

# 補肺元湯이 면역반응에 미치는 영향

은재순\* · 전용근 · 이경아 · 임재윤 · 권진<sup>1</sup> · 장인수<sup>2</sup> · 송정모<sup>2</sup>

우석대학교 약학대학, 1: 한국재활복지대학, 2: 우석대학교 한의과대학

## Effect of *Bopaewon-tang* on Immune Reaction

Jae Soon Eun\*, Yong Keun Jeon, Kyung A Lee, Jae Yoon Leem, Jin Kwon<sup>1</sup>, In Soo Jang<sup>2</sup>, Jung Mo Song<sup>2</sup>

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: Korea National College of Rehabilitation & Welfare, 2: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of *Bopaewon-tang* (BT) on immune reaction in mice. BT (500 mg/kg, *p.o.*) increased the viability of thymocytes, but decreased the viability of splenocytes *in vivo*. BT enhanced the population of CD4<sup>+</sup> cells in thymocytes and enhanced the population of Thy1<sup>+</sup> cells in splenocytes and splenic CD8<sup>+</sup> cells. Also, BT decreased the production of IL-4 from splenocytes. Furthermore, BT enhanced the production of nitric oxide and the phagocytic activity of peritoneal macrophages. These results suggest that BT enhances the immune response *via* activation of thymocytes and macrophages.

**Key words :** *Bopaewon-tang*(補肺元湯), thymocytes, splenocytes, macrophages

### 서론

補肺元湯은 生脈散에 소음인약인 인삼을 거하고 태음인약인 길경을 가한 처방으로 東武 이제마의 辛丑本 <東醫壽世保元><sup>1)</sup>에 태음인의 新定處方으로 처음 제시된 것으로 처방의 내용상 <千金要方><sup>2)</sup>의 生脈散의 變方이라 할 수 있다. 보폐원탕은 생맥산과 마찬가지로 기음양허에 대한 기본 방제로서, 맥문동은 폐음을 보하며 심혈을 없애고 비위의 기능을 도와 진액을 불리며, 오미자는 음을 수렴시키고 땀을 맺게 하며 진액을 자양하고, 길경은 폐를 굳세게 하며 내수하는 힘을 증강시켜, 임상에서 일사병, 열사병, 구토 등의 탈수를 수반하는 쇼크, 만성질환의 기진양상과 기음양상, 폐결핵과 만성기관지염 등의 폐기음양허를 나타낼 때 사용한다<sup>3)</sup>. 즉, 태음인의 약점인 肝大肺小로 인한 呼散之氣 부족으로 인한 병증을 해소하고 肺燥로 인한 병증을 조절하는데 있어서 기본이 되는 처방으로 태음인의 면역조절기능을 담당하는 처방이라 할 수 있다.

한의학에서 면역에 대한 개념은 正氣 학설과 관련하여 肺, 脾, 腎 三臟에서 찾을 수 있는데, 肺는 신체의 표면에서 病邪에 대한 방어작용을 담당하고, 腎은 先天之本으로 正氣와 衛氣의 생

성에 관여하며, 脾는 後天之本으로 정기와 위기의 물질적 기반이 된다. 또한 脾胃의 손상은 元氣의 부족을 초래하므로 모든 병의 발생 원인이 될 수 있다는 점에서 脾胃의 氣는 인체의 방어기능에서 중요한 역할을 수행한다고 볼 수 있다<sup>4,6)</sup>.

면역이란 생체가 자기 성분 이외의 이물질 등이 생체의 항상성을 깨뜨리거나 자기를 위협하는 물질을 배제하기 위해 일어나는 일련의 생체방어반응을 의미한다. 이러한 면역계는 항체의 합성 및 분비에 의한 체액성면역과 T-lymphocyte에 의해 주도되는 세포성면역으로 분류되며, 또한 T- 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역 (specific immunity)과 macrophage가 관련된 비특이적면역 (non-specific immunity)으로도 분류한다<sup>7)</sup>.

