

음양곽분획물이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향

김정훈[#] · 김인훈 · 채병숙 · 강태욱 · 박찬봉 · 안영근

원광대학교 식품약품안전성연구소

(Received December 20, 1995)

Effects of Epimedii Herba Fraction on Response in ICR Mice

Joung Hoon Kim[#], In Hoon Kim, Byeong Suk Chae, Tae Wook Kang,
Chan Bong Park and Young Keun Ahn

Center for Food and Drug Safety, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—The fractions of Epimedii Herba were examined for the immunological effects in ICR mice. Mice were divided into 4 groups and administered orally the fractions of Epimedii Herba for 10 days. The results of this study were summarized as following: (1) The fraction 1 (EtOAc layer) administered group as compared with control group significantly decreased spleen weight, Arthus reaction and hemagglutination (HA) titer but significantly increased circulating white blood cells (WBC). (2) The fraction 2 (H₂O layer) administered group as compared with control group significantly decreased liver weight, Arthus reaction and HA titer but significantly increased WBC. (3) The fraction 3 (ppt) administered group as compared with control group significantly increased liver weight, thymus weight rate, delayed type hypersensitivity, phagocytic activity and WBC. The results showed that Frs. 1 and 2 administered groups reduced humoral immune response but increased WBC, and that Fr. 3 administered group increased cell-mediated immune response, phagocytic activity and WBC.

Keywords □ Fractions of Epimedii Herba, immunological response, SRBC, ICR mice.

음양곽 (Epimedii Herba)은 매자나무과에 속하는 다년생 초본으로써, 그 전초는 옛부터 강장, 강정약으로서 음위, 불임, 류마티스, 건망증, 신경허약 및 허약 체질 개선 등의 목적으로 이용되어 지고 있다.^{1,2)}

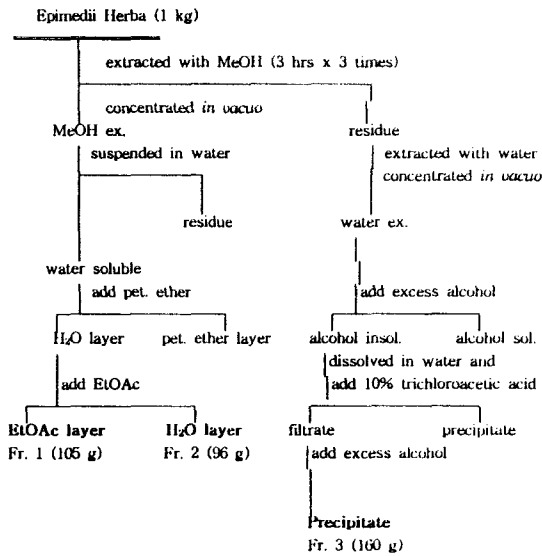
현재까지 알려진 Epimedium속 식물의 성분에는 flavonoid, lignan, ionone derivatives 및 alkaloid 등이 보고되어 있으며, 특히 *Epimedium koreanum*으로부터는 icariin, epimedeside A, epimedin A, B, C 및 quercetin 등이 보고되었다.³⁻¹²⁾ 본 생약의 엑스는 개를 이용한 약리실험에서 최유효효과가 있으며, 말초혈관을 확장시키고 뇌내 혈관운동중추를 억제함으로써 마취한 토끼와 정상 생쥐 및 신장질환이 있는 고혈압흰쥐에 있어서 혈압을 낮추어 주며 그 밖에 진해, 거담, 항천

식효과 및 소량에서는 이노작용이 있는 반면 대량에서는 항이노작용을 나타낸다.¹³⁾ 또한 Inokuchi 등^{14,15)}은 음양곽에서 얻어진 tannin류가 angiotensin converting enzyme에 대해 억제효과를 나타낸다고 보고하였으며, Ono 등¹⁶⁾은 음양곽추출물이 reverse transcriptase와 cellular DNA polymerase에 대해 억제작용을 나타낸다고 하였고, Park 등¹⁷⁾은 음양곽 MeOH추출물이 비정상 상태로 유도배양된 뇌세포에서 pyruvate dehydrogenase complex의 활성을 용량에 따라 증가시키는 경향을 나타낸다고 하였다.

