

대표적인 補陰之劑의 면역 활성화 비교 연구 - 육미지황탕, 자음강화탕, 쌍화탕 -

정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선, 신현규

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Stimulation of the Immune Response by Yin-Tonifying Formula

Dayoung Jung, Hyekyung Ha, Ho Young Lee, Jin-Ah Lee, Jun-Kyoung Lee,
Dae-Sun Huang, Hyeun Kyoo Shin

Herbal Medicine EBM Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

Objectives: Three yin-tonifying formulae (*Ssanghwa-tang*, *Yuknijihwang-tang* and *Jaeumganghwa-tang*) were applied to investigate their immunological activities on antigen (Ag)-specific or Ag-non-specific immune responses in the murine macrophage cell line (RAW 264.7) and in ovalbumin (OVA)-immunized mice.

Methods: This study was carried out in nitricoxide (NO) synthesis in RAW 264.7 cells and cellular proliferation in mouse splenocytes in association with three herbal formulas. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with OVA/aluminum (100 µg/ 200 µg/mouse) on days 1, 8, and 15. Three herbal formulas were administrated to mice orally for 3 weeks from day 1. On day 22, OVA-, lipopolysaccharide (LPS)-, and concanavalin A (Con A)-stimulated splenocyte proliferation and antibodies (OVA-specific antibodies of the IgG, IgG1, and total IgM classes) in plasma were measured.

Results: All three yin-tonifying formulas significantly enhanced cellular proliferation by LPS and Con A in splenocytes from OVA-immunized mice ($p < 0.001$). Also, these herbal formulas all significantly enhanced plasma OVA-specific IgG, IgG1, and total IgM levels compared with the OVA/Alum group.

Conclusion: These results suggested that the three yin-tonifying formulae could be used as stimulators of immune response.

Key Words : *Ssanghwa-tang* (*shuanghe-tang*), *Yuknijihwang-tang* (*liuweidihuang-tang*), *Jaeumganghwa-tang* (*ziyinjianghuo-tang*), immune response

서론

한의학에서 면역의 개념은 邪氣는 인체의 내외 환경 중에서 질병을 일으키는 여러 종류의 인자를 총칭하고 眞氣 혹은 正氣는 생체의 정상적인 기능을 말한다¹⁾. 邪氣와 正氣가 충돌하게 되면 이로 인하여

扶正祛邪의 원칙에 따라 자체내의 正氣나 韓藥, 鍼, 灸 등의 치료 수단을 통하여 正氣를 복돋아 건강을 유지하고 질병을 치료한다. 이런 관점은 생체의 방어기능에 관계된 현대의학의 면역학적 개념과 많은 유사성을 가지고 있다고 할 수 있다. 면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 체

• Received : 29 June 2010

• Revised : 23 August 2010

• Accepted : 9 September 2010

• Correspondence to : 신현규(Hyeun Kyoo Shin)

대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Tel : +82-42-868-9464, Fax : +82-42-864-2120, E-mail : hkshin@kiom.re.kr

액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나눌 수 있으며, 혈액, 임파절, 비장 및 위장관 등 생체 여러 조직 및 기관에 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재한다. 면역에 관여하는 세포로는 T 세포, B 세포, 대식세포 및 NK 세포 등이 알려져 있다^{2,3)}. 대표적인 면역반응으로 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성은 대식세포 활성화의 지표로 NO는 침입한 병원체를 제거하고 기본적인 숙주 방어체계를 작동시키는 역할을 하며 특히 Th 세포의 분화단계 중 Th0 세포가 Th1 세포와 Th2 세포로 분화될 때, Th1 세포로의 분화를 돕는 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}. 또한, 脾臟은 인체 내 면역방어기능을 담당하고 있는 이차 면역기관으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 초기 면역반응을 담당하고 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 주요기관이다⁶⁾. 이들 면역 반응에 관여하는 세포 및 기관에 대한 면역반응 활성화 영향을 검증하는 방법으로 ovalbumin (OVA)을 외부항원으로 사용한 OVA 감각 생쥐 모델에서 mitogen에 의한 비장세포의 증식과 혈중 면역글로불린의 생성 변화 검색 등이 주로 적용된다⁷⁾.

본 연구에서는 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕 등 3종의 대표적인 補陰之劑가 대식세포와 비장세포의 활성화 및 생체 내에서 항체 생성과 관련된 면역 활성화 반응에 어떤 영향을 미치는지 비교 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 처방추출

쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕의 처방 구성 약제들은 (주)음니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 각각 구입하였다. 각각의 처방에 따른 구성비는 Table 1과 같다. 이들 처방 구성 약제를 배합하고 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (추출기: 경서메디텍 COSMOS660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은

270 mesh의 sieve를 사용하여 거르고 동결건조기 (일신 동결건조기 PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 분말을 얻었으며 수득율은 Table 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 대식세포의 활성화 검색

(1) 대식세포의 증식능 검색

補陰之劑 처방들이 대식세포주의 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 murine macrophage cell line인 RAW 264.7세포를 96-well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 약제 추출물을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Gibco BRL, NY, U.S.A.)에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 약제의 세포증식 효과에 대한 비교물질로 lipopolysaccharide 100 ng/mL (LPS, Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 tetrazolium salt인 CCK-8 kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 Benchmark-Plus microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였고 (대조군 100% 기준), 여러 well의 평균값을 사용하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plate에 2.5×10^5 cells/well로 분주한 후 12시간 배양하여 안정화 시키고 이들 처방의 추출물을 독성이 없는 범위 내에서 농도별 (2-200 μ g/mL)로 처리하였다. 양성대조군으로 LPS를 농도별 (0, 1, 10, 1000 ng/mL)로 처리하였으며 18 시간 배양 후 상층액을 수집하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 Griess reagent (Promega, WI, U.S.A)를 이용하여 nitrite 양을 측정하여 계산하였다.

