

팔미원의 *in vitro* 면역조절 작용

이인순* · 이인자*

*포항공과대학교 생명과학과, 대구효성 가톨릭대학교 약학대학
(Received July 2, 1996)

In vitro Immunomodulating Effects of PALMIWON

Ihn-soon Lee* and In-Ja Rhee*

Collage of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyoseung, Kyungsan 713-702, Korea
*Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea

Abstract—PALMIWON is composed of 8 oriental herbs which has been known to show some pharmacological effects in kidney, blood vessels and immune systems, and used for the treatment of kidney disease, hypertension, nervous disease and diabetic mellitus in the Orient for a long time. Based on our previous report that PALMIWON showed different effects on immune cells and β -cells, the immunoreactivity of ICSA (Islet Cell Surface Antibody) with β -cell (RINm5F) and the cell proliferation and function of interleukin-1 β damaged β -cells in the presence of PALMIWON were examined. It was observed that PALMIWON significantly inhibited the immunoreactivity of ICSA with β -cell, and markedly increased cell proliferation and insulin release of interleukin-1 β damaged β -cells.

keywords □ PALMIWON, RINm5F, Interleukin-1 β , ICSA, Cell proliferation, Insulin Release.

팔미원은 숙지황, 산약, 산수유, 택사, 복령, 목단피, 계지, 부자로 구성되어 있으며, 처방의 약리 작용으로 자양강장효과, 신장기능 강화, 이뇨증진 효과, 혈관 장력 강화, 면역반응 조절, 노쇠지연 작용 등이 보고되어 있다.^{1, 2, 3)}

임상에서는 각종 신장 질환, 배뇨이상증, 고혈압, 당뇨병, 신경증 등에 널리 사용되고 있다.^{1, 2)} 지금까지의 팔미원 관련 연구들은 실험적 당뇨 백서에서의 항 당뇨 작용^{4, 5, 6)}, 신성 고혈압에 미치는 영향⁷⁾, 기아 백서에서의 혈청 및 전해질 대사 기질의 변동에 대한 연구⁸⁾ 등이 보고되어 있다.

저자들은 이미 팔미원이 면역세포와 베타세포의 세포 생존에 서로 다른 감수성을 가지고 있음을 보고¹⁷⁾ 하였으며 팔미원의 임상에서의 여러가지 작용들이 면역조절작용과 어떤 관련성이 있을 것으로 생각하여, 이번 연구에

서는 베타세포의 자가면역학적 파괴 과정을 실험 모델로 설정하여 팔미원의 면역조절 작용 연구에 접근하였다. 즉 자가 면역질환 제 1형 당뇨병 전 단계(prediabetic stage)의 세포성 면역이상 표지자인 소도 세포표면항체(ICSA, islet cell surface antibody)^{9, 10)}와 제 1형 당뇨의 면역반응에서 중요한 cytokine인 Interleukin-1 β (IL-1 β)^{11, 12, 13)}에 의한 베타세포 상해에 대한 팔미원의 영향을 조사하였다.

실험방법

세포배양 - American Tissue Culture Collection (ATCC)에서 구입한 흰쥐에서 유래한 췌장 베타 세포주 RINm5F는 10% fecal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (100u-100 μ g/ml), 5.5 mM glucose가 함유된 RPMI 1640 (Gibco, U.S.A) 배지에서 3~4일 간격으로 계대 배양하면서 유지시켰다. 실험을 위해서는 배양된 세포를 PBS로 2회 세척하

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-850-3619 (팩스) 053-850-3702

고 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 분리시켜 5×10^4 cell/ml 농도가 되도록 조정된 후 각 세포를 1~2일 안정화시켜 이용하였다.

