

# 女貞子が 大食細胞 貪食能에 미치는 影響

Effects of *Ligustrum Lucidum*  
on the Phagocytic Activity of Macrophages

李光 祐 · 宋 峰 根 · 金 炯 均 · 李 彦 政\*

## ABSTRACT

Kwang-Souk Lee, Bong-Keun Song, Hyeong-Kyun Kim, Eon-Jeong Lee  
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, Iksan, Korea

The effect of *Ligustrum Lucidum*(LL) on the production of nitric oxide (NO) and superoxide by murine peritoneal macrophages were investigated.

Stimulation of the cells with LL in the presence or absence of interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) resulted in the increased accumulation of nitrite in the medium. To further examine the mechanism of LL induced NO synthesis, we evaluated the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) by LL in murine macrophages. Treatment of LL increased the secretion of bioactive TNF- $\alpha$  in cultured medium. In addition, LL induced NO production was decreased by the treatment of anti-murine TNF- $\alpha$  neutralizing antibodies, indicating that LL induced superoxide production was decreased by the treatment of anti-murine TNF- $\alpha$  neutralizing antibodies. These data suggested that LL induced superoxide production was related to TNF- $\alpha$  secretion.

\* 圓光大學校 韓醫科大學 內科學教室

In conclusion, our results indicates that LL may enhance innate immune response and be applied as a immunoregulating drug improving phagocytosis.

Key Word : Ligustrum Lucidum, nitric oxide (NO), superoxide, interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), innate immune response

### I. 緒論

韓醫學에서의 질병의 발생과 發變過程 및 傳歸는 <素問 評熱病論><sup>1)</sup>에서 말한 “邪氣交爭”과 같이 본질적으로 邪正相爭의 과정으로 파악된다. 그러므로 질병의 과정은 正邪가 相爭하는 과정이며 이 과정 가운데 존재하는 正과 邪 사이의 力量對比와 消長盛衰變化는 疾病發展과 轉歸의 根本原因에 직접 영향을 미친다<sup>2)</sup>. 韓醫學에서 虛實에 대하여 <素問, 通評虛實論><sup>3)</sup>에서는 “邪氣盛則實 正氣奪則虛”라 하여 虛實을 곧 正氣와 邪氣間의 相爭의 형태로 보고 “扶正”과 “祛邪法”을 응용하였다.

蔡<sup>3)</sup>는 正氣虛弱을 疾病發生의 主因으로 인식하고 免疫機能 低下時는 扶正法을 주로 사용하고 免疫過敏疾患은 祛邪法을 주로 활용한다 하였다. 扶正은 益胃氣, 補元氣, 養血氣, 益肺, 健脾, 補腎등을 포괄하면서 인체의 면역을 촉진시킨다<sup>4)</sup> 하였으며, 戴<sup>5)</sup> 또한 대부분의 扶正은 면역을 촉진한다 하였다.

면역이란 病原微生物(pathogenic microbe)의 감염을 받은 個體가 그 微生物의 재감염에 抵抗性を 나타내는 데서 이름 붙여진 현상으로<sup>6)</sup>, 免疫反應의 모든 단계에 大食細胞가 관여한다.<sup>7)</sup> 大食細胞를 포함한 貪食細胞의 주된 역할은 외부에서 침입한 細菌과 같은 異物質이나 내부에서 발생한 癌細胞 혹은 老衰細胞를 貪食하여 세포 내부에서 사멸시켜 개체의 내부환경의 恒常性을 유지하는 일이다.<sup>8,9)</sup>

貪食細胞의 표면에 이물질이 부착되면 貪食細胞는 미생물을 사멸시키기 위하여 反應酸素中間物質(ROI)<sup>10)</sup>과 反應窒素中間物質(RNI)<sup>11)</sup>을 생성하며, ROI는 미생물체의 脂質成分을 酸化시켜 抗微生物

作用을 나타내게 된다. 또한 RNI는 L-arginine에 의존적으로 생성되며 癌細胞의 酵素活性의 억제, 미토콘드리아전자전달계 과정의 차단, DNA 합성 억제를 유발하여 大食細胞가 發癌, 抗癌, 抗微生物 작용을 갖게 한다<sup>11)</sup>.

그 동안 韓藥材가 大食細胞의 貪食能 및 ROI와 ROI에 미치는 영향에 관한 연구로 孫 등<sup>12)</sup>은 鹿茸이 飢餓 mouse의 細網內皮系 貪食能에 미치는 영향을, 權<sup>13)</sup>은 甘草와 雷公藤合劑 煎湯液이 mouse의 免疫抑制에 미치는 영향을, 崔<sup>14)</sup>는 貪食細胞의 貪食能 및 貪食細胞의 ROI 생성능과 NK세포의 활성화도 및 Rosette 형성세포에 미치는 영향을 보고하였으며, 陳<sup>15)</sup>은 黃耆의 투여가 生體 및 試驗管내에서 免疫細胞의 기능에 미치는 영향을, 李<sup>16)</sup>는 補骨脂가 貪食細胞의 貪食能 및 貪食細胞의 ROI 생성능에 미치는 영향을 보고하였다. 또한 韓<sup>17)</sup>은 小柴胡湯煎湯液이 貪食細胞의 貪食能을 향상시켰고 ROI의 생성능을 증가시켰으나 ROI의 생성능은 감소시켰다고 보고하였다.

