

# 柴胡가 HMC 및 Mouse의 염증관련 cytokine 분비에 미치는 영향

최성우 · 강 희<sup>1</sup> · 심범상 · 김성훈<sup>2</sup> · 최승훈 · 안규석\*

경희대학교 한의과대학 병리학교실 · 한의학연구소, 1: BK21 경희대학교 한의과학사업단, 2: 암예방소재개발연구센터

## Effect of *Bupleuri Radix* on Inflammatory Cytokine Secretion to HMC and Mouse Immune Cells

Sung Woo Choi, Hee Kang<sup>1</sup>, Bumsang Shim, Sung Hoon Kim<sup>2</sup>, Seung Hoon Choi, Kyoo Seok Ahn\*

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University · Institute of Oriental Medicine, 1: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center, 2: Cancer Preventive Material Development Research Center

This reserch was performed in order to investigate the anti-inflammatory effects of *Bupleuri Radix*(BR) on the immune response in vitro. Cellular proliferation and cytokine production were measured in mast cells or mouse B cells or CD4 Th cells. BR water extract inhibited the secretions of TNF- $\alpha$  and IL-6 in PMA/A23187 stimulated HMC-1 cells. It increased proliferation but did not affect the expressions of CD69 or CD23 in rIL-4/anti-CD40 activated B cells. BR reduced surface IgE expression and secreted IgE but increased the production of IL-4, IFN- $\gamma$  and IgG1 in the same cells. BR caused an increase in proliferation in anti-CD3/anti-CD28 stimulated CD4 Th cells but it did not affect the differentiation of Th1 or Th2 cells. However, IL-2 was increased in BR treated Th2 cells. Considering the above-mentioned results, BR can be applied to a broad range of anti-inflammatory reactions, but our data suggest that it will not be likely to exert any effects on type 1 allergic response.

Key words : *Bupleuri Radix*(BR), HMC-1, B cells, T cells, cytokine, inflammation

### 서 론

柴胡(*Bupleuri Radix*; BR)는 해열, 진통, 진정, 항염증, 간기능 개선 등<sup>1)</sup>의 효과가 있어 임상에서 빈용 되는 약재이다. 그간 시호, 또는 시호를 함유한 방제의 여러 약리학적 효능에 대한 연구 보고가 있어 왔으나 시호 單味의 항염증 작용을 면역학적 관점에서 고찰한 연구는 보고된 바가 없었으며 이에 저자는 본 연구에서 시호의 항염증 효과를 면역학적 관점에서 분자생물학적 기법을 활용하여 연구하였다.

자연면역을 담당하는 면역세포중의 하나인 비만세포(HMC-1) 및 특이면역을 담당하는 마우스 면역세포 B cell, T cell에 시호를 투여 하였을 때 각 면역세포의 증식도 및 그들이 분비하는 여러 cytokine들의 정량적 분석을 통하여 임상에서 시호가 표출하는 항염증 효과의 기전을 분자생물학적으로 분석하였다.

자연면역 관련하여 HMC-1에 염증을 유도한 뒤 항염

cytokine인 IL-6 and TNF- $\alpha$ 의 변화량을 측정하였고, 특이적 면역에 관련된 B cell에 대한 영향을 보기 위하여 약제 처리한 mouse B cell의 표면단백질 CD69, CD23, surface IgE를 확인한 뒤 분비된 IL-4, INF- $\gamma$ , IgE, IgG1의 변화량을 측정하였고 T cell에 대한 영향을 보기 위하여 활성화 시킨 T cell을 Th1, Th2 로 분화시켜 이들이 분비하는 IL-2, IL-4, INF- $\gamma$ 의 변화량을 측정하였다.

그 결과 시호 물 추출물의 염증관련 cytokine 분비에 관련하여 몇 가지 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 약재

柴胡(*Bupleuri Radix*; BR): (주)나눔제약(경북 영천시 금호읍 원기리 14번지)에서 中國 原産제품으로 구입 후, 물로 세척한 뒤 사용하였다.

##### 2) 동물

본 연구에 사용한 실험용 쥐는 생후 7주령의 BALB/c 수컷

\* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2009/01/10 · 수정 : 2009/01/27 · 채택 : 2009/02/07

마우스(오리엔트(주))를 사용하였으며, 항온 항습 상태에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사료는 방사선 처리가 된 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며, 음용수는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 무제한으로 제공하여 사육하였다.

### 3) HMC - 1 cells

HMC - 1 cell(human mast cell line)은 10% FBS가 함유된 Iscove's media에서 배양하였다.

### 4) 배지 및 시약

Fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic과 Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM)는 GIBCO에서, RPMI-1640는 WelGene에서 구입하였다. MTT assay 용액 (Celltiter 96 aqueous one solution reagent)은 Promega에서 구입하였으며 PMA, calcium ionophore A23187는 Sigma에서 구입하였다. MACS mouse CD45R (B220) microbeads, MACS mouse CD4 (L3T4) microbeads, MACS 세포분리 컬럼(LS column) 그리고 MACS Midi-separator는 Miltenyi Biotec에서 구입하였다. ELISA에 사용한 모든 EIA kit, anti mouse CD40 항체, anti-mouse CD3ε 항체 그리고 anti mouse CD28 항체는 BioLegend에서 구입하였다. recombinant mouse interleukin-4(rmIL-4), recombinant mouse interleukin-2(rmIL-2), recombinant mouse interleukin-12(rmIL-12), anti mouse interleukin-4, anti mouse interleukin-12, phycoerythrin(PE)-anti-mouseCD69, PE-anti-mouse CD23, Fluorescein isothiocyanate(FITC)-anti-mouse- CD45R/B220, FITC-anti-mouse IgE 그리고 PE-anti-mouse CD45R/B220는 BD PharMingenTM에서 구입하였다.