본 연구에서는 보폐원탕의 면역작용에 미치는 영향을 관찰하고자, 특이적 면역반응을 주도하는 thymocyte 및 splenocyte의 proliferation, subpopulation 및 cytokine 분비에 대한 영향, 비특이적 면역반응을 주도하는 macrophages의 phagocytosis를 측정 한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 C57BL/6계 수컷 20 ± 2 g을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5%,

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569  
· 접수 : 2005/09/21 · 수정 : 2005/12/27 · 채택 : 2006/01/31

dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였다.

2. 시약

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Dulbecco's phosphate buffered saline A (DPBS-A), N-naphthylethylenediamine · 2HCl, sulfanilamide, lucigenin, zymosan, MTT, lipopolysaccharide (LPS),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse  $\gamma$ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated *E. coli* particle은 Molecular Probes Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), white multi-well plate (96-well, Nunc), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), 리오 cytometer (Coulter EPICS-XL), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

보폐원탕의 구성약재들은 우석대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 Table 1과 같으며, 처방 3첩 분량을 증류수 1,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 보폐원탕 분말 39.6g (수득률; 49.8%, 이하 BT라 함)을 얻어, 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포실험시에는 membrane filter (0.45  $\mu$ M)로 여과멸균하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Bopaewon-tang*

韓藥名	生藥名	重量 (g)
麥門冬	Liriopsis Tuber	12.0
桔 梗	Platycodi Radix	8.0
五味子	Schizandrae Fructus	4.0
Total		24.0

4. Thymocytes, splenocytes 및 macrophages의 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki<sup>8)</sup> 및 Mizel<sup>9)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 BT 500 mg/kg을 1일 1회씩 5일간 경구투여한 다음 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 또는 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리) thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다.

Macrophage의 분리는 BT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키고, 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage에 DPBS를 넣어 20분간 CO<sub>2</sub> incubator에 방치한 후 분리된 macrophages를 원심분리하여 사용하였다. 세포배양을 할 때 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

5. Thymocytes 및 Splenocytes의 증식능 측정

세포증식능 측정은 Mosmann<sup>10)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>11)</sup>이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 thymocytes 또는 splenocytes를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100  $\mu$ l (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml)를 접종하고 thymocytes에는 concanavalin A (Con A) 5  $\mu$ g/ml를 splenocytes에는 lipopolysaccharide (LPS) 10  $\mu$ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37 °C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

*In vitro* 실험에서는 분리한 thymocytes 및 splenocytes에 BT 10, 100 및 1,000  $\mu$ g/ml를 각각 48 시간 처리하고 동일한 실험을 실시하였다.

6. Thymocytes 및 Splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 thymocytes 또는 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>12)</sup>.

7. Cytokines 측정

Splenocytes 배양액 중 cytokine의 측정은 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 BT 500 mg/kg을 1일 1회씩 5일간 경구투여한 다음 생쥐의 비장으로부터 splenocyte를 분리하여, 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml로 조제한 다음 96 well plate에 200  $\mu$ l 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500 rpm, 2분, 4 °C) 한 다음, 상등액 50  $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여

cytokine의 양을 측정하였다. 즉 sample 50  $\mu\text{l}$ 에 assay diluent 50  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

8. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $2 \times 10^6$  cells을 분주한 후 macrophage로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법<sup>13)</sup>으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100  $\mu\text{l}$ 와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine · 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37°C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO<sub>2</sub>의 농도를 환산하였다. *In vitro* 실험에서는 BT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 30분 후에 동일한 실험을 실시하였다.

9. 복강 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 macrophage를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin solution은 사용하기 직전에 DME 배지로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다<sup>14,15)</sup>. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50  $\mu\text{l}$ 와 lucigenin 용액 50  $\mu\text{l}$  및 zymosan 용액 30  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 최종 volume이 200  $\mu\text{l}$ 가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다. *In vitro* 실험에서는 BT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 30분 후에 동일한 실험을 실시하였다.

10. 복강 macrophage의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 조정 한 후, 100  $\mu\text{l}$ 를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다<sup>16)</sup>.

11. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean  $\pm$  SE로 나타내었고 통계처리는

Student's *t*-test를 실시하여  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Thymocytes 및 Splenocytes의 증식능에 미치는 효과

대조군의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 138.2  $\pm$  1.8%로 증가하였으며, BT를 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 106.8  $\pm$  0.7%로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 147.5  $\pm$  1.2%로 대조군에 비해 증가하였다. 대조군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 134.0  $\pm$  2.2%로 증가하였으며, BT를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 79.4  $\pm$  1.3%로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 97.3  $\pm$  1.0%로 대조군에 비해 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of BT on the cell viability of mitogen treated-thymocytes and splenocytes in mice.