소도세포표면항체 양성혈청 - ^{51}Cr -release법¹⁴⁾을 이용하여 target cell인 베타세포와 ICSA와의 반응성을 조사하였다. 전혈로부터 혈청을 분리하여 -70°C 냉동고에 보관하였다가, 실험 전에 녹여서 동량의 phosphate-buffered saline (PBS, PH 7.4)로 희석한 후 56°C 에서 30분간 비동화시켰다. 한편, 2일간 미리 배양한 RINm5F cell에 $1 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr/well}$ ($100 \mu\text{l}$ in RPMI 1640)을 분주하여 5시간 배양한 후 RPMI 1640배지로 3회 세척하고, 여기에 준비한 비동화혈청 $50 \mu\text{l}$ 를 분주하여 30분간 더 배양하였다.

그리고 나서 $50 \mu\text{l}$ 의 보체 (rabbit complement)를 첨가하고 다시 30분 더 배양하였다. 최대 유리 방사선 (maximum release)을 측정할 때에는 보체 대신 0.1% Triton X-100을 첨가하였다.

한 검체당 3중복으로 실험하여 Gamma counter로 유리된 방사선을 계측하여 임상 증상이나 검사 소견상 당뇨가 없는 건강한 성인 10명의 평균 계측수의 5 SD (standard deviation) 이상인 경우를 ICSA 양성으로 판정하였다.

팔미원 함유 배지에서 미리 배양한 RINm5F cell을 상기에서 ICSA 양성으로 판정된 혈청과 반응시켜 ^{51}Cr 의 유리 정도를 대조군과 비교분석하였다.

세포 증식 - 베타세포의 세포증식 정도는 thymidine uptake법¹⁵⁾으로 관찰하였다. 세포 배양을 마치고 24시간 전 medium에 $2 \mu\text{Ci}$ 의 methyl- ^3H -thymidine을 넣고 배양한 후, 배양액의 상층액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음, $0.5\text{M NaOH } 500 \mu\text{l/well}$ 를 넣어 세포를 용해시켰다. 이 세포용해물을 shaker (Amersham, Germany, model No: 2MD 202)로 골고루 섞은 다음, 용해액 $200 \mu\text{l}$ 에 Scintillation cocktail (Aqualuma Plus) 10 ml 를 넣고 β -counter (Beckman, USA)로 ^3H 의 편입(incorporation) 정도를 측정하였다.

인슐린 분비 - 인슐린 분비 정도는 방사면역법(RIA: radioimmunoassay)¹⁶⁾으로 측정하였다. 48시간 배양한 베타세포의 상층액을 PBS로 적절하게 희석하여(20 또는 30배) 표준품으로 $200 \mu\text{l/tube}$ 씩 취하였다. 쥐 인슐린을 각 농도별 $200 \mu\text{l/tube}$ 씩 취하여 standard curve 작성에 사용하였다.

Antibody로는 guinea pig anti-porcine insulin antiserum을 사용하여 시료 및 표준 인슐린 용액에 각각 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣었다. 여기에 ^{125}I -insulin 용액을 각 tube에 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣었으며 총 ^{125}I -insulin 양을 알기 위해서 한개의 tube에는 ^{125}I -insulin 만 $200 \mu\text{l}$ 넣었다 (총 ^{125}I -insulin). 각 tube를 잘 흔들어서 마개를 하고 실온에서 하룻밤 (18~24 hr. 동안) 방치한 후 총 ^{125}I -insulin 측정용 tube를 제외한 나머지 tube의 상층액을 버리고 반응하지 않은 ^{125}I -insulin을 깨끗이 제거한 다음 ^{125}I -insulin-antibody 중의 radioactivity를 γ -counter로 측정하였다.

시료의 조제 - 본 실험에 적용한 팔미원은 이미 보고한 방법¹⁷⁾으로 건조 분말화하여 시료로 사용하였다.

