

감초가 면역반응에 미치는 영향(II)

— Glycyrrhizin 및 Glycyrrhetic acid의 면역조절작용 —

한중현 · 오찬호* · 은재순**

원광대학교 한의과대학, *전주우석대학 생물공학과, **전주우석대학 약학과

(Received March 22, 1991)

Effect of Glycyrrhizae Radix on the Immune Responses(II) — Immuno-regulatory Action of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid —

Jong-Hyun Han, Chan-Ho Oh* and Jae-Soon Eun**

College of Oriental Medicine, Won-Kwang University, Iri 570-749, Korea

*Dept. of Biotechnology, Chonju Woo-Suk University, Chonju 565-800, Korea

**Dept. of Pharmacy, Chonju Woo-Suk University, Chonju 565-800, Korea

Abstract—These experiments were conducted to investigate the effects of glycyrrhizin(GL) and glycyrrhetic acid(GA) on histamine synthesis, lymphocyte blastogenesis in C57BL/6J mice splenocytes, IL-1 production, Ca^{2+} uptake by macrophage-like P388D₁ cells and plaque forming cell assay against SRBC. Histamine contents, lymphocyte blastogenesis, IL-1 activity, Ca^{2+} uptake and plaque forming cell were determined by enzyme isotope method, [³H]-thymidine incorporation, C3H/HeJ mouse thymocytes proliferation, the addition of 5 μ Ci/ml ⁴⁵Ca²⁺ to P388D₁ cell suspension and assay to sheep red blood cell, respectively. Cytotoxicity, which was expressed as 50% mortality, was occurred by the addition of GL(10^{-3} M) and GA(10^{-4} M). Histamine production in mouse spleen cell culture was significantly increased by the addition of 0.25 μ g/ml of Con A, after 48 hour incubation. Con A dependent T-lymphocyte proliferation was also enhanced by the addition of 0.25 μ g/ml of Con A. The effects of GL on histamine contents and T-lymphocyte proliferation were significantly decreased at high dose (10^{-5} M), while IL-1 activity was remarkably suppressed by 10^{-8} ~ 10^{-4} M of GL. Ca^{2+} uptake was not changed, but antibody production was increased by GL(10 mg/kg). GA inhibited histamine contents at 10^{-9} ~ 10^{-7} M and depressed Con A (0.25 μ g/ml) dependent T-lymphocyte proliferation at 10^{-7} ~ 10^{-5} M of GA, but increased suboptimal dose (Con A 0.1 μ g/ml) at 10^{-9} ~ 10^{-7} M of GA. IL-1 activity was suppressed by 10^{-8} ~ 10^{-4} M of GA and Ca^{2+} uptake was enhanced by 10^{-9} ~ 10^{-6} of GA, but antibody production was not changed by GA. From the above results, it is suggested that GL and GA have immuno-regulatory action. GL decreased cell-mediated immune response, and increased humoral immune response at high dose. On the other hand, low dose of GA enhanced cell-mediated immune response, while high doses of GA decreased humoral immune reaction.

Keywords □ Glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, immuno-regulatory action, concanavalin A, interleukin-1, histamine, Ca^{2+} uptake, IgM, IgG

甘草(Glycyrrhizae Radix)의 주성분은 glycyrrhizin (GL)으로 알려져 있으며, 가수분해되어 glycyrrhetic acid(GA)와 2분자의 glucuronic acid로 된다.¹⁾ GL은 cortisone의 thymolytic action을 차단하여 cortisone의 면역억제 작용을 상승시키며,²⁾ thymus atro-

phy를 일으키지 않으나, GA는 thymus atrophy를 일으키고,³⁾ GL과 GA를 고용량 장기간 투여하면 mineral corticoide-like 작용이 있어 부종 및 고혈압이 야기된다고 알려져 있다.⁴⁾ GL의 복합체인 stronger neo-minophagen C는 만성간염에 효과가 있는데,⁵⁻⁷⁾

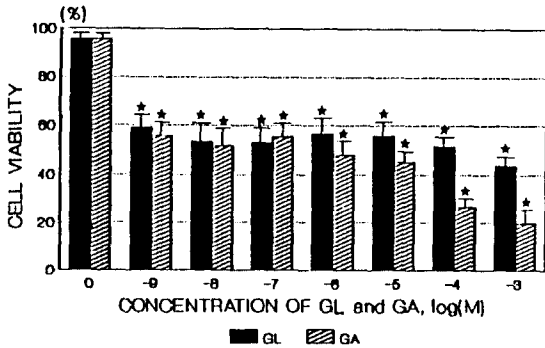


Fig. 1—Effect of glycyrrhizin(GL) and glycyrrhetic acid(GA) on the cell viability in cultured mouse spleen cells. Spleen cells obtained from 2 to 3 month-old C57BL/6 mice of both sexes were cultured in flat-bottomed microtiter plates in RPMI 1640 containing 5% fetal calf serum. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ incubator. After 48 hr. of incubation, cell viability was determined by trypan blue dye staining. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from RPMI 1640 medium-treated control group

