

韓方混合液 APA-01의 면역 증강 효과

이영선¹ · 한옥경¹ · 박찬우³ · 전태원¹ · 이은실¹ · 신상우² · 김광중² · 김효정^{1,2*}

1: (재)경북테크노파크 경산대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원, 2: 경산대학교 한의과대학, 3: 경주한방병원

Enhancement of Immune Response by New Herb Mixture, APA-01, in Mice

Young Sun Lee¹, Ok Kyung Han¹, Chan Woo Park³, Tae Won Jeon¹,
Eun Sil Lee¹, Sang Woo Shin², Kwang Joong Kim², Hyo Jung Kim^{1,2*}

1: Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicines, Kyongsan University, Kyongbuk Technopark,
2: College of Oriental Medicine, Kyongsan University, 3: Kyongju Oriental Hospital, Gyeongju

APA-01, which is an aqueous extract of five Chinese herbs, is a modified formula of Huoxiang-Zhengqi-San. The effect of new herb extract on immune response was investigated. The parameter examined to assess apparent immune response of APA-01 in mice included changes of body weight, relative weight of immune organs, cell proliferation and cytokine gene expression. The body weight and relative weight of immune organs were not significantly changed among the tested groups. In the spleen cell proliferation assay, APA-01 increased the cell proliferation in a dose-dependent manner. Methotrexate (MTX), an agent of immune suppression, inhibited the spleen cell proliferation (IC₅₀: 800 μg/ml). However, APA-01 significantly inhibited the suppression of mouse spleen cell proliferation. Therefore, it seems that APA-01 has a reducing effect of immune suppression. Immunomodulatory effect of APA-01 was further investigated using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in mouse spleen cells. In RT-PCR test, APA-01 enhanced the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in a dose-dependent manner. In spite of immune suppression by MTX, COX-2 mRNA was induced by co-treatment with APA-01. These results suggest that APA-01 stimulates the proliferation of spleen cells, regulates the expression of COX-2 mRNA, and accelerates the recovery of inhibition of spleen cell proliferation induced by MTX, thus providing the immunological basis for clinical benefit of APA-01.

Key words : APA-01, methotrexate, cytokine, RT-PCR, cell proliferation

서 론

免疫이란 무거운 짐 또는 세균으로부터의 면제를 의미하는 희랍의 immunis에서 유래된 용어로 숙주가 外部의 침입을 효율적으로 막기 위한 적절한 生體反應을 유도하는 作用으로 볼 수 있다¹⁾. 韓醫學에서는 이러한 免疫 效果를 滋養·強壯 효과로 설명하고 있는데, 滋養·強壯 효과는 저하된 면역 기능을 직접 또는 간접적으로 향상시킬 수 있는 生物反應變造製 (biological response modifier; BMR)로 생체의 항상성 (homeostasis)을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 현대 의학에서 다루는 면역학적 개념과 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다

^{2,4)} 일반적으로 韓醫學에서는 疾病의 發生에 가장 중요한 요인으로 인체의 정상적인 機能活動과 疾病에 대한 抵抗能力을 나타내는 '正氣'와 人體 구성요소 일부가 상대적으로 부족하여 저항능력이 저하된 상태인 '虛'라고 할 수 있다⁵⁾. 최근 적절한 免疫反應이 疾病의 豫防 및 治療에 중요한 역할을 하고 있음이 알려져, 生體 免疫을 增強시킬 수 있는 면역증강제에 관한 광범위한 연구가 수행되고 있다⁶⁻¹⁰⁾. 기존에 개발된 면역증강제가 대부분 생체에 대해 독성이 강하여 실험 목적으로 사용될 뿐 임상에서의 활용도는 극히 미미한 실정이기 때문에 疾病의 豫防과 면역 방어 기능을 증대시킬 수 있는 즉, 자양·강장 효과를 극대화시킬 수 있는 약재들을 한약재료에서 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 효과가 증명되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 이러한 韓方 生藥의 免疫活性 機能을 잘 이용한다면 身體의 방어 기전을 강화하여 여러 가지 疾病을 豫防하는데 도움을 줄 수 있으리라 생각된다. 생

* 교신저자 : 김효정, 대구시 수성구 상동 706-060, 경산대학교 한의과대학
E-mail : hyokimm@yahoo.co.kr Tel : 053-770-2299
· 접수: 2002/03/23 · 수정: 2002/05/02 · 채택 : 2002/05/20

