

銀翹散의 면역계에 미치는 효과

최신웅 · 오찬호¹ · 권진² · 김정연*

우석대학교 한의과대학, 1: 우석대학교 의약생명공학과, 2: 군장대학 의무행정과

Effects of Eunkyo-San on the Immune System

Shin Woong Choi, Chan Ho Oh¹, Jin Kwon², Jeong Yeon Kim*

College of Oriental Medicine, 1: Department of Medicinal Biotechnology, Woosuk University
2: Department of Medical Administration, Kunjang College

The purpose of this research was to investigate the effect of Eunkyo-San(EKS) on the immune system. Administration of EKS(500 mg/kg) enhanced viability of splenocytes and thymocytes in BALB/c mice, and also EKS increased of splenic B, T lymphocytes and thymic T lymphocytes, significantly increased CD4 positive TH cells. EKS markedly enhanced the production of γ -interferon in mice serum. EKS accelerated the production of nitric oxide in peritoneal macrophages. These results suggest that EKS have an immune-enhancing activity.

Key words : Eunkyo-San(銀翹散), Lymphocytes subpopulation, γ -interferon, Nitric oxide

서론

한의학에서는 모든 질병의 발생을 외감육음, 칠정내상, 음식 등의 병인과 직접적인 관련이 있는 것으로 보고 있으나 정기가 발병의 근본이고 사기가 발병의 조건임을 나타내고 있다. 때문에 정기부족은 발병의 근거로, 병사는 발병의 조건으로 작용한다고 하였다. 정기가 허약할 때는 보익을 위주로 하는 '扶正法'을, 사기가 강할 때는 청열, 해독, 양혈하는 '祛邪法'을 이용하여 왔다¹⁾. '정기'에 대한 개념은 면역세포인 백혈구가 체내로 침입해 들어온 항원을 비자기로 인식해서 그것을 파괴하고 소멸시키는 체계인 <면역>이라는 체계로 이해된다. 면역계는 호중구와 대식세포 등의 식세포와, 세포상해활성을 가진 NK세포 등이 주된 임무를 담당하는 자연 면역과 T림파구 및 항체 등이 반응의 주역이면서 특이적반응인 획득 면역으로 구분된다²⁾.

銀翹散은 비교적 강한 해열작용, 항염작용 등이 있으며 임상적으로는 상기도감염증, 급성 기관지염, 폐렴, 전염성 질환 등에 응용된다고 보고³⁾되어 있으나 실험적 연구보고는 거의 전무한 실정이다.

이에 銀翹散이 면역계에 미치는 영향을 살펴보고자 생쥐의

비장 및 흉선세포의 생존율 및 T, B림파구 아집단분석, 혈청 중 cytokine 생성능, 복강 대식세포에서의 nitric oxide의 생성능 등을 살펴보고 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 웅성(8주령, 20±2 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2°C, 습도 55±5%, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS), sulfanilamide, thioglycolate(Sigma), PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 antibody(Caltag) 등을 사용하였다.

사용기구로서는 96well plate(Costar), inverted microscope(Zeiss), flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), ELISA reader(Dynatech, MR5000) 그 외 centrifuge(VS-15000CF), CO₂ incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision Co.의 제품을 사용하였다.

* 교신저자 : 김정연, 전주시 완산구 중화산동 2-5 우석대학교부속한방병원
· E-mail : jeong626@netian.com, · Tel : 063-220-8626
· 접수 : 2004/03/17 · 수정 : 2004/04/28 · 채택 : 2004/05/29

3. 검액의 조제

실험에 사용한 銀翹散의 구성은 「溫病條辨·卷一·上焦篇」³⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 3첩 분량(174 g)을 증류수 2000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축하고 동결건조하여 분말 23 g(수득율: 13.2 %)을 얻어(이하 EKS라 함), 동물실험시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다.

Table 1. Contents of Eunkyo-San(EKS)

韓藥名	生藥名	重量(g)
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	9
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	9
牛蒡子	<i>Arctii Fructus</i>	9
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	6
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5
荊芥穗	<i>Schizonopetae Herba</i>	5
豆豉	<i>Sojae Semen Praeparatum</i>	5
竹葉	<i>Phyllostachys Folium</i>	4
總量		58

4. MTT법에 의한 비장 및 흉선세포의 생존율 측정

생쥐에 EKS(500 mg/kg)를 7일 동안 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 각 세포부유액을 조제하여 1×10⁶cells/well로 세포수를 조정하고 비장세포 부유액에는 LPS(5 μg/ml), 흉선세포 부유액에는 Con A(0.5 μg/ml)를 첨가하여 48시간 동안 37℃의 5%CO₂배양기 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml농도로 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 환산하였다⁴⁾.