2) 생쥐 비장세포 분리 및 증식능 검색

(1) 비장 세포의 분리 및 배양

6주령의 수컷 ICR 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.)로 세척하고 주사기를 이용하여 비장세포를 분리한 후 RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)로 적혈구를 제거하였다. 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL, NY, U.S.A.)와 100 U/mL penicillin 과 100 µg/mL streptomycin(Gibco BRL, NY, U.S.A.)을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, NY,

U.S.A.)에 비장세포를 부유시켜 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

(2) 비장세포의 증식능 검색

補陰之劑 처방이 비장세포 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 분리 배양한 비장 세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 약제 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 처방의 세포 증식 효과에 대한 비교물질로 T cell lymphocyte에 대한 mitogen인 Concanavalin A (Con A, 0.5 및 1

Table 1. Combinations of Crude Drugs in Herbal Medicine

Crude drugs	Compounded rude drugs (g)		
	Ssangwha-tang	Yukmijiwhang-tang	Jaumganghwa-tang
작약 Paeoniae Radix	9.38		4.88
당귀 Angelicae Gigantis Radix	3.75		4.5
숙지황 Rehmanniae Radix Preparata	3.75	10	3.75
천문동 Asparagi Radix			3.75
백출 Atractylodis Rhizoma			3.75
맥문동 Liriopis Tuber			3.75
생지황 Rehmanniae Radix			3
진피 Citri Unshius Pericarpium			2.63
지모 Anemarrhenae Rhizoma			1.88
황백 Phellodendri Cortex			1.88
감초 Glycyrrhizae Radix	2.81		1.88
생강 Zingiberis Rhizoma	3.75		3.75
대추 Zizyphi Fructus	3.75		3.75
산수유 Corni Fructus		5	
산약 Dioscoreae Radix		5	
목단피 Moutan Radicis Cortex		3.75	
복령 Poria Sclerotium		3.75	
택사 Alimatis Rhizoma		3.75	
황기 Astragali Radix	3.75		
인삼 Ginseng Radix			
승마 Cimicifugae Rhizoma			
시호 Bupleuri Radix			
천궁 Cnidii Rhizoma	3.75		
계피 Cinnamon Bark	2.81		
Total (g)	37.5	31.25	43.15
수율 (%)	25.5	27.0	13.1

μg/mL)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였고, 여러 well의 평균값을 사용하였다.

(3) Cytokine (IL-2, IL-4) 측정

비장세포에서의 cytokine 분비량을 측정하기 위하여 48-well plate에 2×10^6 cells/well로 분주한 후 12시간 배양하여 안정화 시키고 3종 처방 추출물을 독성이 없는 범위 내에서 농도별 (100, 500 μg/mL)로 처리하였다. 양성대조군으로 Con A를 처리하였으며 24 시간 배양 후 상층액을 수집하여 IL-2, IL-4 level을 Duoset mIL-2 및 mIL-4 ELISA kit (R&D systems, MN, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

3) OVA 감작 생쥐에서 면역 활성화 검색

(1) 실험동물 및 항원물질 투여

7주령 (17~21 g)의 수컷 C57BL/6 생쥐(오리엔트바이오, 성남)를 대조군, Ovalbumine (Thermo, IL, U.S.A.)/Aluminium (Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.)/Saline (OVA/Alum군) 투여군, OVA/Alum 및 각 처방 추출물 투여군 (처방 투여군)으로 분리하여 1주일간 순화시킨 다음 실험에 사용하였다. 항원으로 OVA/Alum은 생쥐 당 100 μg/200 μg/100 μL 용량을 1일, 8일, 15일에 복강투여하여 항체생성을 유도하였으며 대조군은 동일량의 주사용 생리식염수를 복강 투여 하였다. 대조군과 OVA/Alum군은 증류수를, 처방 투여군은 각 처방 추출물을 1 g/kg/day 용량으로 OVA 감작과 동시에 21일간 투여하였다. 22일에 엔토발 (pentobarbital, 한림제약, 용인, 150 μg/mouse)을 복강 투여한 후 마취하에 복강 절개하여 후대정맥에서 채혈한 후 비장을 적출하고 방혈치사하였다. 채혈된 혈액은 전혈구수 측정 후 원심분리하여 혈장을 분리하고 다음 실험시까지 -80°C에 보관하였다. 동물실험은 쌍화탕과 육미지황탕, 자음강화탕으로 나누어 진행하였다.

(2) OVA 감작된 생쥐 비장세포의 증식능 검색

적출한 비장에서 앞서와 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 96-well plate에 분주한 다음 대조군, 항원으로 사용한 OVA (10 μg/mL), 또는 Con A (4 μg/mL) 및 LPS (2 μg/mL)를 각각 첨가하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit를 사용하여 세포 증식능을 검색하는 방법으로 처방 투여에 대한 미토젠 효과 (mitogen effect)를 검색하였다.