체내에는 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재하며, 이들 세포들은 혈액, 임파절, 비장 및 위장관 등 생체 여러 조직 및 기관에 자리잡고 있다. 면역세포 구성원에는 임파구, 단핵식세포, 다핵형 백혈구 및 혈소판 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 임파구와 단핵식세포로 알려져 있다¹⁾. 이 중 특히 임파구 증식능은 각종 마이토젠, 항원, 사이토카인, 성장인자 등 여러 종류의 자극에 의하여 생성된 새로운 DNA 합성과 더불어 세포분열의 결과로 나타나는 하나의 과정으로 면역 지표로 여겨지고 있다^{11,13,14)}. 사이토카인은 자연 및 특이면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 자연면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 감하게 하거나 특수화하는데 관여하는 특이면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 그래서 본 실험에서는 전통적으로 健胃, 止嘔, 化濕 등의 효능이 있는 것으로 알려진 藿香과 자양·강장 효과가 뛰어나며 약성이 온화해 虛를 補하고 燥血을 초래치 않으므로 장기간 복용해도 無毒한 것으로 알려진 黃芪 그리고 蘇葉, 白朮, 白茯苓을 주성분으로 한 藿香正氣散의 變方인 새로운 면역증강효과를 가진 韓方混合液을 제조하였다. 이러한 韓方混合液의 免疫反應 조절자로서의 가능성을 기존의 면역증강제와 함께 생체면역반응에서 면역 활성화와 관련된 면역 장기의 무게 변화와 더불어 면역 반응과 사이토카인 유전자 발현 및 임파구 세포증식능 등에 어떠한 영향을 미치는 지에 관하여 조사함으로써 새로운 韓方混合液의 免疫增強 效果에 관한 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검액의 준비

본 실험에 사용된 한방혼합액 APA-01의 재료 내용과 분량은 Table 1과 같다. 시료의 준비는 혼합약재 32kg에 정제수 250kg을 가하여 고온 가압솥에서 4시간 추출한 후 착즙기로 착즙하였다. 이때 추출량은 200kg으로 추출 BRIX는 4.0%였으며, 다시 2차 추출하여 최종 추출량은 150kg으로 추출 BRIX는 2.0%였다. 이를 300mesh pass여과 한 후 진공 농축하여 14.1kg의 농축량을 얻었다. 이를 냉장고에 보관하며, 사용 할 때는 일정량을 멸균 증류수에 녹인 후 열을 가하여 완전히 녹인 후 사용하였다.

Table 1. Composition of APA-01

한약명	학 명
곽향	Agastache rugosa O. Kuntze
황기	Astragalus membranaceus Bunge
소엽	Folium perillae
백출	Atractylodes japonica Koidzumi
백복령	Poria cocos Wilf

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 5-6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)대

한바이오텍 (충북 음성, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 마우스에 사료와 물은 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 5\%$ 를 유지하였다. APA-01은 증류수에 녹여 30일 동안 2일에 1회씩 오전 10시에 각각 경구 투여하였으며, 대조군은 생리 식염수를 경구 투여하였다.

3. 면역저해제 투여

Methotrexate (MTX; $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_6\text{O}_5$, Sigma, U.S.A.)를 생리식염수에 녹여 용량을 1mg/kg으로 조정하여 4일간 오전 10시와 오후 2시에 경구 투여하였다.

4. 체중 및 장기 무게 측정

APA-01의 투여에 의한 마우스 체중 변화와 상대적 장기 중량의 백분율을 구하기 위해 사료 투여 전과 후에 각각의 마우스 체중을 측정하였다. 체중을 측정 후 마우스를 에테르로 마취시켜 희생시키고, 간, 비장 및 신장의 무게를 측정하였다. 상대적 장기 중량의 백분율은 최종 체중에 대한 각각 장기 중량의 백분율로 표시하였다.

5. 비장세포 분리

에테르 마취 후 심장에서 혈액을 채취 후 70% 알코올로 분무한 후 무균적으로 비장을 적출 하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 단일 비장세포로 만든 후 4°C HBSS (GibcoBRL, NY, U.S.A) 용액으로 2회 세척하였다. ACK lysis 용액을 가하여 적혈구를 완전히 용혈시킨 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) 배지로 한 번 더 세척한 후 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유 시켰다. 일정액을 취하여 0.4% trypan blue 염색액에 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 생세포 수를 측정하여 사용하였다.

6. 비장세포 증식능 실험

마우스 비장세포를 $2 \times 10^5/100\mu\text{l}$ 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 시료를 농도별로 가하여, 총량이 $100\mu\text{l}$ 가 되게 조정하여 37°C , 5% CO_2 배양기에 넣어 24시간 배양하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위한 방법으로는 Promega사의 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다. 간략하게 기술하면 배양액 $100\mu\text{l}$ 에 시약을 $20\mu\text{l}$ 첨가한 후 37°C , 5% CO_2 배양기에 넣어 1시간 30분 배양한 후 ELISA reader로 490nm에서 측정하였다. 임파구 증식 결과는 실험군의 평균 O.D.에서 background O.D.를 뺀 값으로 표시하였다.

7. LPS 및 Con. A와의 상관반응 실험

비장세포의 활성화에 따른 시료의 영향을 살펴보기 위하여 각각 T cell 특이 mitogen인 concanavalin A (Con. A; Sigma,

U.S.A, 3 μ g/ml) 및 B cell 특이 mitogen인 lipopolysaccharide (LPS; *E. coli* serotype 055:B5, Sigma, U.S.A, 6 μ g/ml)에 대한 비장세포 증식능을 조사하였다. 마우스 비장세포를 2 \times 10⁵/100 μ 세포가 되게 세포수를 조정하여 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음, 여기에 세포 증식능이 가장 높은 시료의 농도에 각각 Con. A와 LPS를 함께 넣어 3배수로 96 well flat bottom에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 24 시간 배양한 후 임파구 증식능에서와 같이 Promega사의 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell proliferation Assay kit를 사용하여 측정하였다.