女貞子는 木犀(물푸레나무; Oleaceae)에 속한 常綠小喬木인 광나무 (Ligustrum Japonicum Thunberg)의 과실 또는 同科의 當歸나무 (Ligustrum Lucidum Aiton)의 과실을 건조한 것으로, 性은 溫平無毒하고 味는 苦甘하며 滋陰, 補肝腎, 明目, 安五臟등의 작용이 있다<sup>18-22)</sup>.

최근에는 女貞子 煎湯液을 투여한 바 白血球 증가의 효과가 있었으며 淋巴細胞와 母細胞 轉化作用과 體液性 및 細胞性 免疫作用을 증강시켜 免疫機能의 조절에 효과가 있었다는 보고<sup>4,5)</sup>가 있으며, 또한 女貞子는 滋陰, 補肝腎, 安五臟, 養精神, 諸百疾의 主

治<sup>18-22</sup>를 가지고 있으며 扶正의 效能이 있어 免疫機能의 增強에 影響이 있을 것으로 思料된다.

이에 저자는 女貞子를 사용하여 大食細胞에 ROI 生成能 과 RNI 生成能을 측정하여 免疫反應에 미치는 효과를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗 材料

#### 1) 動物

8-10주 사이의 Balb/C 생쥐 (山光大學校 韓醫科大學 實驗動物飼育室)로 cage(18×20cm)당 6個體의 밀도를 유지하였으며, 2주빌간 실온에서 물과 사료(제일사료주식회사)를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 사육한 다음 본 실험에 사용하였다.

#### 2) 藥 材

본 실험에서 사용한 약재는 山光大學校 韓醫科大學 全州韓方病院에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

### 2. 方法

#### 1) 檢液의 調製

女貞子 10g을 粉碎하여 100ml round flask에 넣고 증류수 100ml를 가하여 56℃로 1시간 동안 重湯하여 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 上清液을 濾過布로 여과하여 사용하였다.

#### 2) 檢液

정상 마우스의 大食細胞를 분리한 후 女貞子를 濃度別로 희석하여 가분리된 大食細胞에 처리한 후 각각 6, 48시간 배양하여 실험에 이용하였다.

#### 3) 大食細胞의 分離 및 培養

생후 7-10주된 생쥐의 腹腔을 10ml Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 씻어낸 다음 세포를 모은 후 5% FCS가 포함된 DMEM으로 2시

간 배양시킨 다음 血清이 포함되지 않은 培養液으로 浮遊細胞를 두 번 씻어낸 후 부착된 세포를  $1 \times 10^6$  cell/well로 適定하여 10% FCS가 포함된 DMEM에서 배양하면서 실험 목적에 따라 사용하였다.

#### 4) 大食細胞의 反應素中間物質 (Reactive Nitrogen Intermediate;RNI) 生成能의 測定.

反應素中間物質(RNI)은 大食細胞 특히 생쥐의 腹腔內 大食細胞에서  $\gamma$ -IFN (Boehringer Mannheim, Germany)이나 LPS (Sigma, U.S.A.)또는 다른 미생물의 감염에 자극받아 L-arginine에 의존적으로 생성되며 이들이 特異的 또는 非特異的 免疫反應에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다.

RNI는  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ , NO 등이 있는데 이들은 細胞培養液에 축적되기 때문에 축적된 RNI를 發色시켜 ELISA reader로 측정하였다.

약물을 투여한 생쥐의 腹腔大食細胞를 분리한 후 96 well plate에 well당  $1 \times 10^5$  cell/well개로 넣어주었다.  $\gamma$ -IFN이나 LPS, 또는 RNI생성 저해제, 女貞子를 各各의 濃度에 따라 培養細胞에 첨가하고 48시간 동안 배양 한 후에 각 well로부터 100 $\mu$ l씩의 培養液을 취하여 ELISA TiterTek plate에 옮긴 후 同量의 Griss Reagent (1:1, v/v, N-1-naphthylethylendiamine 0.1% in H<sub>2</sub>O, sulfanilamide 1% in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 첨가하고 10분간 실온에 두었다.

전체 RNI는 TiterTek Multiscan MCC/340 (Flow Lab)으로 540nm에서 吸光度를 측정하였다. 이 때 RNI 농도에 대한 標準曲線은 NaNO<sub>2</sub>를 連續 稀釋하여 얻었다.

#### 5) TNF- $\alpha$ 사이토카인의 定量 (ELISA)

女貞子를 各各의 濃度에 따라 培養細胞에 첨가하고 48시간동안 배양한 후에 각 well로부터 100 $\mu$ l씩 培養液을 취하여 목적에 맞게 사용하였다.

TNF- $\alpha$ 에 대한 특히 단클론 抗體를 먼저 ELISA

plate에 붙힌 다음 각 well당 sample을 넣고 약 1-2시간 반응시킨 후, 2차 抗體를 첨가시켰다. 이후 alkaline-phosphatase가 conjugation된 抗體를 넣은 후 pNPP로 발색반응을 한 다음 약 1시간 후 405 nm filter에서 흡광도를 측정하였다.