생체방어기능에 대한 보고에서 Matsushita 등^{18,19)}은 음양곽의 탈지 수용성추출물중 고분자합유분획이 대식세포의 탐식능을 강화하고 BC-47 cell의 증식을 억제한다고 하였으며, 이어 음양곽의 polysaccharide는 대식세포의 탐식능을 증대시키고 그 chemotaxis를 증가시키며 BC-47 cell과 P 815 cell의 증식을 억제한

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0653-50-6816 (팩스) 0653-54-7286



Scheme I — Extraction and fractionation of Epimedii Herba.

다고 보고하였으며, linuma 등²⁰⁾은 음양곽의 70% MeOH ex., icariin 및 epimedin이 간의 Kupffer cell에 의한 탐식작용을 활성화시킨다고 보고하였다.

한편, 식물에 광범위하게 분포하고 있는 천연 저분자 물질 flavonoids는 항염, 항알러지, 항바이러스 및 항종양작용 등의 다양한 약리작용으로 주목을 받고 있는데, 최근 음양곽에서도 분리된 quercetin 등 여러 flavonoids가 mast cell로부터 histamine 유리 억제작용에 영향을 끼침이 보고되어^{21, 22)}, 면역학적으로 관심이 모아지는 반면 각종 식물 및 고등균류중의 다당체 및 단백질 등의 고분자물질도 면역억제활성에 대한 관심이 높아지고 있다.

따라서 저자들은 오랫동안 강장약으로 이용되고 있는 음양곽의 여러 성분들이 이러한 면역생리활성과 관련있으리라고 예측되어, 음양곽MeOH추출물의 EtOAc layer, H₂O layer와 그 잔사의 침전물을 경구투여하여 이들이 생쥐의 면역체내에 미치는 영향을 검토한 결과, 유의한 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험동물 - 생후 5~6주령, 체중 18~23 g의 수컷 ICR 생쥐를 대륙실험동물개발에서 분양받아 시판사로 1주간 굶식시켜 적응시킨 후, 10마리를 1군으로 하고 전체를 4군으로 분류하여 온도 23±2°C, 습도 50~

60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 10일간 사육하였다.

사료의 추출, 분획 및 투여 - 음양곽 1.0 kg을 세절하여 수욕상에서 MeOH (Duksan Pharmaceutical Co., Ltd., Korea)로 수회 추출한 후 감압하에서 농축하여 MeOH ex. 240 g(수득률 24%)을 얻었다. 이 MeOH ex.를 petroleum ether 처리한 후 EtOAc가용부 (Fraction: Fr. 1) 105 g(수득률 10.5%) 및 H₂O 가용부 (Fr. 2) 96 g(수득률 9.6%)로 분획하고, MeOH로 추출한 후 그 잔사를 증류수를 수욕상에서 추출하여 과량의 alcohol을 가해 그 여액에 다시 과량의 alcohol을 가해 침전물(Fr. 3) 160 g(수득률 16%)을 취했다. Fr. 1은 소량의 무수에탄올에 습윤시킨 후 증류수에 현탁시켰고, Fr. 2 및 Fr. 3는 증류수에 녹인 다음, Fr. 1, Fr. 2 및 Fr. 3을 각각 1일 1회 동일시간에 200, 200 및 250 mg/kg을 10일간 경구투여하였다.

체중 및 장기의 중량계측 - 실험동물의 체중은 약물 투여 개시일과 최종일 약 24시간 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였고, 장기의 중량은 최종 사료투여 2일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 적출하여, 그 중량을 측정하여 체중에 대한 백분율을 구하였다.

항원조제 및 면역 - 항원은 면양적혈구 (Sheep red blood cell: 이하 SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 수컷면양의 경동맥으로부터 heparin처리된 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver's 완충액 (pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 phosphate-buffered saline (이하 PBS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution (HBSS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다. 면역는 원심 세척한 SRBC를 Reed 등²³⁾의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10⁸ SRBC/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml (1×10⁷ SRBC)를 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 실시하였다.

혈청의 분리 및 불활성화 - 생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 불활성화시킨 후 4°C에서 보존하였다.