Samples	Cell Viability (%)			
	Thymocytes		Splenocytes	
	Con A(-)	Con A(+)	LPS(-)	LPS(+)
Control	100.0 $\pm$ 1.2	138.2 $\pm$ 1.8	100.0 $\pm$ 1.4	134.0 $\pm$ 2.2
BT	106.8 $\pm$ 0.7 <sup>*</sup>	147.5 $\pm$ 1.2 <sup>*</sup>	79.4 $\pm$ 1.3 <sup>*</sup>	97.3 $\pm$ 1.0 <sup>**</sup>

BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated thymocytes and splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A (Con A) or lipopolysaccharide (LPS). The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. <sup>\*</sup>: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). Con A(-): Concanavalin A non-treated group, Con A(+): Concanavalin A treated group, LPS(-): Lipopolysaccharide non-treated group, LPS(+): Lipopolysaccharide treated group

*In vitro* 실험에서 thymocytes에 BT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 처리하고 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 92.1  $\pm$  1.5, 87.0  $\pm$  1.2, 80.5  $\pm$  1.8%로 농도의존적으로 세포생존율이 대조군에 비해 감소하였다. Splenocytes에 BT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 처리하고 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 98.3  $\pm$  1.9, 91.3  $\pm$  1.5, 78.9  $\pm$  1.5%로 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 세포생존율이 대조군에 비해 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of BT on the cell viability of thymocytes and splenocytes *in vitro*.

Drug Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Cell viability (%)	
	Thymocytes	Splenocytes
Control	100.0 $\pm$ 1.5	100.0 $\pm$ 1.2
BT 10	92.1 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup>	98.3 $\pm$ 1.9
BT 100	87.0 $\pm$ 1.2 <sup>**</sup>	91.3 $\pm$ 1.5 <sup>**</sup>
BT 1,000	80.5 $\pm$ 1.8 <sup>**</sup>	78.9 $\pm$ 1.5 <sup>**</sup>

Various concentration of BT (10, 100 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added into mouse thymocytes or splenocytes, and then the cells were cultured for 48 hrs. The data represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. <sup>\*</sup>: Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).

2. Thymocytes 및 Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

Thymocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 12.7 ± 0.3% 이었으며, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.1 ± 0.1% 이었으나, BT를 투여하고 분리한 thymic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는 11.8 ± 0.2%로 대조군과 별 차이가 없었으나, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.9 ± 0.2%로 대조군에 비해 증가하였다 (Table 4).

Table 4. Effect of BT on the subpopulation of thymocytes in mice.

Samples	Thymocytes subpopulation (%)	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	12.7 ± 0.3	3.1 ± 0.1
BT	11.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2 <sup>*</sup>

BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (p<0.05).

Splenocytes 중 대조군의 B220 positive 세포 (B220<sup>+</sup>) 세포는 37.4 ± 1.3% 이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1<sup>+</sup>)는 22.8 ± 1.7% 이었다. BT를 투여하고 분리한 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는 31.5 ± 1.3%로 대조군에 비해 감소하였으나, Thy1<sup>+</sup> 세포는 30.5 ± 1.1%로 대조군에 비해 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 14.3 ± 0.5% 이었고, CD8<sup>+</sup> 세포는 7.6 ± 0.4% 이었으며, BT를 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는 14.7 ± 0.6%로 대조군과 별 차이가 없었으나, CD8<sup>+</sup> 세포는 9.8 ± 0.3%로 대조군에 비해 증가하였다 (Table 5).

Table 5. Effect of BT on the subpopulation of splenocytes in mice.

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	Thy1 <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	37.4 ± 1.3	22.8 ± 1.7	14.3 ± 0.5	7.6 ± 0.4
BT	31.5 ± 1.3 <sup>*</sup>	30.5 ± 1.1 <sup>*</sup>	14.7 ± 0.6	9.8 ± 0.3 <sup>*</sup>

BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (p<0.01).

