

三精丸이 대식세포의 면역반응에서 유도되는 IL-1 β 유전자의 발현에 미치는 영향

김세운, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Samjunghwan* on the IL-1 β Gene Expression in the Macrophage

Se-yoon Kim, Ji-cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : Macrophage has an important innate defense role in the immune system. When we are infected with pathogens, macrophage ingests them through phagocytosis or endocytosis, and then secretes many cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF α , which are regulators of immune responses. The aim of this study is to determine how *Samjunghwan* effects the expression of cytokine and other immune-related genes in macrophages.

Methods : Cells were treated directly with *Samjunghwan* and/or LPS at regular intervals. Total RNA of cells was isolated using TRIzol reagent, and the changes in cytokine gene expressions were investigated using RT-PCR, western blot and ELISA.

Results : IL-1 α , IL-1 β and COX-2 genes were inducibly expressed specifically by *Samjunghwan* in macrophage. Especially, IL-1 β gene was induced most strongly by treatment with *Samjunghwan*. Over time, treatment with *Samjunghwan* showed that the expression levels of IL-1 α and IL-1 β genes increased from 1 to 4h, and then decreased from 4 to 15h. However, the expression level of COX-2 gene increased continuously up to 11h. IL-1 α , IL-1 β and COX-2 genes were expressed synergistically by a simultaneous treatment of both *Samjunghwan* and LPS in macrophages. Secretion levels of translated IL-1 β increased continuously up to 11h.

Conclusions : Though this study is only a start in the investigation of the efficacy of *Samjunghwan*, these results suggest that *Samjunghwan* has positive effects on immune responses.

Key Words: Macrophage, Cytokine, IL-1 β , immune response, *Samjunghwan*

1. 緒 論

조직 손상 또는 세균 감염은 일차적으로 자연면역 (native immunity)인 염증 반응 (inflammation)을 유발시킨다. 염증 반응이 시작되면 모세혈관의 투과성이 증가되어 대식세포가 조직으로 빠져 나오게 되고 혈관을 빠져나온 대식세포는 화학주성인자의 유도

로 감염 부위로 이동하여 세포내이입 (endocytosis)과 식작용 (phagocytosis)을 통해 감염원을 제거한다^{1,4}. 이 때 대식세포는 다양한 cytokine을 분비하여 자연면역 (native immunity)과 특이면역 (specific immunity) 세포들을 활성화시키고, 활성화된 면역세포들과 함께 항원을 공격하여 보다 복합적인 면역작용을 할 수 있게 해 준다⁵.

이렇게 자연면역과 특이면역의 대부분에서 중요한 조절기능을 하는 cytokine은 동일한 cytokine이 여러 다른 세포에 각각 다른 작용을 나타내기도 하며 서로 다른 종류의 cytokine과 함께 상승작용 또는

· 접수 : 2006. 2. 14. · 채택 : 2006. 2. 28.
· 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1
동국대학교 경주한방병원 2내과
(Tel. 054-770-1265, Fax. 054-770-1500
E-mail : jjcjh@paran.com)

길항작용 등 다양한 작용으로 면역 반응을 조절하는 특징을 갖고 있다. 또한 cytokine은 분비된 세포 자신에게 작용하는 autocrine, 주변 세포들에 작용하는 paracrine, 멀리 떨어져 있는 세포에 작용하는 endocrine 작용으로 인체의 면역 반응을 효율적으로 조절한다^{5,6}. 자연면역에 속하는 세포들 중에 가장 많은 종류의 cytokine을 분비하는 대식세포는 항원에 의해 감염되었을 때 가장 빠르게 반응하기 때문에 대식세포의 cytokine 분비는 감염 초기의 면역작용에서 매우 중요한 역할을 차지한다.

三精丸은 東醫寶鑑에 養性延年藥餌의 처방으로 久服輕身 延年益壽 面如童子의 효능이 있다고 수록되어 있다⁷. 三精이란 天精, 地精, 人精을 의미하는 것으로 天精에 해당하는 蒼朮 (*Atractylodes japonica*), 地精에 해당하는 地骨皮 (*Cortex lycii radidis*), 人精에 해당하는 桑椹子 (*Morus alba L.*) 등의 세 가지 약재로 구성되어 있다^{8,9}. 주로 脾腎에 작용하여 滋補 肝腎 健脾燥濕 등의 효능을 나타내어 肝腎虧虛 精氣虛損 脾虛濕阻 등의 치료에 활용되므로^{8,9} 노화 억제에의 효과를 가지는 것으로 생각된다. 또한 脾腎은 한의학에서 면역에 관련되는 장기이므로¹⁰ 三精丸의 작용 기전은 면역력 증강과 밀접한 관련이 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 三精丸의 면역 증강 효과를 알아

