

漢藥製劑의 免疫學的 研究 (第 1 報)

金炳珏 · 鄭敬壽 · 崔應七 · 金惠鈴 · 朴希珠 · 趙弼衡*

서울대학교 藥學大學 · 韓豐製藥株式會社*

Immunological Studies on Oriental Pharmaceutical Preparations (I)

Byong-Kak KIM, Kyeong-Soo CHUNG, Eung-Chil CHOI, Hye-Ryung KIM
Hee-Ju PARK, and Pil-Hyoung CHO*

College of Pharmacy, Seoul National University and Han-Poong Pharmaceutical Company*

To examine effects of oriental pharmaceutical preparations on immunity, four of such preparations which are currently being used were examined. After their fluid extracts were injected intraperitoneally to ICR mice, the counts of total cell number, PMN and macrophage in the peritoneal cavity were made by using non-specific esterase staining method, and plaque-forming cells (PFC) were measured by using the modified method of Cunningham and Jerne.

The results showed that "*Bo-Jung-Ik-Ki-Tang*", "*Ih-Jung-Tang*", "*Ohn-Kyeong-Tang*" and "*Ke-Ji-Bok-Ryeong-Hwan-Ka-Dae-Hwang*" increased both the macrophages and the total cells of the peritoneal cavity and that these preparations increased the number of PFC in the spleen. Therefore the data indicate that they potentiate both of the cell-mediated and humoral immunities in the mice.

漢藥處方을 구성하고 있는 각개 漢藥으로 부터 함유성분을 추출하여 화학구조를 결정하거나 그 약리작용을 해명하는 연구는 널리 진행되어 수많은 보고가 발표되고 있으며, 複合處方이 나타내는 약리작용을 밝히는 연구도 근래에 활발히 진행되고 있다.¹⁻¹¹⁾

그러나 보혈강장제로 쓰이거나 전염병의 예방과 치료에 사용되는 漢藥處方이 생체의 면역능(免疫力)에 미치는 영향을 검토한 논문은 별로 찾아 볼 수 없고, 鹿茸의 추출액이 대장균에 대한 항체(抗體) 생산에 미치는 영향을 보고한 논문이 최근에 발표되었을 뿐이다.¹²⁾

이러한 점에 착안하여 많이 쓰이고 있는 몇가지 漢藥製劑가 실험동물의 면역에 미치는 영향을 실험하여 그 결과를 얻었기에 보고코자 한다.

실 험

1. 실험재료

1) 시 료

韓豐製藥株式會社에서 제조한 補中益氣湯(시료 I), 理中湯(시료 II), 溫經湯(시료 III), 桂枝茯苓丸加大黃(시료 IV)의 연조 엑기스를 썼다.

2) 시 약

(1) Non-specific esterase (NSE) staining solution: α -Naphthylacetate 1g을 acetone 50ml 및 탈이온수 50ml에 녹인 용액 2.0ml와, 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) 15ml, 탈이온수 15ml, fast red TR salt (4-chloro-O-toluidine diazotate, Polysciences, Inc., Warrington) 20mg을 빙냉하에 순서대로 진탕 혼합하고 여과하여 즉

시 사용하였다.

(2) Giemsa staining solution: 0.38g의 Giemsa stain powder (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)를 20ml의 글리세린과 함께 60°의 수욕상에서 2시간 진탕하여 용해시킨 후 31ml의 무수 메탄올을 가하여 차광 보존하고 그 중 4ml를 취하여 증류수를 가해 40ml로 만든 후 pH를 7.1로 조절하였다.

(3) Sheep red blood cell (SRBC) : 건강한 면양으로부터 채취한 혈액으로서 국립보건연구원에서 분양받았다.

(4) Complement: 주식회사 녹십자로부터 분양받은 guinea pig의 신선한 혈청을 complement로 사용하였다.

(5) Microchamber: Slide glass을 무수 에탄올로 세척한 후 양면 세포판 tape를 써서 양쪽 단측면을 밀봉시켜 내용량이 약 160 μ l가 되도록 만들었다.

3) 실험동물

체중 20~23g의 건강한 ICR계 생쥐(♂)를 사용하였으며 이들은 서울대학교 실험동물사육장에서 입수하였다.

2. 실험방법

1) 복강세포군(Peritoneal exudate cells = PEC's)에 미치는 영향

(1) 약물의 투여 및 복강세포 총 수의 측정 : 실험 동물 5마리 씩을 하나의 실험군으로 하였으며 시료를 phosphate buffered saline에 용해시켜 1mg/ml의 주사용액을 만들고 이 용액을 실험동물의 복강내에 1ml씩 주사하였다. 약물 투여 후 2일, 3일 및 5일 만에 실험동물을 에텔로 치사 즉시 복강을 노출시켜 병냉한 BSS로 세척하여 복강세포를 모았다. 복강세포 세척액의 총 용량이 10ml가 되도록 세척한 후 복강세포 총 수를 직접 hemacytometer로 측정하였다.