5. 비장 및 흉선세포의 아집단(Subpopulation) 측정

생쥐에 EKS(500 mg/kg)를 7일 동안 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하여 1×10⁶cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:25 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 임파구 아집단을 측정하였다⁵⁾.

6. 혈청 cytokine(IFN-γ, IL-4)의 측정

1) IFN-γ의 측정

IFN-γ의 측정은 sandwich ELISA 방법으로 혈청 내 IFN-γ의 농도를 측정하였다⁶⁾. 4 μg/ml 농도로 0.1M phosphate buffer(pH 9.0)에 희석한 anti-mouse IFN-γ antibody를 96well microplate에 각 well당 100 μl씩 코팅하여 4℃에서 24 시간 동안 반응시켜 흡착시켰다. 그 후 PBS로 2회 세척하고, 1% BSA-PBS를 각 well 당

150 μl씩 가하여 실온에서 1 시간 동안 blocking을 하고 PBS로 3회 세척하였다. 1% BSA-PBS로 희석한 혈청 시료액과 표준용액(recombinant mouse IFN-γ)을 각 well당 100 μl씩 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 2 μg/ml 농도로 1% BSA-PBS에 희석한 biotinylate conjugated anti-murine IFN-γ antibody를 각 well 당 100 μl씩 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 2 μg/ml 농도로 희석한 streptavidin-alkaline phosphatase를 각 well당 100 μl씩 가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 후 PBST로 5회 세척한 후 p-nitrophenyl phosphate 용액을 각 well 당 100 μl씩 가하고 실온 차광 하에서 발색반응을 시켰다. 약 30 분 후 50 μl의 3N NaOH용액으로 반응을 정지시키고, 30분 내에 ELISA reader로 405 nm 파장에서 흡광도를 측정 비교하였다.

2) IL-4의 측정

IL-4의 측정은 IFN-γ의 측정방법에 준하였다.

7. 복강 대식세포에서의 nitric oxide(NO) 측정

생쥐의 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 복강주사하고 3일 후에 생쥐를 경추 탈구하여 복강 내에 cold PBS 5 ml를 주입, 복강 삼출세포를 수집하고 RPMI1640 배지로 2회 세척(1,500 rpm, 10분)한 다음, petri dish에 부착한 세포만 cell scraper로 모아 24 well culture plate에 1×10⁶ cells/well로 분주하였다. 각 well에 EKS를 1, 10 및 100 μg/ml로 처리하고 LPS 1 μg/ml와 v-IFN 25 units/ml를 첨가하여 배양하고 24시간 후에 생성된 NO양을 Griess법으로 측정하였다. 배지 100 μl와 Griess시약(1% sulfanilamide+0.2% N-Naphthylethylene diamine 2HCl+2.5% H₃PO₄)100 μl를 혼합하여 96well에 넣고 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO양을 산정하였다⁷⁾.

8. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며⁸⁾, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 비장 및 흉선세포의 생존율에 미치는 효과

Table 2. Effect of cell viability on the EKS-administered mouse splenocytes and thymocytes in vivo

Treatment	Cells	Splenocytes(%)	Thymocytes(%)
		LPS(+)	Con A(+)
CONTROL		100.0±3.9	100.0±4.1
EKS		119.2±5.3*	109.7±5.9

EKS(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter the each cells were collected, and splenocytes and thymocytes incubated for 48 hours, The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean±S.E. of 3 experiments. *: Significantly different from normal saline-treated control group(*p<0.05).

EKS를 7일 동안 생쥐에 경구 투여하고 비장 및 흉선 내의 면역세포의 생존율을 측정한 결과, 생쥐 비장세포에서 대조군 [LPS(5 μg/ml) 처리]에서의 세포생존율을 100%로 하였을 때,

EKS를 투여한 군에서 119.2±5.3%로 비장세포의 생존율을 유의성 있게 촉진시켰으며, 흉선세포에서도 대조군(Con A(0.5 µg/ml)처리)을 100%로 하였을 때 EKS 투여군에서 각각 109.7±5.9%로 흉선세포의 생존율이 약간 촉진되는 경향이였다(Table 2).