6) 大食細胞의 反應酸素中間物質(Reactive Oxygen Intermediates;ROI) 生成能의 測定

培養細胞에 액을 各各의 濃度로 처리하여 6시간 培養하여 세포를 harvest한 다음 차가운 PBS로 400g에서 10분간 遠心分離하여 2회 세척 하였으며 Veronal buffered saline을 이용하여  $5 \times 10^6$  cells/300 $\mu$ l로 적정된 PEC 單細胞 浮遊液을 Luminometer(LB 9509, Berthold)內에서 37 $^{\circ}$ C로 15-30分 동안 preincubation 시켰다. 여기에 O<sub>2</sub>를 측정할 수 있는 chemiluminogenic probe인 10mM의 lucigenin 10을 注入하고 安靜化 시킨후 大食細胞를 자극시킬 수 있는 5.3 $\mu$ M phorbol myristate acetate (PMA)10 $\mu$ l를 주입한 다음 37 $^{\circ}$ C 조건에서 約 60분 간 CL을 측정하였다.

III. 實驗成績

1. 大食細胞의 反應質素中間物質(RNI)生成能에 미치는 影響

生體外에서 大食細胞에 미치는 女貞子의 影響을 알아보기 위하여 정상 생쥐로부터 腹腔 大食細胞를 분리한 후 濃度 依存的으로 세포에 직접 처리하여 48시간 培養한 후 세포를 收獲하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다. IFN- $\gamma$ 를 前處理 한 세포와 하지 않은 세포 각각에 女貞子를 처리하여 RNI 값을 측정한 결과 對照群에 비하여 女貞子를 처리한 세포에서 RNI값이 현저히 증가 하였다(Fig 1a). 또한 IFN- $\gamma$ 를 前處理한 후 女貞子를 농도의존적으로 처리하여 RNI를 측정하였을 때 농도의존적으로 RNI가 증가하는 경향을 보였으며 특히 농도가 0.8mg/ml일때 최고치에 달하였다(Fig 1).

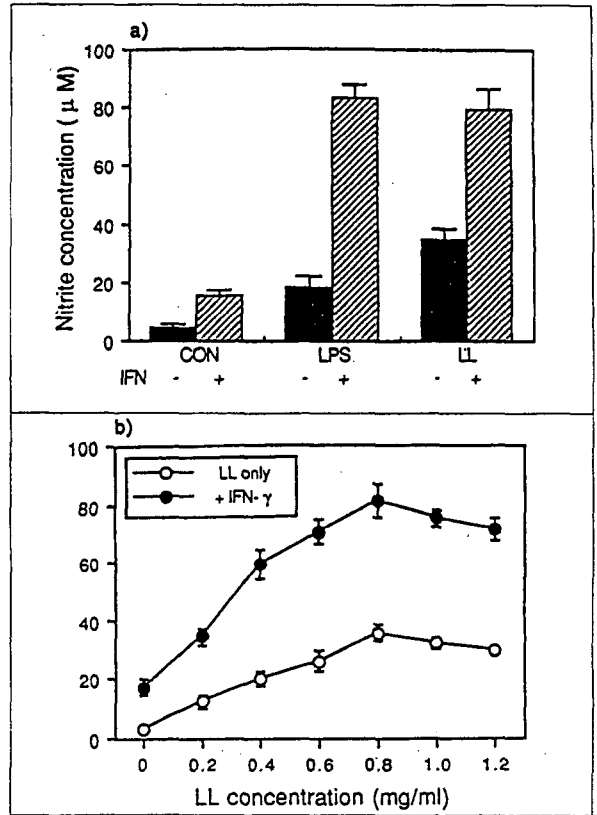


Fig 1. TG-elicited macrophages were cultured for 48 hours with either in medium alone or in medium containing IFN- $\gamma$ (U/ml) and/or LPS or LL(fig 1a). Dose dependent effects of LL on the Nitrite production(fig 1b). The amount of NO<sub>2</sub>-released by macrophages were measured after 48 hours of incubation. Balues are means  $\pm$ SD of four experiments.

2. N<sup>G</sup>MMA, NAA, Arginase가 腹腔大食細胞에서 女貞子에 의해 誘導된 NO 生成에 미치는 影響

Nitric Oxide의 생성은 L-arginine에 依存的인 經路를 가지므로 L-arginine과 競爭的 阻害劑인 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (N<sup>G</sup>MMA) 와 N-amino-L-arginine (NAA), L-arginine을 분해하는 효소인 arginase를 세포에 처리하였을때 NO 생

성이 저해 되는지에 대하여 알아보고자 女貞子를 처리한 세포에 각 저해제를 처리한 腹腔 大食細胞에서의 NO 생성 정도를 비교하였다.

그 결과 각 저해제에 대하여 합성이 저해를 받았다. Fig 2에서 보는 바와 같이 N<sup>G</sup>MMA, NAA, arginase의 농도가 증가할수록 NO값이 현저히 감소하였다(Fig 2)

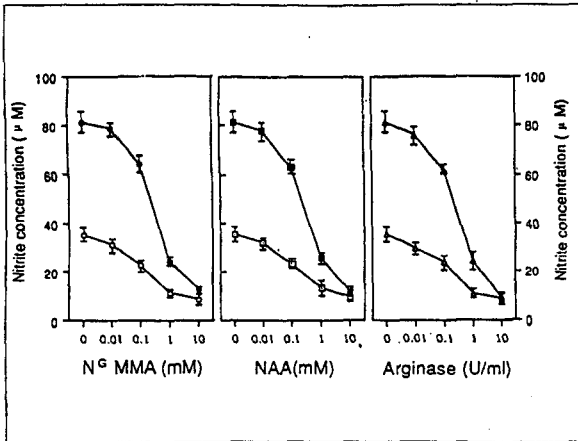


Fig 2. The inhibitory effect of N<sup>G</sup>MMA, NAA, arginase on the LL-induced NO production in murine macrophages. Either LL alone or LL plus IFN- $\gamma$ -stimulate cells were treated with N<sup>G</sup>MMA, NAA, arginase. The amount of NO<sub>2</sub> released by macrophages were measured after 48 hours of incubation. Values are means  $\pm$  SD of four experiments