3. Cytokines 분비에 미치는 효과

Splenocytes 배양액 중  $\gamma$ -interferon의 양은 대조군에서 627.4 ± 23.5 pg/ml 이었으며, BT를 투여한 군은 645.4 ± 21.5 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. Interleukin-2양은 대조군에서 389.4 ± 21.8 pg/ml 이었으며, BT를 투여한 군은 376.9 ± 19.3 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 127.3 ± 11.2 pg/ml 이었으며, BT를 투여한 군은 97.5 ± 9.8 pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다 (Table 6).

4. 복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide(NO) 생성량은 48 시간 후에 1.5 ± 0.1  $\mu$ M 이었

으며, BT를 투여하고 분리한 macrophage에서 NO 생성량은 10.6 ± 0.8  $\mu$ M로, LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 대조군의 NO 생성량은 9.8 ± 0.6  $\mu$ M 이었으며, BT를 투여한 군은 38.4 ± 2.1  $\mu$ M로 대조군에 비해 현저히 증가하였다 (Table 7).

Table 6. Effect of BT on the production of cytokines in murine splenocytes

Samples	$\gamma$ -Interferon (pg/ml)	Interleukin-2 (pg/ml)	Interleukin-4 (pg/ml)
Control	627.4 ± 23.5	389.4 ± 21.8	127.3 ± 11.2
YBT	645.4 ± 21.5	376.9 ± 19.3	97.5 ± 9.8 <sup>*</sup>

BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and the separated splenocytes (2 × 10<sup>7</sup> cells/ml) were cultured for 72 hr in RPMI1640 medium. The production of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (p<0.05).

Table 7. Effect of the administration of BT on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages

Samples	Nitric oxide ( $\mu$ M)	
	$\gamma$ -IFN + LPS (-)	$\gamma$ -IFN + LPS (+)
Control	1.5 ± 0.1	9.8 ± 0.6
BT	10.6 ± 0.8 <sup>*</sup>	38.4 ± 2.1 <sup>*</sup>

BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hrs. in the presence or in the absence of LPS and  $\gamma$ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean ± SE of 5 mice. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (<sup>\*</sup> p<0.05, <sup>\*\*</sup> p<0.01, <sup>\*\*\*</sup> p<0.001).  $\gamma$ -IFN + LPS (-):  $\gamma$ -interferon and lipopolysaccharide non-treated group,  $\gamma$ -IFN + LPS (+):  $\gamma$ -interferon and lipopolysaccharide treated group. <sup>\*</sup> Significantly different from control group (p<0.001).

*In vitro* 실험에서 대조군의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하였을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 9.8 ± 0.6  $\mu$ M 이었으며, BT 10, 100 및 1,000  $\mu$ g/ml를 각각 처리하였을 때 10.2 ± 0.8, 11.3 ± 1.5 및 11.9 ± 1.1  $\mu$ M로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 8).

Table 8. Effect of BT on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages *in vitro*.

Drug Concentration ( $\mu$ g/ml)	Nitric oxide ( $\mu$ M)
Control	9.8 ± 0.6
BT 10	10.2 ± 0.8
BT 100	11.3 ± 1.5
BT 1,000	11.9 ± 1.1

Peritoneal macrophages were cultured with BT (10, 100 and 1,000  $\mu$ g/ml) for 48 hrs. in the presence of  $\gamma$ -interferon and lipopolysaccharide.

5. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 대조군의 macrophages로부터 생성되는 relative lucigenin unit (RLU)는 1.03 × 10<sup>7</sup> 이었으나, BT를 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 RLU는 1.09 × 10<sup>7</sup> 로 증가하였다 (Fig. 1), FITC-conjugated E. coli particle의 탐식도 증가됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). *In vitro* 실험에서는 BT

10, 100 및 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때 농도의존적으로 대조군에 비해 RLU가 증가하였다 (Fig. 3).