8. RT-PCR (역전사 중합효소 연쇄반응)

RNA 분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 TRIzol 900 μ l를 첨가하여 균질화 시켰다. 여기에 클로로포름 100 μ l를 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 위층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC-에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer에서 농도를 결정하였다. 5 \times RT buffer 2 μ l, 10mM dATP 0.25 μ l, 10mM dGTP 0.25 μ l, 10mM dTTP 0.25 μ l, 10mM dCTP 0.25 μ l, MMLV reverse transcriptase (200U/ μ l) 0.25 μ l, RNase inhibitor (28U/ μ l) 0.25 μ l, 50 μ M oligo dT primer 0.5 μ l, DEPC-DW 4 μ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들고 여기에 total RNA를 첨가하였다. 이 시험관을 PCR machine (PTC-100TM Programmable Thermal Controller; MJResearch, Inc.)에 넣어 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 먼저 10 \times PCR buffer 3 μ l, 25mM MgCl₂ 1.8 μ l, 10mM dATP 0.3 μ l, 10mM dGTP 0.3 μ l, 10mM dTTP 0.3 μ l, 10mM dCTP 0.3 μ l, 50 μ M sense 및 antisense primer 0.25 μ l, Taq polymerase (5U/ μ l, Promega) 0.25 μ l를 혼합하고, 여기에 DW를 넣어 최종 용량이 20 μ l되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물 5 μ l를 넣고 혼합한 뒤 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에 3분간 1cycle 반응 후, 94 $^{\circ}$ C 45초, 57 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초간 35cycles 반응시켰으며, 72 $^{\circ}$ C에서 10min extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 UV transilluminater를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아 (충북 청원, 한국) 사에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

9. Flow cytometry

각 실험군의 비장세포의 phenotype를 조사하기 위하여 마우스 비장세포를 LPS와 APA-01을 처치하여 48시간 배양한 후 배양된 비장세포에 phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD3 mAb, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated

rat anti-mouse CD4 mAb를 제조회사의 설명에 따라 염색한 후 FACScan을 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

Table 2. Primer sequences used for detection of cytokine and inflammatory related gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5'-CCA CCG AGA AGA CTG TGG ATG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-1 α	5'-CAC TAT CTC AGC ACC ACT TG-3' 5'-CTG GAA GTC TGT CAT AGA GG-3'
IL-1 β	5'-CCG TGG ACC TTC CAG GAT GA-3' 5'-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GC-3'
IL-12p40	5'-GAC ATG TGG AAT GGC GTC TC-3' 5'-CCA ACC AAG CAG AAG ACA GC-3'
COX-1	5'-CCT GTT GTT ACT ATC CGT GC-3' 5'-GTA GTC ATG CGC TGA GTT GT-3'
COX-2	5'-TTG AAG ACC AGG AGT ACA GC-3' 5'-GGT ACA GTT CCA TGA CAT CG-3'

10. 통계 처리법

모든 실험결과는 means \pm S.D.로 나타내었고, 각 실험군간의 측정치에 대한 자료분석은 각 군간 ANOVA와 Duncan's test에 의해 검정하였다.

결 과

1. 시료 투여에 의한 체중 및 장기 무게의 변화

시료의 투여가 체중 및 장기 무게에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 실험군간 실험 전과 후의 체중을 측정하고, 각 장기를 분리하여 무게를 측정하여 변화를 비교하였다. 체중 변화의 경우 APA-01의 투여와 다른 실험군간에는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Table 3). 비장, 간장 및 신장의 체중에 대한 상대중량비에서는 각 실험군간에 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다. APA-01의 독성효과를 살펴보기 위하여 고농도의 APA-01 (1g/kg)을 복강에 주사하여 관찰하였다. 고농도의 APA-01의 투여에 따른 마우스의 생존율과 행동상의 변화를 관찰한 결과 생존율은 실험종료 후까지 지속되었으며, 행동상의 변화도 관찰 할 수 없었다.

Table 3. Effects of APA-01 on the body weights and immune organ weights change of ICR mice

Group	Dosage (mg/kg /day)	Change of body weights (%)	Relative organ weights (%)		
			Spleen	Liver	Kidney
Control	0	109 \pm 0.87	0.32 \pm 0.02	4.97 \pm 0.28	1.15 \pm 0.03
APA-01	50mg	109 \pm 3.80	0.36 \pm 0.04	5.06 \pm 0.38	1.14 \pm 0.07
MTX	1mg	108 \pm 2.86	0.35 \pm 0.05	5.32 \pm 0.21	1.28 \pm 0.18
MTX+APA-01	1mg + 50mg	110 \pm 3.45	0.38 \pm 0.04	5.23 \pm 0.63	1.20 \pm 0.08

Female ICR mice received methotrexate(MTX) orally for 4 days and received APA-01 orally every other day for 30 days prior to sacrifice. Body and organ weights were determined and values are means \pm S.D. Change of body weight(%)=(final body weight/initial body weight) \times 100. Relative organ weight(%)=(organ weight/final body weight) \times 100.

