

芎藭化痰煎과 清神化痰煎의 면역조절효과

김락형* · 권진¹ · 이광규 · 정한솔 · 오찬호²

우석대학교 한의과대학, 1: 군장대학 보건행정과, 2: 우석대학교 생명공학부

Immunoregulatory Effects of Gungchihwadam-jeon and Cheongsinhwadam-jeon

Lak Hyung Kim*, Jin Kwon¹, Kwang Gyu Lee, Han Sol Jeong, Chan Ho Oh²

College of Oriental medicine, Woosuk University, 1: Department of Health Administration, Kunjang College, 2: Division of Biotechnology, Woosuk University

This study was performed to evaluate the immunoregulatory effects of Gungchihwadam-Jeon(芎藭化痰煎, GCHDJ) and Cheongsinhwadam-Jeon(清神化痰煎, CSHDJ). GCHDJ or CSHDJ was administered(p.o.) once a day for 14 days to mice. By the treatment of GCHDJ or CSHDJ was increased the cell viability of cultured mice splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells. Administration of GCHDJ or CSHDJ was increased the splenic T lymphocyte, especially the Tc cell subpopulation was increased by the GCHDJ, on the while the TH cell was increased by the CSHDJ. The administration of GCHDJ or CSHDJ was significantly increased the apoptosis of transplanted-L1210 leukemia cells to mice peritoneal cavity. These results suggest that GCHDJ and CSHDJ have an immunoregulatory action

Key words : Gungchihwadam-Jeon(芎藭化痰煎), Cheongsinhwadam-Jeon(清神化痰煎), splenocytes, thymocytes, mesenteric lymph node cells, L1210 leukemia cells, apoptosis

서론

스트레스는 신경내분비계, 자율신경계, 면역계를 통하여 인체에 영향을 주게되며, 특히 심리적 스트레스는 각종 면역기능을 감소시키고 신체적 질병에 대한 감수성을 증대시킨다^{1,2)}. 한의학에서는 정신적 스트레스에 의한 인체의 반응을 七氣, 九氣, 中氣, 氣痛, 氣鬱, 氣逆 등 인체내 氣의 변화로 파악하고 있다³⁾. 芎藭化痰煎은 六鬱湯의 變方으로 김의 《晴崗醫鑑》⁴⁾에 기재되어 脫營氣鬱로 인한 不安 焦燥 不消食 痞悶하며, 或 胸膈停痰, 咽下梅核, 腹中動悸 등 신경성으로 인한 諸症에 광범위하게 사용된 처방이며, 清神化痰煎은 溫膽湯의 變方으로 역시 김의 《晴崗醫鑑》에 기재되어 七情六鬱로 心火亢甚하여 暴喜暴怒, 欲成癡狂하는 등 氣鬱化火로 인한 신경증에 광범위하게 응용된 처방이다.

理氣解鬱의 작용과 祛痰 清熱의 효능으로 氣鬱로 인한 諸神經證 및 心火亢甚으로 인한 여러 질환에 활용되는 두 처방은

스트레스로 인한 면역기능의 저하에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 궁치화담전과 청신화담전의 면역계에 미치는 효과를 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 세포주

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 웅성(8 주령, 20±2 g)을 다물Science(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2 ℃, 습도 55±5 %, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다. 또한 실험에 사용한 세포주로는 생쥐유래의 백혈병세포주인 L1210세포를 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium

* 교신저자 : 김락형, 전북 전주시 중화산동 2가 우석대학교 부속한방병원
· E-mail : kimlak@yahoo.co.kr · Tel : 063-220-8617
· 접수 : 2003/05/02 · 수정 : 2003/06/16 · 채택 : 2003/07/30

iodide(PI), concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS), PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 monoclonal antibody 등을 사용하였다. 기기로서는 inverted microscope(Zeiss), flow cytometer(Coulter), ELISA reader(Dynatech), CO₂ incubator, freeze dryer, deep freezer(Vision Scientific Co.) 등을 사용하였다.

3. 검액 조제

본 실험에 사용한 궁치화담전 및 청신화담전의 구성은 《購崗醫鑑》⁴⁾에 따랐으며, 1전을 편의상 4 g으로, 생강 3편은 4 g으로 하여 각 2첩 분량(96 g, 96.8 g)을 증류수 2000 ml로 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 각각 분말 12.5 g, 12 g(수득율: 13.0%, 12.4%)을 얻어(이하 GCHDJ, CSHDJ라 함), 동물실험 시에는 생리식염수, 세포배양시에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 궁치화담전 및 청신화담전 1첩의 처방구성 내용은 다음과 같다.

