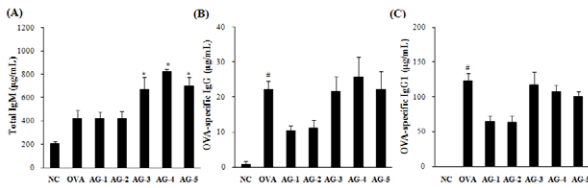


Figure 5. The plasma levels of total IgM (A), OVA-specific IgG (B) and OVA-specific IgG1 (C) on OVA-immunized mice. Mice were immunized intraperitoneally with ovalbumin/aluminium (OVA; 100  $\mu$ g/200  $\mu$ g) on day 1, 8, and 15. The AG mixtures were orally administered for 3 weeks. Plasma was collected on day 22 and analyzed by ELISA. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M. # $p$ <0.05 compared with NC. \* $p$ <0.05 compared with OVA. Abbreviations: NC, normal control mice; OVA, OVA-immunized mice; AG, mixture of *Aconiti Radix Lateralis Preparata* and *Glycyrrhizae Radix*-treated and OVA-immunized mice.

## 고찰

한의학에서는 서구의 전통 식물의약과 같이 한 가지의 약물을 복용하는 경우는 드물고, 대부분 다수의 복합 한약을 투여하고 있다. 본초이론에서도 복합 투여시 약성의 변화와 치료 효과의 차이에 대한 이론을 펼치고 있다. 이렇게 다수의 한약이 복합으로 투여될 시에 독성에 의한 부작용이 우려되었지만, 한약의 경우 부작용과 관련된 주요 성분이 복합처방에 따른 다른 약물과의 상호작용에 의한 상쇄효과에 의해 적은 것으로 추측된다<sup>4)</sup>. 본 연구에서는 약성을 완화시키는 것으로 알려진 감초와 독성이 있는 부자에 대한 七情論의 相須이론을 규명하기 위해, 배합에 따른 화학적인 면과 활성적인 면을 관찰하였다.

甘草는 콩과에 속하는 다년생 본초로서 모든 약을 화합시키는 성질이 있어 한방의 처방전에 많이 이용되는 한약 중의 하나다. 감초의 약리 작용으로는 항암효능<sup>5)</sup>, 면역증강 및 간기능 증가효능<sup>6)</sup>, 항염증 효능<sup>7)</sup>, 항궤양 효능<sup>8)</sup> 등이 보고되었다. 附子는 미나리아재비과에 속하는 다년생 본초로서 항류마티스, 진통효과 등에 대한 효능이 보고되었다<sup>9)</sup>. 그러나 부자는 diterpenoid alkaloid 성분으로 인한 독성을 가지고 있어 장시간 염수에 침적하거나, 가열 처리하는 등의 修治과정을 거쳐 독성을 감소시킨 염부자 또는 포부자 등이 사용되어 오고 있다. 부자와 감초는 각각에 대한 다양한 약리작용이 연구되었으나 부자와 감초 배합에 따른 효능 변화에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 다만 임상에서 부자와 감초를 배합하여 風濕痺症의 骨節掣痛, 급히거나 퍼기 힘든 증상, 陽虛陰寒內盛의 四肢가 厥冷하고, 정신이 피로하고 맥이 沈遲한 사람, 外感으로 寒邪가 침입하여 陽氣가 손상을 입고, 惡寒하며 脈이 微한 것 등의 증상에 쓴다<sup>2)</sup>고 하였다. 따라서 본 연구에서는 부자와 감초의 배합에 따른 화학적인 변화를 HPLC로 분석하고, 면역활성에 대한 효과를 비교하였다.

각 배합 비율에 따른 HPLC 분석 결과 이미 제조과정에서 법제된 염부자와 감초의 배합 추출물에서 부자의 성분으로 알려진 aconitine, hyaconitine 및 mesaconitine 등의 3가지 성분은 모두 검출되지 않았고, 감초의 주요 성분으로 알려진 liquiritin 및 glycyrrhizin 등의 2가지 성분은 감초의 비

율이 높을수록 많이 검출되었다. 추후 부자와 감초의 상호작용을 좀 더 명확히 연구하기 위해서는 법제가 안된 부자 시료를 통하여 감초와의 상호작용을 밝힐 필요가 있다고 사료된다.