보기 위하여 면역세포에 三精丸을 처리하였을 때 cytokine 발현에 어떤 영향을 미치는지 살펴본 뒤 체내 작용 기전에 대하여 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

아래의 약재를 시중에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약

Fetal bovine serum (Cell-Gen, CGA15-649, German), L-glutamine (Gibco, 25030-081, USA), MEM nonessential amino acids (Gibco, 11140-050, USA), MEM sodium pyruvate (Gibco, 11360-070, USA), 2-mercaptoethanol (Gibco, 21985-023, USA), penicillin G-streptomycin (Gibco, 15140-122, USA) DMEM (Hyclone, SH30003.02, USA), LPS (Sigma, L6529, USA), TRIzol reagent (Invitrogen, 15596-026, USA) PCR pre-mixture (Genenmed, CAN0070, Korea), [NaCl, Tris-Cl, SDS, Triton X-100, deoxycholate, EDTA, PMSF; (Amresco, USA)], protein assay solution (Biorad 500-0006, USA), enhanced chemiluminescence kit (Santacruz, USA).

	약재	생약명	중량
三精丸	桑椹子	<i>Mori Fructus</i>	125 g
	蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	60 g
	地骨皮	<i>Lycii Cortex Radicis</i>	60 g
	계		245
二精丸	黃精	<i>Polygonati sibirici Rhizoma</i>	150 g
	枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	150 g
	계		300 g
靑娥丸	杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	100 g
	補骨脂	<i>Pasoraliae Semen</i>	100 g
	胡桃	<i>Juglandis Semen</i>	100 g
	生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	62.5 g
	계		362.5 g

3) 항체

Anti-IL1 β (Santa cruz, sc-1251, USA), anti- β tubulin (Santa cruz, sc-9104, USA), HRP conjugated anti-goat IgG (Santa cruz, sc-2768, USA) HRP conjugated anti-goat IgG (Santa cruz, sc-2004, USA).

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 三精丸 245g에 3배 량의 95% methanol을 가하고 60 $^{\circ}$ C에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압 농축기를 사용하여 건조시켜 三精丸추출물 21.8g (수율 8.9%)을 얻어 실험에 사용하였다. 위와 같은 방법으로 二精丸 32.7 g, 靑娥丸 45.68 g을 얻어 시험에 사용하였다.

2) 세포 배양

S194 (mouse plasma B cell), EL4 (mouse T helper cell), RAW264.7 (mouse macrophage), BV2 (mouse microglia)를 6-well tissue culture dish에 1×10^6 cells/ml 밀도로 배양하였다. 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM nonessential amino acids, 1mM MEM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin G-100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO $_2$, 37 $^{\circ}$ C 환경으로 배양하였다.

3) 검액, LPS 처리

二精丸, 三精丸, 靑娥丸은 100 μ g/ml, LPS는 1 μ g/ml 농도로 배양액 (FBS free DMEM media)에 직접 처리하고 1hr~20hrs 동안 배양하였다.

4) Total RNA 분리

배양액을 제거한 후 세포에 TRIzol reagent 를 처리하고 chloroform을 처리한 후 원심분리하여 수층을 isopropyl alcohol을 이용하여 total RNA를 침전 분리하였다.

5) Reverse transcription

Total RNA 1 μ g을 oligo (dT)15 primer를 사용하여 reverse transcription하였다. 먼저 45 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 reverse transcriptase를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

6) cDNA PCR

역전사 (Reverse Transcription)에 의하여 합성된 cDNA 1 μ l를 주형으로 사용하고 세포에 알맞은 primer pair (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , COX-2, iNOS, β -actin primer)를 PCR pre-mixture 와 잘 혼합한 후 pre-denaturation (95 $^{\circ}$ C, 5분)을 먼저하고, 이어서 denaturation (95 $^{\circ}$ C, 30초), annealing (53 $^{\circ}$ C~59 $^{\circ}$ C, 30초), elongation (72 $^{\circ}$ C, 30초)을 25회 반복한 후 마지막으로 post-elongation (72 $^{\circ}$ C, 5분)을 실시하는 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR products 는 1.5% agarose gel에 전기영동을 한 후 EtBr staining으로 확인하였다.(primer sequence는 Table.1 참조)