2. 비장세포 증식에 미치는 영향

APA-01의 면역계에 대한 작용기전을 조사하기 위하여 APA-01의 비장세포 증식능을 관찰하였다. 마우스 비장세포를

분리 후 *in vitro* 상에서 여러 가지 농도 (0, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 APA-01를 처리하여 이에 대한 세포 증식능을 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비하여 APA-01의 처리 시 비장세포의 증식능이 각각 58%, 84%, 102%로 농도 의존적으로 유의하게 증가됨이 관찰되었으나, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서는 세포증식능이 다소 억제 (73%)됨이 관찰되었다. (Fig. 1).

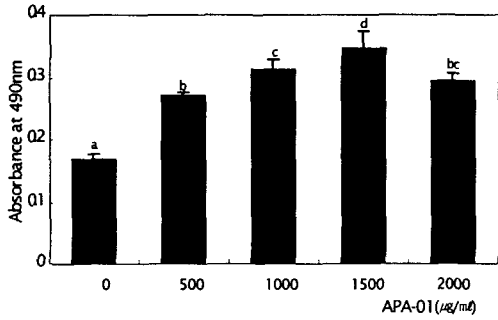


Fig. 1. Dose response of APA-01 on the proliferation of mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/well) were cultured with various concentrations (0, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of APA-01 for 24hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as means \pm S.D. in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates a significant difference between groups by $p < 0.05$.

3. Con. A 및 LPS와의 상관반응

비장세포의 활성화에 따른 APA-01에 대한 반응의 변화를 살펴보기 위하여 각각 T 세포 특이 mitogen인 concanavalin A (Con. A)와 B 세포 특이 mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)에 대한 비장세포 증식능을 관찰하였다. 사용한 APA-01 자체가 세포 증식 효과가 있음이 관찰되었고, B 세포 특이 mitogen인 LPS를 함께 배양하였을 때 LPS 단독에 의한 세포 증식 효과에 비해 APA-01 동시 처리 시 통계적으로 유의하게 세포 증식이 상승 (53%)됨이 관찰되었다. Con. A와의 배양에서도 Con. A 단독에 비해 APA-01을 함께 처리하였을 때 비장세포 증식능이 21% 증가되었다 (Fig. 2).

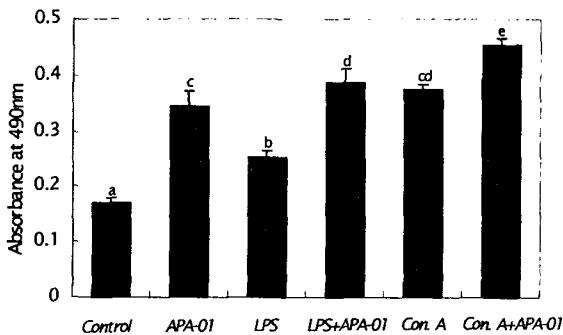


Fig. 2. Interaction of APA-01 with LPS or Con. A. Spleen cells from ICR mouse were incubated with APA-01 (1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and lipopolysaccharide (LPS; *E. coli* serotype 055:B5) or concanavalin A (Con. A) for 24hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as means \pm S.D. in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates a significant difference between groups by $p < 0.05$.

4. 비장세포증식 억제 보호효과

APA-01의 면역반응 억제 보호 효과를 관찰하기 위하여, 면역억제제인 MTX를 처리하여 감소된 임파구 증식능에 미치는 APA-01의 효과를 살펴보았다. 먼저 MTX의 비장세포 증식을 50% 억제하는 농도를 구하였다 (IC_{50} ; 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$). APA-01을 비장세포에 처리시 세포 증식능은 대조군에 비해 175% 증가되었으나, MTX (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 처리시 세포 증식능은 대조군에 비해 61% 감소되었다. 그러나 MTX와 APA-01의 동시 처리시 세포 증식능은 MTX 단독 처리군에 비해 5.67배 증가되었다 (Fig. 3).

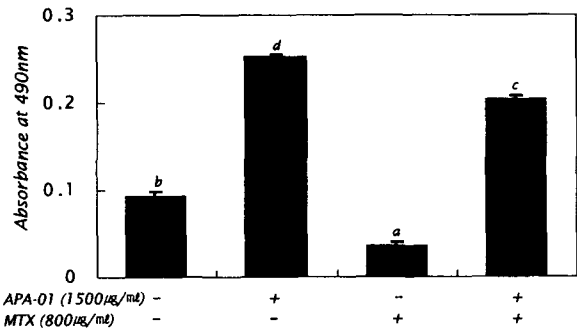


Fig. 3. Effect of APA-01 on the proliferation of MTX-treated mouse spleen cells. Spleen cells from ICR mouse were incubated with MTX only or with APA-01 for 24hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Results are expressed as means \pm S.D. in triplicate cultures. Different letter on the top of the line indicates a significant difference between groups by $p < 0.05$.