(2) 복강세포중의 임파구, PMN, macrophage의 측정 : 위의 복강세포 세척액을 각각 4°에서 400 \times g로 10분간 원심분리하여 각각의 세포침전물을 얻고 이를 0.2ml의 BSS와 함께 현탁시킨 후, 각각 4매씩의 slide glass에 도말하여 자연 건조시켰다. 건조된 도말표본 중에서 2매는 무수

메탄올로 5분간 고정을 시킨 후 Giemsa staining solution을 가하여 실온에서 20분간 염색을 시행하였다. 염색된 표본을 95% 에탄올로 탈색하고 건조시켜 cedar oil을 mounting solution으로 하여 1,000배로 관찰하였다. 각 시야중의 임파구와 PMN을 계수하되 5시야 이상을 관찰하여 평균치를 구하였다. 한편 자연 건조된 도말 표본 중 2매는 어름위에서 병냉한 아세톤으로 5분간 고정시킨 후 NSE staining solution에 세포 도말면을 아랫쪽으로 향하여 넣고 26°에서 30분간 배양하여 염색을 시행하였다. 상수로 세척한 후 1% malachite green으로 5초간 counter staining을 하고 다시 세척한 뒤 글리세린을 mounting solution으로 하여 1,000배로 관찰하였다. Malachite green에 의해 염색된 반달~말굽형의 핵을 지니며, cytoplasm내에 NSE stain에 의해 염색된 적색 입자를 지닌 세포를 macrophage로 간주하였다.

2) 생쥐의 용혈반 형성 세포수에 미치는 영향

용혈반 형성 세포 수의 측정은 Cunningham의 방법을¹³⁻¹⁴⁾ 개량하여 다음과 같이 시행하였다.

(1) 약물 투여 및 면역 : 각 실험군마다 5마리의 동물을 사용하고 대조군에는 생리식염수를, 투여군에는 시료 50mg을 생리식염수 10ml에 용해시켜 각각 0.1ml씩 매일 1회, 5일간 복강내에 주사하였다. 시료투여 최종일로부터 10일 후에 SRBC 현탁액(1×10^7 cells/ml)을 1ml씩 복강내에 주사하여 SRBC에 대한 면역을 시행하였다.

(2) 비장세포 부유액의 제조 : 5일 후에 실험동물을 치사시켜 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 병냉한 BSS와 함께 homogenizer로 분쇄하여 비장세포를 단세포로 분리시키고 400 \times g에서 원심분리하여 세포 침전물을 취하였다. 이 비장세포 침전물을 37°의 0.83% NH₄Cl에 부유시켜 용혈시킨 후 다시 원심분리하여 적혈구가 제거된 세포 침전물을 얻었다. 이 세포 침전물을 병냉한 BSS에 부유시켜 총용량 10ml로 하여 비장세포 수를 측정하였다.

(3) 20% SRBC의 제조 : Alsever's solution에 보존중인 SRBC를 생리식염수로 4회 세척하고

(×400g, 5분)마지막 세척 후 20%가 되도록 멸균 생리식염수에 부유시켰다.

(4) Complement-SRBC의 제조: Microwell에 20% SRBC 250 μ l, complement 500 μ l를 섞어 ice bath 위에 30분간 방치한 후에 사용하였다.

(5) Incubation mixture의 제조: Microwell에 complement-SRBC 150 μ l, 비장세포 부유액 650 μ l를 잘 섞은 후 이를 microchamber에 150 μ l씩 넣어 주었다.

(6) 배양 및 결과 판단: Microchamber를 wax-vaseline(1:1)으로 밀봉하여 37°에서 1시간 배양하고 형성된 용혈반을 간접광선하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 복강 세포군에 미치는 효과

네개의 시료를 각각 생쥐에 투여하였을때 그 복강내의 세포 총수, PMN 및 macrophage에 미치는 효과를 Table I에 요약하였다.