## 2. 방법

### 1) 약재 추출물 제조

약재 추출은 세척한 시호 약재를 유리로 된 추출용기에 넣고 물을 충분히 잠기도록 하여 하루 동안 상온에서 浸出한 후 sonicator(Elmasonic, Germany)를 사용, 50 ℃에서 1시간 씩 2회 물리적 자극을 가하여 浸出을 촉진하여 시행하였다. 이 용액을 여과지로 여과한 후 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압증류농축한 결과 얻은 농축액을 freezing dryer(Eyela, Japan)로 24시간 시행, 동결 건조된 분말 상태의 시료로써 사용하였다(수율은 7.96%).

### 2) 시호 물 추출물의 HMC-1 에 대한 항염증 효과

#### (1) HMC-1 세포주 배양

사람의 비만세포 계열인 HMC-1 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic-antimycotic 가 함유된 Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

#### (2) 생존율 측정

HMC-1 cell의 시호 물 추출물에 대한 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 well 당 2×10<sup>4</sup> 개의 세포가 들어가도록 serum free media에 현탁하여 분주하고 시호 물 추출물을 0, 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리하였으며 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서

24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. MTT assay 용액은 well당 20 μl 씩 첨가하였고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 흡광도(490-650 nm)를 microplate reader (TECAN, Austria)를 사용하여 측정하였다. 반응시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. HMC-1의 시호 물 추출물에 대한 생존율은 시호 물 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

### (3) IL-6 and TNF-α 측정

시호 물 추출물의 항염증 효과를 보기 위하여 HMC-1 세포에 PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate)와 calcium ionophore A23187 으로 자극하여 유도된 염증반응에 대해 pro-inflammatory cytokine(IL-6 and TNF-α) 분비량 변화를 ELISA 방법으로 측정하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다. HMC-1 세포는 24 well plate에 well 당 5×10<sup>5</sup> 개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 PMA (20 nM) 와 calcium ionophore A23187 (1 μM)을 넣고 동시에 시호 물 추출물을 각각 0, 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리한 후 8 시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 ELISA 측정에 사용하였다.

### 3) 시호 물 추출물이 마우스 B 세포에 미치는 영향

#### (1) 脾臟세포 부유액의 준비

脾臟을 마우스(BALB/c)로부터 적출하여 10% FBS와 1% 항생제(antibiotic-antimycotic)가 함유된 RPMI-1640 배지로 세척한 후 Micro slide glass의 거친 면을 이용하여 spleen을 잘게 으갠 뒤 0.40 μm nylon cell strainer로 여과하여 脾臟세포를 분리하였다. 분리한 脾臟세포 부유액은 300 g 에서 10분간 원심분리한 후 그로부터 얻은 세포 침전물에 함께 존재하는 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer를 처리하였다. 파괴된 적혈구를 비장 세포 부유액 으로부터 완전히 제거하기 위하여 RPMI-1640 배지로 2회 세척하였다. 원심분리에 의해 최종적으로 얻은 비장 세포를 적당량의 RPMI-1640 배지에 현탁한 후 trypan blue exclusion assay를 통해 생존율을 확인과 함께 cell 수를 측정하였다.

#### (2) B 세포(CD45R/B220)의 분리

脾臟세포 중에서 B 세포를 분리하기 위하여 MACS mouse CD45R(B220) microbeads를 사용하였다. 脾臟세포 1×10<sup>7</sup>개 당 90 μl의 완충용액(0.5% BSA-2 mM EDTA-PBS, pH 7.2)을 넣고 잘 현탁한 후 1×10<sup>7</sup>cells/90μl 농도에 10 μl의 MACS CD45R (B220) microbeads를 첨가하여 4 ℃에서 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액에 10~20배 부피의 완충용액을 넣고 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 얻은 침전물에 500 μl의 완충용액을 첨가하여 재현탁하였다. B 세포 분리를 위해 MACS 세포 분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator에 장착하여 준비한 뒤 앞서 준비된 세포 현탁액을 column 안으로 통과시켰다. 그 상태에서 3회 완충용액으로 컬럼을 세척하여 컬럼에 결합하지 않은 분획을 제거한 후 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator로부터 분리시킨 뒤 컬럼 안에 남아있는 B 세포 분획은 피스톤을 사용하여 밖으로 밀어내어 분리시켰다.

(3) 배양 및 증식능 측정

마우스 B 세포의 증식능을 측정하기 위하여 96 well plate를 사용, 각 well 당  $4 \times 10^5$  개의 세포를 분주하고 시호 물 추출물을  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체 ( $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 rmlL-4 ( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ )를 처리하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT assay 용액을 well당  $20 \mu\text{l}$  씩 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 흡광도( $490\text{-}650 \text{ nm}$ )를 microplate reader (TECAN, Austria)를 사용하여 측정하였다. 반응시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. 마우스 B 세포의 시호 물 추출물에 대한 증식능은 시호 물 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

(4) CD23과 CD69 및 sIgE 발현분석

B 세포의 CD23, CD69 그리고 sIgE 의 발현을 분석하기 위하여 유세포 형광분석기(FACS)를 사용하였다. 마우스의 비장으로부터 분리한 B 세포를 24-well plate에 각 well 당  $1 \times 10^6$  개가 되도록 세포를 분주하고 시호 물 추출물을  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체 ( $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 rmlL-4 ( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ )를 처리하여 CD69의 경우 48시간, CD23과 sIgE의 경우 72 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 유세포형광분석을 실시하기 위해서 배양한 B 세포를 FACS용 완충액 (1% FBS-0.1%  $\text{NaN}_3$ -PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하고 각각 해당되는 형광물질로 염색하였다. CD69의 경우 PE-anti-mouse CD69와 FITC-anti-mouse-CD45R/B220으로 염색하였으며 CD23의 경우 PE-anti-mouse CD23과 FITC-anti-mouse-CD45R/B220으로 염색하였고 sIgE의 경우 FITC-anti-mouse IgE와 PE-anti-mouse CD45R/B220으로 염색하였다. 모든 염색 반응은 상온에서 30분간 시행하였다. 형광을 띠는 항체로 표지한 세포는 반응 종료 후 3회 이상 FACS용 완충액으로 세척한 후 유세포형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 측정하여 해당 세포에서의 sIgE, CD23(Fce) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램을 사용하였으며 결과는 CD23+/B220+, CD69+/B220+, sIgE+/B220+의 백분율(%)로 산출하였다.