5. APA-01에 의한 비장세포에서의 cytokine 및 염증반응 관련 유전자 발현양상

APA-01의 면역계에 대한 작용기전을 조사하기 위하여, 마우스 비장세포에서의 cytokine 유전자 및 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 마우스 비장세포에 한방혼합액 APA-01을 농도별로 가하여 IL-12p40, IL-1 α , IL-1 β 및 cyclooxygenase(COX) 유전자 발현을 관찰하였다. 이들 중IL-12p40,

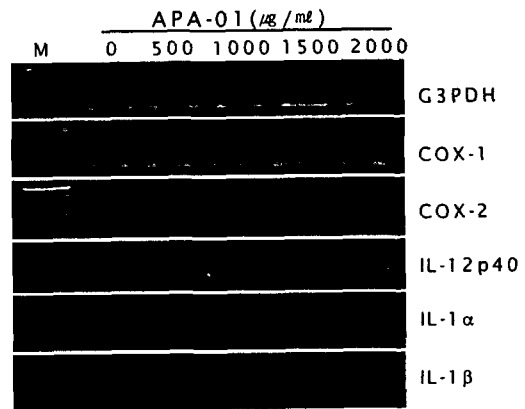


Fig. 4. Dose effect of APA-01 on cytokine mRNA expression in mouse spleen cells. Mouse spleen cells ($4 \times 10^6/\text{ml}$) were stimulated with various concentration of APA-01 for 24hr. Total RNA was isolated from the cultured cells using TRIzol and RT-PCR were performed. M: 100bp size marker; G3PDH was used as control genes.

고찰

IL-1 α 및 IL-1 β 의 유전자 발현은 관찰되지 않았다. 그러나 cyclooxygenase 유전자 중 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유전자 발현이 농도 의존적으로 증대됨이 RT-PCR 결과에서 관찰되었다 (Fig. 4). APA-01에 의해 유도된 COX-2 유전자 발현이 면역억제제의 처치에 의해 영향을 받는지를 살펴보기 위해 MTX와 MTX 처치와 동시에 APA-01을 처치하여 COX-2 유전자 발현의 변화를 관찰하였다. APA-01은 MTX 처치에도 불구하고 COX-2 유전자 발현을 유지시킴이 관찰되었다 (Fig. 5).

韓醫學에서는 疾病因子에 관한 것보다는 인체의 생활능력과 疾病에 대한 抵抗能力을 중시하여 치료방법이 대부분 인체의 氣의 보존과 배양을 목표로 하고 있다. 이러한 관점은 西洋醫學 중 에서 생체의 방어기능에 관계된 면역학적 관점과 많은 유사성을 가지고 있다. 최근 한의학에서 사용되고 있는 많은 처방들에 관한 면역반응 증강 효과에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다¹⁹⁻²³⁾. 免疫反應이란 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 體液性 면역반응과 細胞性 면역반응이 있다. 이러한 면역반응의 적절한 조절은 疾病의 예방뿐만 아니라 치료에 있어서도 중요하다. 따라서 면역조절효과를 갖는 면역증강제의 개발에 관한 많은 연구들이 수행되고 있다. 대부분의 기존 면역증강제가 생체에 대한 독성이 커서 활용도가 낮은 실정이기 때문에 오랜 기간 동안 韓醫學에서 면역을 증강시키는 것으로 알려진 여러 本草 및 方劑에 관한 다양한 연구가 현재 진행되고 있다²¹⁻²⁴⁾. 여기서 우리는 藿香正氣散의 變方인 'APA-01'의 면역계에 대한 증강효과를 살펴보기 위하여 APA-01의 마우스내 경구 투여, methotrexate의 투여에 의한 면역억제시 APA-01이 생체면역반응에 면역 활성화와 관련된 면역 장기의 무게 변화와 더불어 면역 반응 관련된 유전자 발현 및 비장세포 증식능에 어떠한 영향을 미치는 지에 관하여 조사하였다. 체중 및 면역 장기의 무게 변화는 면역계의 이상을 간접적 확인의 지표라 할 수 있어 가장 기본적인 지표로 이용되고 있다. 따라서 여러 면역활성과 관련된 한약의 투여에 의한 실험동물의 체중 증가에 의한 보고들이 있다^{11,25)}. 이번 실험에서는 유의성 있는 체중 및 면역관련 장기의 증가는 관찰되지 않았다. APA-01의 독성효과를 살펴보기 위하여 고농도 (1g/kg)의 APA-01을 직접 복강에 주사하여 마우스의 생존율과 행동상의 변화를 관찰한 결과 생존율은 실험 종료 후 까지 지속되었으며, 행동상의 변화도 관찰 할 수 없었다. Methotrexate (MTX)는 면역억제제로서 생체에 투여하게 되면 DNA 합성을 저해하고 세포 독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소 현상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 이러한 MTX로 유도된 면역억제 동물에 한방에서 사용되는 사군자탕이나 사물탕이 면역억제 동물의 면역 기능 향진에 관한 연구결과들이 보고되었으며, 황기수침이 MTX를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 연구에서 황기 수침은 면역 억제된 마우스에 백혈구 수를 증대시킴이 보고되었다²⁶⁻²⁸⁾. 임파구의 증식은 각종 mitogen, 항원, cytokine, 성장인자 등 여러 종류의 자극에 의하여 초래된 새로운 DNA 합성과 더불어 세포분열의 결과로 나타나는 하나의 과정으로 이러한 임파구 증식능의 측정은 면역지표의 하나로 여겨지고 있다²⁹⁻³¹⁾. 한방혼합액 APA-01이 비장세포 증식에 미치는 효과를 조사해본 결과, *in vitro*상에서 비장세포의 증식능이 한방혼합액 APA-01에 대하여 농도 의존적으로 증가되었다. 이는 APA-01이 직접 mitogen으로 작용될 수 있는 있음을 간접적으로 제시하는 결과라 할 수 있다. 또한 APA-01의 T 세포와 B 세포에 대한 비장세포 증식능을 관찰하기 위하여 T 세포 특이 mitogen인 concanavalin A (Con. A)와 B 세포 특이 mitogen인 lipopolysac-