(3) 혈중 항체 생성량 측정

생체내 항체 생성량을 측정하기 위하여 감작항원으로 사용한 OVA에 대한 특이적 (OVA-specific) 또는 비특이적 (total) 면역 글로블린의 양을 측정하였다. 생쥐 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, OVA-specific IgG2a, total IgM level은 ELISA kit (Bethyl Laboratory, Inc., Texas, USA)를 사용하여 측정하였다. OVA-specific IgG, IgG1 및 IgG2a을 검색하기 위하여 microtiter plate에 OVA (10 μg/mL in carbonate buffer, pH 9.6) 용액을 100 μL/well씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 OVA를 부착시켰다. Total IgM을 측정하기 위하여 IgM capture antibody (Ab)를 carbonate buffer (pH 9.6)에 1:100으로 희석하여 100 μL/well씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 Ab를 부착시켰다. 각각 wash buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 3번 세척한 후 blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)를 200 μL/well씩 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 비특이적인 결합부위를 차단하였다. Wash buffer로 세척한 후 혈장을 1:1000 (OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1), 1:5 (OVA-specific IgG2a) 또는 1:10,000 (total IgM)으로 희석한 후 100 μL/well씩 가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a 또는 IgM을 1:100,000으로 희석하여 100 μL/well씩 가하고 상온에서 1시간 방치한 후 세척하였다. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB)용액을 100 μL/well로 가하여 빛을 차단하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 2 M H₂SO₄를 100 μL/well로 가

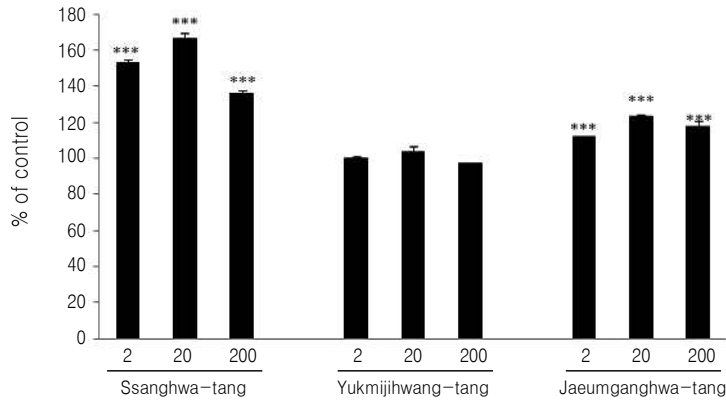


Fig. 1. The proliferation of RAW 264.7 cells treated with Yin-tonifying formula.

Cells (3×10^3 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with Yin-tonifying formulas for 48 hr. The unit of concentrations of Yin-tonifying formula is $\mu\text{g/mL}$. The values are presented as $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Differences between control and herbal formula-treated groups were evaluated in each group. ***; $p < 0.001$.

하여 반응을 종결시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 통계처리

모든 측정 결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 나타냈으며 실험군 간의 차이는 Student's t-test (Excel 2007 program)법으로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 대식세포 활성화에 미치는 영향

대식세포는 1차적인 면역 반응과 관련되므로 補陰之劑 처방이 대식세포주인 RAW 264.7의 증식에 미치는 영향을 검색한 결과 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕은 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 세포독성을

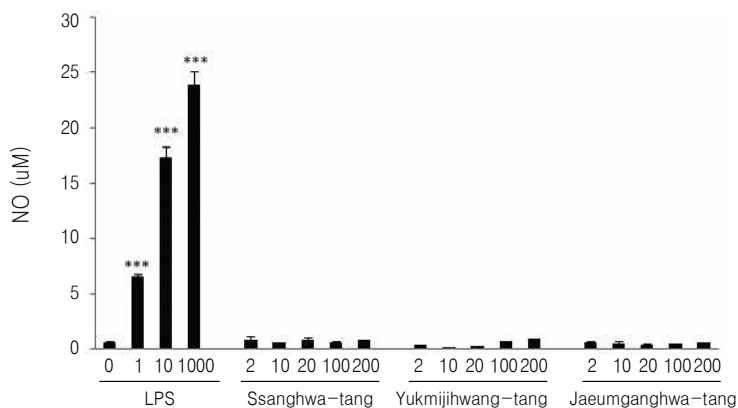


Fig. 2. The stimulation of NO production in RAW 264.7 cells treated with Yin-tonifying formula.

Cells (2.5×10^5 cells/well) were seeded into 48-well plates and treated with herbal formulas for 18 hr. LPS was used as positive control. The units of concentrations of LPS and herbal formulas are ng/mL and $\mu\text{g/mL}$, respectively. The values are presented as $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Differences between LPS 0 (control) and herbal formula-treated groups were evaluated in each group. *** $p < 0.001$.

나타냈으므로 (data not shown) 이후의 RAW 264.7 세포를 이용한 효능 검색에서 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도를 사용하였다. 쌍화탕은 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군과 비교하여 53.08 \pm 1.37, 66.78 \pm 2.95, 35.97 \pm 1.84% (각 $p<0.001$)의 대식세포 증식효과를 나타냈고, 육미지황탕은 대조군과 차이가 없었으며, 자음강화탕은 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군과 비교하여 12.03 \pm 0.70, 23.24 \pm 1.27, 18.01 \pm 2.56% (각 $p<0.001$)의 증식 효과를 나타냈다(Fig. 1).