(5) IFN- $\gamma$ , IL-4, IgG1 및 IgE 생산량 측정

시호 물 추출물이 in vitro 상에서 B 세포 면역능에 미치는 영향을 보기 위하여 시호 물 추출물을 처리한 B 세포로부터 생성되는 IFN- $\gamma$ , IL-4, IgG1 및 IgE의 양을 ELISA로 측정하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다. 마우스(BALB/c)로부터 분리한 B 세포는 24-well plate에 각 well 당  $1 \times 10^6$  개의 세포를 분주하였고, 시호 물 추출물을  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체 ( $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 rmlL-4( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ )를 처리하여 IFN- $\gamma$ , IL-4, IgG1의 경우 72시간, IgE의 경우 10일 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 ELISA 측정에 사용하였다.

4) 시호 물 추출물이 Th2 세포 분화에 미치는 영향

(1) CD4+ T cell의 분리

脾臟세포 중에서 CD4+ T 세포를 분리하기 위하여 MACS mouse CD4(L3T4) microbeads를 사용하였다. 脾臟세포  $1 \times 10^7$ 개 당  $90 \mu\text{l}$ 의 완충용액(0.5% BSA-2 mM EDTA-PBS, pH 7.2)을 넣고 잘 현탁한 후  $1 \times 10^7$ cells/ $90 \mu\text{l}$  농도에  $10 \mu\text{l}$ 의 MACS mouse CD4(L3T4) microbeads를 첨가하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액에 10~20배 부피의 완충용액을 넣고 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 얻은 침전물에  $500 \mu\text{l}$ 의 완충용액을 첨가하여 재현탁하였다. CD4+ T 세포 분리를 위해 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator에 장착하여 준비한 뒤 앞서 준비된 세포 현탁액을 column 안으로 통과시켰다. 그 상태에서 3회 완충용액으로 컬럼을 세척하여 컬럼에 결합하지 않은 분획을 제거한 후 MACS 세포분리 컬럼을 MACS Midi-separator로부터 분리시킨 뒤 컬럼 안에 남아있는 CD4+ T 세포 분획은 피스톤을 사용하여 밖으로 밀어내어 분리하였다.

(2) 증식능 측정

마우스 비장으로부터 분리한 CD4+ T 세포의 증식능을 측정하기 위하여 anti-mouse CD3 $\epsilon$ ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )이 처리된 96-well plate를 사용, 각 well 당  $4 \times 10^5$  개의 세포를 분주하고 시호 물 추출물을  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD28 항체 ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT assay 용액을 well당  $20 \mu\text{l}$  씩 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 흡광도( $490\text{-}650 \text{ nm}$ )를 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 반응시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. 마우스 CD4+ T 세포의 시호 물 추출물에 대한 증식능은 시호 물 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

(3) In vitro Th1/Th2 polarization 및 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-2 생산량 측정

시호 물 추출물이 in vitro 상에서 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향을 보기 위하여 anti-mouse CD3 $\epsilon$ ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )이 처리된 24-well plate에  $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 분주한 후 anti mouse CD28 항체( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 rmlL-2( $5 \text{ ng}/\text{ml}$ )를 첨가하였다. Th1 polarization은 rmlL-12( $5 \text{ ng}/\text{ml}$ , )과 anti mouse IL-4 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 첨가하여 시행하였고 Th2 polarization은 rmlL-4 ( $5 \text{ ng}/\text{ml}$ )과 anti mouse IL-12 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 첨가하여 시행하였다. 그리고 동시에 시호 물 추출물을  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 Th1/Th2 세포로부터 생성된 IL-4, IFN- $\gamma$ , 및 IL-2의 정량을 위하여 ELISA 측정에 사용하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다.

5) ELISA 측정

본 연구에서 cytokine의 생산량은 sandwich ELISA 방법으로 측정하였으며 각 시료는 duplicate로 시행하였다. 측정 대상

에 따라 각 1차 항체 원액을 coating 완충용액에 해당 농도가 되도록 희석하여 96-micro plate에 well 당 100  $\mu$ l씩 분주한 후 4°C에서 12~16시간 동안 반응하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 well 당 200  $\mu$ l씩 넣고 최소 1시간 동안 상온에 두어 blocking하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 well 당  $\geq 200$   $\mu$ l씩 넣고 3회 세척한 후 B 세포 배양 상등액을 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 시료를 분주한 96 microplate는 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 well 당  $\geq 200$   $\mu$ l씩 넣고 6회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 해당 농도가 되도록 10% FBS가 함유된 PBS에 희석하여 well 당 100  $\mu$ l씩 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척용 완충용액으로 well 당  $\geq 200$   $\mu$ l씩 넣고 6회 세척 후 Streptavidin-HRP 용액을 해당 농도로 희석하여 well 당 100  $\mu$ l씩 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 well 당  $\geq 200$   $\mu$ l씩 넣고 6회 세척 후 TMB substrate 용액을 well 당 100  $\mu$ l씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 종료는 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 well 당 50  $\mu$ l씩 첨가함으로써 완료하였으며 흡광도는 450-570 nm 파장에서 microplate reader기를 사용하여 측정하였다.

6) 통계분석

실험결과와 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 결정하였으며 유의확률(p-value) 값은 0.05 미만인 경우에만 인정하였다.

결 과

1. 시호 물 추출물이 HMC-1의 IL-6 와 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

1) HMC-1 cell의 시호 물 추출물에 대한 생존율

HMC-1의 시호 물 추출물에 대한 농도별 (0, 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/ml) 생존율을 측정한 결과 시호 물 추출물이 1, 10  $\mu$ g/ml 처리된 실험군은 대조군과 비교하여 생존율에 변화가 없었으나 100, 1000  $\mu$ g/ml에서 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이며 (각각 p = 0.0001과 p = 0.00001) 생존율이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과를 기반으로 HMC-1 세포의 항염증 효과 실험에 대한 시호 물 추출물 처리 농도를 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml로 결정하였다.