Tale 1. The Composition of Gungchihwadam-jeon

韓藥名	生藥名	重量 (g)
香附子	Cyperi Rhizoma	10 g
陳皮	Citri Pericarpium	6 g
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4 g
半夏(薑拌)	Pinelliae Rhizoma	4 g
赤茯苓	Poria	4 g
川芎	Cnidii Rhizoma	4 g
連翹	Forsythiae Fructus	4 g
枳殼	Aurantii Fructus	4 g
神麩(炒)	Massa Medicata Fermentata	4 g
梔子(炒)	Gardeniae Fructus	2 g
木香	Aucklandiae Radix	2 g
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	4 g
總重量		48 g

Tale 2. The Composition of Cheongsinhwadam-jeon

韓藥名	生藥名	重量 (g)
香附子	Cyperi Rhizoma	8 g
半夏(薑拌)	Pinelliae Rhizoma	6 g
白茯苓	Poria	6 g
橘皮	Citri Pericarpium	6 g
青竹茹	Bambusae Caulis in Taeniam	4 g
枳實	Aurantii Immaturus Fructus	4 g
遠志	Polygalae Radix	2.8g
黃連(酒炒)	Scutellariae Radix	2.8g
黃芩(酒炒)	Coptidis Rhizoma	2.8g
甘草	Glycyrrhizine Radix	2 g
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	4 g
總重量		48.4g

4. 면역세포 생존율에 미치는 효과 (in vitro)

생쥐를 경추 탈구시켜 비장, 흉선 및 장간막 림프절을 무균적으로 적출하고 각각의 세포를 세정(×3회, PBS, 1500rpm, 10분)해서 각 세포 부유액을 무균 조제한 후, 1×10⁶cells/well이 되도록 세포수를 조정하고, 비장세포 부유액에는 LPS(5 μg/ml), 흉선 및 장간막 림프절세포 부유액에는 Con A(0.5 μg/ml)와 각 농도(0.1, 1, 10 및 100 μg/ml)의 GCHDJ 및 CSHDJ를 각각 첨가하여 48시간 동안 37℃의 CO₂배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μl를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에

녹인 10% SDS 100 μl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁵⁾.

5. 림프구 아집단에 미치는 효과 (in vivo)

생쥐에 14 일 동안 GCHDJ 및 CSHDJ(100, 250 및 500 mg/kg)를 각각 경구 투여(p.o)한 다음 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하고 1×10⁶cells/well에 PE-anti B220/FITC-anti Thy1 antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:30 dilution)로 이중 염색하여 4℃에서 30분간 반응시키고 flow cytometer (excitation: 488 nm. emission: 525 nm/FITC, 575 nm/PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다⁶⁾.

6. 복강에 이식한 L1210세포의 세포자멸사 측정(in vivo)

생쥐에 5×10⁶cells/mL의 L1210(mouse leukemia)세포를 복강 내 주사(i.p)한 다음 GCHDJ 및 CSHDJ(250 mg/kg)를 14 일간 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 복강에서 L1210세포를 무균적으로 수집하고 세포부유액을 조제해서 세정(×3회, PBS)한 후, 1×10⁶cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원심분리(1,500 rpm, 10분)하고 침전시킨 세포분획에 PI(10 μg/ml)를 20 μl /1×10⁶세포의 농도로 염색 (4℃, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용해서 DNA 단편화 (sub-G1 peak)를 정량하였다⁷⁾.

7. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성은 student t-test를 이용하였다.

결 과

1. 궁치화담전 및 청신화담전의 면역세포의 생존율에 미치는 효과 (in vitro)

GCHDJ 및 CSHDJ의 주요 면역장기 중의 세포생존율에 미치는 효과를 세포배양계를 이용해서 살펴본 결과 다음과 같다.

Table 3. Effect of GCHDJ or CSHDJ on the cell viability in mouse splenocytes, thymocytes and mesenteric lymph node cells in vitro.