적혈구응집소가의 측정 - 적혈구응집소가 (Hemagglutination titer 이하: HA titer)를 microtitration

trays (Limbro Chemical Co., Inc. New Haven, Connecticut, U.S.A.)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 불활성화된 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% SRBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집유형을 관찰판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

족척종창반응의 측정 (Footpad swelling test) -

Arthus반응 및 지연형과민반응 (delayed-type hypersensitivity reaction 이하: DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등²⁴⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 면역 4일 후에 SRBC 0.05 ml (1×10^8 cells)를 생쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사 후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper (Mitutoyo Mfg. Co., Ltd., Japan)로 측정하였으며, 종창정도의 측정가는 측정기에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등²⁵⁾의 판독기준에 따라, 3시간 경과 후의 반응을 Arthus반응, 24시간 경과후의 반응을 DTH으로 간주하였다. 족척종창지수는 다음과 같이 하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

비장세포 부유액의 조제 - 비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium (이하: MEM: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 큰 세포 덩어리를 제거하였으며, 한병 MEM으로 4°C에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포수가 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험 때마다 비장세포의 생존율 검사를 실시하였는데, 이 검사는 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후 백혈구 계산판에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정 후, 그 백분율을 계산 하였다.

비장세포의 rosette forming cell (이하: RFC)수의 측정 - 비장세포의 rosette 형성세포수의 검사는 Garvey 등²⁶⁾ 및 Elliott 등²⁷⁾이 기술한 방법에 준하여 다음

과 같이 실시하였다. 즉, 비장세포 부유액 (2×10^7 cells/ml) 0.25 ml를 시험관에 넣은 후 HBSS에 부유한 SRBC (2×10^8 cells/ml) 0.25 ml를 넣고 혼합하여 200×g에서 12분간 원심분리한 후, 4°C에서 2시간 방치하였다. 그 후 조심스럽게 흔들어 채부유시킨 후, 이 부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경판찰하였다. 검경시 비장세포에 SRBC가 3개이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음식에 준하여 계산하였다.

Rosette forming cells (%) =

$$\frac{\text{No. of rosette forming cells}}{10^2 \text{ spleen cells} \times \% \text{viability}} \times 100$$

대식세포활성도의 측정 - 대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등²⁸⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물투여 2일 후에 rotring ink를 멸균증류수에 녹인 1% gelatin액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소현탁액을 생쥐 체중 g당 0.01 ml씩 꼬리정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와 후부정맥혈관총 (retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube (20 μl: microhematocrit)로 천자하여 20 μl의 혈액을 10, 20 및 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate용액 2 ml가 든 test tube에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient과 corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B: Body weight

L: Liver weight

S: Spleen weight

K: Phagocytic coefficient (측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph곡선)

말초순환백혈구수의 측정 - 생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하여 türk액으로 희석하여 혈구 계산판상에 적합한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

통계학적 분석 - 모든 자료는 mean ± standard error (S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 Student's t-test로 행하였다.²⁹⁾

Table I—Effects of Epimedii Herba fraction on body weight in ICR mice

Group	Body weight gain (%)
Control	1.46±3.58
Fr. 1	-8.66±3.69***
Fr. 2	-5.27±4.71***
Fr. 3	-5.20±0.76***

The fractions of Epimedii Herba (Fr. 1, 2 and 3 in Scheme 1) were orally administered to mice once a day for 10 days. Control group was administered water alone. Each value is the mean±S.E. of 10 mice. Asterisks denote the significances of the difference between control and Epimedii Herba fraction administered groups. (*** P<0.001)

Table II—Effects of Epimedii Herba fraction on organ weight in ICR mice

Group	liver wt. × 100 body wt.	spleen wt. × 100 body wt.	thymus wt. × 100 body wt.
Control	5.51±0.04	0.80±0.01	0.19±0.01
Fr. 1	5.40±0.11	0.69±0.02***	0.20±0.01
Fr. 2	5.16±0.11**	0.77±0.03	0.20±0.02
Fr. 3	5.86±0.11**	0.81±0.03	0.23±0.00***

Other legends and methods are the same as described in Table I. (** P<0.01, *** P<0.001)

실험결과

체중의 변화 - 각 군의 체중변화는 Table I에서와 같이, 정상대조군이 1.46±3.58%인데 비하여 음양곽 MeOH추출물의 EtOAc층 (Fr. 1), 음양곽 MeOH추출물의 H₂O층 (Fr. 2) 및 음양곽 MeOH잔사의 침전물 (Fr. 3)투여군에서 각각 -8.66±3.69%, -5.27±4.71% 및 -5.20±0.76%로 유의성 있는 체중감소의 경향을 보였다.