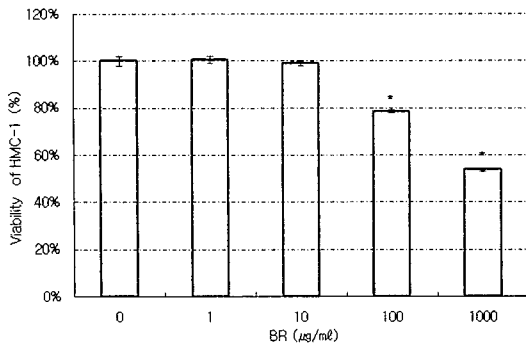


Fig. 1. Effect of BR water extract on cell viability in HMC-1 cells. HMC-1 cells(1×10<sup>5</sup> cells/ml) were incubated with BR water extract for 24 hours as indicated concentrations. Viability was evaluated using the MTT assay. Statistically significant value compared to control data(\*p < 0.05)

2) 시호 물 추출물의 HMC-1 cell에 대한 항염증 효과

HMC-1 세포주에 PMA (20 nM)와 calcium ionophore A23187 (1  $\mu$ M)으로 염증 반응을 유도하고 동시에 BR 물 추출물을 첨가했을 때 항염증효과를 pro-inflammatory cytokines인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA를 통해 비교함으로써 알아보았다. IL-6의 경우 시호 물 추출물의 1  $\mu$ g/ml 농도에서는 대조군과 차이가 없었으며 10, 100  $\mu$ g/ml 농도에서는 대조군에 비해 감소(각각 p=0.0264와 p= 0.0091)하였다. TNF- $\alpha$ 의 경우 시호 물 추출물 첨가량이 증가 할수록 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  분비량이 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소(각각 p= 0.0377, p=0.0198와 p=0.0031)하는 경향을 나타내었다. 두 가지 pro-inflammatory cytokines의 ELISA 결과는 mean $\pm$  SD 값으로 나타내어 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Effect of BR water extract on pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) secretion in HMC-1 cells

BR ( $\mu$ g/ml)	IL-6 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
0	505.96 $\pm$ 9.03	113.05 $\pm$ 0.76
1	474.57 $\pm$ 14.29	106.30 $\pm$ 2.68*
10	459.68 $\pm$ 12.79*	105.35 $\pm$ 2.10*
100	455.43 $\pm$ 3.76*	93.32 $\pm$ 0.76*

HMC-1 cells were sensitized with PMA (20 nM) and calcium ionophore A23187 (1  $\mu$ M) for 8 hours with or without BR water extract. TNF- $\alpha$  levels in cell culture supernatant were measured using the ELISA. Statistically significant value compared to control data.\*p < 0.05)

2. 시호 물 추출물이 마우스 B 세포에 미치는 효과

1) 마우스 B 세포의 시호 물 추출물에 대한 증식능

마우스 B 세포의 시호 물 추출물에 대한 농도별 (0, 10, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml) 증식능을 측정한 결과 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 증가(10, 50, 100  $\mu$ g/ml 농도 각각 p=0.0091, p=0.0003, p=0.0001)하였으나 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군과 비슷한 수준으로 감소하는 경향을 보였으므로 마우스 B 세포에 대한 면역실험에 있어서 시호 물 추출물 적용 농도는 10, 50, 100  $\mu$ g/ml로 결정하였다(Fig. 2).

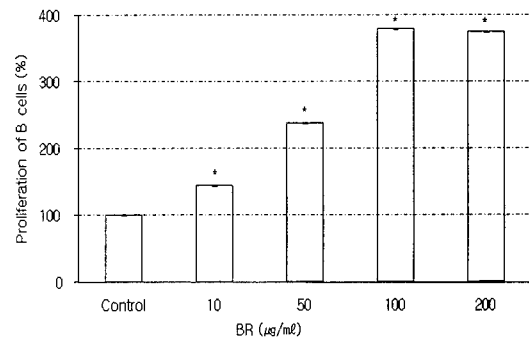
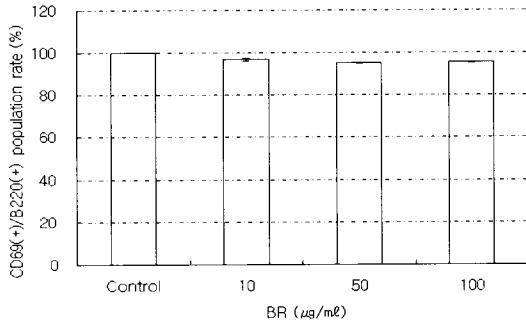


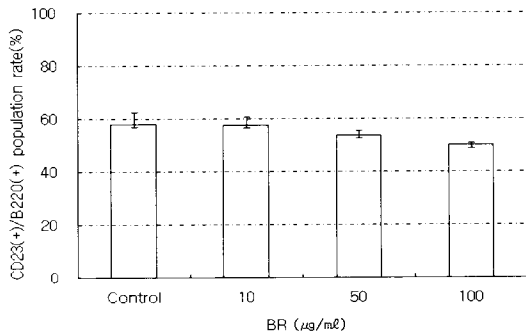
Fig. 2. Effect of BR water extract on the cell proliferation in mouse splenic B cells. Mouse splenic B cells (4×10<sup>5</sup> cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies (3  $\mu$ g/ml) and recombinant mouse IL-4 (10 ng/ml) with or without BR water extract for 72 hours as indicated concentrations. Proliferation was evaluated using the MTT assay. Statistically significant value compared to control data.\*p < 0.05) SD bars are too small to be seen.