## 고찰

생체의 면역 반응을 일으키는 실체는 임파구이며 외부로부터 항원이 들어오면 임파구가 감작하여 두가지 형태의 면역반응을 일으킨다. 첫째는 항원의 공격을 숙주의 조직에는 손상을 일으키지 않고 제거하거나 국소염증반응만을 일으키는 정상적인 면역반응이다. 둘째는 면역반응이 지나치게 증가되거나 원하지 않는 방향으로 진행되어 인체에 병적인 상태를 유발하는 과격한 반응을 일으키는 알레르기 (allergy) 또는 과민반응 (hypersensitivity)이다. 따라서 면역반응은 생체방어와 알레르기라는 양면성을 지니게 되며, 그 비중에 따라 생체에 있어서 의미가 전혀 다르게 나타나게 된다<sup>18)</sup>. 흉선세포는 thymus의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte ( $\text{CD4}^+$ ) 및 cytotoxic T lymphocyte ( $\text{CD8}^+$ )로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는  $\gamma$ -IFN 및 IL-2가, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 T, B 임파구 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 한편 B 임파구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

BT를 투여하였을 때 thymocytes의 생존율은 증가하였으나, splenocytes의 생존율은 감소하였다. 이러한 결과가 BT의 직접작용에 의한 것인지를 관찰하기 위해 BT를 *in vitro*에서 처리한 결과 thymocytes 및 splenocytes의 생존율이 감소하였다. 이 결과는 BT가 thymocytes의 생존율에는 간접적으로 splenocytes의 세포생존율에는 직접적으로 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

BT를 투여하였을 때 thymocytes의  $\text{CD4}^+$  세포의 population은 대조군과 차이가 없었으나,  $\text{CD8}^+$  세포의 population은 증가하였다. 한편, BT를 투여하였을 때 splenocytes의 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 대조군에 비해 감소하였으나, Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 증가하였으며, splenic  $\text{CD4}^+$  세포의 population은 대조군과 별 차이가 없었으나, splenic  $\text{CD8}^+$  세포의 population은 증가하였다. 이는 BT가 thymocytes 및 splenocytes의 cytotoxic T 세포의 population을 증가시켜 면역능을 조절하고 있음을 의미하는 것이다. 비장세포에서 분비되는 cytokines인  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4의 양을 측정하였다. BT를 투여하고 분리한 비장세포에서 분비되는  $\gamma$ -IFN 및 IL-2의 양은 대조군과 차이가 없었으나, IL-4의 양은 대조군에 비해 감소하였다. 이 결과는 BT가 비장세포의 Th2 세포를 억제하여 면역능을 조절하고 있음을 의미하는 것이다.

생체에서 분비되는 cytokines들은 macrophage를 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에<sup>20)</sup> 복강 macrophages에서 분비되는 nitric oxide 및 phagocytic activity를 측정하였다. 외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된

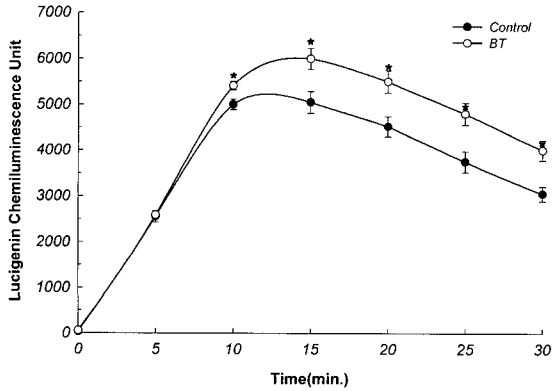


Fig. 1. Effect of the administration of BT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. BT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \* Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

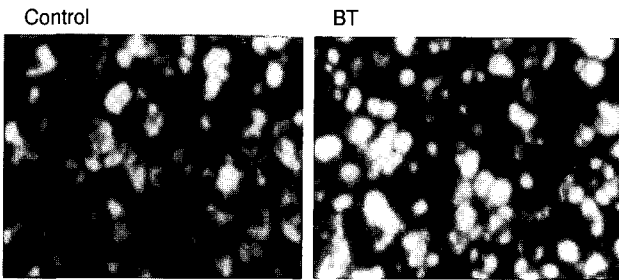


Fig. 2. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from BT-administered mice. Photographs (taken at 200 $\times$  magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and BT (500 mg/kg)-administered mice (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