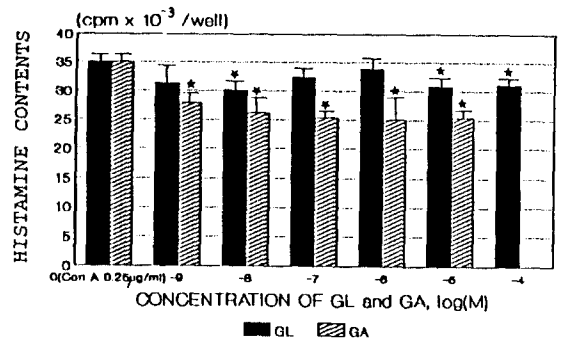


Fig. 2—Effect of GL and GA on histamine production in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells, 5×10⁵ cells/well were cultured in 24 well culture dish with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.25 μg/ml) was added with varying doses of GL and GA at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% O₂-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, histamine contents were determined by enzymatic-isotopic assay. Each point vertical bar represents the mean± S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from Con A-treated control group

이는 interferon system과 관련이 있다고 하였으며,⁸⁾ GA는 tumor promotor인 TPA 및 teleocidin에 의한 tumor에 억제작용이 있다고 보고되었다.^{9,10)} 한편 Kiso 등¹¹⁾은 간세포 초대 배양계에서 GL 및 GA가 고농도에서 GPT치를 감소시키나, GA는 고농도에서 세포독성을 나타내며, Abe 등¹²⁾은 GL 및 GA가 B16 melanoma cell의 성장을 GA가 GL보다 20배 정도 강하게 억제하며, 세포막에 대한 효과는 GL보다 GA가 더 강하다고 하였다. 이에 저자는 GL 및 GA의 다양한 약리작용의 차이점을 면역학적 측면에서 비교하여 보았으며, 전보(I)에서 보고한 감초의 면역조절능이 어떠한 성분에 기인된 것인가를 검토하고자 GL 및 GA에 대한 세포성 및 체액성면역에 대한 실험을 통하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

검역조제—시료로 사용한 glycyrrhizin은 Tokyo

kasei社(Japan), glycyrrhetic acid는 Wako社(Japan)의 제품을 구입하여 필요에 따라 인산완충액으로 희석하여 사용하였다. 그 외는 전보(I)에서와 동일한 방법으로 행하였다.

결 과

비장세포 생존률에 미치는 효과—Fig. 1은 비장세포 배양계에 GL과 GA를 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 cell viability를 검토한 것이다. GL은 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ 및 10⁻³M 농도에서 세포생존률은 각각 59.2±6.4, 53.5±5.7, 53.4±6.1, 56.9±6.2, 56.1±6.4, 51.7±5.5 및 43.9±5.9%를, GA는 같은 농도에서 각각 55.9±5.1, 51.9±6.6, 55.6±5.3, 48.3±6.3, 45.3±5.5, 26.6±4.5 및 19.7±5.5%의 생존률을 나타냈다. 이상의 결과에서 비장세포 배양계에 미치는 영향은 GL은 10⁻³M에서, GA는 10⁻⁴M 이상에서 세포생존률이 50% 이하로 현저히 억제되었으며, 이는 고농도에서 세포독성을 나타내고 있는 것으로 추정된다. 따라서 본 실험에서는 GL은 10⁻⁹~10⁻⁴M,

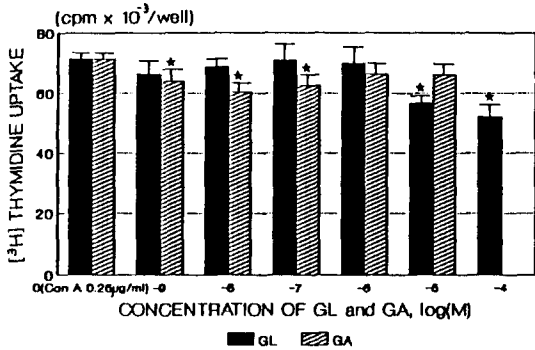


Fig. 3—Effect of GL and GA on the histamine dose of Con A (0.25 μg/ml)-dependent lymphocyte blastogenesis in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells, 5×10⁵ cells, were cultured in flat-bottomed microtiter plates with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.25 μg/ml) was added with varying doses of GL and GA at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% air-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, 10 μl of [6.³H] thymidine (0.5 μCi) was added for overnight pulsing. The cells were harvested on a cell harvester and cell-associated radio activity was counted in a liquid scintillation counter. Each point with vertical bar represents the mean±S.E. of three assays. ★ : (P<0.05); Significantly different from Con A-treated control group