2) 시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 CD23과 CD69 및 sIgE 발현에 미치는 영향

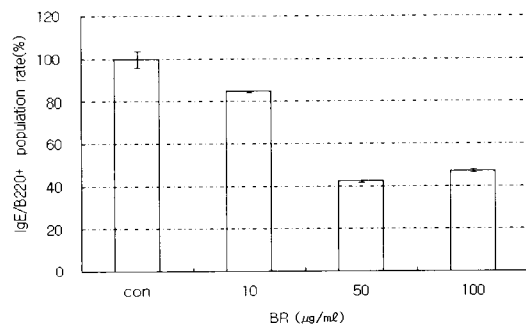
시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 CD69(early activation marker), CD23(low affinity IgE receptor) 그리고 sIgE 발현에 미치는 영향을 유세포형광분석기를 사용하여 측정하였다. CD69와 CD23의 경우 모두 첨가량에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3, 4). 그리고 sIgE의 경우 시호 물 추출물 첨가량이 증가할수록 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 5).



**Fig. 3. Percentage of CD69+ positive mouse splenic B cells.** Mouse splenic B cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) and recombinant mouse IL-4 ( $10 \text{ ng/ml}$ ) with or without BR water extract for 48 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for CD69+ /B220+ expression by flow cytometry. Statistically significant value compared to control data. (\*:  $p < 0.05$ ) SD bars are too small to be seen.



**Fig. 4. Percentage of CD23+ positive mouse splenic B cells.** Mouse splenic B cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) and rIL-4 ( $10 \text{ ng/ml}$ ) with or without BR water extract for 72 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for CD23+ /B220+ expression by flow cytometry. Statistically significant value compared to control data. (\*:  $p < 0.05$ )



**Fig. 5. Percentage of sIgE positive mouse splenic B cells.** Mouse splenic B cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) and rIL-4 ( $10 \text{ ng/ml}$ ) with or without BR water extract for 72 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for sIgE/B220+ expression by flow cytometry. Statistically significant value compared to control data. (\*:  $p < 0.05$ )

3) 시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 IgE, IgG1, IL-4 및 IFN- $\gamma$  생성에 미치는 영향

시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 IgE 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 대조군에 비해 시호 물 추출물의 첨가량이 증가 할수록 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다(Table 2). 이와 함께 시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 IgG1 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군과 차이가 없었으나 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 통계적으로 유의한 차이(각각  $p=0.0063$ 과  $p=0.0028$ )를 보이며 증가하였다. 시호 물 추출물이 마우스 B 세포의 IL-4와 IFN- $\gamma$  분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 IL-4의 경우 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 감소( $p=0.0017$ )하였으며 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비해 증가(각각  $p=0.0075$ 와  $p=0.0168$ )하였다. IFN- $\gamma$ 의 경우 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 감소( $p=0.0018$ )하였으며 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비해 증가(각각  $p=0.0004$ 와  $p=0.0002$ )하였다.

**Table 2. Effect of BR water extract on IL-4, IFN- $\gamma$ , IgE and IgG1 secretion in mouse splenic B cells**

BR ( $\mu\text{g/ml}$ )	IL-4 (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)	IgE (ng/ml)	IgG1 (ng/ml)
0	58.31 $\pm$ 1.58	103.91 $\pm$ 2.57	2.00 $\pm$ 0.11	2.02 $\pm$ 0.11
50	32.19 $\pm$ 1.46*	66.18 $\pm$ 1.93*	1.47 $\pm$ 0.21*	1.72 $\pm$ 0.29
100	90.90 $\pm$ 5.48*	209.82 $\pm$ 3.21*	1.02 $\pm$ 0.2**	9.78 $\pm$ 1.23*
200	71.24 $\pm$ 3.05*	220.73 $\pm$ 1.93*	0.33 $\pm$ 0.1**	8.98 $\pm$ 0.74*

Mouse splenic B cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) and rIL-4 ( $10 \text{ ng/ml}$ ) with or without BR water extract for 3 days (IL-4, IFN- $\gamma$ , IgG1) or 10 days (IgE). The levels of cytokines or immunoglobulins from cell culture supernatant were measured using ELISA. Statistically significant value compared to control data. (\*:  $p < 0.05$ )

3. 시호 물 추출물이 마우스 CD4 T 세포에 미치는 효과

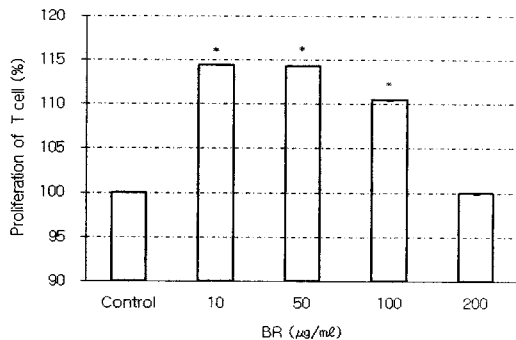
1) CD4+ T cell의 시호 물 추출물에 대한 증식능

마우스 CD4 T 세포의 시호 물 추출물에 대한 농도별 (0, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) 증식능을 측정된 결과 대조군에 비해 시호 물 추출물 10, 50, 100,  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가(각각  $p=0.0015$ ,  $p=0.0001$ 와  $p=0.0029$ )하고 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군과 비슷한 수준으로 감소하였다. 따라서 마우스 CD4 T 세포에 대한 면역실험에 있어서 시호 물 추출물 적용 농도는 0, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 으로 결정하였다(Fig. 6).