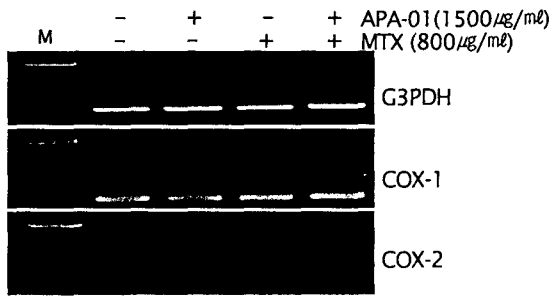


Fig. 5. Effect of APA-01 on the expressions of COX-1 and COX-2 mRNA in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (4×10^6 /ml) were incubated with MTX only or with APA-01 for 24hr. After stimulation, total RNA was isolated from the cultured cells using TRIzol and RT-PCR were performed. M: 100bp size marker; G3PDH was used as control genes.

6. APA-01 처치에 의한 비장세포 표현형의 변화

한방혼합액 APA-01 처치에 의한 마우스 비장세포의 표현형의 변화를 관찰하기 위하여, 배양된 마우스 비장세포에 APA-01을 처치하여 48시간 후 CD3와 CD4 발현 양상을 관찰하였다. 유세포 측정기로 측정된 결과, 대조군에 비해 APA-01 처치 군에서 마우스 비장세포의 CD4 발현이 LPS 처치군과 유사하게 증가됨이 관찰되었다 (Fig. 6).

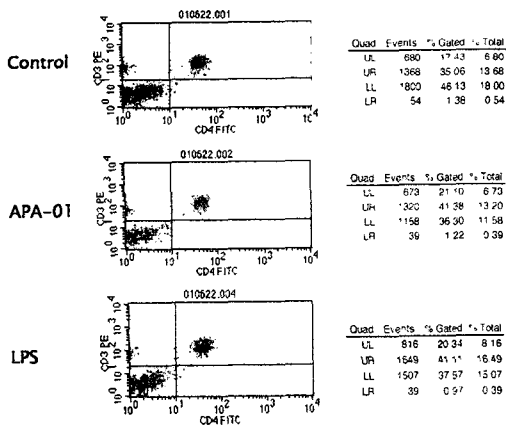


Fig. 6. Flow cytometry analysis of APA-01 treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (4×10^6 /ml) were incubated with APA-01 or LPS for 48hr. The cultured spleen cells were stained with phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD3 mAb and fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated rat anti-mouse CD4 mAb, and analyzed by flow cytometry.