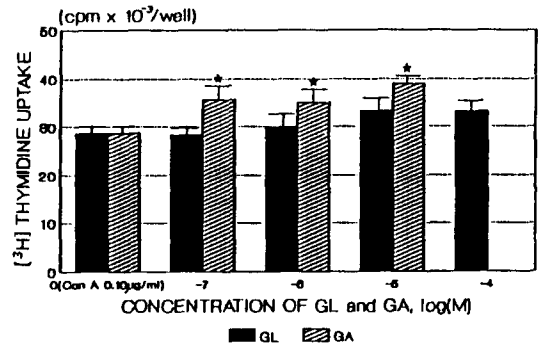


Fig. 4—Effect of GL and GA on the suboptimum dose of Con A (0.10 μg/ml)-dependent lymphocyte blastogenesis in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells were cultured in flat-bottomed microtiter plates with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.10 μg/ml) was added with varying doses of GL and GA at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% air-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, 10 μl of [6.³H] thymidine (0.5 μCi) was added for overnight pulsing. The cells were harvested on a cell harvester and cell-associated radio activity was counted in a liquid scintillation counter. Each point with vertical bar represents the mean ±S.E. of three assays. ★ : (P<0.05); Significantly different from Con A-treated control group

GA는 10⁻⁹~10⁻⁵ M의 농도에서 실험을 수행하였다.

비장세포의 histamine 생성에 미치는 효과—Fig. 2는 histamine 생성에 미치는 GL 및 GA의 영향을 검토한 것 성적이다. 비장세포 배양액에 Con A 0.25 μg/ml를 첨가하였을 때 histamine량은 35.0±1.0 (cpm×10⁻³/well)이었으며, GL 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ M 각 농도에 의한 histamine량은 각각 31.3±2.5, 30.1±1.5, 32.4±1.0, 33.9±1.9, 30.8±1.0 및 31.1±2.0(cpm×10⁻³/well)이었고, GA 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵ M의 각 농도에 의한 histamine량은 각각 27.9, 1.2, 26.2±1.8, 25.3±1.0, 25.1±2.7 및 25.3±1.0(cpm×10⁻³/well)이었다. 이상의 결과는 GL 및 GA가 비장세포 배양액의 histamine 생성을 억제하였는데 이는 T세포 및 macrophage의 활성을 억제하여 면역억제 작용을 나타내고 있음을 시사하며, GL 보다는 GA의 억제효과가 더욱 현저하

였다.

임파구 증식반응에 미치는 효과—Fig. 3은 임파구 증식반응에 미치는 GL 및 GA의 효과를 나타낸 것으로, 비장세포 배양액에 Con A 0.25 μg/ml를 첨가하였을 때 [3H]-thymidine uptake는 71.4±1.3(cpm×10⁻³/well)이었으며, GL 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ M과 GA는 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵ M의 각각의 농도에서 [3H]-thymidine uptake가 GL에서 66.4±3.2, 68.8±2.7, 70.8±4.0, 70.0±3.0, 56.6±1.4 및 52.1±2.8(cpm×10⁻³/well), GA는 64.0±3.4, 60.3±2.8, 62.4±3.1, 66.4±4.9 및 66.0±4.5 (cpm×10⁻³/well)로, GL은 10⁻⁵ M 이상의 농도에서, GA는 10⁻⁹~10⁻⁷ M의 농도에서 임파구 증식반응이 유의성 있게 억제되었는데, 이는 감초에 의한 면역억제가 주로 GL에 의해 야기됨을 시사한다. 또한 Con A 0.1 μg/ml를 첨가하였을 때 [3H]-thymidine up-