대식세포의 활성화 지표인 NO 생성량을 측정한 결과, 무처리군 (대조군)의 배지 내 NO의 농도는 0.65 \pm 0.12 μM 로 나타났고, 양성 대조군으로 사용한 LPS (0.001-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 23.78 \pm 1.34 μM 로 대조군의 36배 이상으로 NO 생성을 유발하는 것으로 나타났다 ($p<0.001$). 반면 3종의 처방 모두 NO 생성을 유발하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

2. 생쥐 비장세포 증식능에 미치는 영향

분리한 생쥐 비장세포에 처방 추출물을 처리하여 비장세포의 증식능을 검색한 결과, 양성대조군으로 사용한 Con A는 0.5 또는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 각각

53.22 \pm 1.92, 44.7 \pm 3.07%로 40% 이상의 비장세포 증식효과를 나타냈다 ($p<0.001$). 쌍화탕은 62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 11.14 \pm 4.79% ($p<0.05$), 14.33 \pm 3.00% ($p<0.01$), 13.62 \pm 4.12% ($p<0.05$)의 비장세포 증식능을 나타냈으나, 육미지황탕은 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 자음강화탕은 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 112.50 \pm 3.21% ($p<0.05$)의 비장세포 증식능을 나타냈다(Fig. 3).

3. OVA 감작된 생쥐에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

3종 처방이 생체내에서 면역 활성화에 미치는 영향을 검색하기 위하여 처방 추출물을 투여한 생쥐의 비장세포를 분리하여 항원으로 사용한 OVA, B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대한 미토젠 효과를 검색하였다. 각 투여군에서 mitogen을 처리하지 않은 무처리군을 대조군으로 하여 이에 대한 세포 증식효과를 Fig. 4에 나타냈다. 대조군에서 항원인 OVA에 대한 반응은 나타나지 않았고 LPS와 Con A처리시 각각 59.09 \pm 6.19%, 52.25 \pm 3.53%의 비장세포 증식을 유발하였다. OVA/Alum

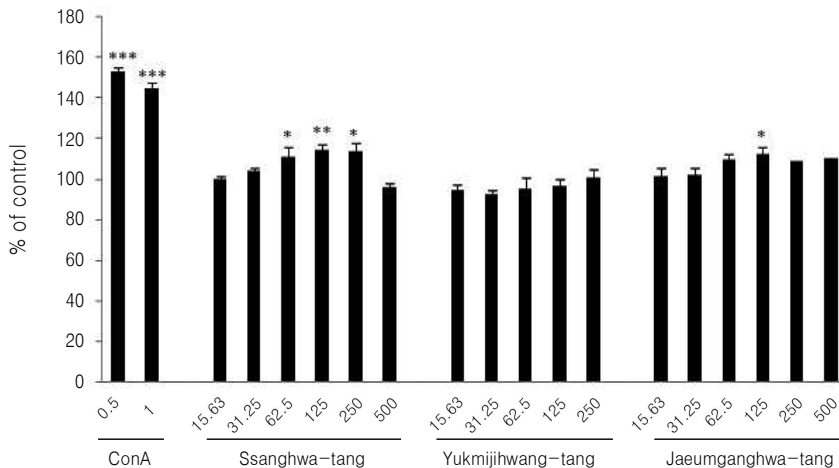


Fig. 3. The proliferation of mouse splenocytes treated with Yin-tonifying formula.

Isolated mouse splenocytes (5×10^5 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with Yin-tonifying formula for 48 hr. The unit of concentrations of Con A and Yin-tonifying formula is $\mu\text{g}/\text{mL}$. Differences between control and herbal formula-treated groups were evaluated in each group. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

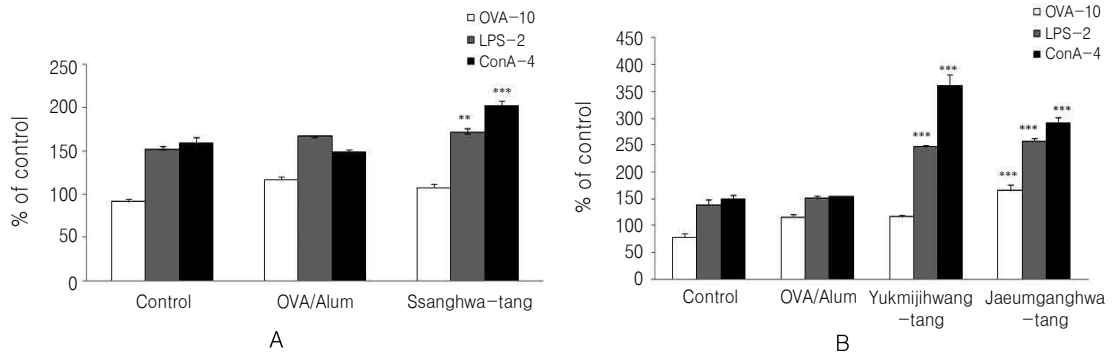


Fig. 4. Effects of Yin-tonifying formula on OVA- or mitogen-stimulated splenocyte proliferation (A; *Ssanghwa-tang* B; *Yukmijihwang-tang* and *Jaeumganghwa-tang*).