補中益氣湯(시료 I)은 복강세포 총수를 17.0 × 10⁶개로 증가시켰으며, 더우기 NSE staining에 양상을 나타내는 macrophage의 숫자를 증가시켜 총 세포수에 대한 비율이 62.2%까지 증가되었다. 그러나 PMN의 비율은 정상 마우스의 27.3%에 비하여 큰 변화가 없음을 알 수 있다. 이러한 효과는 시료 II, 시료 III 및 시료 IV에서도 비슷하게 나타났다. 즉 理中湯(시료 II)의 경우 약물 투여후 제 2일 만에 복강세포 총수가 12.2 × 10⁶개로 증가하였으며 macrophage는 61.1

Table I. Effects of four samples on the peritoneal cell populations.

| | Time after injection (day) | PEC count ^{b)} (×10 ⁶) | PMN ^{c)} (%) | Macrophage ^{d)} (%) |
|---------------------------------------|----------------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| Control ^{a)} | 0 | 6.1 | 27.3 | 20.9 |
| "Bo-Jung-Ik" | 2 | 17.0 | 51.7 | 42.3 |
| "Ki-Tang" | 3 | 10.9 | 30.8 | 62.2 |
| (Sample I) | 5 | 12.6 | 28.7 | 45.0 |
| "Ih-Jung-Tang" | 2 | 12.2 | 50.5 | 44.2 |
| (Sample II) | 3 | 10.9 | 30.8 | 61.1 |
| | 5 | 11.8 | 28.7 | 45.0 |
| "Ohn-Kyeong-Tang" | 2 | 14.7 | 46.3 | 41.9 |
| (Sample III) | 3 | 9.8 | 34.6 | 60.3 |
| | 5 | 7.9 | 24.3 | 46.4 |
| "Ke-ji-Bok-Ryeong-Iwan-Ka-Dae-Ihwang" | 2 | 14.8 | 60.3 | 32.8 |
| (Sample IV) | 3 | 8.8 | 33.3 | 51.4 |
| | 5 | 9.2 | 25.1 | 43.8 |

a) As for control, five normal mice were used.

b) PEC count was determined using a hemacytometer.

c) PMN was counted after the cytocentrifugate was stained with Giemsa stain.

d) Macrophages were identified after NSE Staining.

%로 증가되었다. 瀉經湯(시료 III)은 복강세포 총수는 14.7 × 10⁷개, macrophage의 비율은 60.3 %로 증가시켰다. 한편 桂枝茯苓丸加大黃(시료 IV)는 복강세포총수를 14.8 × 10⁷개로 증가시켰으며 macrophage의 비율을 51.4%로 증가시켰다.

이와 같이 이들 시료가 복강 세포수와 마크로페이지를 각각 증가시켰음은 생쥐의 비특이적

Table II. Effects of four samples on hemolytic plaque-forming cells (PFC's) in the spleen of ICR mice immunized with sheep red blood cells (1 × 10⁷/mouse).

| | Body weight (g) | Spleen cell count(×10 ⁷) ^{a)} | PFC/10 ⁶ Spleen cells | PFC/Spleen (×10 ³) |
|------------|-----------------|--|----------------------------------|--------------------------------|
| Control | 24.9 | 17.7 ± 1.5 ^{b)} | 5.5 ± 4.3 | 1.0 ± 0.7 |
| Sample I | 24.1 | 18.1 ± 2.7 | 156.9 ± 27.2 | 28.9 ± 10.3 |
| Sample II | 25.2 | 26.2 ± 3.9 | 154.2 ± 39.0 | 45.2 ± 21.2 |
| Sample III | 25.2 | 26.7 ± 5.5 | 237.7 ± 36.5 | 54.5 ± 5.6 |
| Sample IV | 24.6 | 17.0 ± 2.7 | 270.0 ± 26.2 | 44.8 ± 7.8 |

a: The cells were counted after removal of SRBC by hemolysis with 0.83% NH₄Cl.

b: Meas ± S. E.

면역을 강화시켰다고 볼 수 있으며, 더 나아가서 종양(腫瘍)에 대한 저항성도 아울러 증가시켰다고 풀이되므로, 생쥐에 침입하는 각종 병원균은 물론 체내에 생긴 비정상적 세포를 제거하는 능력을 높혀 주었다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 Saito¹⁵⁾ 및 Mashiba,¹⁶⁾ Weinberg,¹⁷⁾ 및 Kurashige¹⁸⁾ 등의 연구 보고와 유사한 결과를 보여 주고 있다. 따라서 세포성 면역의 증강 효과가 있음을 알 수 있었다.