2) Th1/Th2 분화 및 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-2 생성에 미치는 영향

시호 물 추출물이 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향을 각 세포에서 분비되는 대표적인 cytokine의 양을 ELISA를 통해 측정함으로써 알아보았다. Th1 polarization의 경우 대표적인 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 분비량을 측정된 결과 시호 물 추출물의 어떠한 농도 범위에서도 대조군에 비해 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 3). Th2 polarization의 경우 대표적인 cytokine인 IL-4와 최근 Th2에 영향을 주는 것으로 알려진 IL-2의 분비량을 측정된 결과 Th2의 IL-4 분비량은 시호 물 추출물 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해 증가( $p=0.0320$ 과  $p=0.0032$ )하였으며 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비해 감소( $p=0.0238$ )하였다. Th2의 IL-2 분비량은 시호 물 추출물 10, 50  $\mu\text{g}$

/ml 농도에서 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가(각각 p=0.0005와 p=0.0099)하였으며 100 µg/ml 농도에서는 대조군과 비슷한 수준의 값을 나타내었다.



**Fig. 6. Effect of BR water extract on the cell proliferation in mouse splenic CD4+ T cells.** Mouse splenic CD4+ T cells( $4 \times 10^5$  cells/well) were stimulated with plate-bound anti-mouse CD3 $\epsilon$  antibodies( $10 \mu\text{g/ml}$ ) and anti-mouse CD28 antibodies( $2 \mu\text{g/ml}$ ) with or without BR water extract for 48 hours as indicated concentrations. Proliferation was evaluated using the MTT assay. Statistically significant value compared to control data.( $p < 0.05$ ) SD bars are too small to be seen.

**Table 3. Effect of BR water extract on cytokine secretion in the differentiated Th1/Th2 cells**

BR (µg/ml)	Th1 cell		Th2 cell	
	IFN- $\gamma$ (ng/ml)	IL-4(ng/ml)	IL-4(ng/ml)	IL-2(ng/ml)
0	457.87 $\pm$ 20.27	7.65 $\pm$ 0.21	22.09 $\pm$ 0.00	
50	443.70 $\pm$ 1.18	8.57 $\pm$ 0.28*	29.13 $\pm$ 0.31*	
100	445.53 $\pm$ 1.89	9.95 $\pm$ 0.15*	26.32 $\pm$ 0.85*	
200	443.87 $\pm$ 7.07	6.99 $\pm$ 0.01*	24.02 $\pm$ 1.17	

Purified CD4+ T cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with rIL-12( $125 \text{ ng/ml}$ ) and anti-mouse IL-4 antibodies( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for Th1 polarization and with or without BR water extract for 72 hours as indicated concentrations. Cytokine levels from cell culture supernatant were measured using the ELISA. Statistically significant value compared to control data.( $p < 0.05$ )

## 고찰

柴胡는 미나리아재비과의 여러해살이풀로서 학명은 *Bupluerum falcatum* L. 이며 그 뿌리를 약용으로 하고 생약명은 *Bupleuri Radix*이다.<sup>2)</sup> 성미는 苦寒하며 表裏를 조화시키고 풀어 주며 肝氣를 통하게 하고 陽을 상승시키는 효능이 있어 寒熱往來, 胸滿脇痛, 目眩, 口苦 등의 증상을 치료한다.<sup>3)</sup>

柴胡 및 柴胡를 主劑로 상용한 처방에 대한 그간의 연구는 담석증<sup>4)</sup>, 알러지 천식<sup>5)</sup>, 간 손상회복<sup>6)</sup>, 자궁경부 암세포에 대한 영향<sup>7)</sup>, 뇌손상 보호<sup>8)</sup>, 고지혈증에 대한 영향<sup>9)</sup>, 신경세포 보호효과에 대한 연구<sup>10)</sup> 등을 들 수 있다.

柴胡가 君藥으로 사용된 대표적인 처방인 大柴胡湯 및 小柴胡湯의 적응증 중 염증관련 질병을 살펴보면 간염, 肩關節炎, 뇌염, 感冒, 폐결핵, 담낭염, 편도선염, 말라리아, 중이염, 폐염, 늑막염, 임파선염, 이차선염<sup>11)</sup> 등 대단히 넓은 범위의 염증관련 질환에 활용됨을 알 수 있으며 이는 君藥인 柴胡의 항염증 효과를 시사하는 것이다.

이에 저자는 柴胡 單味の 염증치료 효과의 기전을 그동안 시도되어지지 않은 면역학적 관점을 통한 분자생물학적 방법으로 밝혀 보았다.

염증(inflammation)은 다양한 원인으로 인하여 야기된 손상에 대한 생체조직의 국소적인 방어보호반응으로 정의될 수 있으며 그 과정에서 發熱, 發赤, 疼痛, 浮腫의 특징적 증상을 수반한다.<sup>12)</sup> 인체에서 손상에 대한 치료반응을 담당하는 것이 면역기능인데, 면역반응은 적절한 범위 내에서 조절되어야 하며 무력한 면역반응은 손상에 의한 감염을 충분히 회복시키지 못하여 염증이 만성적으로 진행되게 하거나 감염조직의 영구적 기능부전을 불러올 수 있고, 반대로 과도한 면역반응은 병원체나 항원들보다 오히려 더 심한 조직손상을 가져올 수 있다.

인체의 면역체계는 자연면역계와 특이면역계로 크게 나뉘고 또한, 특이면역은 주로 항체 및 B 세포가 담당하고 있는 체액성 면역과 주로 T 세포가 담당하는 세포성 면역으로 나누어진다.<sup>13)</sup>

면역기능 담당 세포가 분화, 증식, 또는 effector 활성을 발휘할 때 세포간에 각종 방법에 의한 signal이 전달되는데, 근접한 세포 사이에서 signal을 전달하는 단백질 분자를 cytokine이라 부른다.<sup>14)</sup> cytokine의 종류로는 interleukin(IL-1~IL-13), interferon, TNF (tumor necrosis factor) 등이 있으며 세포표면의 수용체에 결합하여 매우 소량으로 세포의 분화, 증식과 작용에 영향을 미친다.<sup>14)</sup>

### 1. 자연면역계 관련 면역세포에 미치는 영향

Mast cell은 피하 결합조직에 광범위하게 분포하고 있으며 주로 자연면역 반응시기에 세포질과립에 저장된 histamin, serotonin, heparin등의 화학전달물질들과 TNF- $\alpha$ , 여러 interleukin 등의 cytokine들을 탈과립 과정을 통하여 분비하여 염증과정에 관계한다.<sup>14)</sup>