### 3. 大食細胞의 細胞活性物質 生成能에 미치는 影響

女貞子에 의한 腹腔大食細胞의 細胞活性物質 생성능을 알아보기 위하여 女貞子를 농도의존적으로 처리하여 24시간 배양한 후 腫瘍塊死因子 (tumor necrosis factor; TNF- $\alpha$ )의 생성정도를 측정하여 본 결과 TNF- $\alpha$  생성능은 對照郡에 비하여 實驗群에서는 女貞子를 처리한 농도에 따라 증가함을 알 수 있었고 특히 1.0mg/ml을 처리하였을 때 최대로

생성 되었음을 알 수 있었다(Table I)

Table 1. Effect of LL on the secretion of TNE- $\alpha$  in murine peritoneal macrophages.

LL concentration(mg/ml)	TNF- $\alpha$ secretion(ng/ml)
medium only	0.12 $\pm$ 0.02
0.2	2.32 $\pm$ 0.01
0.4	2.94 $\pm$ 0.03
0.6	3.51 $\pm$ 0.02
0.8	4.25 $\pm$ 0.04
1.0	4.50 $\pm$ 0.05
1.2	4.18 $\pm$ 0.04

TG-elicited macrophages were cultured with medium alone, or various concentration of LL. the amount of TNF- $\alpha$  secretion by macrophages were measured after 48 hours of incubation. Values are means  $\pm$  SD of four experiments.

### 4. 女貞子에 의해 誘導된 Tumor Necrosis Factor Alpha(TNF- $\alpha$ )와 腹腔大食細胞의 NO 生成과의 關係

活性化된 大食細胞에 의한 NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>의 생성은 L-arginine에 依存的 生成經路인 NO의 생성능을 측정하는데 유용하다. 따라서 細胞活性物質중의 하나인 TNF- $\alpha$ 와 腹腔 大食細胞의 L-arginine 의존적인 NO생성의 관계를 알아보기 위하여 女貞子를 농도別로 회석하여 mouse 腹腔細胞에 처리한 뒤 48시간 동안 배양한 다음 TNF- $\alpha$ 와 NO를 측정하였다.그 결과 女貞子の 농도가 높을 수록 TNF- $\alpha$ 와 NO는 서로 有意性 있게 증가하였다.(Fig 3)

### 5. 女貞子에 의하여 誘導된 NO生成에 있어서 抗 TNF- $\alpha$ 抗體의 抑制 效果

女貞子에 의하여 유도된 TNF- $\alpha$ 가 自家分泌性 (autocrine)效果로서 세포가 NO를 생성하게 하는데 관계가 있는지를 알아 보기 위하여 女貞子에 의하여 유도된 TNF- $\alpha$ 의 NO생성에 대한 직접적인 영향을 검정하였다. 즉 TNF- $\alpha$ 에 대한 抗-TNF- $\alpha$

抗體를 희석하여 女貞子 단독 배양세포와 IFN- $\gamma$ 와 女貞子로 처리된 배양세포에 넣어준 결과 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다.

따라서 TNF- $\alpha$ 는 女貞子の 자극에 대하여 大食細胞에서 유도되어 NO생성에 대한 직접적인 영향을 미치고 있음을 검정할 수 있었다(Fig 4)

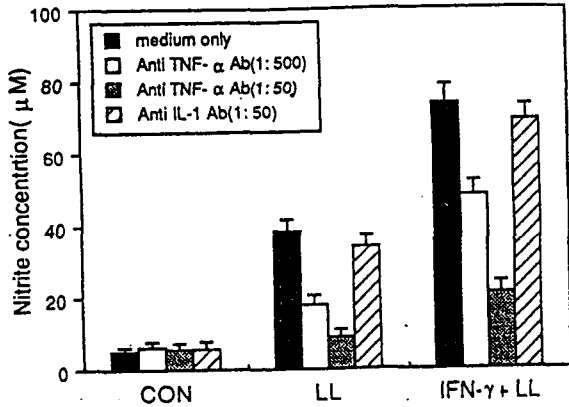


Fig 3. Effects of anti TNF- $\alpha$  Ab on the secretion of Nitrite mediated by IFN- $\gamma$  and LL. Peritoneal macrophages( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated for 48 hours with IFN- $\gamma$ (5U/ml) and LL(0.8mg/ml) in the presence or absence of anti-TNF- $\alpha$  Ab. NO $_2^-$  was measured spectrophotometrically as described in Methods. Values are  $\pm$ SD of four experiments.