Table 1. The sequences of PCR primer pairs

	Forward primer	Reverse primer
IL-1 α	caa ctc taa gaa cta ctt cac atc agc	tca ttt aga att aca gag act cag cac
IL-1 β	gcc cat cct ctg tga ctc atg	aag gcc aca ggt att ttg tgg
IL-2	gtg ctc ctt gtc aac agc gc	agc atc ctg ggg agt ttc agg
IL-6	agt tgc ctt ctt ggg act gat g	ttc cac gat ttc cca gag aac
IFN γ	aac tgg caa aag gat ggt gac	atg agc tca ttg aat gct tgg
TNF α	taa aat gtc ggc tcc agg ac	agg tgg att cat tcc ctt cc
COX-2	gca cgt agt ctt cga tca ct	tct cca acc tct cct act ac
iNOS	ggc tgt cag agc ctc gtg gct ttg g	ccc ttc cga agt ttc tgg cag cag c
β -actin	aca ccc cag cca tgt acg ta	ctc ttt gat gtc acg cac ga

7) Western blot 분석

三精丸과 LPS가 처리된 대식세포 (RAW264.7)를 ice-cold PBS로 씻어준 후 RIPA buffer (150mM NaCl, 10mM Tris-Cl (pH 7.2), 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 5mM EDTA, 1mM PMSF)를 넣어주고 lysis된 세포들을 1.5ml tube에 옮겼다. 얼음에서 10분간 1.5ml tube를 놓아둔 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 수층을 다른 1.5ml tube에 옮긴 후 protein assay solution (Bio-rad 500-0006)을 이용하여 단백질 정량을 하고 각각 30ug의 단백질을 12% acrylamide gel에 전기영동을 하고 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 10% skim milk로 membrane을 1시간 동안 blocking시키고 1차 항체인 anti-IL1 β 또는 anti- β tubulin을 1시간 동안 처리한 후, 2차 항체인 HRP conjugated anti-rabbit IgG 또는 HRP conjugated anti-goat IgG를 1시간 동안 처리하고 ECL (Enhanced chemiluminescence) kit으로 확인하였다.

8) ELISA 분석

대식세포에서 분비된 IL-1 β 를 분석하기 위해 indirect ELISA 방법¹¹⁾을 약간 변형하여 실험하였다. 먼저 三精丸과 LPS가 처리된 RAW264.7 세포의 배양액 50ul를 96well에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 방치하고 TBS-T 용액으로 세정한 후 10% skim milk로 well을 blocking을 하고 TBS-T 용액으로 3회 세정하였다. 그리고 1차 항체인 anti-IL1 β 를 1시간 동안 처리한 후 TBS-T 용액으로 3회 세정하고 2차 항체인 HRP conjugated anti-goat IgG를 처리하였다. 마지막으로 TBS-T 용액으로 3회 세정과 TBS 용액으로 2회 세정한 후 50ul ECL solution을 넣고 luminometer로 측정하였다.

III. 結果

1. 대식세포의 면역반응에서 유도되어지는 cytokine 및 효소 유전자의 발현에 미치는 三精丸의 영향
三精丸이 대식세포의 면역반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여 RAW264.7 (mouse macrophage)

세포주에 三精丸 (100 μ g/ml)을 처리한 후 RT-PCR에 의하여 Cytokine 및 면역관련 효소들의 발현 정도를 확인해 보았다. Negative control로는 Non-treated 대식세포를 사용하였다. 한편 二精丸 (100 μ g/ml) 또는 靑娥丸 (100 μ g/ml)을 처리한 경우를 三精丸을 처리한 경우와 비교하였다. 그리고 Positive control로는 LPS (1 μ g/ml)를 처리한 대식세포를 이용하였다.