염증반응을 인위적으로 유도한 HMC-1 (human mast cell line)에 柴胡의 물 추출물을 처리한 뒤, HMC-1에서 분비되는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정함으로써 항염증 효과를 측정해 보았다. IL-6는 면역반응세포의 성장 및 분화에 관계하는 다기능 cytokine<sup>15)</sup>으로서 염증병소에서는 그 양이 항상 증가되는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 또한 TNF- $\alpha$ 는 생체 내에서 단독, 또는 다른 cytokine들과의 협력에 의해 일부 종양의 혈관손상기전에 의해 종양괴사를 유도하는 cytokine으로서 면역반응의 초기에 분비된다. TNF- $\alpha$ 는 염증반응시에 骨損傷 및 맥관 내피염 등을 초래하여 생체에 해로운 영향을 미치기도 한다.<sup>17)</sup>

측정결과, IL-6는 시호 물 추출물의 10, 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 감소하였다. TNF- $\alpha$ 도 역시 시호 물 추출물 첨가량이 증가 할수록 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  분비량이 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다. 염증을 유도한 HMC-1로부터 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제함이 확인된 바, 항염증 효과가 확인된 것으로 사료된다.

### 2. 특이면역계 관련 면역세포에 미치는 영향

#### 1) B 세포에 대한 영향

마우스 비장 B 세포에 시호 물 추출물을 가한 결과 200µg/ml 농도에 이르기까지 농도 의존적으로 증식하는 것으로 나타났다. 즉, B 세포 개체수를 늘림으로서 체액성면역 증강의 효과를

보인다고 유추할 수 있는 결과이다.

인체의 특이면역중 B 세포가 주로 관여하고 있는 체액성 면역의 과정은 림프구의 항원인식단계를 거친 후 림프구가 활성화되며 그로 인하여 항원을 제거하게 된다. 림프구 및 기타 백혈구는 세포의 분화 또는 활성화 특정 시기에 세포 표면에 식별 가능한 수많은 다른 분자들을 발현하며 이들 세포표면표지자(surface marker)들은 CD명명법에 의해 분류된다.<sup>18)</sup> CD69는 세포의 활성화 초기에 등장하는 표지자로서 세포의 활성성이 시작되었는지 여부 판정에 유효한 분자이다. CD23은 성숙한 B 세포의 표면에 발현되며 IgE receptor로서 IgE로 덮인 입자의 세포내 이입을 매개하므로 CD23의 증가는 IgE 생산시작 전단계 B 세포의 증가를 의미한다. IgE는 B 세포가 분화되어 생긴 형질세포(plasma cell)에서 분비되는 것으로 mast cell에 강하게 결합하여 제 1형 과민반응을 유발한다.<sup>19)</sup> slg(표면/막형Ig)는 항원에 의한 B 세포의 활성화를 매개하는 수용체의 역할을 하므로 slgE의 증가는 slgE의 항원 인식을 통한 IgE를 분비하는 B 세포의 활성화가 그만큼 많이 이루어졌음을 의미한다.

실험결과, CD69와 CD23의 경우 시호 물 추출물 첨가량에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 slgE의 경우 첨가량이 증가할수록 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 감소하였다.

이상의 결과는, 시호 물 추출물은 B 세포의 증식을 통한 면역증진 효과가 있으며 증식 후 IgE의 분비를 위한 활성화 과정은 억제함을 시사하는 것이다.

또한, 활성화 시킨 B 세포에 시호 물 추출물을 처리한 후 B 세포가 분비하는 cytokine 들을 정량 분석한 결과 IgE의 경우 대조군에 비해 시호 물 추출물의 첨가량이 증가 할수록 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다. 이는 천식, 발진, anaphylactic shock 등의 과도한 면역반응 억제효과가 있음을 의미한다<sup>20)</sup>. 더구나 IgE와 길항적으로 세포성 면역반응을 촉진하는 항체인 IgG1 분비량이 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가한 것이 그 억제효과를 상충시킬 수 있을 것으로 사료된다.

IL-4는 B 세포를 plasma cell 로의 발달을 이끌어 IgE IgG 등의 생성을 유발시키는데 실험결과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 감소하였으나 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 대조군에 비해 증가하였다. 이는 IgE억제 및 IgG1 증가에 의한 염증억제 효과를 저해하는 결과이며 복합성분을 함유한 천연물 약재의 한계라 생각되는 부분이다.

INF- $\gamma$ 는 세포성 면역반응을 증진시켜서 체액성 면역반응과 길항작용을 일으키는 cytokine인데<sup>21)</sup> 실험결과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 감소하였으나 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 대조군에 비해 증가 하였다. 즉 체액성 면역반응인 제 1형 과민반응에 대한 억제효과를 시사한다고 볼 수 있다.

## 2) T 세포에 대한 영향

마우스 CD4 T 세포의 시호 물 추출물에 대한 농도별 증식능을 측정된 결과 대조군에 비해 시호 물 추출물 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가하였다. 이는 시호 물 추출물이 T 세포의 수효를 늘려 세포

성면역을 강화하는 것으로 풀이될 수 있다.

T 세포는 Th(T helper cell) cell 과 Tc(T killer cell) 의 두 종류로 나뉘어지며 Th cell은 생성하는 림프구의 차이에 의해 Th1과 Th2의 다시 두 종류의 아집단으로 나뉘어진다.<sup>14)</sup> Th1 세포는 INF- $\gamma$ 를 생산하여 세포성 면역반응을 증진시켜서 체액성 면역반응과 길항작용을 일으키는데 실험결과 시호 물 추출물의 어떠한 농도 범위에서도 대조군에 비해 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Th2 세포는 IL-2와 IL-4를 생산하는데 IL-2는 활성화된 T 세포를 G1기로부터 S기로 진행시키는 성장인자이며<sup>14)</sup> IL-4는 전술한대로 B cell stimulator로서 작용한다. 실험결과 IL-2와 IL-4 모두 대조군에 비해 증가하다가 시호 물 추출물 농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도 이후 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 시호 물 추출물은 T 세포에 대하여 그 성장을 촉진하여 세포성 면역을 강화하나 B 세포에서의 경우와 마찬가지로 B 세포를 plasma cell로의 발달로 이끌어 IgE IgG 등의 생성을 유발시켜 염증반응을 촉진할 수도 있다고도 볼 수 있다.