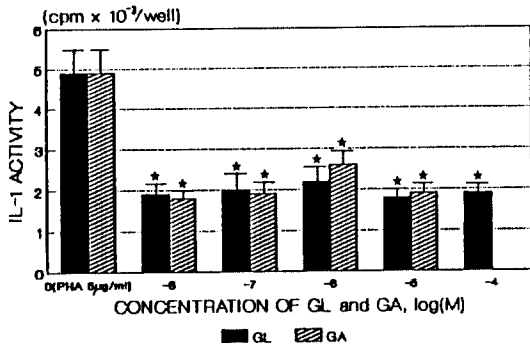


Fig. 5—Effect of GL and GA on interleukin-1 production in macrophage-like P388D₁ cells. P388D₁ murine macrophage cell line, 2.5×10⁵ cells/ml/well were cultured in a φ 35 mm culture dish with 5% FCS-RPMI 1640. Various dose of GL and GA were added to culture plate. The plate was incubated at 37°C CO₂ incubator. After 24 hr. of incubation, cell-free supernatant was used by IL-1 sample. IL-1 activity assayed for stimulation of C3H/HeJ mouse thymocyte proliferation. Each point with vertical bar represents the mean±S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from PHA-treated control group

take는 28.7±1.3(cpm×10⁻³/well)이었고, GL은 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴M 농도에서 각각 28.3±1.3, 29.9±2.4, 33.4±1.8 및 33.0±1.0(cpm×10⁻³/well)을, GA는 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵M 농도에서 각각 35.7±2.9, 35.0±2.1 및 38.9±1.5(cpm×10⁻³/well)로 유의하게 면역반응을 증가시켰다(Fig. 4). 이러한 결과는 Con A 의존성 T 임파구 증식반응을 검토한 면역조절작용에 있어서 GL은 고농도에서 면역억제작용이 있었으나 GA는 오히려 저농도에서 억제작용을 나타내었다. 따라서 감초는 T세포에 의한 세포성 면역능력을 그 주성분인 GL에 의해서 억제시키고 있는 것으로 추정된다. 또한 Con A 농도를 낮춘 상태에서는 GL은 면역반응에 별다른 영향이 없었으나 GA에서는 면역반응이 유의성 있게 증가되었다는 사실은 이들 약물 중 면역조절기능 항진에는 GA가 관여함을 시사하는 것이며 추후 검토되어야 할 것이다.

IL-1 활성에 미치는 효과—Fig. 5는 macrophage-like cell line인 P388D₁ 세포에서 생성되는 IL-1 활성에 미치는 GL 및 GA의 영향을 검토한 것이다. P388

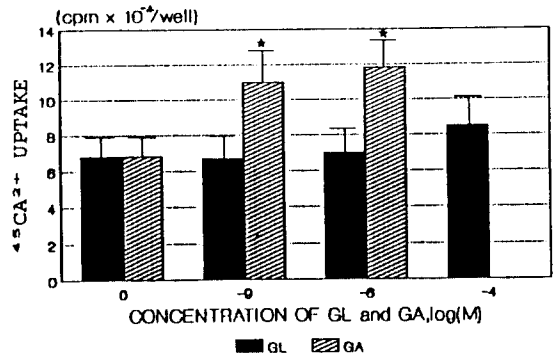


Fig. 6—Effect of GL and GA on ⁴⁵Ca²⁺ uptake to a P388D₁ cells. Net ⁴⁵Ca²⁺ uptake by P388D₁ cells (1×10⁶ cells/well) was determined by the addition of 5 μCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ to a cell suspension. At confluency, the adherent cells were harvested in modified Gey's buffer solution at 4°C. Cells were kept at 4°C until used. ⁴⁵Ca²⁺ efflux was measured by rapidly warming the cells to 37°C, the addition of sample or MGB only. Each point with vertical bar represents the mean±S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from MGB-treated control group

D₁으로부터의 IL-1 활성은 대조군(PHA 5g/ml)에서 4.9±0.6(cpm×10⁻³/well)이었고, GL 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴M 농도에 의한 IL-1 활성은 각각 1.9±0.2, 2.0±0.3, 2.2±0.3, 1.8±0.2 및 1.9±0.2 (cpm×10⁻³/well)이었고, GA 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵M 농도에 의한 IL-1 활성은 각각 1.8±0.2, 1.9±0.3, 2.6±0.3 및 1.9±0.2(cpm×10⁻³/well)이었다. GL 및 GA의 전농도에서 IL-1 활성이 유의성 있게 억제되었다. 즉 GL 및 GA가 전반적으로 macrophage에서 생성되는 IL-1을 억제하여 면역억제 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Ca²⁺ uptake에 미치는 효과—P388D₁ 세포로 유입되는 Ca²⁺ uptake는 6.8±0.4(cpm×10⁻⁴/well)이었으며 GL 10⁻⁹, 10⁻⁶ 및 10⁻⁴M 농도에 의한 Ca²⁺ uptake는 6.7±0.4, 7.0±0.5 및 8.5±1.8(cpm×10⁻⁴/well)이었고, GA 10⁻⁹ 및 10⁻⁶M 농도에 의한 Ca²⁺ uptake는 11.0±0.9 및 11.8±1.3(cpm×10⁻⁴/well)이었고, GA에서 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6). 이 결과에서 특히 GA가 Ca²⁺ uptake를 증가시키는 작용이 있음이 확인되었으나 이것이 macrophage로부