Treatment	Dose (μg/ml)	Cell Viability(%)		
		Splenocytes	Thymocytes	Lymph node cells
Control		100.0±1.7	100.0±13.1	100.0±1.8
GCHDJ	0.1	110.8±1.9*	103.6±3.1	82.8±3.1
	1.0	104.2±1.9	98.9±6.3	79.6±2.6
	10	103.5±1.5	110.7±6.6	80.9±2.1
	100	102.0±0.6	115.5±9.1	80.7±3.4
CSHDJ	0.1	101.3±2.3	101.7±2.9	83.1±1.1
	1.0	106.7±1.1*	102.8±6.7	113.0±0.7*
	10	102.8±1.1	107.9±6.6	79.9±1.1
	100	99.7±2.0	106.8±1.9	112.6±6.1*

GCHDJ or CSHDJ(0.1~100 μg/ml) was treated to cultured splenocytes, thymocytes or lymph node cells for 48 hrs. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. The data represents the mean±S.D. of 3 experiments. *: Significantly different from control group(p<0.05).

비장세포에서는 GCHDJ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 CSHDJ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 생존율이 유의성 있게 증가하였고, 흉선세포에서는 유의성있는 차이를 나타내지 않았으며, 장간막 림프절세포에서는 CSHDJ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 세포생존율이 유의성 있게 증가하였다 (Table 3, Fig.1,2).

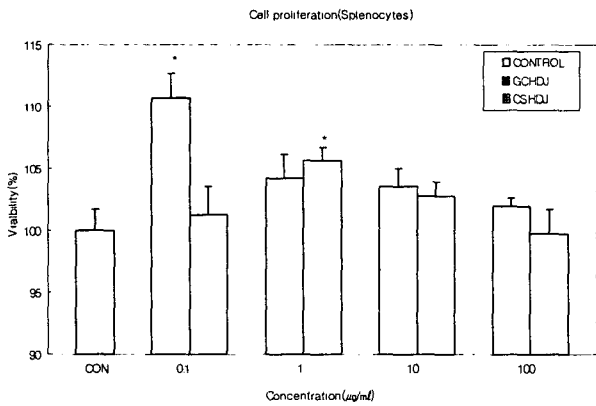


Fig. 1. Effect of GCHDJ or CSHDJ on the cell viability in mouse splenocytes.

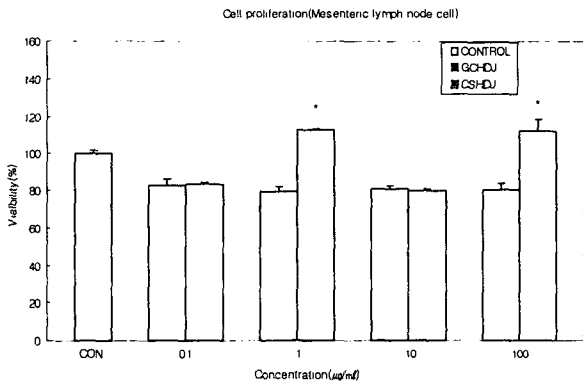


Fig. 2. Effect of GCHDJ or CSHDJ on the cell viability in mouse mesenteric lymph node cells.

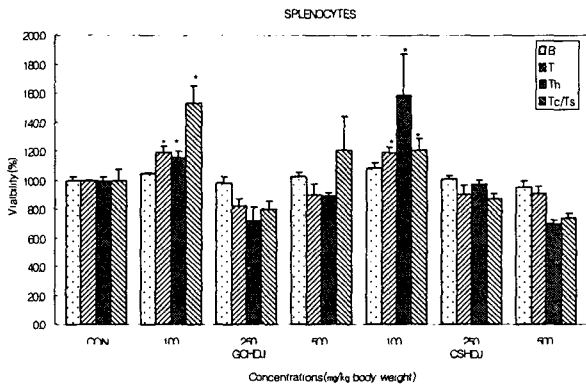


Fig. 3. Lymphocyte subpopulation change of splenocytes in GCHDJ or CSHDJ-administered mice. GCHDJ or CSHDJ were administered p.o. once a day for 14 days, thereafter the cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. The data represents the mean \pm S.D. of 5 mice. *: Significantly different from control group (*p<0.05).

2. 비장 및 흉선림프구 아집단변화에 미치는 효과 (in vivo)

GCHDJ 및 CSHDJ를 투여한 생쥐의 비장 및 흉선세포의 아집단 변화는 비장세포 중 B 및 T 림프구가 대조군에 비하여 GCHDJ 및 CSHDJ 100 mg/kg투여군에서 유의성있게 증가하였으며 비장내 T세포의 아집단분석 결과, GCHDJ 100 mg/kg투여군에서 Tc림프구가 유의성있게 증가하였고 CSHDJ 100 mg/kg투여군에서 T림프구 중 TH림프구가 특히 증가하였다(Fig. 3). 흉선세포에서도 대조군에 비하여 GCHDJ 및 CSHDJ 100 mg/kg투여군에서 현저하게 증가하였다(Fig. 4).