결론적으로, 시호 물 추출물의 항염증 효과는 자연면역계와 관련하여 일어나는 염증반응에 특히 우수한 것으로 나타났으며 특이면역계 관련하여서는 염증관련 cytokine의 종류에 따라 억제효과와 촉진효과가 혼재되어 있다고 볼 수 있다.

본 실험은 시호의 항염증 효과를 면역학적 관점에서 분자생물학적으로 분석해 보려는 취지에서 고안되었으며, 고찰된 면역 관련 cytokine들은 일부일 뿐이고 염증과 관련된 기전은 보다 다양한 관점에서 연구될 수 있으므로 면역학적 관점에서 본 시호의 항염증 효과에 대해서는 후후 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

임상에서 사용되는 방제들의 약물구성으로부터 유추할 수 있는 시호의 항염증효과를 면역학적 관점에서 분석해 보기위해 HMC-1과 마우스 비장에서 얻은 면역세포들에 시호 물 추출물을 가하여 증식도 및 분비된 염증관련 cytokine들을 정량분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

염증을 유발한 HMC-1 세포주에 시호 물 추출물을 가한 결과 IL-6는 시호 물 추출물의 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군과 차이가 없었으며 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 대조군에 비해 감소하였고 TNF- $\alpha$ 의 경우 시호 물 추출물 첨가량이 증가 할수록 대조군에 비해 분비량이 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다. 마우스 B cell의 시호 물 추출물에 대한 증식능을 측정한 결과 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 증가 하였다. 시호 물 추출물로 처리한 마우스 B cell의 CD23과 CD69 및 slgE 발현분석결과 CD69와 CD23의 경우 모두 첨가량에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 slgE의 경우 시호 물 추출물 첨가량이 증가할수록 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 감소하였다. 시호 물 추출물로 처리한 마우스 B cell의 IgE, IgG1, IL-4 및 INF- $\gamma$  분비량 측정결과 대조군에 비해 IgE는 감소되었고 IgG1는 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가하였으며 IL-4와 INF- $\gamma$ 는 증가하였다.

마우스 T cell의 시호 물 추출물에 대한 증식능을 측정한 결과 모든 농도 범위에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보이며 증가하였다. 시호 물 추출물로 처리한 마우스 T cell의 IL-2, IL-4의 분비량이 대조군에 비해 증가하였고 INF- $\gamma$ 는 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아 시호는 광범위한 염증반응에 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 인정되나 제 1형 과민반응과도 같은 특이면역계 관련 염증반응에는 유의한 효과를 기대하기 어려울 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港, 商務印書館香港分館, p 58, 1983.
2. 배기환. 한국의 약용식물. 서울, 교학사, p 458, 2000.
3. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 완역 중약대사전. 서울, 도서출판 정담, p 3404, 1998.
4. 안규석. 담석증의 한방치료 및 예방에 대한 실험적 연구. 병리학회지 8: 1-16, 1993.
5. 김성훈, 송호철. 시호치천탕과 보익정천탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 조직에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19: 106-113, 2005.
6. 권영모, 이재은, 박선동. 시호가 acetaminophen으로 유도된 간손상흰쥐에 미치는 영향. 본초학회지 19: 91-104, 2004.
7. 조옥현, 정우석, 서윤정, 조한백. 시호소간산가미방이 자궁경부암세포에 미치는 영향. 부인과학회지 17: 101-111, 2004.
8. 오병열, 김민상, 우병찬, 최영, 설인찬. 가미시호탕이 뇌허혈시 Glutamate receptor, free radical 및 뇌손상보호에 미치는 영향. 한의학회지 25: 32-44, 2004.
9. 김성훈, 송욱, 송효정. 가감시호가용골모려탕이 고지혈증에 미치는 영향. 한의학회지 14: 332-347, 1993.
10. 신광식, 권건록, 김재우, 손낙원, 정승현, 신길조, 이원철. BV-2 미교세포를 통한 시호의 신경세포 보호효과에 대한 연구. 정보학회지 10(2):61-69, 2004.
11. 남산당 편집국. 對譯 맥증방약합편. 서울, 남산당, p 151, 1985.
12. Stanley, L., Robbins Ranzi, S., Cotran Vinay Kumar. Pathologic Basis of Disease, W.B.Saunders Company, p 40, 1984.
13. 손의섭, 이영자, 복모란. 간장병, 알 알고 치료받아야 산다. 서울, 북스토리, pp 103-111, 2000.
14. 中島 泉, 오찬혁 역. 新 면역학 입문. 서울, 지구문화사, p 63, 118, 120, 125, 253, 2000.
15. Ershler, W.B., Keller, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. Annu Rev Med 51: 245-270, 2000.
16. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 37(6):355-361, 2003.
17. 김완수. rHRF 유발로 활성화 된 생쥐의 B림프구와 비만세포에서 신이 추출물의 항알러지작용에 관한연구. 동의생리병리학회지 15: 917-926, 2001.
18. Ivan Roitte, Jonathan Brostoff, David Male, 하대유 역. Immunology. 서울, 고문사, p 12, 1994.
19. 최승구. 필수임상면역학. 서울, 청구문화사, p 425, 1998.
20. 정규만. 알레르기와 韓方. 서울, 제일로, pp 17-26, 1993.
21. Abul, K., Abbas Marshall A., Lichtman Pober, 강재성 역. Cellular and Molecular Immunology. 서울, 범문사, pp 260-271, 2005.