그 결과 병원성 항원으로 작용하는 LPS를 처리한 Positive control에서는 대식세포가 활성화되어 면역반응을 유도하는 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 Cytokine과, 그리고 COX-2, iNOS 등의 효소를 발현함을 보여 주었다. 활성화시키지 않은 Negative control (Non-treated)과 二精丸, 靑娥丸을 처리한 대식세포에서는 어떤 Cytokine도 발현되지 않았고, COX-2와 iNOS 또한 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 三精丸을 처리한 대식세포에서는 LPS를 처리한 대식세포에서 보다는 약하지만 IL-1 β 와 IL-1 β 에 의해 활성화된다고 알려진 COX-2가 발현되는 것을

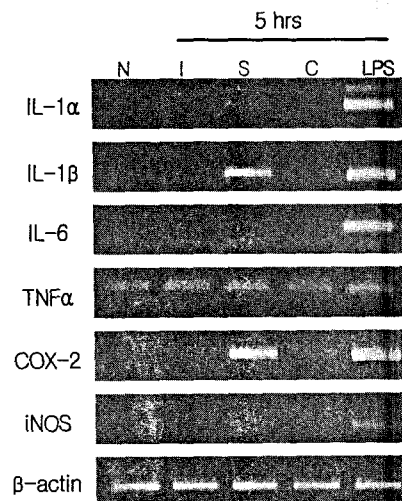


Fig. 1. Effects of Samjunghwan on the expression of cytokines in the macrophage. IL-1 α , IL-1 β and COX-2 genes were expressed specifically in macrophage by the treatment of Samjunghwan. N; non-treated, I; Ichunghwan (100 μ g/ml), S; Samjunghwan (100 μ g/ml), C; Chunghwan (100 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml); Lipopolysaccharide.

확인할 수 있었다. 또한 IL-1 α 도 약하게 발현되고 있는 것을 확인하였다(Fig.1). 모든 세포에서 항상 발현하고 있는 유전자인 β -actin을 실험의 Loading control로 사용하였다.

2. B 세포 또는 T 세포의 면역반응에서 유도되어 지는 cytokine 유전자의 발현에 미치는 三精丸의 영향
 다른 종류의 면역세포인 S194 (mouse plasma B cell), EL4 (mouse T helper cell) 세포주에 三精丸 (100 μ g/ml)을 처리하고 Negative control인 Non-treated 세포주의 경우와 비교하여 그 영향을 평가하였다. 그리고 또 다른 약제인 二精丸 (100 μ g/ml) 또는 靑娥丸 (100 μ g/ml)을 5시간 동안 처리한 경우에서도 cytokine의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 면역반응 시 B 세포에서 유도 발현되는 IL-1 α , IL-1 β 와 T helper 세포에서 유도 발현되는 IL-2, IFN- γ 의 발현에 어떠한 변화도 확인할 수 없었다(Fig. 2).

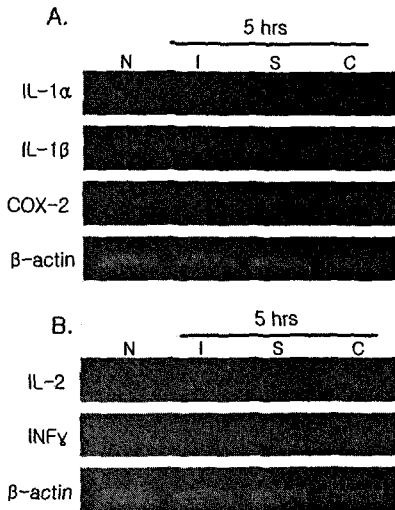


Fig. 2. Effects of *Samjungghwan* on the expression of cytokines in B and T cells. *Samjungghwan* did not affect the expression of cytokines in B (A) and T cells (B). N; non-treated, I; *Ichunghwan* (100 μ g/ml), S; *Samjungghwan* (100 μ g/ml), C; *Chunghwan* (100 μ g/ml).

3. 다른 종류의 대식세포와 상피세포의 면역반응에서 유도되어지는 cytokine 유전자 발현에 미치는 三精丸의 영향

뇌에 상주하는 대식세포인 BV2 (microglia)와 상피세포인 NIH3T3 (fibroblast) 세포주에 三精丸 (100 μ g/ml)을 처리하고 negative control인 non-treated 세포주의 경우와 비교하여 그 영향을 평가하였다. 그리고 또 다른 약제인 二精丸 (100 μ g/ml) 또는 靑娥丸 (100 μ g/ml)을 5시간 동안 처리한 경우에서도 cytokine의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 BV2 (A)와 NIH3T3 (B) 세포주에서 IL-1 α , β 유전자의 발현에 어떠한 변화도 확인할 수 없었다(Fig. 3).