면역반응에 관여하는 세포는 림프구, 대식세포, 자연살해세포, 수지상세포 등이 있으며 면역세포 중 대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 대식세포가 활성화되면 세포수가 증가되고 NO를 생성하며 생성된 NO는 침입한 병원균을 없애고 기본적인 숙주 방어 역할을 한다<sup>11)</sup>. 본 연구에서 면역체계에서 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 증식 및 활성화와 관련하여 부자와 감초 배합 추출물의 영향을 알아보기 위해 대식세포의 증식능과 NO 생성능을 확인한 결과, 대식세포의 증식능 및 NO 생성능은 감초의 비율이 높을수록 증가되었다.

비장은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 면역 반응 부위로 B 및 T 림프구의 성숙과 항원의 자극에 의한 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프 기관이며 비장 내 림프구의 증식은 면역계에서 매우 중요한 의미를 갖는다<sup>12)</sup>. 또한 B 및 T 림프구, 대식세포 등의 여러 가지 면역세포가 밀집되어 있어 비장의 크기 및 세포의 수는 면역반응에 밀접한 관련이 있으므로 비장세포 증식능 평가는 면역활성화 지표로 많이 이용된다<sup>13-14)</sup>. 이에 부자와 감초의 배합에 대한 비장세포 증식효과를 검색한 결과, 감초의 비율이 높을수록 증식효과가 증가되었다. 그리고 OVA를 외부 항원으로 사용하여 감작시킨 생쥐에 부자와 감초의 배합 추출물을 경구투여하여 비장세포 증식효과를 검색한 결과, B 림프구의 증식을 유도하는 LPS에서는 부자와 감초의 비율이 1:1인 AG-3에서 증식효과가 가장 높게 나타났으며, T 림프구의 증식을 유도하는 Con A에서는 감초의 비율이 높을수록 증식효과가 높게 나타났다. 이는 부자와 감초 배합 추출물이 B 및 T 림프구의 증식을 촉진하여 체액성 및 세포성 면역반응을 증진시키는 것으로 사료된다.

체액성 면역반응은 B 림프구에 의한 면역반응으로 바이러스나 박테리아 등에 의해 B 림프구가 활성화되어 세포 표면에 발현된 면역글로블린을 분비한다. 세포성 면역반응은 T 림프구에 의한 면역반응으로 T 림프구는 helper T cell (Th)와 cytotoxic T cell (CTL) 등 두 가지 아형이 있다. 표면 항원 CD4 분자를 가지는 Th는 항원 자극에 의해 IL-2와 같은 cytokine이 생성되어 B 림프구 및 CTL 등의 다양한 면역세포들의 기능을 활성화하는 역할을 하며 autocrine mechanism에 의해 Th도 증식되는 것으로 알려져 있고<sup>15)</sup>, CD8 분자를 가지는 CTL는 면역의 항상성을 유지하고, 조절하기 위하여 바이러스에 감염된 세포들을 인지하여 방어하는 역할을 한다<sup>16)</sup>. 부자와 감초의 배합 추출물에 의해 T 림프구, 특히 Th 비율은 감초의 비율이 높을수록 증가되었으며 이는 배<sup>17)</sup> 등의 감초의 물 추출액이 Th에서 분비되는 cytokine을 증가시킨다는 보고와 일치하였다. 따라서 감초에 의해 Th 비율이 높아지고 cytokine의 분비가 증가되어 T 림프구의 증식 및 활성이 촉진되는 것으로 사료된다.

면역글로블린 중 IgM은 생체 내 처음으로 만들어지는 항체로 낮은 친화력을 가졌으나 다양한 특이성을 가져 미생물 감염 등 선천면역에 중요한 역할을 한다<sup>18-19)</sup>. 생체 내 가장 많이 존재하는 IgG의 아형 중 IgG1은 IgG의 약 70%를 차지

하고, IgG2는 다양한 항원에 반응하나 결핍시 세균감염의 위험이 증가한다. 부자와 감초 배합 추출물을 경구투여하여 생체 내 이들 항체 생성 변화를 검색한 결과, 혈중 IgM과 OVA-specific IgG 생성은 감초의 비율이 높을수록 증가하여 AG-4이 가장 높게 나타났다. 이는 감초의 비율이 높을수록 비장세포 내에서 B 림프구의 비율이 감소하나 T 림프구, 특히 Th의 비율을 증가시켜 B 림프구를 활성화시키는 것으로 사료된다.