Splenocytes were prepared from control, OVA/Alum or herbal formula-administrated mice on day 22 and cultured with OVA, Con A or LPS for 48 h. Cellular proliferation was shown as a percentage of the proliferation of cells cultured without a mitogen (% of control). The values are presented as means±SEM. Differences between OVA/Alum and herbal formula-administrated groups were evaluated in each group. **p<0.01, ***p<0.001

군에서는 OVA 처리시 16.80±3.10%, LPS 처리시 67.04±1.15%, Con A 처리시 48.59±2.47% (p<0.01)의 세포증식 유발 효과가 나타났다. 쌍화탕 투여군은 OVA에 대해서는 세포증식이 유발되지 않았고, LPS, Con A에 대해서 71.33±5.12% (p<0.05), 102.13±6.42% (p<0.001)로 비장세포 증식을 유발하였다 (Fig. 4-A). 육미지황탕 투여군은 OVA, LPS, Con A 처리시 각각 16.25±2.52%, 146.43±2.49% (p<0.001), 261.25±20.62% (p<0.001)의 비장세포 증식을 유발하였고 자음강화탕 투여군은 OVA, LPS, Con A 처리시 각각 65.05±11.19% (p<0.001), 156.90±6.07% (p<0.001), 190.92±10.21% (p<0.001)의 비장세포 증식을 유발하였다(Fig. 4-B).

이상의 결과를 종합하면 OVA/Alum군에서 OVA에 대한 비장세포 증식이 약 16% 증가되었고 3종 처방중 자음강화탕 투여군만 OVA/Alum군과 비교해서 유의적인 비장세포 증식 효과를 나타냈다 (p<0.001). B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대해서 미토겐 효과를 검색한 결과, 3종의 처방인 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕 투여군은 OVA/Alum군 보다 LPS 및 Con A에 대한 미토겐 효과를 증가시키는 것으로 나타났다 (각 p<0.001).

4. 생체내에서 항체생성능에 미치는 영향

혈장에서 OVA-specific IgG, IgG1을 정량한 결과 OVA/Alum군에서 각각 7.56±0.56 µg/mL, 44.18±2.68 µg/mL로 OVA에 감작되었음을 나타냈다. OVA 감작 생쥐에 처방 추출물을 투여한 결과 쌍화탕투여군은 OVA-specific IgG, IgG1 level이 각각 23.64±3.25 µg/mL (p<0.01), 144.18±19.92 µg/mL (p<0.01)로 나타났으며 OVA/Alum군과 비교하여 3.1배 및 3.2배 증가된 것으로 나타났다(Fig. 5-A). 육미지황탕군은 OVA-specific IgG, IgG1 level이 15.33±0.61 µg/mL (p<0.001), 157.39±3.08 µg/mL (p<0.001)으로 OVA/Alum 군과 비교하여 각각 2.7배, 3.2배 증가시켰고, 자음강화탕군은 OVA-specific IgG, IgG1 level이 22.79±2.91 µg/mL (p<0.001), 178.42±11.21 µg/mL (p<0.001)으로 OVA/Alum 군과 비교하여 각각 4.1배, 3.7배 증가시켰다(Fig. 5-A). 그러나 OVA-specific IgG2a는 detection limit이하로 측정할 수 없었다.

초기 면역반응에서 증가하는 혈중 total IgM을 정량한 결과 대조군과 OVA/Alum군에서 각각 228.02±24.33 µg/mL와 317.62±22.72 µg/mL으로 OVA 감작시 1.4배 증가되었고 쌍화탕투여군에서 496.60±