2. 용혈반 형성 세포수에 미치는 효과

생쥐에 補中益氣湯(시료 I), 理中湯(시료 II), 溫經湯(시료 III) 및 柱枝茯苓丸加大黃(시료 IV)을 투여한 후, 그 비장내의 세포중에서 용혈반을 형성하는 세포수를 측정한다 이들 시료는 비장의 용혈반 형성 세포를 현저히 증가시켰다. 즉 백만개의 세포중 시료 I은 157개로, 시료 II는 154개로, 시료 III은 238개로, 그리고 시료 IV는 270개로 그 용혈반 형성세포를 증가시켰다 (Table II). 이러한 수치들은 대조군의 5.5보다 28~49배로 증가된 값이다. 한편 비장 전체 중의 용혈반 형성 세포수도 현저히 증가되어, 시료 I 투여군은 28.9×10^3 개, 시료 II 투여군은 45.2×10^3 개, 시료 III 투여군은 54.5×10^3 개, 시료 IV 투여군은 44.8×10^3 개였으며, 이러한 값들은 대조군의 1.0×10^3 개와 비교할 때 28~54배로 증가된 값이다. 그러나 이 시료들은 실험동물의 체중과 비장세포수에는 큰 영향을 미치지 않은 점으로 보아, 이들 시료들이 단순한 체세포의 수를 증가시킨 것이 아니라 면역을 담당하는 세포만을 선별적으로 증강시켰음을 알 수 있었다. 바꿔 말하면, 용혈반 형성 세포는 항체를 생성하는 세포수와 정비례하므로, 마우스의 체액성 면역(體液性 免疫)을 선택적으로 증강시켰음을 증명할 것이다. 그러므로 이들 한약 복합처방의 외부에서 침입하는 항원에 대항하여 유도되는 특이적 면역 반응을 강화시킬 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 Ohno¹⁹⁾, 沈²⁰⁾, 및 저자들의 연구결과²¹⁾와 거의 일치되는 현상이었다.

그러나 이들 한약제제가 어떤 기전에 의하여 체액성 면역과 세포성 면역을 동시에 증가시키는지에 대하여는 앞으로 더 연구할 가치가 있다

고 생각된다. 또한 이들 처방중의 특정한 단일 생약이 이러한 면역 강화작용을 일으키는지 혹은 복합 제제로서만 그러한 작용이 나타나는지도 검토해 볼 필요가 있다고 본다.²²⁾

감사의 말씀 : 이 연구에 소요된 경비의 일부는 文敎部 學術研究 助成費와 서울大學校 藥學大學 附設 綜合藥學研究所의 研究費로 충당되었으며 이에 대하여 깊이 감사하는 바입니다. 이 연구에 격려와 도움을 주신 國立保健院 微生物部 趙敏基 博士에게도 감사드리는 바입니다.

〈1983년 9월 19일 접수〉

참 고 문 헌

1. 洪南斗, 金鍾禹, 宋一炳, 金南宰 : 생약학회지, **12**, 136 (1981).
2. 洪南斗, 金鍾禹, 宋一炳, 金南宰 : 생약학회지, **12**, 190 (1981).
3. 洪南斗, 金鍾禹, 鄭在赫, 崔乘基 : 생약학회지, **12**, 195 (1981).
4. 洪南斗, 金鍾禹, 杜鎬京, 金南宰 : 생약학회지, **13**, 20 (1982).
5. 洪南斗, 金鍾禹, 杜鎬京, 金南宰 : 생약학회지, **13**, 26 (1982).
6. 洪南斗, 金鍾禹, 金秉雲, 孫楨坤 : 생약학회지, **13**, 33 (1982).
7. 洪南斗, 金鍾禹, 金秉雲, 孫楨坤 : 생약학회지, **13**, 70 (1982).
8. 洪南斗, 金鍾禹, 丁奎萬, 金南宰 : 생약학회지, **13**, 79 (1982).
9. 洪南斗, 金鍾禹, 丁奎萬, 金南宰, 생약학회지, **13**, 87 (1982).
10. 洪南斗, 金鍾禹, 李珩九, 金南宰, 金圭燮, 생약학회지, **13**, 122 (1981).
11. 洪南斗, 金鍾禹, 李珩九, 金南宰, 생약학회지, **13**, 157 (1982).
12. 李炯煥, 諸葛承柱 : 한국미생물학회지, **21**, 15 (1983).
13. A. Cunningham: *Prog. Allergy*, **17**, 5 (1973).
14. N.K. Jerne, C. Henry, A.A. Nordin, H. Fuji, A.M.C. Kares, and I. Lefkovitz: *Transplant. Rev.*, **18**, 130 (1974).

15. H. Saito, and H. Tomioka: *Gann*, **70**, 671 (1979).
16. H. Mashiba, K. Matsunaga, and M. Gojobori: *Gann*, **70**, 687 (1979).
17. J.B. Weinbery: *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 529 (1981).
18. S. Kurashige, and S. Mitsuhashi: *Gann*, **73**, 85 (1982).
19. R. Ohno, S. Yokomaku, K. Wakayama, S. Sugiura, K. Imai and K. Yamada: *Gann*, **67**, 97 (1976).
20. M.J. Shim: *Kor. J. Mycol.* **9**, 49 (1981).
21. C.Y. Kang, C.O. Lee, K.S. Chung, E.C. Choi, and B.K. Kim: *Arch. Pharm. Res.* **5**, 39 (1982).
22. 趙弼衡: 藥局의 漢方, 大韓科學漢方藥研究會, 서울, p-293, (1982).