charide (LPS)을 사용하여 각각에 대한 세포 증식 효과를 관찰하였다. 이번 연구에서 APA-01은 B 세포 특이 mitogen인 LPS를 함께 배양하였을 때 LPS에 의한 세포 증식 효과를 상승시켜주는 것으로 관찰되었으며, Con. A와의 동시 배양에서도 통계적으로 유의한 상승 효과가 관찰되었다. 이는 APA-01이 B와 T 세포의 증식에 둘 다 영향을 미치며, 특히 B 세포 증식에 더 영향을 미치는 것으로 생각된다. APA-01의 마우스 비장세포의 표현형의 변화를 관찰한 결과, 배양된 마우스 비장세포에 APA-01을 처치하여 48시간 배양한 후 유세포 측정기로 측정한 결과, 대조군에 비해 APA-01 처치 군에서 마우스 비장세포의 CD4 발현이 LPS 처치군과 유사하게 증가됨을 관찰되었다. 이러한 결과로 볼 때, APA-01은 CD4 발현의 증대를 통하여 B 세포 증식을 촉진하는 것으로 추측되며, 이러한 관찰은 사용한 한방혼합액 APA-01이 면역세포를 활성화시킴으로 인하여 면역 증강에 기여함을 시사한다고 볼 수 있다. 임파구를 비롯한 많은 면역 관련 세포들은 cytokine을 분비하여 각 세포에 신호를 전달하여 세포증식 및 분화에 관련하여 면역반응 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다^{1,13,18,30}. 따라서 본 연구에서는 비장세포를 이용하여 APA-01 처치 시에 면역활성과 관련된 cytokine의 발현양상에 관하여 조사하였다. 이번 실험의 결과 비장세포에서는 면역반응 증대와 관련된 cytokine의 발현은 관찰되지 않았는데, 이는 단방이 아닌 복합 형태의 한방혼합액이 각각 작용하여 이들 cytokine의 발현을 상호 조절하는 것으로 생각된다. 이러한 상호 조절은 생체내 항상성의 유지에서 볼 때 의미 있는 결과로 생각된다. 이번 실험에서는 prostaglandin을 합성하여 항상성 유지에 관여하는 효소로 알려져 있는 cyclooxygenase 효소의 발현이 매우 흥미롭게 관찰되었다. Cyclooxygenase (COX) 유전자는 두 가지 isoform을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, cyclooxygenase-1 (COX-1)은 주로 endoplasmic reticulum에 존재하는 일상유지 유전자 (housekeeping gene)로 지속적으로 전사되어 만들어지는 효소로 생리적 호르몬에 의하여도 조절되고 prostaglandin을 합성하여 항상성 유지에 관여하는 효소로 알려져 있다. 이에 반해 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 주로 핵막에 존재하며 위기상황대기 유전자 (immediate early gene)에 의하여 상승 조절된 mRNA를 통하여 조절되는 유도 효소 (inducible enzyme)로 위기 상황 시에 COX-2는 성장인자 (growth factor)나 cytokine 등에 의해 유도되어 염증 반응이 빠르게 prostaglandin을 합성하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 이번 실험의 결과 한방혼합액 APA-01을 마우스 비장세포에 처치 시 COX-2 유전자의 발현이 관찰되었는데, 이러한 COX-2의 발현은 아마도 prostaglandin을 빠르게 합성하여 면역반응을 신속하게 유도하기 위한 작용으로 볼 수 있을 것이다. 그리고 이러한 COX-2의 발현은 한방혼합액 APA-01에 대하여 농도 의존적으로 발현이 증대되었으나, 이러한 COX-2의 발현이 이미 과다 발현이 되어 있을 경우 사용한 한방혼합액 APA-01의 처치로 인하여 COX-2의 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었다 (data not shown). 또한 면역억제제인 MTX의 처치에도 불구하고 APA-01 처치에 의해 COX-2 유전자 발현이 유지되었다. 이러한 유전자 발현의 조절기

능을 볼 때 APA-01은 생체의 적절한 면역 반응을 유도하여 생체의 면역반응을 증대시키고 동시에 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 생물 활성 조절자 (BMR)로 작용할 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

결 론

곽향정기산 (藿香正氣散)의 變方인 한방혼합액 APA-01의 면역증강효과를 실험적으로 평가하고자 마우스에 APA-01의 경구 투여로 인한 체중증가 및 장기무게 변화, 면역억제제를 이용한 실험 및 마우스 비장세포를 이용하여 세포증식능과 면역관련 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 마우스에 APA-01의 경구 투여에 의한 체중 및 면역관련 장기의 무게 변화는 각 실험군간에 통계적인 유의성은 관찰되지 않았고, APA-01의 독성효과를 살펴보기 위하여 APA-01 (1g/kg)을 복강에 주사하여 마우스의 생존율과 행동상의 변화를 관찰한 결과 생존율은 실험 종료 후 까지 지속되었으며, 행동상의 변화도 관찰할 수 없었다. 또 비장세포의 증식능이 한방혼합액 APA-01에 대하여 농도 의존적으로 증가되었으며, APA-01은 B 세포 특이 mitogen인 LPS 및 T 세포 특이 mitogen인 Con. A를 함께 배양하였을 때 LPS와 Con. A 단독 처치군에 비해 유의한 세포 증식 효과를 나타내었다. APA-01에 의한 마우스 비장세포에서의 사이토카인 발현 관찰에서, IL-12p40, IL-1 α 및 IL-1 β 의 유전자 발현은 관찰되지 않았으나, COX-2 유전자 발현은 관찰되었으며 COX-2 유전자가 APA-01 농도 의존적으로 발현이 증대되었다. 또한 면역억제제인 MTX의 처치에도 불구하고 APA-01 처치에 의해 COX-2 유전자 발현이 유지되었다. 비장세포의 표현형의 변화에서 대조군에 비해 APA-01을 처치하여 48시간 배양한 마우스 비장세포의 CD4 발현이 LPS 처치군과 유사하게 증가됨이 관찰되었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 APA-01은 비장세포에 적절한 면역반응을 유도하여 면역 증강 효능을 가진다고 추정된다.