통계 처리 - 통계처리는 SPSS프로그램을 사용하여 Student's unpaired/paired t-test로 검정하였으며 유의 수준은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

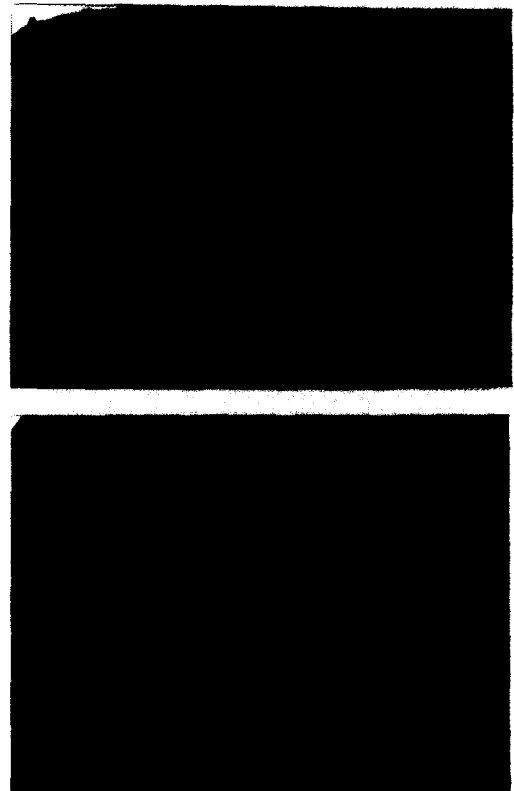


Fig. 1 - Morphological appearance of ICSA-reactive RINm5F cells by inverted microscope (magnification $\times 40$)
A: control group B: ICSA-reactive group

Table I— ICSA assay by ^{51}Cr release

Sample	Mean		Judgement
	cpm	Lysis	
1	1274	3.14	normal
2	1472	6.72	normal
3	1341	4.34	normal
5	1273	3.11	normal
6	4510	61.9	ICSA positive
7	2987	34.24	ICSA positive

Mean(cpm) of maximum release and spontaneous release were 6598 and 1102.

The specific lysis was calculated as follows and expressed as percent lysis.

$$\text{specific lysis} = \frac{\text{cpm of experiment} - \text{cpm of spontaneous release}}{\text{cpm of maximum release} - \text{cpm of spontaneous release}} \times 100$$

ICSA positive cut off point was $[6.21 + 5 \times 3.16 = 22\%]$

ICSA : Islet Cell Surface Antibody

결과 및 고찰

소도 세포표면 항체와 베타세포의 면역 반응성에 대한 팔미원의 영향을 알아보기 위해 팔미원 함유 그리고 팔미원 미함유 배지에서 배양한 베타세포들을 소도세포 표면항체 양성혈청과 반응시켰을 때의 세포독성을 세포 유리(cell lysis) 정도 측정으로 소도세포 표면 항체에 대한 면역 반응성을 조사하였다.

우선 ICSA positive serum과 베타세포의 항원 항체 반응은 위상차 현미경하에 관찰 가능한데 ICSA에 의해 베타세포(RINm5F cell)의 깨어지는 모습을 Fig. 1에 나타내었다.

소도세포 표면항체 양성 혈청(ICSA positive serum)의 판정을 위하여 시료혈청들과 ^{51}Cr 표지 베타세포를 반응시켜 정상인 혈청의 ^{51}Cr 방사능 유리의 평균값(mean)과 표준편차(S.D.)를 구하고, 평균값(mean)과 5배의 표준편차(S.D.)의 합을 ICSA positive cut off point로 정하였다.

실험한 정상 시료혈청들의 유리 방사능 평균 값은 6.21%이며, 표준편차가 3.16으로 하였을 때 몇가지 serum들의 ICSA positive 판정 결과를 Table I에 나타내었다. 이 중 ICSA positive serum을 이용하여 팔미원 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유 배지에서 미리 배양된 베타세포를 면역 공격하였을 때 팔미원 미함유배지에서 배양된 대조군에 비해 어느 정도 보호되어 세포 ^{51}Cr 의 유리 정도가 유의성있게 감소하였다(Table II). 이는 전 당뇨시(prediabetes stage)에 나타나는 베타세포와 세포성 면역 이상 표지자와의 반응을 팔미원이 억제시켜 베타세포를 보호하므로써 면역과피(ICSA에 의한 항원

Table II— Immunoreactivity between ICSA and β -cell by ^{51}Cr release

PALMIWON ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LYSIS (%)	Significance
0	57.66 \pm 1.29***	control
100	54.45 \pm 0.709	*
1000	54.15 \pm 0.430	**

-Significant differences (* p<0.05, ** p<0.01) between control and PALMIWON treated group.