각장기의 중량변화 - 각 장기의 중량변화는 Table II에서와 같이, 간장의 중량비가 정상대조군이 5.51±0.04%의 증가를 보인데 비해 Fr. 2투여군은 5.16±0.11%로 유의한 감소를 보였으나, Fr. 3투여군은 5.86±0.11%로 유의한 증가를 보여 Fr. 2와 Fr. 3은 간장에 상반된 영향을 미쳤다. 비장의 중량비는 정상대조군이 0.80±0.01%인데 비하여 Fr. 1투여군은 0.69±0.02%로 유의한 감소를 보여 비장에 영향을 미쳤다. 한편, 흉선의 중량비는 정상대조군이 0.19±0.01%인데 비하여 Fr. 1, Fr. 2 및 Fr. 3투여군에서 각각 0.20±0.01%, 0.20±0.02% 및 0.23±0.00%로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 Fr. 3투여군에서는 유의성 있는 증가를 보였다.

Table III—Effects of Epimedii Herba fraction on hemagglutination titer in ICR mice

Group	HA# titer (log ₂)
Control	3.25±0.12
Fr. 1	2.50±0.27*
Fr. 2	2.75±0.21*
Fr. 3	3.20±0.13

#HA: Hemagglutination. HA titer was assessed 4 days after immunization. Other legends and methods are the same as described in Table I. (* P<0.05)

Table IV—Effects of Epimedii Herba fraction on Arthus reaction in ICR mice

Group	FPSI#
Control	13.20±0.12
Fr. 1	12.55±0.22*
Fr. 2	9.73±0.27**
Fr. 3	13.16±0.28

#FPSI: footpad swelling index. Mice were challenged s.c. with 10⁸ SRBC on left hind footpad 4 days after immunization. FPSI=[(T-T₀/T₀)×100, where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T is the hind footpad thickness 3 hr after challenge. Other legends and methods are the same as described in Table I. (* P<0.05, ** P<0.001)

Table V—Effects of Epimedii Herba fraction on delayed-type hypersensitivity in ICR mice

Group	FPSI#
Control	5.76±0.29
Fr. 1	5.98±0.41
Fr. 2	5.80±0.21
Fr. 3	6.66±0.25*

#FPSI: footpad swelling index. Mice were challenged s.c. with 10⁸ SRBC on left hind footpad 4 days after immunization. FPSI=[(T-T₀/T₀)×100, where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T is the hind footpad thickness 24 hr after challenge. Other legends and methods are the same as described in Table I. (* P<0.05)

적혈구응집소가에 미치는 영향 - 적혈구응집소가의 결과는 Table III에서와 같이, 정상대조군이 3.25±0.12인데 비하여 Fr. 1과 Fr. 2투여군에서는 각각 2.50±0.27 및 2.75±0.21로 유의한 감소를 보여 적혈구응집소가에 영향을 미쳤으나, Fr. 3투여군에서는 3.20±0.13로 유의성 없는 감소를 보여 적혈구응집소가에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

Arthus반응에 미치는 영향 - Arthus반응의 결과는 Table IV에서와 같이, 족척종창의 지수가 정상대조군이 13.20±0.12인데 비하여 Fr. 1과 Fr. 2투여군에서는 각각 12.55±0.22 및 9.73±0.27로 유의한 감소를 보여

Table VI— Effects of Epimedii Herba fraction on rosette forming cells in ICR mice

Group	#RFC(%)
Control	4.04±0.09
Fr. 1	4.09±0.13
Fr. 2	4.24±0.09
Fr. 3	4.76±0.15***