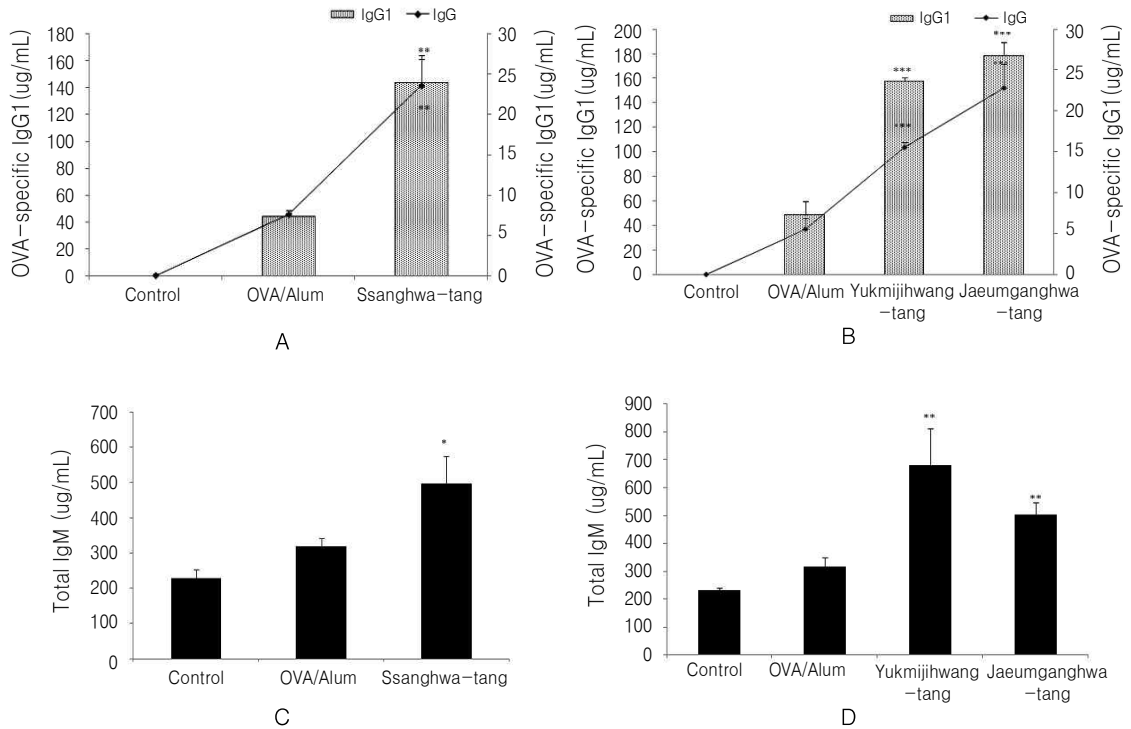


Fig. 5. The plasma levels of OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, (A; *Ssanghwa-tang*, B; *Yukmijihwang-tang* and *Jaeumganghwa-tang*) and total IgM (C; *Ssanghwa-tang*, D; *Yukmijihwang-tang* and *Jaeumganghwa-tang*) on OVA-immunized mice.

Data represent the means±SEM (n=5~6) **p<0.01 and ***p<0.001 compared with OVA/Alum

76.78 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.05$)로 OVA/Alum군과 비교하여 1.6배 상승한 것으로 나타났다(Fig. 5-C). 육미지황탕, 자음강화탕군의 total IgM level은 각각 $679.77\pm 133.67 \mu\text{g/mL}$ ($p<0.01$)와 $504.00\pm 43.34 \mu\text{g/mL}$ ($p<0.01$)으로 OVA/Alum군과 비교하여 2.1배, 1.6배 증가되었다(Fig. 5-D). 본 연구에 사용한 3종의 補陰之劑 처방은 모두 OVA-specific IgG, IgG1 및 total IgM level을 상승시켰다.

고찰

인체는 陰陽의 조화, 상호제약과 평형이 균형 있게 이루어져 偏盛·偏衰하지 않아야 건강한 상태를 유지할 수 있는데, 이러한 陰陽이 조화를 이루지 못

하고 어느 한쪽이 盛·衰하게 되면 병리적 변화가 발생하게 된다. 이 중 체내 陰分이 衰하여 陰虛가 발생하게 되면 肝腎의 陰分이 부족하여 血, 津液 등이 우리 몸을 충분히 滋養하지 못하게 되고, 이로 인하여 陽分을 제약하지 못하여 虛陽이 盛하게 된다. 이에 陰分의 근본이라고 할 수 있는 腎陰不足을 補할 수 있는 대표적인 처방인 육미지황탕과 陰虛로 인해 발생한 虛熱에 陰分을 滋養하여 熱을 내리는 자음강화탕, 陰血과 氣分이 소모된 증상에 사용할 수 있는 쌍화탕 등 補陰의 성격을 지닌 3가지 처방을 선정하여 이 처방들의 면역 활성을 확인해 보고자 하였다.

이 선정한 3종 처방에 대한 최근까지의 연구 결과를 정리해 보면, 쌍화탕은 연구논문을 분석한 선

행연구로 항피로 효과, 간기능 개선 효과, 항염증 및 중추억제 효과, 평활근 이완효과 등이 보고된 바 있었다⁸⁾. 육미지황탕의 연구논문을 분석한 선행연구로는 신장기능 조절 및 보호 효과, 인지기능 강화 및 뇌 조직 보호효과, 성장 및 골 형성에 미치는 영향, 항당뇨 효과, 면역기능 조절, 항산화 효과, 근육운동과 피로회복에 미치는 영향, 간기능 조절에 미치는 영향 등이 보고된 바 있다⁹⁾. 자음강화탕은 염증성 세포활성물질들의 분비를 억제하는 효과, 해열, 진통, 항경련작용의 효과 등이 보고되었다^{10,11)}. 본 연구에서는 이들 3종 처방들이 인체 방어에 가장 기본적인 면역 활성화 검증을 위하여 대식세포 및 비장세포의 증식 효과, 면역글로불린의 생성량 변화를 검색하여, 대표적인 3종의 補陰之劑 3종 처방의 면역반응에 대한 차이를 비교하고자 하였다.