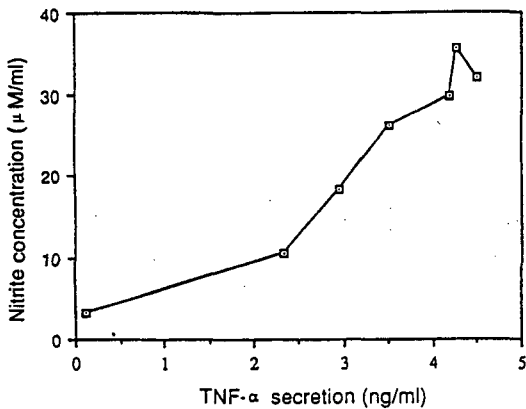


Fig 4. Correlation of NO production and TNF- $\alpha$ . TG-elicite macrophages were cultured for 48 hours with either medium alone or in

medium containing 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2mg/ml LL concentration, respectively.

Values are means  $\pm$ SD of four experiments.

## 6. 大食細胞의 反應酸素中間物質(Reactive Oxygen Intermediates; ROIs) 生成能에 미치는 影響

大食細胞에 미치는 女貞子の 영향을 알아보기 위하여 정상 생쥐로부터 腹腔 大食細胞를 분리한 후 女貞子를 각각 농도별로 희석하여 세포에 직접 처리하여 6시간 배양한 후 세포를 收獲하여 ROI를 측정하였다. ROI의 측정은 腹腔 大食細胞에 lucigenin을 첨가하고 PMA로 자극한 후 luminometer로 측정하였다. 그 결과 對照郡의 cpm(integral)이  $4.53 \times 10^7$ 인데 비하여 0.2mg/ml 처리시는  $4.82 \times 10^7$ , 0.4mg/ml 처리시는  $5.17 \times 10^7$ , 0.6mg/ml 처리시는  $6.50 \times 10^7$ , 0.8mg/ml 처리시는  $7.18 \times 10^7$ , 1.0mg/ml 처리시는  $6.19 \times 10^7$ , 1.2mg/ml 처리시는  $6.08 \times 10^7$ 으로 나타났다. 발생한 photons의 양을 비교해보면 O $_2^-$ 는 對照郡에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였다 (Table II)

Table 2. Effect of LL on PMA-induced superoxide formation in murine peritoneal macrophages

LL concentration (Mg/ml)	Superoxide release(photone)	
	Integral(cpm) $\times$ cpm $\times 10^7$	Peak(cpm) $\times 10^7$
medium only	$4.53 \pm 0.03$	$1.07 \pm 0.02$
0.2	$4.82 \pm 0.02$	$1.16 \pm 0.04$
0.4	$5.17 \pm 0.04$	$1.15 \pm 0.04$
0.6	$6.50 \pm 0.03$	$1.51 \pm 0.03$
0.8	$7.18 \pm 0.02$	$1.68 \pm 0.05$
1.0	$6.19 \pm 0.06$	$1.43 \pm 0.02$

Peritoneal macrophages were incubated with various concentration of LL at 37°C for 6 hours before determination of O $_2^-$ . Chemiluminingenic probe used was 10mM of lucigenine, which is amplifying Superoxide radicals. Murine peritoneal macrophages( $1 \times 10^6$  cells/well) were stimulated by 5.3mM phobol

myristate acetate(PMA) and measurement of Superoxide radical was carried out in the chemiluminometer for 60 min at 37°C. Values are means±SD of four experiments.

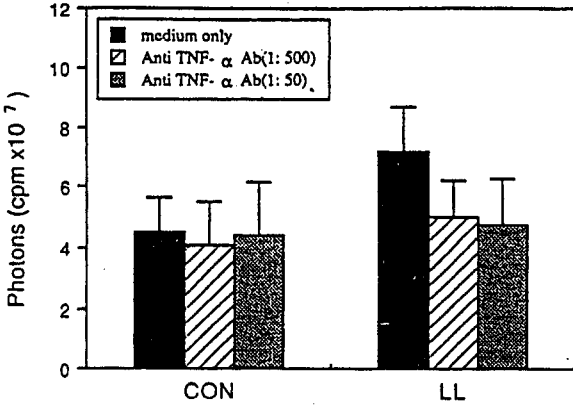


Fig 5. Effect of anti TNF- $\alpha$  Ab on the secretion of Superoxide by PMA from LL-treated (0.8mg/ml) murine peritoneal macrophages. Values are means±SD four experiments.

### 7. 女貞子에 의하여 誘導된 ROI 生成에 있어서 抗-TNF- $\alpha$ 抗體의 抑制效果

女貞子에 의하여 유도된 ROI 생성에 있어서 TNF- $\alpha$ 의 영향을 알아보기 위하여 女貞子를 처리하여 배양한 세포에 抗-TNF- $\alpha$ 抗體를 넣어 주어 6시간 동안 배양하였다. 對照群에서는 별 차이가 없었으나 女貞子를 처리한 배양세포에서는 ROI생성을 억제하였다 (Fig 5).

## IV. 考 察

韓醫學에서 人體는 正常生理 情況下에 體內的 陰陽, 氣血, 臟腑, 經絡이 모두 相互依存 및 相互制約의 相對平衡狀態에 있으며, 이러한 相對 平衡狀態가 파괴될 때 질병이 발병하고 그 發病과 變化는 內的根據가 되는 正氣와 外的條件이 되는 邪氣의 消長進退로 歸納시킬 수 있다<sup>29)</sup>.