#RFC: rosette forming cells. RFC was assessed 4 days after immunization. RFC (%) = [(No. of rosette forming cells/10² spleen cells × % viability) × 100]. Other legends and methods are the same as described in Table I. (***) P<0.001

Table VII— Effects of Epimedii Herba fraction on phagocytic activity in ICR mice

Group	Corrected phagocytic index ^{a)}
Control	4.63±0.14
Fr. 1	4.33±0.02
Fr. 2	4.76±0.07
Fr. 3	5.13±0.09**

^{a)} Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weights of the liver and spleen. Other legends and methods are the same as described in Table I. (***) P<0.01

Table VIII— Effects of Epimedii Herba fraction on the number of circulating leukocyte in ICR mice

Group	Number of circulating leukocyte (/mm ³)
Control	6,210±393
Fr. 1	8,064±229***
Fr. 2	9,672±420***
Fr. 3	8,660±468***

Blood samples for measuring leukocyte in mice were collected from the retro-orbital plexus immediately before assay. Other legends and methods are the same as described in Table I. (***) P<0.001

Arthus반응에 영향을 미쳤으나, Fr. 3투여군에서는 13.16±0.28로 유의성 없는 감소를 보여 Arthus반응에 영향을 미치지 못했다.

지연형과민반응 (Delayed-type hypersensitivity; 이하 DTH)에 미치는 영향 - DTH에 대한 결과는 Table V에서와 같이, 정상대조군의 DTH가 5.76±2.91인데 비해 Fr. 3투여군은 6.66±0.25로 유의한 증가를 보여 DTH반응에 영향을 미쳤다.

비장세포의 rosette형성능 (RFC)에 미치는 영향 - RFC를 %로 환산한 결과는 Table VI에서 보는 바와 같이, 정상대조군이 4.04±0.09%인데 비하여 Fr. 3투여군은 4.76±0.15%로 유의한 증가를 보여 비장세포의

rosette형성능에 영향을 미쳤다.

대식세포의 활성에 미치는 영향 - 대식세포의 탐식능력을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table VII에서 보는 바와 같다. 정상대조군이 4.63±0.14인데 비해 Fr. 3투여군에서는 5.13±0.09로 유의한 증가를 보여 대식세포의 활성에 영향을 미쳤다.

말초순환 백혈구수 - 말초순환 백혈구수는 Table VIII에서 보는 바와 같이, 정상대조군의 백혈구수가 6,210±393인데 비해 Fr. 1투여군, Fr. 2투여군 및 Fr. 3투여군은 각각 8,064±229, 9,672±420, 8,660±468로 유의한 증가를 보여 말초순환 백혈구에 영향을 미쳤다.

고 찰

옛부터 강장, 강정약으로 많이 이용되는 음양곽은 그 70% MeOH ex.와 polysaccharide분획이 macrophage의 탐식능을 증가시킴이 보고된 바 있으며¹⁸⁻²⁰⁾, 음양곽의 성분분석학적 연구에 있어 icariin, epimedin, icarisid, epimedeside, lignan, ionone, phenolic glycoside 등 여러 성분들이 분리 보고되었고³⁻¹²⁾ 이중 특히 icariin은 혈압강화작용이 있다고 알려져 있는데 그 추출물 전반에 관한 면역학적인 영향에 관한 연구는 찾아볼 수 없는 바, 저자들은 음양곽분획물이 생쥐에 미치는 면역반응을 검토하고자 실시한 본 연구의 결과에 대한 고찰은 다음과 같다.

본 실험에서 음양곽의 각 분획별 투여군은 체중이 정상대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 간장의 중량비는 Fr. 2투여군에서는 유의한 감소를 보였으나 Fr. 3투여군은 유의한 증가를 보여 음양곽의 분획물이 생쥐의 간장에 대해서 상반되게 영향을 미친 것으로 사료된다. 면역장기인 비장의 중량비는 정상대조군에 비해 Fr. 1투여군에서 감소되었으며, 흉선의 중량비는 음양곽의 분획별 투여군 모두에서 증가하는 경향을 보였고, 특히 Fr. 3투여군에서는 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이는 음양곽의 분획물이 생쥐의 면역기능에 상반되게 영향을 미친 것으로 사료된다.