***: Values are mean \pm standard deviation

항체반응)를 차단할 수 있다는 사실을 입증해 주는 것으로 팔미원의 면역 조절 작용을 지지해주고 있다.

베타세포의 면역학적 과피에 중요하게 관여하는 또 다른 인자인 cytokine IL-1 β 로 유도 상해된 베타세포 주 RINm5F cell에서의 팔미원의 영향을 살펴보았다. IL-1 β 에 의한 세포손상에서는 Zawalich 등의 결과¹⁴⁾와 마찬가지로 이중효과(dual effects)¹⁴⁾가 관찰되었는데, 50 u/ml 농도를 이중효과의 변곡역가로 하여 이보다 낮은 농도에서는 베타세포의 활성이 오히려 증가하였으며(자료는 나타내지 않았음), 50 u/ml 농도에서는 대조군과 거의 동일한 활성을 보였고, 50 u/ml 이상의 농도에서는 베타세포에서의 세포독성이 유발되었다.

IL-1 β 상해전에 팔미원을 처리한 경우(Table III, IV)와 IL-1 β 노출 후에 팔미원을 처리할 경우(Table V, VI) 모두 베타세포의 인슐린 분비와 세포증식이 유의적으로 증가하였다. 특히 인슐린 분비의 결과는 IL-1 β 에 의해 저해를 많이 받은 군(1000 u/ml IL-1 β 처리군)이 상해를 적게 받은 군(100 u/ml IL-1 β 처리군)보다 더 큰 폭으로 증가하여 정상군(IL-1 β 와 팔미원을 처리하지 않는군)의 인슐린 유리량(8.56 \pm 0.16 ng/ml)

Table III— Preventive effects of PALMIWON on the cell proliferation by ³H-thymidine uptake in the IL-1 β induced prediabetic model of RINm5F Cell

IL-1 β (u/ml)	PAL (μ g/ml)	³ H-thymidine uptake		Significance
		cpm	% of control	
50	0	3220 \pm 86.1***	100	Control
50	100	4823 \pm 131.0	150	**
50	1000	5281 \pm 113.5	164	**
100	0	2365 \pm 54.6	100	Control
100	100	4299 \pm 110.5	181	**
100	1000	4640 \pm 74.1	196	**
1000	0	1551 \pm 65.1	100	Control
1000	100	1984 \pm 100.9	128	**
1000	1000	2424 \pm 86.9	156	**

-Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) between control and PALMIWON treated group.

-PAL : PALMIWON, IL-1 β : interleukin-1 β

*** : Values are mean \pm standard deviation

Table IV— Preventive effects of PALMIWON on the Insulin Release by RIA in the IL-1 β induced prediabetic model of RINm5F Cell

IL-1 β (u/ml)	PAL (μ g/ml)	Insulin Release		Significance
		ng/ml	% of control	
50	0	8.49 \pm 0.07***	100	Control
50	100	9.40 \pm 0.14	111	**
50	1000	10.4 \pm 0.43	122	**
100	0	8.13 \pm 0.14	100	Control
100	100	8.60 \pm 0.19	106	**
100	1000	9.80 \pm 0.16	121	**
1000	0	5.63 \pm 0.19	100	Control
1000	100	7.83 \pm 0.14	139	**
1000	1000	8.10 \pm 0.13	144	**

-Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) between control and PALMIWON treated group.