대식세포는 생체 내에서 T, B lymphocyte와 더불어 항원 제시세포, 탐식세포, 불필요하게 된 세포의 제거, 림프구의 활성화 등의 중요한 면역력을 발휘하는 세포로 알려져 있다. 또한 NO는 생체내에서 vasodialating agent, neuro-transmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 비특이적 면역반응의 효능물질로 잘 알려져 있으며, 생쥐에서는 특히 대식세포와 호중구 등의 탐식작용을 가지는 세포에서 분비되고 있는 것으로 알려져 있다^{12,13)}. NO가 필요이상 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 유발하여 생체내 유해한 작용을 나타내는 것으로도 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 이와 같이 NO는 이중적 성질을 가지고 있어 대식세포의 면역반응 조절연구에 많이 이용되고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 본 연구에서 선정된 처방 3종에 대해 NO 생성능을 검색한 결과 3종의 처방 모두 NO 생성을 유발하지 않는 것으로 보아 대식세포를 활성화로 인한 1차적인 면역기능 증진에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

비장은 면역력을 알아보는 중요한 2차 장기로서 적색수질은 대식세포와 적혈구로 이루어져 sinusoid로 구성되고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳이며, 백색수질은 T 세포로 이루어진 periarteriolar

lymphoid sheath (PALS)를 형성하여 동맥을 둘러싸고 있다. PALS의 바깥쪽에 위치한 marginal zone은 primary lymphoid follicle로 형성되어 있으며 B 세포가 많이 분포되어 있어 면역력을 검색하는데 주로 사용된다^{20,21)}. 이에 3종의 補陰之劑에 대한 비장세포 증식효과를 검색하였고 T 세포의 활성화를 비교하고자 T 세포 mitogen인 Con A를 양성 대조군으로 사용하여 활성을 비교하였다. 쌍화탕과 자음강화탕은 유의적인 비장세포 증식 효과를 나타냈다. 비장세포 증식이 Th1 및 Th2 세포 중 어느 세포에 기인된 것인가를 확인^{22,23)}하기 위해 Th1 세포에서 분비되는 cytokine인 IL-2와 Th2 세포에서 분비되는 IL-4 level을 측정하였다^{24,25)}. IL-2는 CD4 T cell에 의해 생산되며, natural killer (NK) cell, lymphokine activated killer (LAK) cell, B cell의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있고, IL-4는 B cell 성장인자로서 T 림프구, 비만세포, 호염기성세포에서 생성되며 B cell 증식 및 분화, T cell 활성의 조절을 하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 본 실험결과에서 IL-2 및 IL-4 level을 측정하였으나 검출되지 않아 (data not shown) 각 처방의 자세한 작용 경로는 확인 할 수 없었다.

생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 확인하고자 OVA를 외부 항원으로 사용하여 감각시킨 생쥐에 3종의 처방 추출물을 투여하였다. 각 처방의 1첩용량은 쌍화탕 37.5 g, 육미지황탕 31.25 g, 자음강화탕 43.15 g으로 이들 처방의 수율을 적용하면 처방 추출물 각 9.56 g, 8.44 g, 5.65 g으로 성인 60 kg 기준으로 적용하면 쌍화탕 추출물 159.3 mg/kg, 육미지황탕 140.7 mg/kg, 자음강화탕 94.2 mg/kg으로 계산 된다. 체표면적 (body surface area) 등을 고려한 인체와 실험동물의 용량 비교²⁷⁾에 따르면 생쥐의 경우 인체 적용 용량의 12.5 배가 동등한 용량 (dose equivalent)이 되므로 본 연구에서 생쥐에 적용한 처방 추출물의 투여량은 1 g/kg으로 결정하였다. 각 처방 추출물 투여 후 비장세포의 미토겐 효과를 검색한 결과, 감각 항원으로 사용한 OVA, 각각 T 세포와 B 세포의 mitogen인 Con A와 LPS에 대해서

쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕의 처방 모두 미토젠 효과를 상승시켜 비장내 T 세포와 B 세포를 매개로 하는 면역반응인 세포성 면역과 체액성 면역을 증가시키는 것으로 사료된다.

항원 자극시 초기 면역 반응으로 IgM이 주로 생성되나, 항원자극에 의해 B 세포가 분화됨에 따라 생성되는 항체의 형이 IgM에서 IgG, IgA, IgE로 바뀌게 된다. 이런 과정을 개별형 전환(isotype switching)이라 한다. B 세포가 생산하는 항체 종류의 변화를 관찰하기 위해 혈장내 IgG subclass인 IgG1, IgG2a level을 검색한 결과, 3종의 처방 모두 일차적인 항체 반응에 관련된 IgM level을 상승시켰고, 그 후 항원에 대한 2차 항체 반응에서 중요한 부분을 차지하는 OVA-specific IgG 및 OVA-specific IgG1 level 또한 증가시키는 것으로 나타나 이들 대표적인 3종의 補陰之劑는 모두 항원 특이적 면역 반응을 활성화 시키는 것으로 생각된다.

본 실험결과를 처방별로 분류하면, 쌍화탕은 대식세포의 세포 증식을 시켰으나 NO 생성을 유발하지 않았고, OVA로 감작된 생쥐에 투여시 비장세포에서 Con A 및 LPS에 대해 미토젠 효과를 나타냈으며, 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 상승시키는 것으로 나타나 초기 면역 반응인 항원 비특이적 면역반응 보다는 항원 특이적 면역반응을 활성화 시키는 것으로 판단된다. 육미지황탕은 대식세포의 증식과 NO 생성을 유발시키지 않았고, 또한 비장세포에 대한 직접적인 세포 증식 효과도 나타나지 않았다. OVA로 감작된 생쥐에 투여시 비장세포에서 Con A와 LPS에 대해 미토젠 효과를 상승시켰고 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 상승시키는 것으로 나타나 항원 비특이적 면역반응보다는 항원 특이적 면역반응을 활성화시키는 것으로 판단된다. 자음강화탕은 대식세포의 증식을 유발 시켰으나 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성을 유발하지 않았고, OVA로 감작된 생쥐에 투여하였을 때 비장세포에서 OVA, Con A 및 LPS에 대해 유의성 있는 미토젠 효과를 나타냈으며, 혈중 OVA-specific IgG,

OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 유의성 있게 증가시켰으므로 항원 비특이적 면역 반응보다는 항원 특이적 면역반응을 활성화 시키는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에 대한 결과로 3종의 대표적인 보음보제인 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕은 모두 면역 활성을 증가 시키는 효과가 있으나 세부적인 작용 시점은 처방별로 차이가 있는 것으로 판단된다.