2. 비장 및 흉선세포의 아집단에 미치는 효과

EKS를 투여한 생쥐의 비장 및 흉선세포의 아집단변화를 살펴보면, 비장세포는 대조군에서 B, T세포가 각각 37.9±3.1% 및 24.3±2.2%, EKS투여군에서 각각 47.4±3.9% 및 30.8±2.7%로 B, T세포가 모두 증가하였으며, 비장 T세포 중 대조군은 TH세포가 13.7±1.2%, Tc세포는 7.9±0.8%, EKS처리군은 각각 18.9±1.8% 및 9.2±1.1%로 특히 TH세포가 유의성있게 증가하였다. 흉선세포에서는 대조군에서 TH세포가 11.2±1.3%, Tc세포는 5.1±0.5%, EKS 투여군은 각각 15.7±1.2% 및 6.3±0.7%로 흉선 내에서도 TH세포가 증가하였다(Table 3). 이상의 결과에서 EKS는 주요 면역장기인 비장 내의 B, T세포 및 흉선 T세포를 증가시켰으며, T림프구 아집단분석 결과 특히 TH림프구가 유의성있게 증가되었다.

Table 3. Lymphocyte subpopulation change of splenocytes and thymocytes in EKS-administered mice

Treatment	Cells	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)		
		B cell	T cell		TH	TC
			TH	TC		
CONTROL	37.9±3.1	24.3±2.2		11.2±1.3	5.1±0.5	
		13.7±1.2	7.9±0.8			
EKS	47.4±3.9*	30.8±2.7*		15.7±1.2*	6.3±0.7	
		18.9±1.8*	9.2±1.1			

EKS(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter each cells were collected and the subpopulation was measured by a flow cytometer staining with PL/FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. Each data represents the mean±S.E. of 5 mice. *: Significantly different from control group(*p<0.05).

3. 혈청 중 cytokine생성에 미치는 효과

EKS를 투여한 생쥐의 혈청 IFN-γ와 IL-4의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 IFN-γ는 대조군에서는 17.9± 1.7 pg/ml이었으며, EKS 투여군에서는 57.5±5.9 pg/ml로 유의성있는 증가를 보였다. 반면 IL-4는 대조군에서는 13.1±1.5 pg/ml인데 비하여 EKS 투여군에서는 15.9±1.8 pg/ml으로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

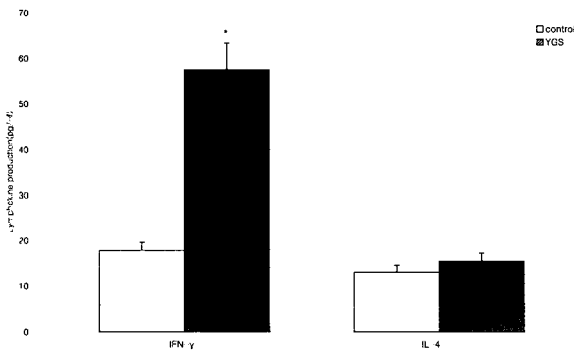


Fig. 1 Effect of EKS on the cytokine production in mice serum. EKS(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the collected mice serum was assayed cytokine with ELISA kit. The data represents the mean±S.E. of 5 mice. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

4. 복강 대식세포에서의 nitric oxide(NO)생성에 미치는 효과

생쥐의 복강 대식세포를 수집해서 LPS와 γ-interferon을 첨가, 배양하면서 EKS(1, 10 및 100 µg/ml)를 가하여 대식세포가 생성하는 nitric oxide양을 살펴본 결과, 대조군(LPS와 γ-interferon만 첨가)에 비하여 특히 10, 100 µg/ml의 EKS 첨가에 의해 NO생성이 증가하였다(Fig. 2).

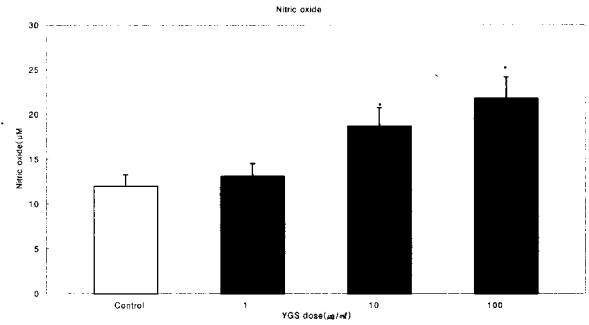


Fig. 2 Effect of EKS on the nitric oxide production from peritoneal macrophage. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI1640 media with LPS(1 µg/ml) and γ-IFN(25 units/ml). Cells were cultured with EKS(1-100 µg/ml) in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate ELISA reader. Nitric oxide standard curve were measured with NaNO₂. Each bar represents the mean±S.E. of 3 experiments. LPS: lipopolysaccharide, γ-IFN: γ-interferon. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