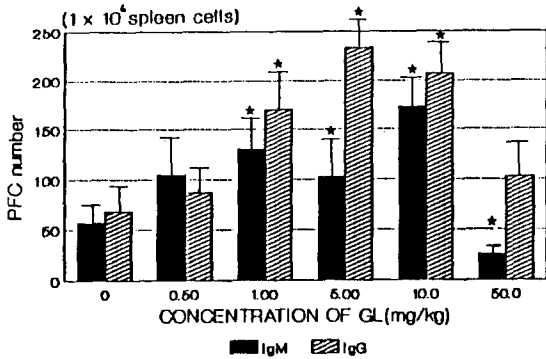


Fig. 7—Effect of GL on direct or indirect hemolytic plaque assay. Mice were injected i.p. with 2.0×10^8 cells/0.2 ml of SRBC and injected i.p. with GL of 0.5~50 mg/kg/day for 4 days. After 5 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FCS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay. Value are mean \pm S.E. of 3 mice.

★ : ($P < 0.05$); Significantly different from saline-treated control group

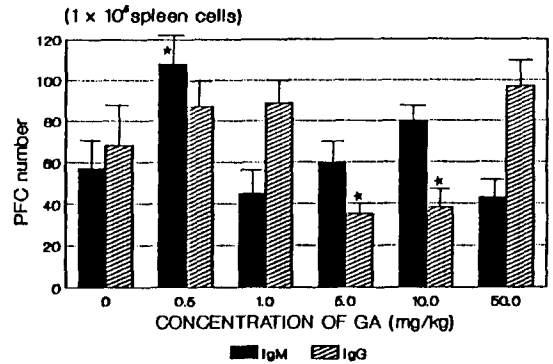


Fig. 8—Effect of GA on direct or indirect hemolytic plaque assay. Mice were injected i.p. with 2.0×10^8 cells/0.2 ml of SRBC and injected i.p. with GA of 0.5~50 mg/kg/day for 4 days. After 5 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FCS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay. Values are mean \pm S.E. of 3 mice.

★ : ($P < 0.05$); Significantly different from saline-treated control group

터의 IL-1 생성과 직접적으로 연관성이 있는지는 추후 더 검토를 행하여야 할 것으로 생각된다. 특히 낮은 농도의 GA에서 T세포의 활성화가 일어난 것은 Ca^{2+} uptake 촉진과 관계가 있으며 macrophage에서 생성되는 IL-1에 의한 T세포의 활성화와는 직접적인 상관관계가 없는 것이라 추정되며, c-AMP 등과 같은 또다른 세포내 second messenger가 관계하는 것이 아닌가 사료된다.

용혈반형성세포에 미치는 효과—본 실험은 GL 및 GA 등의 약물이 항체생성 능력에 미치는 영향을 검토하기 위하여 용혈반형성세포 측정방법으로 IgM과 IgG를 동시에 측정하여 표시하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 IgM은 생리식염수만을 첨가한 대조군(1×10^6 비장세포)에서 57 ± 14 개에 비하여 GL 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 및 50.0 mg/kg을 투여하면 각각 105 ± 32 , 130 ± 23 , 103 ± 22 , 173 ± 37 및 26 ± 7 개로 특히 1.0, 5.0, 10.0 mg/kg을 투여한 군에서 유의한 증가를 보였으며, 50.0 mg/kg을 첨가하면 오히려 항체생성이 억제되었다. IgG는 대조군 68 ± 18 개에서 약물의 용량에 따라 각각 87 ± 15 , 170 ± 30 , 233 ± 31 , 207 ± 25