적혈구응집소가는 면역적혈구에 대한 항체와 항원과의 반응으로서 T-dependent antigen에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데³⁰⁾, 본 실험의 결과 적혈구응집소가는 정상대조군에 비해 Fr. 1과 Fr. 2투여군은 유의한 감소를 보인 반면 Fr. 3투여군은 유의성 없는 감

소를 나타내었다. Arthus반응은 감작숙주에 주입된 항원이 항원-항체 면역복합체를 형성하여 조직에 침착하고 보체를 활성화시키며 그 항원에 의해 자극된 mast cell로부터 유리된 histamine 및 leukotriene은 다형핵 백혈구로부터 lysosomal enzyme을 유리하여 염증반응을 촉진시키는 현상으로²⁴⁾, 본 실험의 결과 Fr. 1과 2투여군에서는 유의성 있는 감소를 나타낸 반면 Fr. 3투여군에서는 유의성 없는 감소를 나타내었다. 이상의 체액성 면역반응인 적혈구응집소와 Arthus반응에 대한 결과를 종합해 보면, 음양곽의 polysaccharide가 면역된 생쥐의 T-suppressor cell증가와 수혈된 생쥐에 있어서 항체생산을 억제한다는 Wang 등³¹⁾의 보고와 flavonoid인 quercetin이 생쥐의 장간막과 복강액에서 비만세포막을 안정화 한다는 Johrl 등³²⁾의 보고와 비만세포와 호중구에서 flavonone, phoretin, taxifolin 및 quercetin 등이 histamine유리를 억제한다는 Bennett 등³³⁾의 보고로 미루어, Fr. 1과 2투여군에 함유된 minor flavonoid들이 mast cell에서 Ca-uptake를 억제하여 histamine유리억제 및 immunoglobulin합성을 억제하여 체액성 면역반응을 감소시킨 것으로 생각되는바, 이에 대한 정확한 기전을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

지연형 과민반응은 감작임파구에 의한 lymphokine의 유리에 기인하는 세포매개형 과민반응으로³⁴⁾, 본 실험에서 Fr. 1과 2투여군은 정상대조군에 비해 유의성 없는 증가를 보인 반면 Fr. 3투여군은 유의한 증가를 보였다. 비장세포의 rosette형성세포 (RFC)는 T-cell 및 대식세포가 모두 rosette를 형성할 수 있으나 대부분 T-cell이 더 깊이 관여한다고 하였는데³⁴⁾, 본 실험의 RFC의 결과는 Fr. 1, 2 및 3투여군에서 정상대조군에 비해 증가를 나타내었으며, 특히 Fr. 3투여군은 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 비장세포의 RFC의 결과를 DTH결과와 함께 생각할 때, 음양곽의 Fr. 3투여군은 lymphokine의 생성 또는 macrophage의 활성화 등을 증가시켜 세포성 면역반응을 증가시킨 것으로 사료된다. 따라서 음양곽의 Fr. 3분획물의 주성분인 polysaccharide가 세포성 면역반응의 향진을 유도한 것으로 생각된다.

대식세포의 활성화는 항원에 대한 면역능의 발현 및 interleukine의 분비에 중요한 역할을 하여 그 탐식능이 망상조직내피계에 영향을 끼쳤는가를 알기 위한 중요한 지표로 이용되고 있는 바³⁵⁾, 본 실험의 결과 Fr.

1과 2투여군은 정상대조군에 비해 유의성 없는 증감을 나타내었으나 Fr. 3투여군은 유의한 증가를 나타내었다. 이는 polysaccharide가 대식세포의 탐식작용을 활성화시킨다는 Matsushita 등¹⁹⁾의 보고와 음양곽추출물이 대식세포활성과 T-cell수를 증가시켰다는 Chen 등³⁶⁾의 보고로 미루어, 음양곽의 Fr. 3분획물의 주성분인 polysaccharide가 T-cell의 증식과 lymphokine 등의 분비를 촉진함으로써 대식세포의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다.