-RIA : radioimmunoassay, PAL : PALMIWON, IL-1 β : interleukin-1 β

*** : Values are mean \pm standard deviation

Table V— Recovery effects of PALMIWON on the cell proliferation by ³H-thymidine uptake in the IL-1 β induced prediabetic model of RINm5F cell

IL-1 β (u/ml)	PAL (μ g/ml)	³ H-thymidine uptake		Significance
		cpm	% of control	
50	0	3298 \pm 84.9***	100	control
50	100	5359 \pm 119.0	162	**
50	1000	5827 \pm 84.8	176	**
100	0	2465 \pm 55.2	100	control
100	100	4702 \pm 97.5	178	**
100	100	5192 \pm 87.0	196	**
1000	0	1767 \pm 68.1	100	control
1000	100	2396 \pm 100.3	136	**
1000	1000	2731 \pm 59.6	154	**

-Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) between control and PALMIWON treated group.

-PAL : PALMIWON, IL-1 β : interleukin-1 β

*** : Values are mean \pm standard deviation

Table VI—Recovery effects of PALMIWON on the Insulin Release by RIA in the IL-1 β induced prediabetic model of RINm5F cell

IL-1 β (u/ml)	PAL (μ g/ml)	Insulin Release		Significance
		ng/ml	% of control	
50	0	8.61 \pm 0.09***	100	control
50	100	9.55 \pm 0.11	111	**
50	1000	10.9 \pm 0.28	127	**
100	0	8.26 \pm 0.21	100	control
100	100	8.75 \pm 0.26	106	**
100	1000	9.83 \pm 0.26	119	**
1000	0	6.00 \pm 0.16	100	control
1000	100	8.10 \pm 0.17	135	**
1000	1000	8.37 \pm 0.13	140	**

-Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) between control and PALMINON treated group.

-RIA : radioimmunoassay, PAL : PALMIWON, IL-1 β : interleukin-1 β

*** : Values are mean \pm standard deviation

에 근접하게 도달하였다(Table IV, VI). 따라서 IL-1 β 는 소도세포에 국소화되어 면역반응을 유발하므로서 베타세포의 dysfunction과 destruction을 일으키는 immunological effector molecule 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

최근에 제시된 베타세포 상해 모델에 의하면, 소도에 침윤된 활성화된 대식세포(macrophage)에 의해 생성된 IL-1 β 가 β -cell receptor에 작용하여 nitric oxide synthase의 expression을 유도하여 free radical nitric oxide를 생성하고, 이 nitric oxide가 베타세포의 mitochondria 기능 저해와 DNA synthesis 억제를 일으켜 결국 베타세포 파괴를 일으킨다고 한다.¹⁵⁾ IL-1 β receptor를 가진다고 알려진 RINm5F cell¹⁶⁾의 IL-1 β 로 유도되는 상해에 팔미린이 유의적으로 영향을 나타낸다는 사실은, 팔미린이 베타세포의 자가면역적 파괴로부터 베타세포의 생존 및 기능을 모두 보호 또는 회복시켜 줄 수 있는 능력을 지니고 있음을 말해 준다.

소도세포 표면 항체와 베타세포의 면역반응성, 그리고 IL-1 β 로 상해받은 베타세포의 세포증식과 인슐린 분비에 미치는 팔미린의 영향은 *in vitro* 실험의 한계성 때문에 면역 조절작용을 더욱 확고히 해 줄 수 있는 일련의 실험들을 더 필요로 하지만 적어도 베타세포주 RINm5F에 대해서는 팔미린이 면역조절 작용을 발휘하고 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 논문은 효성가톨릭대학교 학술연구조성기금에 의

하여 연구가 수행되었습니다.