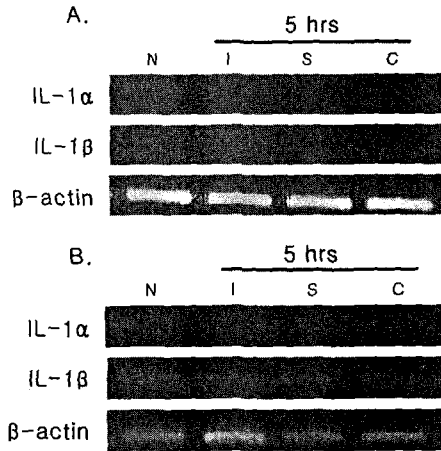


Fig. 3. Effects of *Samjungghwan* on the expression of cytokines in microglia and fibroblast cells. *Samjungghwan* did not affect the expression of cytokines in microglia (A) and fibroblast cells (B). N; non-treated, I; *Ichunghwan* (100 μ g/ml), S; *Samjungghwan* (100 μ g/ml), C; *Chunghwan* (100 μ g/ml).

4. 三精丸을 처리한 대식세포에서의 시간 경과에 따른 IL-1 β , COX-2 유전자의 발현량 변화

대식세포에 三精丸 (100 μ g/ml)을 15시간, 4시간, 1시간 처리 후 IL-1 β , COX-2 유전자의 발현량을 관찰하였다. 그리고 또 다른 약제인 二精丸 (100 μ g/ml) 또는 靑娥丸 (100 μ g/ml)도 三精丸과 동일하게 처리

하여 비교해 보았다. 三精丸을 처리한 대식세포에서 IL-1β는 1시간부터 4시간까지 증가하고 그 이후 15시간까지 다시 감소되는 것을 확인하였다. 그리고 IL-1β에 의해 활성화된다고 알려진 COX-2는 IL-1β보다 느리게 발현이 되는 것을 확인하였다. IL-1α에서도 IL-1β보다 매우 적은 양이지만 비슷한 형태의 변화를 확인할 수 있었다(Fig 4).

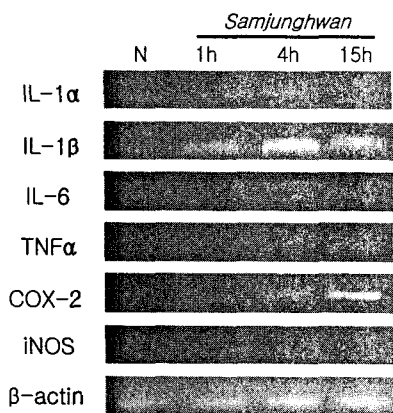


Fig. 4. Changes of IL-1α, IL-1β and COX-2 gene expression levels in the presence of *Samjungghan* for the indicated times in the macrophage. The expression levels of IL-1α and IL-1β genes increased from 1 to 4h, and decreased from 4 to 15h. The expression level of COX-2 gene increased continuously for the period of 15h. N; non-treated, *Samjungghan* (100μg/ml),

5. LPS와 三精丸을 처리한 대식세포에서의 IL-1β 유전자 발현의 상승 효과

대식세포를 LPS (1μg/ml), 三精丸 (100μg/ml), 또는 LPS (1μg/ml) 및 三精丸 (100μg/ml)으로 각각 1시간 처리 후 cytokine과 COX-2, 그리고 iNOS 유전자들의 발현량을 RT-PCR 실험으로 비교해 보았다. 그 결과 LPS 및 三精丸을 동시에 1시간 처리한 경우에 LPS와 三精丸을 각각 따로 처리했을 때 보다 IL-1β 유전자의 발현이 상승함을 확인하였다(Fig. 5).

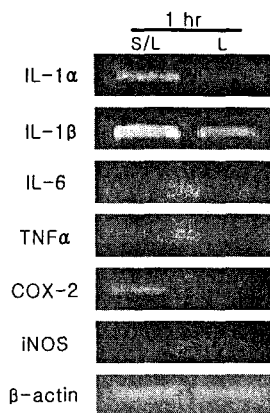


Fig. 5. Synergistic effects of *Samjungghan* on the expression of IL-1α, IL-1β and COX-2 genes in the macrophage. IL-1α, IL-1β and COX-2 genes were expressed synergistically by the simultaneous treatment of *Samjungghan* and LPS in macrophage. S; *Samjungghan* (100μg/ml), L; Lipopolysaccharide (1μg/ml).