正氣는 精, 神, 氣, 血, 津液 및 臟腑, 經絡등 組織器官의 機能活動을 주관하며, 人體를 生長, 發育,

健壯하게 하고, 人體의 內外環境에 대한 適應能力과 發病後의 抗病能力 및 病後 恢復期의 恢復能力 등으로 표현된다<sup>24)</sup>. 따라서 正氣는 邪氣를 제거하고 陰陽을 調節하여 人體를 보호하는 작용을 하므로 生體의 免疫調節 기능을 가지고 있다 하였다<sup>4)</sup>. 正氣와 免疫과의 관계에 대하여 蔡<sup>3)</sup>는 衛氣가 氣의 生成上 先天性免疫 뿐만 아니라 後天性免疫 까지도 포괄하며, 益胃氣, 養血氣, 補元氣, 益肺, 健脾, 補腎 등의 扶正法은 人體의 면역을 촉진한다 하였다. 趙<sup>25)</sup>는 韓醫學의 측면에서 正氣는 非特異的 防禦機能 및 이와 관련된 諸防禦物質을 총칭한다 하였다. 한편 章<sup>26)</sup>은 正氣가 허약한 환자에서 免疫機能이 저하되어 있다는 것을 보고하였고, 劉<sup>27)</sup>는 氣虛患者에서 白血球의 減少 등의 免疫機能의 減少가 나타남을 보고하였다.

서양의학에서 免疫은 외부 또는 내부의 이물질에 대하여 防禦, 恒常性維持, 免疫監視의 機能<sup>28-30)</sup>을 하는 것으로, 외부에서 침입한 이물질에 대하여 特異的 면역반응을 야기시키거나 이물질을 食食하고 分解하는 면역반응의 처음과 끝을 장식하는 非特異的인 先天的 免疫反應과 임파구에 의하여 수행되고 特異性, 適應性, 多樣性, 彼我區別性 및 觸發性 등의 특성을 보여주는 特異的 免疫反應으로 대별할 수 있다<sup>31)</sup>.

감염의 초기 단계에서 작용하는 중요한 기전은 大食細胞로부터 사이토카인 분비를 유발시키는 것이다. 사이토카인은 자극된 세포로부터 분비되는 물질로 림프구로부터 유래하며 림포카인, 인터페론 (IFN), 집락자극인자(CSF), 종양괴사인자(TNF)등이 이에 해당한다.

이 중 미생물과의 반응에서 大食細胞로부터 遊離되는 가장 중요한 伸介物質은 TNF- $\alpha$ 이다. TNF- $\alpha$ 는 大食細胞 및 증성호구의 殺菌殺害 능력을 향진시키며, 알려지지 않은 細菌成分과 함께 自然殺害(NK) 세포로부터 IFN- $\gamma$ 를 분비시켜 大食細胞의 살균기능을 향진시킨다. 또한 內皮細胞와 食細胞에 변화를 야기시켜 食細胞가 혈관벽에 잘 부착되게

함으로써 이 세포가 염증 부위로 이동할 수 있게 하는 역할도 가지고 있다.

특히 骨髓性細胞에서는 大食細胞에 의한 腫瘍細胞 殺害에 TNF- $\alpha$ 가 확실히 관여하며 感受性있는 腫瘍의 살해에서 IFN-T는 강렬하게 TNF- $\alpha$ 의 상승 효과를 나타낸다.<sup>7)</sup> 食食機能을 왕성히 보이는 호중구나 單核食食細胞系 세포들의 細胞質에는 여러가지 加水分解 酵素들을 함유하는 顆粒이 존재하여 食食된 微生物을 사멸시키려 하지만, 病源性이 강한 많은 미생물들은 그러한 세포들의 有害作用에도 불구하고 생존할 수 있게 저항성이 길러져 있다. 그러나 食食細胞를 활성화시킬 수 있는 T 세포가 생산하는 림포카인의 영향을 食食細胞가 받게 되면 세포내 lysosome에 있는 여러가지 加水分解 酵素의 증가와 反應酸素中間物質(ROI)이나 反應窒素中間物質(RNI)을 생성하여 탐식된 세포내 미생물을 효과적으로 사멸시키거나 번식을 저지할 수 있게 된다.<sup>32)</sup> 食食細胞 표면에 이물질이 부착되면 呼吸爆發 현상에 의한 과정에 의한 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 생성되며, 이는 여러 과정을 거쳐 O<sub>2</sub><sup>-</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 같은 ROI로 전환된다. ROI는 微生物體의 脂質成分을 酸化시켜 결국은 抗微生物作用을 나타내게 된다.<sup>33)</sup>

非特異的인 免疫防禦에서 大食細胞에 의하여 생성된 NO와 같은 RNI는 腫瘍細胞, 眞菌, 原生動物 및 抗酸性菌 등에 細胞毒性을 부여하는 防禦分子이며, 病毒力이 강한 寄生生物에 대한 방어작용을 갖는다. 특히 RNI는 L-arginine에 농도의존적으로 생성되며 癌細胞의 酵素活性抑制, 미토콘트리아 전자 전달계 과정의 차단, DNA합성억제를 유발하여 抗癌 및 抗微生物活動을 나타낸다. 이 과정에서 IFN-T는 大食細胞의 酸化窒素 合成酵素가 L-arginine과 결합하는 經路를 活性化시키며, TNF는 酸化窒素合成酵素的 작용을 유도한다.<sup>7)</sup>