고찰

면역의 주된 기능으로는 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데 방어기능은 외부로부터의 면역자극에 대한 반응을 나타내는 기능으로, 미생물의 자극에 대한 방어기능이 비정상적으로 과도하게 나타나면 알레르기 반응을 보이고, 반대로 비정상적으로 낮게 나타나면 그 미생물에 감염되는 “기회감염”을 일으키게 된다. 항상성 유지기능이란 생체의 내부환경을 항상 평형상태로 유지시켜주는 기능으로, 어떤 면역자극에 의해 이 기능이 지나치게 커지게 되면 면역계 고유의 기능인 “자기”와 “비자기”를 판별할 능력을 잃게 되어 “자기면역질환”을 일으키게 된다. 감독기능이란 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이를 일으킨 세포를 제거하도록 하는 기능으로서, 감독기능이 제대로 되지 못할 경우에는 변이된 세포를 제거하지 못하여 악성종양을 일으킬 수 있다³⁾. 면역세포의 주역인 T림프구 중 CD4+세포인 TH세포는 비자기를 인식해서 그 정보를 B림프구에 전달하고, 항원에 대하여 특이한 항체를 혈청 속에 만들어 내도록 촉진하는 중요한 기능을 가지고 있다. 항체를 만들어 내는 수순이 면역계에 기억되어, 동일한 항원이 다시 침입해 들어오는 경우에는 이 항체가 동원되어 항원을 효과적으로 처리한다⁴⁾. 본 연구결과에서 면역계에 대한 실험으로 비장 및 흉선세포의 증식반응, 림프구 아집단, 혈청 중 cytokine생성능 및 복강 대식세포에서의 nitric oxide생성능 등을 관찰하였는데, 銀麴散은 주요 면역장기인 비장, 흉선 내의 림프구의 생존율을 촉진시켰으며 또한 비장 및 흉선세포의 아집단을 분석한 결과, 비장내의 B 및 T림프구와 흉선 T림프구를 증가시켰으며, T세포 중 특히 CD4양성세포인 TH세포를 증가시켜 생체의 면역력을 증강시키는 것으로 사료된

다. 또한 혈청 중 γ -interferon의 생성이 증가하였는데 이는 銀翹散이 특히 T세포 중 TH1세포를 활성화시키는 결과를 의미한다. Nitric oxide는 생체 내에서 vasodilating agent, neurotransmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 면역반응을 하는 효능물질로 잘 알려져 있으며, 특히 생쥐에서는 대식세포 등의 탐식작용을 하는 세포에서 분비되는 것으로 보고⁹⁾되어 있고, T림파구에서 분비하는 cytokine을 조절하는 인자로도 알려져 있는데¹⁰⁾ 銀翹散은 복강 대식세포에서 생성하는 nitric oxide의 생성을 증가시켰다. 이상의 결과로 보아 銀翹散은 림파구 및 대식세포 등 주요 면역세포의 활성을 항진시키는 면역증강능력이 있는 것으로 추정된다.

결 론

銀翹散(EKS)의 각종 면역계에 미치는 효과를 관찰한 결과, 은교산은 생쥐의 비장 및 흉선세포의 생존율을 증가시켰으며, 림파구 아집단분석 결과, 비장의 B 및 T세포를 유의하게 증가시켰고 비장 T세포 중에서는 CD4+인 TH세포가 증가하였으며, 흉선에서도 TH세포가 유의하게 증가하였다. 또한 은교산은 혈청 중 γ -interferon의 생성을 현저하게 증가시켰으며 복강 대식세포에서의 nitric oxide의 생성을 증가시키는 이른바 면역증강능력을 보유하고 있는 것으로 추정된다.

참고문헌

1. 成肇智, 中醫病機論, p.13-137, 中國醫藥科學出版社, 北京, 1997.

2. Abbas, A.K., Lichman, A.H. and Poper, J.S. Cellular and molecular immunology, 2, 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A., 1994.
3. 柯新橋, 中醫呼吸病學, p. 196, 中國醫藥科學出版社, 中國, 1994.
4. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays, J. Immunol. methods, 65, 55-63, 1983.
5. 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.
6. Enavall, E., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay III, Quantitation of specific antibodies of enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes, J. Immunol., 109, 129-135, 1972.
7. Kondo, Y., Takano, F. Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with glycyrrhizin, Biol. Pharm. Bull., 17(5), 759-761, 1994.
8. Dowdy, S. and Weardon, S. Statistics for research, p. 262, Wiley, U.S.A., 1983.
9. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259-263, 1994.
10. Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide, a pathogenic factor in autoimmunity, Immunology Today, 13, 157, 1992.