## 결론

법제 부자와 감초의 배합에 따른 HPLC 분석과 면역활성화 효과를 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모든 배합에서 부자의 독성 성분으로 알려진 aconitine, mesaconitine 및 hypaconitine 등의 3가지 성분은 검출되지 않았고, 감초의 주요 성분으로 알려진 liquiritin 및 glycyrrhizin 등의 2가지 성분은 감초의 비율이 높을수록 많이 검출되었다.
2. 감초의 비율이 높을수록 대식세포의 증식 및 NO 생성을 증가시켰고, 비장세포의 증식능을 상승시켰다.
3. OVA로 감작된 생쥐에 부자와 감초 배합 추출물 투여 시 감초의 비율이 높을수록 비장세포에서 Con A에 대한 세포 증식 및 Th 세포의 비율과 혈중 total IgM, OVA-specific IgG 및 OVA-specific IgG1 level이 상승되었다.

결론적으로 법제 부자와 감초를 배합했을 때 감초의 비율이 높을수록 Th세포에 의해 면역세포들이 증식 및 활성화되어 면역활성화 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '한약물 상호작용 과학화 연구'에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 전국한외과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 95.
2. Changyong, Zhongyao, Peiduiyujinji. 常用中藥配對與禁忌. 중국 : 山西科學技術出版社. 2003 : 34.
3. 이영우, 강순수. 약물배합에 따른 감초의 주치작용 변화에 대한 고찰. 방제학회지. 1991 ; 2(1) : 59.
4. Park YC, Lee S, Lee IS. Pharmacological effects and toxicity of licorice. J Toxicol Pub Health, 2002 ; 18(3) : 301-309.

5. 류춘안. 향암중초약대사전. 중국 : 호북과학기술출판사. 1994 ; 2 : 60-265.
6. Mori K, Sakai H, Suzuki S. Effects of glycyrrhizin in hemo-philia patients with HIV-1 infection. Tohoku J Exp Med, 1990 ; 162 : 183-193.
7. Huang KC. The pharmacology of chinese herbs. CRC press. 1993 : 84.
8. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. Chem Pharm Bull, 1992 ; 40(6) : 1439-1442.
9. Sato H, Yamada C, Konno C, Ohizumi Y, Endo K, Hikino H. Pharmacological actions of aconitine alkaloids. Tohoku J Exp Med. 1979 ; 128 : 175-187.
10. 박재승, 이정호, 하대유. Capsaicin 전처치가 마우스 대식세포의 기능에 미치는 영향. 대한면역학회지. 2000 ; 22 : 39-49.
11. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. Annals of the Rheumatic Diseases. 1996 ; 55 : 7-20.
12. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. Science. 1999 ; 286 : 2098-2102.
13. Svec F, Porter J. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. Proc Soc Exp Biol. 1998 ; 218 : 174-191.
14. Roberts JCW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. Clin Microbil Rev. 2001 ; 14 : 476-488.
15. Kang SM, Lee WJ, Kim JH. 웨이트 트레이닝의 운동 강도 증가시 CBC 8종 및 면역기능에 미치는 영향. J Sport and Leisure Studies. 2010 ; 40 : 647-658.
16. 유철주, 신주옥, 임정일. Naegleria fowleri 감염 마우스에 있어서 interleukin-2 생성 및 T 림프구 아형 변동. 기생충학잡지. 1993 ; 31(3) : 246-257.
17. 배향, 명유진, 강희, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 보기약물인 인삼, 황기, 백출, 감초의 물 추출액이 생쥐 면역세포의 cytokine 분비에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005 ; 19(1) : 69-74.
18. Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. Eur J Immunol. 1998 ; 18 : 313-316.
19. Connolly SE, Benach JL. The versatile roles of antibodies in Borrelia infections. Nat Rev Microbiol. 2005 ; 3 : 411-420.