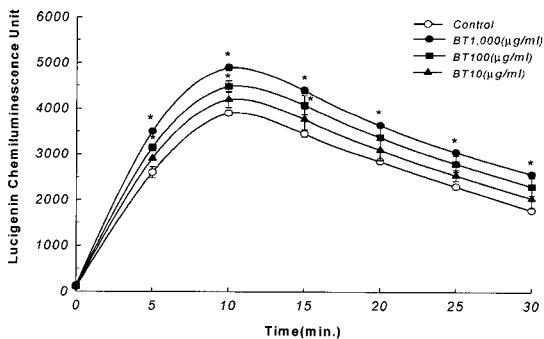


Fig. 3. Effect of BT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with BT (10, 100 and 1,000  $\mu\text{g/ml}$ ). The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \* Significantly different from control group ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다<sup>21)</sup>.

BT를 투여하였을 때 nitric oxide (NO)의 양이 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 이 결과가 BT의 직접작용에 의한 것인가를 확인하기 위해 BT를 in vitro로 처리하였을 때, NO양은 대조군과 차이가 없었다. 이는 BT가 macrophages에 간접적으로 작용하여 NO 생성을 증가시킴을 의미하는 것이다. 또한, BT를 투여하였을 때 macrophages의 탐식능이 증가하였다. 이를 확인하기 위해 FITC-conjugated E. coli를 이용하여 macrophages의 engulfment를 측정할 결과 동일한 실험결과를 나타내었다. 어의 작용이 BT의 직접작용에 의한 것인가를 확인하기 위하여 BT를 in vitro로 처리하였을 때 농도의존적으로 탐식능이 증가하였다.

이 결과는 BT의 macrophages의 탐식능 증가작용이 직접작용에 의해 나타나고 있음을 의미하는 것이다. NO는 활성화된 macrophages의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. BT가 NO 생성 및 탐식능을 동시에 증가시켰다는 것은 BT의 탐식능 증가작용이 NO와는 다른 경로를 통하여 나타나고 있음을 시사하는 것이다.

## 결론

흉선세포의 생존율은 증가시켰으나, 비장세포의 생존율은 감소시켰다. 흉선세포의 CD8<sup>+</sup> 세포의 population, 비장세포의 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population과 splenic CD8<sup>+</sup> 세포의 population을 증가시켰다. 비장세포로부터  $\gamma$ -IFN 및 IL-2의 분비에는 영향을 주지 않았으나, IL-4의 양은 감소시켰다. 복강 macrophages로부터 nitric oxide의 분비를 촉진하였다. 복강 macrophages의 탐식능을 증가시켰다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. 이제마. 동의수세보원, 서울, 행림출판, p 124, 1986.
2. 김창민, 류순섭: 사상체질의학, 아카데미서적, p 841, 2002.
3. 송일병 외. 개정증보 사상의학. 서울, 집문당, p 341, 2004.
4. 심승향: 中醫與免疫, 浙江中醫學院學報, pp 14, 6-7, 1990.
5. 서증명: 脾與免疫系統關係研究近況, 四川中醫, pp 1, 16-18, 1993.
6. 박재현: 보중약기탕이 Cyclosporin A를 투여한 흰쥐의 간 및 신손상에 미치는 영향, 대한한의학회지, pp 15, 451-456, 1994.
7. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. : Cellular and Molecular Immunology. 2ed. p 5, Saunders, 1994.

8. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 2844, 1978.
9. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. : Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol. 120, 1497, 1979.
10. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65, 55, 1983.
11. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129, 23, 1990.
12. Suda, T. and Nagata, S. : Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994.
13. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. : Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity, 59(9), 3280, 1991.
14. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259, 1994.
15. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112, 163, 1988.
16. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. : A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immunol. Methods, 162, 1, 1993.
17. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 45, 1, 1984.
18. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. : Cellular and molecular immunology. p.p.279-282 Saunders Company (2ed). U.S.A. 1994.
19. Miceli, M.C. and Parnes, J.R. : The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology, 53, 59, 1993.
20. Charles, A.J., Paul, T., Mark, W. : The immune system in health and disease. 4ed, Garland Pub., p 463, 2000.
21. Channon, J.Y., Leslie, C.C. and Johnston, Jr. R.B.: Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. J. Leucocyte Biol. 41, 450-455, 1987.
22. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. Kor. J. Immunol. 18, 635-644, 1996.