6. 三精丸을 처리한 대식세포에서 IL-1β의 발현을 단백질 수준에서 확인

대식세포에서 三精丸이 IL-1β의 발현에 미치는 영향을 단백질 수준에서 확인하기 위해 三精丸을 처리한 후 시간이 경과함에 따른 발현 정도를 Western blot을 이용하여 확인하였다. 그 결과 三精丸을 처리한

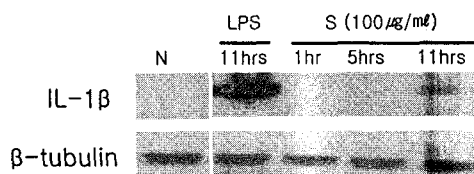


Fig. 6. Identification of IL-1β expression at the level of protein in the *Samjungghan*-treated macrophage (RAW264.7). The protein expression levels of IL-1β increased continuously from 1h to 11h in the *Samjungghan*-treated macrophage (RAW 264.7). IL-1β was also expressed strongly in the LPS-treated macrophage as a positive control. β-tubulin was used as a loading control. N; nontreated, S; *Samjungghan*, LPS (1μg/ml); Lipopolysaccharide.

대식세포 주에서 처리시간에 따라 점점 IL-1 β 의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, negative control인 non-treated 세포주에서는 IL-1 β 의 발현이 확인되지 않았고 positive control인 LPS 처리 세포주에서는 IL-1 β 의 강한 발현이 확인되었다(Fig. 6).

7. 三精丸을 처리한 대식세포에서의 IL-1 β 분비 확인
 三精丸에 의해 발현이 유도된 IL-1 β 가 세포 밖으로 분비되는지 확인하기 위해 三精丸을 처리한 세포주의 배양액을 indirect ELISA 방법으로 분석하였고 negative control로는 三精丸을 처리하지 않은 세포주의 배양액을 사용하였다. 그리고 luminometer control로서는 항체와 기질만 넣고 측정한 값 (Mock)을 사용하였다. 그 결과 三精丸을 처리한 시간에 따라 IL-1 β 의 분비량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 三精丸을 5시간 처리한 세포주는 1시간 처리한 세포주보다 약 1.5배 정도 많은 양의 IL-1 β 를 분비하였고, 11시간 처리한 세포주는 1시간 처리한 세포주보다 약 3배 정도 많은 양의 IL-1 β 를 분비하는 것을 확인하였다.

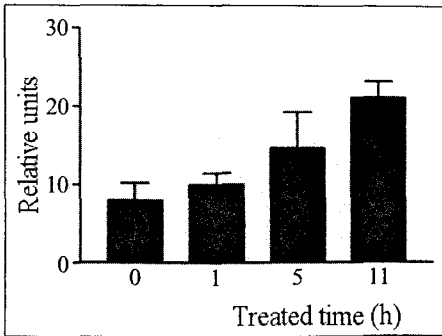


Fig. 7. The levels of secreted IL-1 β in the *Samjung-hwan*-treated macrophage were increased during the periods of 11 hours. The levels of secreted IL-1 β increased continuously by the treatment of *Samjung-hwan* from 1h to 11h. The levels are relative to that of mock and shown with error bars.

IV. 考 察

三精丸은 예로부터 久服輕身 延年益壽 등의 효능이 있다고 하여^{7,9} 노화를 억제할 가능성이 기대되는 처방이다. 구성 약물을 살펴보면 桑椹子는 性味が 甘酸溫으로 心, 胃, 小腸, 膀胱經에 歸經하여 補腎水利五臟 安魂鎮神 聰耳明目 生津止渴 利水消腫 解酒烏髮 등의 효능을 가지고 있으며^{12,4}, 항산화 작용을 나타내었다고 보고되었다¹⁵. 蒼朮은 性味が 苦辛溫이며 肺, 脾, 胃, 大腸, 小腸經에 歸經하여 燥胃強脾 發汗除濕 散風寒濕 能升發胃中陽氣 등의 효능을 가지고 있으며^{12,4}, 비만 白鼠와 3T3-L1 지방세포에 효과를 나타내었다고 보고되었다¹⁶. 地骨皮는 性味が 苦寒辛으로 三焦經에 歸經하여 清熱涼血 助正氣 除肝腎虛熱 降肺中伏火 등의 효능을 가지고 있으며^{12,4}, 고지방 식이로 유발된 白鼠의 고지혈증에 효과를 나타내었다고 보고되었다¹⁷.