말초순환 백혈구수는 Fr. 1, 2 및 3투여군 모두가 정상대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 이는 음양곽추출물이 백혈구감소증 환자에 있어서 백혈구수의 현저한 증가와 임파구의 활성을 증가시켰다는 Liu 등³⁷⁾의 보고로 미루어 보아, 음양곽분획물이 임파구의 활성 증가에 영향을 미친 것으로 사료된다. 따라서 황기에 의한 면역치료시 음양곽분획물인 Fr. 3형태 투여가 바람직하다고 사료되고, 이에 대한 정확한 면역작용기전은 앞으로 진행할만한 연구과제인 것으로 생각된다.

결 론

음양곽분획물 (음양곽 MeOH추출물의 EtOAc층: Fr. 1, 음양곽 MeOH추출물의 H₂O층: Fr. 2 및 음양곽 MeOH잔사의 침전물: Fr. 3)이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향은 다음과 같다.

1. Fr. 1투여군은 정상대조군에 비해 비장의 중량비, Arthus 및 HA titer를 유의성 있게 감소시켰으나, WBC는 유의성 있게 증가시켰다.
2. Fr. 2투여군은 정상대조군에 비해 간장의 중량비, Arthus 및 HA titer를 유의성 있게 감소시켰으나, WBC는 유의성 있게 증가시켰다.
3. Fr. 3투여군은 정상대조군에 비해 간장과 흉선의 중량비, DTH, RFC, phagocytic activity 및 WBC를 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 Fr. 1과 2투여군은 체액성 면역반응을 감소시켰으나 말초순환백혈구수는 증가시킨 반면, Fr. 3투여군은 세포성 면역반응, 대식세포의 활성화 및 말초순환 백혈구수를 증가시켰다.

문 헌

- 1) Yang, Z. Z. : Clinical applications of Yinyang-

- huo. *Zhejiang J. Trad. Clin. Med.* **20**, 478 (1985).
- 2) Liu, C. M., Yu, Q. H. and Zhang, L. H. : Effects of icariin on heart. *Chin. Trad. Herb Drugs* **13**, 414 (1982).
 - 3) Liu, C. R. and Xu, L. X. : Analysis of active ingredients in traditional chinese herbal drug. Assay of icariin in Epimedium. *Chin. J. Pharm. Anal.* **4**, 81 (1984).
 - 4) Liu, B. Q., Ma, H. S. and Mon, P. : Isolation and identification of icariin. *Chin. Trad. Herb Drugs* **11**, 201 (1980).
 - 5) Oshima, Y., Okamoto, M., Hikino, H. O. and Maki, O. : Epimedin A, B and C, flavonoid glycosides of *Epimedium koreanum* Herbs. *Heterocycles* **16**, 935 (1987).
 - 6) Xu, G. W., Xu, B. J. and Wang, M. T. : Isolation and identification of icariin and icariside I. *Chin. Pharm. Bull.* **22**, 129 (1987).
 - 7) Xu, S. C., Wang, Z. X., Wu, L. J., Wang, N. B. and Chen, Y. J. : Isolation and identification of icariin and epimedeside A. *Chin. Trad. Herb Drugs* **13**, 9 (1982).
 - 8) Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Oguchi, H. : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* (I). *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1109 (1987).
 - 9) Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Oguchi, H. : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* (II). *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3713 (1987).
 - 10) Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Oguchi, H. : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* (III). *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 2475 (1988).
 - 11) Tokuoka, Y., Daigo, K. and Takemoto, T. : Studies on the constituents of flavonoids of *Epimedium grandiflorum* (IV). *Yakugaku Zasshi* **95**, 825 (1975).
 - 12) Mizuno, M., Iinuma, M., Tavaka, T., Sakakibara, N., Hanioka, S. and Liu, X. : Flavonol glycosides in *Epimedium grandiflorum* Sp. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3487 (1988).
 - 13) Hong, H. : Oriental materia medica. *Oriental Healing Arts Institute, Taiwan*, 563 (1986).
 - 14) Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauch, T. and Nagamatsu, A. : Inhibitors of angiotension converting enzyme in crude drugs (I). *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3615 (1984).
 - 15) Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauch, T. Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Inhibitors of angiotensin converting enzyme in crude drugs (II). *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 264 (1985).
 - 16) Ono, K., Nakane, H., Meng, Z., Ose, Y., Sakai, Y. and Mizuno, M. : Different inhibitory effects of various herb extracts on the activities of reverse transcriptase and various deoxyribonucleic acid polymerase. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1810 (1989).
 - 17) Park, M. J., Song, J. H. and Kim, Y. C. : Studies on the effect of several crude drugs on cultured chicken brain cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**, 32 (1989).
 - 18) Matsushita, S., Takahashi, M., Yoshida, S., Weber, I. and Yamauchi, K. : Extract from barrenwort. *U. S. Patent*, 4501734 (1985).
 - 19) Matsushita, S., Takahashi, M., Yoshida, S., Weber, I. and Yamauchi, K. : Polysaccharide PS-A obtained from barrenwort deriving from plants belonging to the Genus *Epimedium*, process for preparation there of and phylactic and immunostimulating agents comprising said polysaccharide PS-A effective component. *U.S. Patent*, 4528188 (1985).
 - 20) Iinuma, M., Tanaka, T., Sakakibara, N., Mizuno, M., Matsuda, H., Shiomoto, H. and Kubo, M. : Phagocytic activity of leaves of *Epimedium* species on mouse reticuloendothelial system. *Yakugaku Zasshi* **110**, 179 (1990).
 - 21) Amellal, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R. and Landry, Y. : Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Planta Medica* **51**, 16 (1985).
 - 22) Elliott, M. and Gary, D. : Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3333 (1984).
 - 23) Reed, N. D., Crowle, P. K. and Ha, T. : Use of mast deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. *B. Sor-*