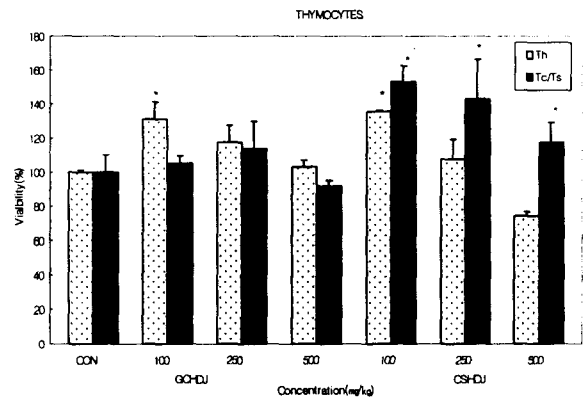


Fig. 4. Lymphocyte subpopulation change of thymocytes in GCHDJ or CSHDJ-administered mice. GCHDJ or CSHDJ was administered p.o. once a day for 14 days, thereafter each cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. Each data represents the mean \pm S.D. of 5 mice. *: Significantly different from control group(*p<0.05).

3. 이식된 L1210백혈병세포의 세포자멸사에 미치는 효과(in vivo)

L1210백혈병세포를 생쥐의 복강내에 이식한 후 GCHDJ 및 CSHDJ(250 mg/kg)을 14 일간 경구투여하고 이식된 L1210세포의 세포자멸사를 관찰한 결과, 대조군(10.9 \pm 0.6%)에 비하여 GCHDJ 및 CSHDJ 투여군에서 각각 28.1 \pm 2.7% 및 42.9 \pm 5.1%로 세포자멸사가 크게 증가하였으며, 특히 CSHDJ 투여군에서 현저하게 촉진되었다(Fig.5).

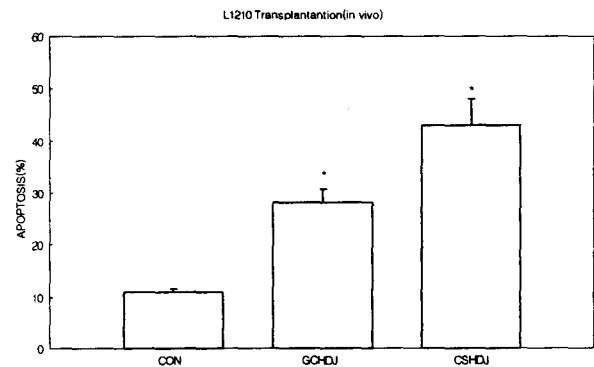


Fig. 5. Effect of GCHDJ or CSHDJ on the apoptosis of transplanted-L1210 leukemia cells. L1210 leukemia cells transplanted to peritoneal cavity of BALB/c mouse. GCHDJ or CSHDJ(250 mg/kg) were administered p.o. once a day for 14 days. Transplanted-L1210 cells were collected from peritoneal cavity and sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. *: Significantly different from control group(*p<0.05).

고찰

스트레스는 자율신경계, 내분비계, 면역계를 통하여 신체상태를 변화시키고 여러 가지 질병을 야기하는데, 특히 심리적 스트레스는 면역기능의 장애를 가져와 각종 내분비장애, 자율신경장애, 암 등을 유발할 수 있다²⁾. 한의학에서는 감정의 변화나 寒熱의 差 등이 일종의 stressor로서 작용하는 데 대한 생체의 반응, 특히 자율신경계의 긴장과 이완에서 오는 諸症候를 七氣, 九氣, 中氣 등 氣의 病證으로 다루고 있다³⁾.