결론

대표적인 補陰之劑인 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕 3종에 대한 면역반응 조절 효과를 비교한 결과는 다음과 같다.

1. 대식세포의 활성화 측면에서 쌍화탕과 자음강화탕은 대식세포 증식을 유발하였으나 3종의 처방 모두 NO 생성을 유발하지 않는 것으로 나타났다.
2. 비장세포의 직접적인 세포증식을 비교해보면 쌍화탕과 자음강화탕은 비장세포증식 효과를 나타냈다.
3. 비장세포의 IL-2 및 IL-4 분비 유발효과를 검색한 결과 3종 처방 모두 검출되지 않아 Th세포 관련 면역 반응은 비교할 수 없었다.
4. OVA로 감작된 생쥐의 비장세포 증식효과를 검색한 결과, B cell의 mitogen인 LPS와 T cell의 mitogen인 Con A에 대해 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕은 모두 유의성 있는 미토젠 효과를 나타냈다.
5. OVA로 감작된 생쥐의 혈청에서 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 측정된 결과 3종 처방 모두 항체 생성을 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 쌍화탕, 육미지황탕, 자음강화탕은 모두 대식세포 활성화 지표인 NO 생성을 유도하지 못하지만 항원특이적 면역반응을 활성화시키는 방향으로 면역반응을 활성화 시키는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘표준 한방처방 EBM 구축사업 (K10030)’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lim EM, Lee SH. The meaning of immunity in the documents of oriental medicine. J Kor Inst Orient Med Inform. 2006;12(1):129-145.
2. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994:1-21.
3. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울:서울대학교 출판부. 1986:1-3.
4. Friedl R, Moeslinger T, Kopp B, Spieckermann PG. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of Panax ginseng root in Raw 264.7 cells. Br J Pharmacol. 2001;134(8):1663-1670.
5. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. Ann Rheum Dis. 1996;55(1):7-20.
6. Ryu HS, Kim J, Park SC, Kim HS. Enhancing effect of Zingiber Officinale Roscoe extract on mouse spleen and macrophage cells activation. Kor J Nut. 2004;37(9):780-785.
7. Sun J, Hu S, Song X. Adjuvant effects protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 2007;25:1114-1120.
8. Lee JK, Lee NH, Ha HK, Lee HY, Seo CS, Jung DY, et al. Analysis of studies on *Ssanghaiwa-tang* for establishment of evidence based medicine. Kor J Orient Med. 2008;14(3):41-47.
9. Lee JK, Lee NH, Ha HK, Lee HY, Jung DY, Choi JY, et al. Analysis of studies on *Yukmijihwang-tang* for establishment of evidence based medicine. Kor J Orient Physiol Pathol. 2009; 23(1):15-26.
10. Kim YK, Kim HJ, Kim WS, Park HJ, Moon G, Kim DW, et al. Inhibitory effect of *Jaeumganghwatang* on allergic inflammatory reaction. J Kor Orient Internal Med. 2004;25(2):174-182.
11. Rhee HK. Experimental studies on the efficacy of *Gamijaumganghwatang*. J Kor Orient Med. 1987;8(1):9-19.
12. Willite AH, Kerr JFR, Currie AR. The significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980;68: 251-306.
13. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacciai MC, Grignani G, Riccardi CA. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991;139(2): 271-279.
14. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by *Juzen-taiho-to* in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med. 2000;28(2):217-226.
15. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J Endotoxin Res. 2001;7(6):431-438.
16. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. Phytother Res. 2003;17(5):485-489.
17. Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role nitric oxide and superoxide. Free Radical Biol Med. 2002; 33(8):1026-1036.
18. Thornberry NA, Molineaux SX. Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. Protein Sci. 2005;4(1):3-12.
19. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? Best Pract Clin Rheumatol. 2006;20 (5):879-896.

20. Kupper TS. T cells, immunosurveillance, and cutaneous immunity. *J Dermatol Sci.* 2000;24: S41-45.
21. Zalys R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. *In vivo* effect of chronic treatment with (MET5)-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci.* 2000;66(9):829-834.
22. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
23. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, et al. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand *in vitro* human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest.* 1991;88(1):346-350.
24. Carter LL, Dutton RW. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(3):336-342.
25. Stephens R, Eisenbarth SC, Chaplin DD. T helper type 1 cells in asthma: friend or foe? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2002;2(1):31-37.
26. Janeway T. *Immunobiology* (3rd Ed). London: Current Biology. 1997:715-731.
27. Van Miert, A.S.J.P.A.M. The use in animals of drugs licensed for human use only. In: Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G., Debackere, M. (Eds.), *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy*. Boston: MTP Press. 1986:489-500.