- deted. Kargen Baselip*. 184 (1984).
- 24) Yoshikai, Y., Maie, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effects of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed-type footpad reaction to SRBC in mice. *Immunology* **38**, 577 (1979).
- 25) Sugimoto, M., Kijima, A. M., Yaginuma, K. and Gashira, Y. E. : Cell-mediated and humoral immunity in mice. *J. Med. Sci. Biol.* **28**, 23 (1975).
- 26) Garvey, T. S., Cremer, N. E. and Sussclorf, D. H. : Methods in immunology, *Benjamin* **3**, 449 (1980).
- 27) Elliott, B. E. and Haskill, J. S. : Characteristics of thymus-derived bone marrow derived rosette forming cell lymphocytes. *Eur. J. Immunol* **3**, 68 (1973).
- 28) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stuffle, C. and Halpern, B. N. : Etude quantitative de l'activite granulopexique du systeme reticuloendothelial chez la souris. *C.R. Soc. Biol. Paris* **148**, 43 (1954).
- 29) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. : Statistical methods. *Iowa State University Press* **6**, 1 (1967).
- 30) Stavitsky, A. B. : Micro methods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.* **72**, 360 (1954).
- 31) Wang, T. R., Xing, S. T. and Zhou, J. H. : Action of *Epimedium sagittatum* polysaccharide and icariin on T suppressor cells. *Chin. J. Immunol.* **2**, 74 (1986).
- 32) Johrl, R. K., Iutsshi, U., Kameshwaran, L. and Atal, C. K. : Effect of quercetin and albizzia saponins on rat mast cell. *Ind. J. Physiol. Pharm.* **29**, 43 (1985).
- 33) Bennett, J. P., Gomperts, B. B. and Wol-lenweber, E. : Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Drug Res.* **31**, 433 (1981).
- 34) Back, J. E. and Dardenne, M. : Antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell Immunol.* **3**, 1 (1972).
- 35) Hambach, A., Stiller-Winkler, R., Oberbarnscheidt, J. and Ewers, U. : Sind suppressor T-zellen die primaren zellen der immunotoxischen wirkungen von bile?. *Zbl. Bart. Hyg., I. Abt. Orig. B.* **178**, 361 (1983).
- 36) Chen, K. J. and Zhang, W. P. : Advances on antiageing herbal medicines in China. *Abstr. Chin. Med.* **1**, 309 (1987).
- 37) Liu, F. C., Li, J. X., Ding, G. X., Zhang, J. X., Zhou, S. H., Guo, F., Wu, Y. C. and Hu, T. H. : Correlation between trace elements and immunological function in patients with vital energy deficiency. *J. Trad. Chin. Med.* **26**, 856 (1985).