문헌

- 1) 박영순 : 한방의 약리해설. 한성사 p. 642 (1994).
- 2) 동의 과학원 : 동의 처방대전 1, 여강출판사 p. 56 (1993).
- 3) 韓大錫 : 생약학. 동명사. (1988).
- 4) 이인자, 신정연 : 팔미린이 Streptozotocin으로 유발한 실험적 당뇨병에서 미치는 영향. 효성여자대학교 응용과학연구논문집 3, 181 (1994).
- 5) 이인자, 박성희 : 팔미린과 Gliclazide 병용투여가 실험적 당뇨병에서 미치는 영향. 효성여자대학교 응용과학 연구논문집 2, 115 (1993).
- 6) 山原條二, 壬生寬之, 藤村一 : 生藥の生物活性成分に關する研究 Streptozotocin による病態モデルを用いた 山茱萸抗糖尿病活性成分の検討, 藥學雜誌, 101, 86 (1981).
- 7) 노영수, 홍남두, 김수옥, 김남재 : 팔미린이 신성고혈압에 미치는 영향. 생약학회지 12, 179 (1984).
- 8) 신민규, 김완희 : 기아백서 혈청중 전해질 및 대사기질의 변동에 대한 팔미린의 효과. 경희한의대 논문집 5, 147 (1982).
- 9) Lernmark, A., Freedman, Z. F., Kanatsuna, T. I., Patzelt, C., Rubenstein, A. H. and Steiner, D. F. : Islet cell surface antibodies and diabetes mellitus in immunology of diabetes, Irvine, W. J. (ed), Teviot Scientific Publications, Edinburgh. p. 155 (1980).
- 10) Toguchi, Y., Ginsberg-Fellner, F. and Ru-

- binstein, P. : Cytotoxic islet cell surface antibodies(ICSA) in patients with type I diabetes and their first-degree relatives. *Diabetes* **34**, 855 (1985).
- 11) Amano K. and Yoon J. W. : Studies on autoimmunity for initiation of β -cell destruction. *Diabetes* **39**, 590 (1990).
- 12) Koevary, S.B., Williams, D. E., Williams, R. M. and Chick, W. .L. : Passive transfer of diabetes from BB/W to Wistar-Furth rats. *J. Clin. Invest.* **75**, 1904 (1985).
- 13) Lee, K. U., Pak, C. Y., Amano, K. and Yoon, J. W. : Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes-prone BB rats by depletion of macrophage. *Diabetol.* **31**, 400 (1988).
- 14) A. Johnstone and R. Thorpe : Immunoassays *In Immunochemistry in Practice* 2nd. p. 246-254, Blackwell Scientific Publications, London, 1987.
- 15) M. A. Ghalambor, H. G. Rittenhouse, S. A. Schwartz, S. M. Pek, D. AR, and D. L. Oxender : Cytotoxic mechanisms in insulin-dependent Diabetes Mellitus. *In J. Larner and S. L. Pohl (eds) : Methods in Diabetes Research*, Vol. 1, p. 121-138, A Wiley-Interscience Publication, NewYork, 1985.
- 16) A. Rabinovitch : Pancreatic Monolayer cultures-Preparation of purified Islets cell cultures and Assessment of β cell replication. *In Joseph Larner, S. L. Pohl (eds) : Methods in Diabetes Research Vol. 1*, A Wiew-Interscience Publication, NewYork, 1985, p. 310-314.
- 17) Zawalich, W. S. and Zawalich, K. C. : Interleukin-1 is a potent stimulator of islet insulin secretion and phosphoinositide hydrolysis. *Amer. J. Physiol.* **256**, E19 (1989).
- 18) Corbett, J. A and Mcdaniel, M. L. : Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β -cells? *Diabetes* **41**, 897 (1992).
- 19) Eizirik, D. I., Tracey, D. E., Bendtzen, K., Sandler, S. : An interleukin-1 receptor antagonist protein protects insulin-producing β -cells against suppressive effects of interleukin-1 β . *Diabetol.* **34**, 445 (1991).
- 20) 이인순, 이인자 : 췌장소도세포와 면역세포에 미치는 팔미원의 영향. *약학회지*, **39**, 541-547 (1995).