공치화담전과 청신화담전은 김의 《晴嵐醫鑑》⁴⁾에 기재되어 氣鬱로 인한 諸神經證 및 心火亢甚으로 인한 여러 질환에 활용되고 있다. 이러한 두 처방은 스트레스와 관련된 여러 질환 및 증상을 치료할 뿐 아니라 스트레스 상황에서 인체의 면역기능 조절에 효과가 있을 것으로 짐작할 수 있다. 공치화담전에 대하여 박⁵⁾이 구속스트레스 흰쥐에서 항스트레스 효과에 대해 보고한 바 있으며, 김⁶⁾이 두 처방의 항경련 효과 및 경련 유발시 뇌조직에서의 항산화 효과에 대해 보고한 바 있다. 본 연구에서는 감정의 변화가 stressor로 작용하여 氣의 鬱結과 氣鬱化火로 나타나는 여러 증상에 활용되는 공치화담전과 청신화담전이 면역계에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 *in vitro*와 *in vivo*계에서 면역세포의 생존율, 비장 및 흉선립프구 아집단변화 및 복강 내에 이식한 L1210 백혈병세포의 세포자멸사에 대하여 살펴보았다.

In vitro 실험에서 GCHDJ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 CSHDJ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 비장세포의 생존율을 촉진하였으며, CSHDJ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 장간막 림프절세포의 생존율이 증가되었다. 또한 *In vivo* 실험에서 14 일간의 경구투여 후 비장세포 중 T림프구가 GCHDJ 및 CSHDJ 100 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가하였는데, 비장내 T세포의 아집단 분석 결과 GCHDJ 100 mg/kg 투여군에서 Tc 림프구가, CSHDJ 100 mg/kg 투여군에서 TH림프구가 특히 증가하였다. 흉선세포에서 GCHDJ 100 mg/kg 투여군과 CSHDJ 100 mg/kg 투여군에서 TH세포의 증가, CSHDJ 100, 250, 500 mg/kg 투여군에서 Tc세포의 증가를 나타내었다. GCHDJ 및 CSHDJ의 면역세포 활성의 증가는 주로 저농도에서 강하게 나타났는데, *in vitro*에서는 GCHDJ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CSHDJ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서, *in vivo*에서는 GCHDJ 100 mg/kg 투여군과 CSHDJ 100 mg/kg 투여군에서 강하게 나타났다. T세포 아집단분석 결과 GCHDJ 및 CSHDJ는 TH세포 및 Tc세포의 아집단을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 사료된다. 세포자멸사(apoptosis)는 1972년 Kerr, Willie 및 Currie박사가 조직의 괴사와는 전혀 다른 세포의 사망기전을 최초로 설명하면서 비롯되었는데¹⁰⁾, 이는 세포가 죽을 때 사전에 이미 준비되어진 상황에서 사망프로그램을 가동시켜 능동적으로 죽음에 돌입하는 세포의 자발적인 사망기전이다. 기존의 항암요법과 항암제들에 의한 종양세포의 사망이 세포자멸사에 의한 것이라는 것이 확인된 후, 세포자멸사의 연구를 통하여

항암기전을 규명하고 새로운 항암제를 개발하여 임상에 응용하려는 많은 노력이 이루어지고 있다¹¹⁾.

본 실험에서 GCHDJ 및 CSHDJ의 경구 투여로 생쥐의 복강 내에 이식한 생쥐유래의 백혈병세포주인 L1210세포의 세포자멸사를 유의성있게 증가시켰으며, 특히 CSHDJ가 더욱 효과가 있었다.

이상의 결과에서 공치화담전과 청신화담전은 T, B림프구 등의 주요 면역세포의 활성을 증가시키고, 백혈병세포의 세포자멸사를 유도하는 항암작용을 가지고 있어, 정신적 스트레스로 발생하는 인체의 면역력 저하와 그에 수반되는 질병 및 암의 예방과 치료에 활용할 수 있을 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 우석대학교 학술연구비(신임교수 기초연구비 지원)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

1. 고경봉. 스트레스와 정신신체의학. 서울:일조각. 62-70, 2002.
2. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. p.461-469, 1998.
3. 황의완, 김지혁. 동의정신의학. 서울: 현대의학서적사. p.651-652, 1992.
4. 김영훈. 청강의감. 서울:성보사. 248-252, 1992.
5. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65:55-63, 1983.
6. Shortman, K. and Backson, H. The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. Cell. Immunol. 12:230-246, 1974.
7. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods. 139:271-279, 1991.
8. 박두병. 공치화담전의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지. 20(1):172-184, 1999.
9. 김라형. 공치화담전과 청신화담전의 항경련 및 항산화작용에 대한 연구. 우석대학교 학위논문. 2003.
10. Willie A.H., Kerr J.F.R. and Currie A.R.: The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68:251-306, 1980.
11. 金仁鄉. 아포토시스와 종양성장억제. 大韓醫學協會誌. 37(10): 1222-1227, 1994.