참고문헌

1. 김세중, 면역학. 1-21. 고려의학. 1994.
2. 홍문엽, 박원환, 신상습, 최달영, 이태균. 신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 IL-1 α 의 유전자 발현에 미치는 영향. 동의병리학회지. 13: 33-40. 1999.
3. 전병훈, 이진홍, 정우열. 황기도홍탕(黃道桃紅湯)의 항종양 효과 및 면역조절반응에 관한 연구. 동의병리학회지. 10: 133-143. 1996.
4. 김기환, 이인란, 정인성, 정희용, 윤연숙. 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현. 고려인삼학회지. 22: 324-330. 1998.
5. 安德均. 면역과 한방. 19-21. 서울 열린책들. 1994.
6. Zhao KS, Mancini C, Doria G. Enhancement of the immune response in mice by Astragalus membranaceus extracts. Immunopharmacology. 20: 225-233. 1990.

7. Rittenhouse JR, Lui PD, Lau BH. Chinese medicinal herbs reverse macrophage suppression induced by urological tumors. *J Urol.* 146: 486-490. 1991.
8. Kurashige S, Jin R, Akuzawa Y, Endo F. Anticarcinogenic effects of shikaron, a preparation of eight Chinese herbs in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Invest.* 16: 166-169. 1998.
9. Jin R, Kurashige S. Effects of Chinese herbs on macrophage functions in N-butyl-N'-butanolnitrosoamine treated mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 18: 105-114. 1996.
10. 이인선, 하영득. 생약제가 면역세포 활성화에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지.* 23: 150-155. 1994.
11. 표명윤, 양기숙, 현수미. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. *응용약물학회지.* 9: 194-200. 2001.
12. 백남인, 김영숙, 경종수, 박기현. 황기(黃耆)의 간기능 보호 성분. *생약학회지.* 27: 111-116. 1996.
13. 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향. *대한면역학회지.* 12: 113-118. 1990.
14. 조성기, 윤연숙, 박승용, 문은이, 박은규. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향(II). *대한면역학회지.* 13: 71-78. 1991.
15. 길영성, 정승기, 이형구. 어성초 및 상국음이 면역기능에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 16: 295-318. 1995.
16. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 10: 8-15. 2000.
17. Okamura S, Shimoda K, Yu LX, Omori F, Niho Y. A traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-yoei-to) augments the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 13: 595-598. 1991.
18. 김종수, 신상습, 김철호, 박선동, 박원환. 신수혈의 침자극과 황기약침이 실험용 생쥐의 면역활성물질인 cytokine의 IL-6 발현에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 15: 147-155. 1998.
19. 송봉근, 이연정, 김형균, 진선두, 김성재, 김동혁. 황기가 면역세포의 기능에 미치는 영향. *대한본초학회지(본초분과학회지).* 13: 115-128. 1998.
20. Jin R, Wan LL, Mitsuishi T, Sato S, Akuzawa Y, Kodama K, Kurashige S. Effect of shi-ka-ron and Chinese herbs on cytokine production of macrophage in immunocompromised mice. *Am J Chin Med.* 22: 255-66. 1994.
21. 서영준. 식품을 이용한 화학적 암예방. *식품과학과 산업.* 30: 59-63. 1997.
22. 배만종. 인삼 엑기스의 경구 면역 관용에 관한 연구. *한국식품영양학회지.* 9: 176-180. 1996.
23. Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. Effects of astragali radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Invest.* 17: 30-35. 1999.
24. 정하열, 김현배. 13종 허브추출물의 수퍼옥사이드 소거능과 세포독성 및 면역증강 효과의 *in vitro*계 검색. *한국식품과학회지.* 32: 699-705. 2000.
25. 김용석, 이재동, 김창환, 최도영, 박동석, 남상수, 강성길, 이윤호, 안병철, 최용태, 고희균, 주정주. 공진난 약침자극이 혈액 및 각 면역 조직의 임파구와 CD4+ T세포에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 16: 179-202. 1999.
26. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *동국대학교대학원 박사학위논문.* 1996.
27. 김창환, 고희균, 배원영. 황기수침(黃耆水鍼)이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 11: 49-66. 1994.
28. 김일영, 이상재, 김광호. 하수오가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *대한예방한의학회지.* 4: 152-169. 2000.
29. Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchida H. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured *Panax ginseng*. *Biochem Biophys Res Commun.* 200: 1672-1678. 1994.
30. 박종욱, 한인숙, 서성일, 백원기, 서민호, 배지현, 최병길. 인삼 사포닌이 인간면역계 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향. *고려인삼학회지.* 20: 15-22. 1996.
31. 정태준, 김정목, 조양자, 정용훈, 임대철. 마이토젠 및 림포카인이 마우스 비장 세포 임파구 및 사람 말초 혈액 임파구 증식 반응에 미치는 영향. *대한면역학회지.* 11: 89-96. 1989.
32. Lin CH, Sheu SY, Lee HM, Lee WS, Ko WC, Sheu JR. Involvement of Protein kinase C- α in IL-1 β induced cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 57: 36-43. 2000.
33. Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, Haeggstrom JZ, Samuelsson B, De Witt D, Hokfelt T. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res.* 303: 235-252. 2001.