女貞子是 補肝腎, 強腰膝의 효능을 가지고 있는 약으로 補中, 安五臟, 養精神, 生津液, 諸百疾의 主治를 가진다 하였고, 성분으로는 Oleanolic acid, oleicacid, Linoleic acid, d-Mannit 등을 함유하고

있다.<sup>18-22)</sup>

또한 女貞子是 化學療法 및 放射線療法에 의하여 일어나는 白血球減少를 억제시키는 작용이 있으며 水浸劑는 실험동물의 移植腫瘍의 성장을 억제하고 煎劑는 黃色葡萄球菌, 赤痢菌, 大腸菌 등에 대하여 억제작용이 있다고 보고<sup>34)</sup> 되었다. 최근에는 임상에서 女貞子是 白血球減少證이나 免疫機能低下證에 응용되고 있으며 淋巴細胞와 母細胞轉化作用과 體液性 및 細胞性免疫作用을 증강시켜 면역기능의 조절에 효과가 있었다는 보고<sup>45)</sup> 와 女貞子가 補中 및 補肝腎 등의 扶正의 효능이 있음에 비추어 볼 때, 女貞子是 韓醫學에서의 扶正에 따른 大食細胞의 食食能 및 ROI, RNI의 生成能에 영향을 미칠 것으로 사료되어 실험을 실시하였다.

본 실험에서 女貞子가 大食細胞 食食能에 미치는 결과를 살펴보면 大食細胞의 反應窒素中間物質(RNI) 생성능에 미치는 영향에 있어서 IFN- $\gamma$ 를 前處理한 세포와 하지 않은 세포 각각에 女貞子를 처리하여 RNI값을 측정 한 결과 對照群에 비하여 女貞子를 처리한 세포에서 RNI값이 현저히 증가하였다(Fig 1a).

또한 IFN- $\gamma$ 를 前處理한 후 女貞子를 농도의존적으로 처리하여 RNI를 측정하였을 때 농도의존적으로 RNI가 증가하는 경향을 보였으며 특히 농도가 0.8mg/ml일때 최고치에 달하였다(Fig 1b).

N<sup>G</sup>MMA, NAAM Arginase가 腹腔大食細胞에서 女貞子에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향은 N<sup>G</sup>MMA, NAA, arginase의 농도가 증가할수록 NO 값이 현저히 감소하였다(Fig 2). 그리고 大食細胞의 細胞活性物質 생성능에 미치는 영향으로는 女貞子를 濃度依存的으로 처리하여 24시간 배양한 후 腫瘍壞死因子 TNF- $\alpha$ 의 생성정도를 측정하여 본 결과 對照群에 비하여 TNF- $\alpha$  생성능이 女貞子를 처리한 농도에 따라 증가하였고 1.0mg/ml을 처리하였을 때 최대로 생성 되었다(Table I).

女貞子에 의하여 유도된 TNF- $\alpha$ 과 腹腔大食細胞의 NO 생성과의 관계에서는 女貞子の 농도가 높을



수록 TNF- $\alpha$ 와 NO는 서로 유의성 있게 증가하는 경향을 보였다(Fig 3). 그리고 女貞子에 의하여 유도된 NO생성에 있어서 抗-TNF- $\alpha$ 抗體의 억제효과는 TNF- $\alpha$ 가 女貞子の 자극에 대하여 大食細胞에서 유도되어 NO생성에 대한 직접적인 영향을 미치고 있음을 검정할 수 있었다(Fig 4).

大食細胞의 反應酸素中間物質(ROI) 생성능에 미치는 영향으로는 對照群의 cpm(integral)이  $4.53 \times 10^7$ 인데 0.2mg/ml 처리시는  $4.82 \times 10^7$ , 0.4mg/ml 처리시는  $5.17 \times 10^7$ , 0.6mg/ml 처리시는  $6.50 \times 10^7$ , 0.8mg/ml 처리시는  $7.18 \times 10^7$ , 1.0mg/ml 처리시는  $6.1 \times 10^7$ , 1.2mg/ml 처리시는  $6.08 \times 10^7$ 으로 나타났다. 발생한 photons의 양을 비교해 보면  $O_2$ 는 대조군에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였다(Table II).

女貞子에 의하여 유도된 ROI 생성에 있어서 抗-TNF- $\alpha$  抗體의 억제효과는 대조군에 있어서는 별 차이가 없으므로 女貞子는 ROI생성에 있어서 TNF- $\alpha$ 로 경유하지 않는 것으로 사료된다.

결과적으로 女貞子는 大食細胞의 RNI 생성능과 ROI 생성능을 증가시켰으며 TNF- $\alpha$ 의 생성능도 증가시켰다. 또한 女貞子에 의한 NO의 생성 증가는 항TNF- $\alpha$ 항체에 의하여 억제 되는 바 TNF- $\alpha$ 가 NO 생성에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 그러나 ROI 생성과 TNF- $\alpha$ 는 직접적인 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 본 실험의 결과로 미루어 보아 女貞子는 선천적 면역반응을 증가시키는 것으로 사료되어 貪食細胞의 기능을 항진시키는 면역조절제로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

女貞子が 大食細胞의 貪食能에 미치는 영향을 알기 위하여 女貞子를 생쥐의 腹腔內 大食細胞에 투여한 후 여러가지 면역반응의 변화와 이러한 변화가 체내의 恒常性에 미치는 영향에 대해서 조사하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 女貞子 투여는 농도의존적으로 RNI 생성을 증

가시켰다.