및 103 ± 15 개로 1.0~10.0 mg/kg 농도를 투여한 군에서 유의성 있게 증가되었다. GA 투여군의 IgM은 대조군 57 ± 14 개에 비하여 약물의 용량에 따라 각각 108 ± 25 , 45 ± 11 , 60 ± 8 , 80 ± 12 및 43 ± 9 개로 0.5 mg/kg 투여군에서만 유의한 증가를 나타냈으며, IgG는 대조군 68 ± 18 개에서 약물의 용량에 따라 87 ± 12 , 89 ± 11 , 35 ± 5 , 38 ± 7 및 97 ± 15 개로 5.0 및 10.0 mg/kg을 투여한 군에서 유의성 있게 억제되었다(Fig. 8). 이상의 결과를 요약하면 GL은 10.0 mg/kg 투여군에서 특히 유의하게 항체생성을 촉진시켰으며 GA는 IgM에서만 0.5 mg/kg의 낮은 농도에서 항체생성을 증가시켰다. 또한 GA는 5.0 및 10.0 mg/kg 투여군에서 IgG 항체생성을 억제시켰으며, GL은 50.0 mg/kg의 고농도에서 IgM 항체생성을 억제시켰으며 GL 10.0 mg/kg 투여군에서 항체생성을 증가시켰다는 사실은 결국 체액성 면역반응을 증강시키는 것이라 사료되며, GA는 대조군에 비해 차이가 없었고, 항체생성을 일부 저하시키고 있음은 체액성 면역반응을 억제시키는 것이라 추정된다.

고 찰

비장세포 배양계에서의 세포생존률에 있어서는 48 시간 배양시 특히 10^{-3} M의 GL, 10^{-4} M 이상의 GA에서 현저한 세포독성을 나타내었는데, 이는 Kiso 등¹¹⁾의 고농도 GA가 세포상해 작용을 나타낸다는 보고와 B16 Melanoma cell의 성장을 GL 및 GA가 억제하고 GA가 GL보다 20배 정도 강하며 특히 세포막에 대한 효과도 GL보다 GA가 강하였다는 Abe 등¹²⁾의 보고와 유사한 성적이다. Con A 0.25 μ g/ml를 첨가하였을 때 비장세포 배양계에서 생성되는 histamine량은 GL(10^{-9} ~ 10^{-4} M) 및 GA(10^{-9} ~ 10^{-5} M) 첨가시에 억제되었는데 GL 보다는 GA의 억제효과가 강하였다. 이와 같은 감초의 histamine 생성억제 작용은 감초의 항염 및 항알러지작용과 직접적으로 연관되는 것으로 이는 비만세포내의 c-AMP 농도를 상승시켜 감초엑스가 복강내 mast cell에서 histamine 유리를 억제한다고 한 Kato 등¹³⁾의 보고와 유사하며, 본 연구에서는 histamine 생성량의 억제만을 검토하였지만 GL 및 GA가 allergy 반응에 있어서, 그 외의 mediator로 알려진 serotonin, SRS-A 등¹⁴⁾도 억제하는지의 여부는 추후 더 검토해 보아야 할 것이다. histamine의 유리는 많은 요인에 의해 결정되어지기 때문에 이는 더욱 추구해야할 문제이다. 감초의 세포성면역 조절능력을 검토하기 위하여 Con A 0.25 μ g/ml를 첨가하였을 때 GL은 10^{-5} M 이상에서, GA는 10^{-9} ~ 10^{-7} M의 비교적 저농도에서 T 임파구의 증식반응이 유의성 있게 억제되었다. GL이 고농도에서, GA는 저농도에서 세포성 면역능을 저하시킨다는 결과는 GL이 thymus atrophy를 일으키지 않으나 GA는 thymus atrophy를 일으킨다는 Hiai 등³⁾의 보고와 차이가 있으나 이는 T 임파구의 기능을 검토한 실험방법의 차이에 의한 것이 아닌가 추정된다. 임파구 증식반응을 지표로 하는 실험방법 중에는 Con A 농도를 suboptimum으로 하여 별도의 면역조절 능력을 검토할 수 있는데, 저자는 Con A 농도를 0.1 μ g/ml로 하여 T 임파구 증식반응을 검토하였다. 그 결과 GA만이 T 임파구 증식반응을 유의성 있게 촉진하였으며, 이는 GA가 T세포의 활성화 정도에 따라서는 세포성 면역능을 증강시킬 수도 있음을 시사하는 것이다. 즉 감초의 주성분인 GL은 T세포에 의한 세포성 면역능력을 억제시키고, GA는 농도에 따라 면역조절 능력을