그러므로 三精丸은 한의학에서 先天의 근본인 腎臟과 後天의 근본인 脾臟을 함께 보충하고 조절하는데^{8,9}, 腎과 脾의 虛損은 한의학에서 노화의 주된 원인¹⁸으로 인식되고 있을 뿐만아니라 면역 기능의 저하¹⁰를 가져온다. 따라서 三精丸이 면역 증강에 효과를 나타내는지를 검토하여 노화 억제와의 연관을 규명하고자 본 실험을 시도하였다.

대식세포는 인체가 세균에 감염되었을 때 가장 먼저 반응하여 식작용과 더불어 다른 종류의 면역 세포들을 활성화시킬 cytokine을 분비¹⁹하기 때문에 감염 초기의 면역작용에 중요한 역할을 한다. 이러한 대식세포의 작용은 감염된 후 급격히 진행되기 때문에 만약 대식세포가 감염 초기에 기능을 제대로 할 수 없다면 감염원에 대항하는 인체는 면역반응이 늦어져 심각한 상태에 이르게 될지도 모른다. 따라서 감염 초기 대식세포의 cytokine 분비는 면역반응에 있어서 상당히 중요하다고 말할 수 있다. 대식세포가 분비하는 cytokine들 중에 IL-1은 면역반응에 중요한 역할을 하는 T helper 세포와 NK 세포를 활성화시켜주고 B 세포의 성숙 및 클론 확장을 항진시킨다. 또한 혈관내피세포에 ICAM-1 발현을 항진

시키고, 대식세포와 호중구의 화학주성이 생기게 하여 감염원으로 더 많은 대식세포들이 모일 수 있게 해 주며, hepatocytes에서 급성기 단백질의 생산을 유도하여 염증 확산 억제 및 감염 세균의 독성을 완화시켜주는 기능을 한다⁵.

흥미롭게도 이렇게 면역반응에서 중요한 기능을 하는 IL-1 β 유전자가 대식세포에 三精丸을 처리하면 특이적으로 발현이 되는 것을 확인할 수 있었고 다른 한약재 (二精丸, 靑娥丸)를 처리한 대식세포에서는 이러한 효과를 전혀 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 오직 三精丸이 특이적으로 대식세포를 활성화시킬 수 있다는 것을 의미한다. 또한 IL-1 α 유전자도 적은 양이 발현되는 것을 확인할 수 있었으나 발현 정도로 볼 때 IL-1 β 에 비해 현저히 떨어지는 것으로 확인되었고, IL-1 β 에 의해 유도되어 발현되는 것으로 알려진 COX-2 유전자^{20,21}도 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 대식세포의 한 종류로 뇌에서만 존재하는 BV2 (mouse microglia)에서는 三精丸의 효과가 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 三精丸이 특정 대식세포에만 특이적으로 IL-1 β 발현에 영향을 미친다는 것을 의미한다.

三精丸 처리 후 시간에 따른 IL-1 β 유전자의 발현 양의 변화는 점점 증가하다 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 IL-1 β 유전자의 발현이 점점 증가되다가 IL-1 β 가 너무 많이 생성되면 feedback inhibition에 의해 더 이상 IL-1 β 유전자를 발현시키지 않을 것이라는 추측할 수 있게 해주는 결과이다. 뿐만 아니라 三精丸과 LPS를 동시에 처리하여 면역 반응을 유도할 때 단순히 LPS만으로 면역 반응을 유도했을 때 보다 IL-1 β 의 발현이 상승작용을 하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 곧 三精丸으로 어느 정도 활성화된 대식세포는 감염초기에 더욱 효과적으로 IL-1 β 의 분비를 일으키고 이러한 대식세포의 빠른 반응은 결국 전체적인 면역작용이 보다 빠르게 일어날 수 있게 해줄 수 있는 것을 의미한다.

三精丸의 면역효과를 전사에 의한 RNA 수준에서는 물론, Western blot과 ELISA 실험을 통하여 단백질 수준에서도 확인할 수 있었다. Western blot 결

과는 대식세포에서 三精丸의 영향을 받아 만들어진 IL-1 β 유전자의 전사체, 즉 mRNA가 단백질로 translation되고 있음을 보여주고 있고, ELISA 결과는 단백질로 만들어진 IL-1 β 가 대식세포 밖으로 분비되고 있음을 잘 보여주고 있다.