2. 女貞子 투여로 유도된 NO는  $N^G$ MMA, NAA, arginase에 농도의존적으로 현저히 감소하였다.
3. 腫瘍壞死因子(TNF- $\alpha$ ) 생성능은 女貞子를 처리한 농도에 따라 증가하였다.
4. 女貞子の 농도가 높을수록 TNF- $\alpha$ 와 NO 생성능은 서로 유의성 있게 증가하였다.
5. TNF- $\alpha$ 는 女貞子の 자극에 대하여 大食細胞에서 유도되어 NO생성에 대한 직접적인 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.
6. 발생한 photons을 비교해보면  $O_2$ 는 대조군에 비하여 모두 증가하였다.
7. ROI생성에 있어서 女貞子는 抗-TNF- $\alpha$ 抗體의 培養細胞에서는 ROI생성을 억제하였다.

따라서 女貞子는 貪食細胞의 기능을 촉진시켜서 抗微生物 및 抗癌作用을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

1. 楊維傑編: 皇帝內經素問靈樞解釋, 成輔社, 서울. (素問) p. 3, 19, 235, 263, 266, 349, 573, (靈樞) p.469, 1980.
2. 文濬典 .外: 東醫病理學, 高文社, 서울, p.79, 1990.
3. 蔡禹錫: 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察, 大韓韓醫學會誌, 11(2): 54-91, 1990.
4. 駱和生: 免疫と 漢方, 谷口書店, 東京, pp 55-60, 110-112, 1988.
5. 戴新民: 中醫免疫學, 啓業書局, 臺北, pp.1~30, 63-64, 1985.
6. 李榮基: 最新醫療大百科辭典(권7), 新太陽社, 서울, p.22, 1991.
7. 하대유: 면역학, 고문사, 서울, p 109, 110, 115, 116, 227, 348, 1994

8. Bonventre PF, Strauss D, Baughn RE, Imhoff J : Enhancement of carrier-mediated transport after immunological activation of peritoneal macrophage. *J Immunol* 118:1827, 1977
9. Sbarra AJ, Kaenovsky ML : The biochemical basis of phagocytosis. *J Biol Chem* 234:1355, 1989.
10. Hibbs JB, RE Taintor, Z Vavrin, and C Rachlin : Nitro oxide ; a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 161:420, 1989.
11. Drapier JC, J Wietzerbin, JB Hibbs : Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 141 : 2407, 1988.
12. 孫洛源. 外: 기아마우스의 세망내피계 탐식능에 미치는 녹용의 영향, *大韓韓醫學會 學會誌*, 6(2):61-72, 1986.
13. 權文鉉: 甘草와 雷公藤合劑 煎湯液이 마우스의 免疫抑制에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文. 裡里, 1993.
14. 崔貞和: 韓國產靈芝 煎湯液이 마우스의 免疫細胞機能에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 裡里, 1990.
15. 陳善斗: 黃耆의 投與가 生體 및 試驗管藍에서 免疫細胞의 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 裡里, 1995.
16. 李秀炯: 補骨脂煎湯液의 投與가 大食細胞 및 림프구의 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 碩士學位論文, 裡里, 1994.
17. 韓性燦: 小柴胡湯이 마우스 免疫細胞의 Free Radical 生成 및 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 裡里, 1994.
18. 申佶求: 申氏本草學, 壽文社, 서울, pp. 131-132, 1988.
19. 辛民教: 臨床本草學, 南山堂, 서울, p.245, 1986.
20. 吳儀洛: 本草從新, 杏林書院, 서울, p.134, 1972.
21. 陸昌洙 外: 韓藥의 藥理 成分 臨床應用, 癸丑文化社, 서울, p.766, 1982.
22. 李載熙: 藥理 藥能의 臨床應用, 學林社, 서울, p.488, 1985
23. 鄭遇悅: 韓方生理學, 圓光大學校 韓醫科大學 病理學教室, 裡里, pp.16,94-106, 1986.
24. 張慶榮: 中醫'正氣'概念探析, *中醫雜誌*, 1:60, 1991.
24. 文濬典 外: 東醫病理學, 高文社, 서울, p.79, 1990.
25. 趙鍾寬: 免疫에 관한 東洋醫學的考察, *東洋醫學*, 12(1)19-23, 1986.
26. 章育正: 虛證和實證病人的免疫狀態, *上海中醫藥雜誌*, 6:44-45, 1984.
27. 劉福春: 氣虛病人微量元素與免疫功能關係初探, *中醫雜誌*, 11: 56-57, 1985.
28. 鄭憲鐸 外: 免疫學入門, 서울, 高文社, p.443, 1988.
29. 李淵台: 最新免疫學, 서울, 集文堂, p.33, 1985.
30. 閔昌泓 外: 最新微生物學, 서울, 高文社, pp.79-80, 1981.
31. 趙誠璟: Nitric Oxide의 免疫反應 調節機能, 圓光大學校 大學院 博士學位 論文, 1992.
32. Suny SSJ, Nelson RS and Silverstein SC : Yeast mannose inhibits binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages, *J. Cell. Biol.*, p.106, 1983.
33. 鄭憲鐸: 알기쉬운 면역생물학, 행암사, 서울, pp.12:93-121
34. 陳存仁: 中國藥學大全(권2), 松嶽出版社, 서울, pp.402-403, 1988.