억제 또는 강화시킬 수 있음을 보여주는 성적으로 주목할만한 것이다. Macrophage에 의한 IL-1 활성화는 GL 및 GA 전농도에서 억제되었는데, 이 결과는 전술의 T세포에 의한 세포성 면역능 억제효과와 관련 있는 것으로 사료되며, macrophage로부터의 IL-1 생성을 억제하여 결과적으로 T세포의 기능이 억제된 것이라 추정되나 좀 더 연구되어야 할 점이다. 또한 macrophage의 활성화 경로에는 세포외로부터 세포내로의 Ca^{2+} 유입량이 증가됨이 알려져 있는데,¹⁵⁾ 본 연구에서는 GL은 Ca^{2+} 유입량에 큰 영향은 미치지 않은 반면에, GA는 Ca^{2+} 유입량을 유의하게 상승시켰다. 이는 특히 낮은 농도의 GA가 T세포를 활성화 시킨 것과 관련이 있는 것이라 생각되나 macrophage에 의한 IL-1 유도에 직접적으로 관계있는 것인지, 또는 그 외의 second messenger로 작용하는 c-AMP와 같은 nucleotide에 대한 작용인지는 더욱 추구해야할 문제이다. 항체생성능력을 검토하기 위하여 직접 및 간접 용혈반형성 측정을 수행한 결과 GL (10 mg/kg)은 비교적 고농도에서 IgM 및 IgG 생성을 증가시켰고, GA는 거의 영향을 미치지 않거나 오히려 항체생성을 억제하는 경향을 나타냈는데 이는 자가면역질환의 하나인 만성류마티스성관절염에 있어서 변성 IgG에 대한 항체로서의 류마티스인자의 보체결합 능력을 억제하는 것과 관련이 있지 않나 생각되며 본 결과는 GL이 특히 체액성 면역능력을 증강시키는 작용을 가지고 있는 것이 아닌가 추정된다. 이상의 결과에서 감초의 주성분인 GL은 T세포가 주도하는 세포성 면역반응을 고농도에서 억제시켰으며, B세포의 항체생성 능력을 10 mg/kg 이상의 고농도에서 증강시킨 반면에, GA는 세포성 면역반응을 농도의존적으로 증가시키나 체액성 면역반응은 오히려 억제하는 경향을 보여, 전반적으로 GL 및 GA의 면역조절능력은 농도에 따라 변화하고 있으며, 그 밖의 natural killer 세포의 활성화, T 및 B세포의 활성화 조절인자의 탐색 등과 이들 감초 주성분 이외의 물질과의 관계도 폭넓게 연구가 이루어져야 할 것이다.

그러나 GA가 GL의 가수분해 산물로서 같은 유도체가 이와 같이 상반된 현상, 즉 biphasic한 결과는 나타내는 것에 대하여는 현재 정확한 기전을 파악하기는 어렵지만 농도차이, 감수성의 차, 그리고 실험조건의 차이 등이 아닌가 추정되나, Hiai 등³⁾이 정반대의 현상이 있음을 보고한 것에 비교하여 볼 때

상당히 흥미있는 결과라고 추정되며, 아직까지 GL 및 GA의 면역에 있어서의 정확한 메커니즘이 알려져 있지 않아서 여러 각도로 광범위하게 연구 검토되어야 할 것이다.

결 론

감초의 주성분인 glycyrrhizin(GL) 및 그 가수분해 물질인 glycyrrhetic acid(GA)의 면역조절작용에 미치는 효과를 검토하기 위하여 C57BL/6 마우스 비장세포에서의 histamine 생성과 T세포의 증식반응, macrophage-like P388D₁ 세포로부터 interleukin-1 활성화와 Ca²⁺ uptake 측정 및 B세포로부터 항체(IgM, IgG) 생성능력을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 비장세포를 48시간 배양하였을 때의 세포생존률은 GL 10⁻³ M, GA 10⁻⁴ M 이상에서 50% 이상의 세포독성을 나타내었다.

2. GL 10⁻⁵ M 이상의 고농도는 비장세포 배양계에서 histamine 생성을 억제하였고, 동시에 Con A 0.25 µg/ml 첨가시의 T 임파구 증식반응도 유의성 있게 억제하였으며, GL은 전농도(10⁻⁸~10⁻⁴ M)에서 macrophage에서 생성되는 IL-1을 현저하게 억제하였다. 또한 GL은 macrophage로 유입되는 Ca²⁺ uptake에 영향을 미치지 못하였으며, 10.0 mg/kg 고농도의 GL은 항체생성을 촉진시켰다.

3. GA 10⁻⁹~10⁻⁵ M은 전농도에서 histamine 생성을 유의하게 억제하였고, GA 10⁻⁹~10⁻⁷ M의 저농도는 Con A 0.25 µg/ml 첨가시 T 임파구 증식반응을 억제시켰으며, Con A 0.1 µg/ml 첨가시의 T 임파구 증식반응은 오히려 증가시켰다. 또한 GA는 macrophage에서 생성되는 IL-1을 억제시켰으나 macrophage로 유입되는 Ca²⁺ uptake 양은 유의하게 촉진시켰으며, 항체생성에 대해서는 영향을 미치지 않거나 오히려 억제시키는 경향을 보였다.