본 연구에서 비록 세포주를 사용하여 *in vitro*에서 실험을 수행하였지만 三精丸이 IL-1 β 유전자의 발현에 미치는 효과는 RNA 및 단백질 수준에서 너무도 분명히 나타나고 있다. 따라서 앞으로 IL-1 β 유전자의 발현에 관련되는 Receptor와 그 하위의 Cell signaling pathway에 관계되는 분자들을 밝히는 실험을 수행하고, 나아가서 *in vivo* 실험을 수행하여 三精丸에 의한 면역효과를 보다 명확하게 밝히는 실험이 따라야 한다고 생각된다.

V. 結 論

三精丸의 면역 증강 효과를 알아보기 위하여 三精丸을 처리한 대식세포에서 cytokine의 발현과 분비 정도를 RNA 및 단백질 수준에서 검토하였다. 三精丸은 대식세포에서 발현하는 cytokine 중 IL-1 β 의 발현에 상승효과를 나타내었고, 대식세포를 제외한 다른 종류의 면역세포에서 발현하는 cytokine에는 어떠한 영향을 주지 않았다. 三精丸은 대식세포에서 IL-1 β 유전자의 발현을 지속적으로 유지시키지 않았으며, LPS에 의해 면역 반응이 유도된 대식세포에서 IL-1 β 의 발현을 급격히 상승시켰다. 이러한 결과는 IL-1 β 가 많은 종류의 다른 면역세포들을 활성화시킨다는 점을 고려할 때, 三精丸이 면역 증강에 유용한 약물로 이용될 수 있을 것이라는 가능성을 제시해 주었다고 생각된다.

參考文獻

1. Incani, R. N. and McLaren, D. J. Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma*

- mansoni*. *Int J Parasitol*. 1984;14:259.
2. Riengrojpitak, S., Anderson, S. and Wilson, R. A. Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. *Parasitology*. 1998;117:301.
 3. Hogg, K. G., Kumkate, S. and Mountford, A. P. IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Int Immunol*. 2003;15:1451.
 4. Hogg, K. G., Kumkate, S., Anderson, S. and Mountford, A. P. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun*. 2003;71:3563.
 5. Richard A Goldsby, Thomas J Kindt, Barbara A Osborne. Immunology fourth edition, New York: W.H. Freeman and company: 2000.
 6. Baumann H and Gauldie J. The acute phase response: general aspects. *Baillieres clin Rheumatol*. 1994;8(3):513-30.
 7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 1981, p.78.
 8. 何紹奇, 宋乃光 編著. 中老年保健養生方. 北京: 學苑出版社; 2002, p.219-20.
 9. 王毅, 靳長金 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1989, p.95.
 10. 채우석. 면역 질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. *대한한의학회지*. 1990;11(2):54-91.
 11. G. J. Renukaradhya, S. Mitra-Kaushik, G. Sinnathamby, M. Rajasekhar, and M. S. Shaila. Mapping of B-Cell Epitopes of Hemagglutinin Protein of Rinderpest Virus. *Virology*. 2002;298: 214-23.
 12. 李尙仁. 本草學. 서울: 醫藥社; 1981, p.135, 241-2, 509-10.
 13. 辛民敎. 原色臨床本草學. 서울: 영림출판사; 1989, p.414-5, 302-3, 227
 14. 吳儀洛. 本草從新. 上海: 上海科學技術出版社; 1982, p.12.
 15. 朴涌基, 康秉秀. 桑椹子の 抗酸化 作用에 관한 연구. *대한본초학회지*. 1999;14(2):43-50.
 16. 김동윤. 蒼朮 추출액이 비만백서와 3T3-L1 지방 세포 분화에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위논문.
 17. 이성두. 地骨皮가 고지방 식이로 유발된 백서의 고지혈증에 미치는 영향. 경산대학교 대학원 박사학위논문.
 18. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧: 遼寧科學技術出版社; 1989, p.53-4, 327-9, 331-4.
 19. Triantafilou and K. Triantafilou. Lipopolysaccharide Recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation Cluster. *Trends in Immunology*. 2002; 23:301-4.
 20. Zai-Feng Huang, John B. Massey and David P. Via Differential Regulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA Stability by Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in Human *In Vitro* Differentiated Macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 2000;59:187-94.
 21. Shintaro Nakao, Takashi Kuwano, Chikako Tsutsumi-Miyahara, Shu-ichi Ueda, Yusuke N. Kimura, Shinjiro Hamano, Koh-hei Sonoda, Yasuo Saijo, Toshihiro Nukiwa, Robert M. Strieter, Tatsuro Ishibashi, Michihiko Kuwano and Mayumi Ono. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 β -induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest*. 2005;115:2979-91.