감초의 주성분인 glycyrrhizin이 고농도에서 T세포가 주도하는 세포성 면역반응을 억제시키고, B세포에서의 항체생성 능력을 고농도에서 증강시킨다는 결과는 감초의 면역조절 작용이 주로 glycyrrhizin에 의함을 시사하는 것이며, glycyrrhetic acid가 세포성면역 반응을 일부 증강시키고, 체액성면역 반응을 억제한다는 결과는 glycyrrhizin과는 상반되는 작용이

있음을 의미하는 것이다.

감사의 말씀

본 실험을 수행하는데 협조하여 주신 일본 나고야 대학 생화학제어실 Nakano 박사에게 감사드립니다.

문 헌

- 1) Sotomatsu, S., Takaishi, Y., Hiroi, J., Namikata, A. and Okano, N.: Glycyrrhizin and skin. *Skin and Urology* **21**, 138(1955).
- 2) Kumagai, A., Nanaboshi, M., Asanuma, Y., Yagura, T., Nishino, K. and Yamamura, Y.: Effects of glycyrrhizin on thymolytic and immuno-suppressive action of cortisone. *Endocrinol. Japan* **14**, 39-42 (1967).
- 3) Hiai, S., Sasayama, Y. and Ogura, L.: Chronic effects of Ginseng saponin, Glycyrrhizin and flavin adenine-m-dinucleotide on adrenal and thymus weight in normal and dexamethasone treated rats. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 241(1987).
- 4) Shibata, S., Takahashi, K., Yano, S., Harada, M., Saito, H., Tamura, Y., Kamagai, A., Hirabayashi, K., Yamamoto, M. and Nagata, N.: Chemical modification of Glycyrrhetic acid in relation to the biological activities. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1910 (1987).
- 5) 熊谷 朗: "Glycyrrhizin의 作用에 對する 機序". *Minophagen Med. Rev.* **23**, 181(1978).
- 6) 淺沼 克次, 植村泰三, 藤井 隆: Glycyrrhizin의 生理. 藥理作用. *日生病院醫學雜誌*, **4**, 1(1976).
- 7) Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiya, M., Tanaka, T. and Minamoto, S.: AI-HU-TANG and GUI-ZHI-FU-LING-WAN, on the blood lipoproteins, apoproteins and prostanoids and on hepatic lipids in experimental hyperlipidemia. *和漢醫藥學會誌* **2**, 377(1985).
- 8) 林芳郎, 中田勝彦, 麻生久, 鈴木富士父, 石田名香雄: Glycyrrhizin製劑의 interferon 誘起作用. *藥理と治療* **25**, 386(1979).
- 9) Kitagawa, K., Nishino, H. and Iwashima, A.: Inhibition of the specific binding of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate to mouse epidermal membrane

- fractions by glycyrrhetic acid. *Oncology* **43**, 127 (1986).
- 10) Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizawa, H., Kunishi, S., Okamoto, H., Okabe, H., Shibata, S., Fujiki, H. and Sagimura, T.: Glycyrrhetic acid inhibits tumor promoting activity of teleocidin and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage mouse skin carcinogenesis. *JPN. J. Cancer Res. (GANN)* **77**, 33(1986).
 - 11) Kiso, Y., Kawakami, Y., Kikuchi, K. and Hikino, H.: Assay method for antihepatotoxic activity using complement mediated cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica* **53**, 241(1987).
 - 12) Abe, H., Ohya, N., Fujikawa, Y., Shibuga, T., Arichi, S. and Odashima, S.: Effects of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. cancer clinc. Oncol.* **23**, 1549(1987).
 - 13) Kato, M., Marumoto, M., Hayashi, M., Maeda, T. and Hayashi, E.: Pharmacological studies on Saiko-prescriptions. V. Mechanisms of actions of SHO-SAIKO-KO on swelling of rat hind paws induced by carrageenin. *Yakugaku Zasshi* **104**, 516(1984).
 - 14) Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.A.: *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd Ed., p.761, Blackwell Scientific Publications, Oxford(1975).
 - 15) Somers, S.D., Weifl, J.E. Hamilton, T.A. and Adams, D.O.: Phorbol esters and calcium ionophore can prime peritoneal macrophage for tumor cell destruction. *J. Immunol.* **136**, 4199(1986).