

## 수지상세포에서 止帶方의 T 세포 활성화에 미치는 영향

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

김지양, 정지혜, 정현철, 최창민, 조한백, 김송백

### ABSTRACT

Study of *Gidaebang* on the T cells activation using dendritic cells

Ji-Ryang Kim, Ji-Hye Jeong, Hyun-Cheol Cheong, Chang-Min Choe,  
Han-Baek Cho, Song-Baeg Kim

Dept. of Oriental Obstetric and Gynecology, college of Oriental Medicine,  
Wonkwang University

**Purpose:** In this study, we investigated the effects of GDB(*Gidaebang*) on the immune response to establish the treatment mechanism of vaginitis.

**Methods:** We examined the effects of GDB on the DCs(Dendritic cells) phenotypic and functional maturation. iDCs were cultured in the presence of GM-CSF and the generated iDCs were respectively stimulated by GDB or LPS as the control group for 24 hours. To evaluate the DCs phenotypic and functional maturation, we used flow cytometric analysis, RT-PCR and ELISA.

**Results:**

1. GDB upregulated the expression of class II MHC and CD40 on DCs.
2. GDB upregulated the expression of CD80 and CD86 on DCs.
3. GDB induced cytokine IL-12 production and mRNA expression in DCs.

**Conclusion:** These results suggest that GDB is able to improve the antigen-presenting capacity of DCs through the upregulation of their maturation, and might induce proliferation of T cells. In conclusion, this immunomodulatory properties of GDB may be useful in the treatment of vaginitis.

**Key Words:** *Gidaebang*(GDB), Vaginitis, Dendritic cells(DCs), T cells, IL-12, Herbal medicine

“이 논문은 2009년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.”  
“This research was supported by Wonkwang University in 2009”

## I. 緒 論

止帶方은 清代의 《世補齊·不謝方》<sup>1-3)</sup>에 수록된 처방으로, 健脾, 清熱, 燥濕, 利水, 活血의 효능이 있으며, 임상에서 濕熱로 인한 帶下를 治療하는데 多用되어 왔다<sup>4-11)</sup>.

질염은 질분비물, 냄새, 작열감, 소양감, 성교통, 배뇨통 등의 증상을 특징으로 하는 질의 감염 또는 염증상태이다. 질염의 발병은 단순히 원인균에 의한 감염에 의한 것이 아니라 선행 유발요인, 정상적인 질 내 세균군의 교란 및 질 내 주요 면역기전의 약화 등과 관련되어 있다. 따라서 최근 질염의 치료는 정확한 진단과 적절한 치료를 통한 원인균의 제거뿐만 아니라 선행유발인자의 제거, 정상적인 질 내 생태의 회복, 질 내 면역기전의 강화 등이 중요시되고 있다<sup>12-14)</sup>.

수지상세포(DCs)는 외부항원을 인식하는 인체의 모든 부위에 분포하여 보조병 역할을 하며 외부항원을 T cell에 전달하는 가장 중요한 항원제시세포(APCs)이다<sup>15-17)</sup>. 최근에 DCs가 외부항원에 대한 면역조절에 핵심적으로 작용함이 알려지고 있으며, DCs를 억제 또는 활성화시킴으로써 종양, 바이러스성 만성질환, 알레르기 질환, 자가면역 질환 및 AIDS 등의 질병을 치료하는 방법이 연구되고 있다<sup>15,18-22)</sup>.

中國에서는 止帶方으로 帶下過多<sup>23)</sup>, 濕熱帶下<sup>24)</sup>, 子宮頸部糜爛<sup>25)</sup> 및 骨盤炎<sup>26)</sup>을 치료하여 임상적으로 효과가 있음을 보고한 바 있었으나 止帶方의 帶下 치료 기전에 대한 연구는 없었으며 국내에서도 止帶方에 관한 연구가 행하여 지지

않았다. 이에 본 연구자는 止帶方의 帶下에 대한 치료 기전을 실험적으로 究明하기 위하여 止帶方 추출물로 유도된 DCs의 세포표면 수용체인 class II MHC, CD40, CD80, CD86의 발현정도와 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 mRNA 발현 정도 및 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생산량을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

실험에 사용된 止帶方의 처방구성은 《世補齊·不謝方》<sup>2,3)</sup>에 준하였으며, 약재 각각의 용량은 기재되지 않아 동일한 양으로 하여 실험하였다. 본 실험에 사용한 약재들은 옴니허브(경북 영천, Korea)에서 구입하였다(Table 1).

Table 1. The Prescription of *Gidaebang* (GDB)

韓藥名	生藥名	重量 (g)
茵陳蒿	HERBA ARTEMISIAE CAPILLARIS	4
黃 柏	CORTEX PHELLODENRI	4
山 梔	FRUCTUS GARDENIAE	4
赤芍藥	RADIX PAEONIAE RUBRA	4
牡丹皮	CORTEX MOUTAN RADICIS	4
牛 膝	RADIX ACHYRANTHIS BIDENTATAE	4
車前子	SEMEN PLANTAGINIS	4
豬 苓	POLYPORUS	4
茯 苓	PORIA	4
澤 瀉	RHIZOMA ALISMATIS	4
Total amount		40

2) 시약 및 기기

FBS, RPMI-1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, U.S.A.)에서, 배양조는 Corning(Rochester, U.S.A.)에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 FITC-conjugated anti-MHC class II Ab(25-3-17), PE-conjugated anti-CD40 Ab, PE-conjugated anti-CD80 Ab, FITC-conjugated anti-CD86 Ab, APC-conjugated anti-CD11c Ab는 BD Pharmingen(San Diego, CA, U.S.A.)에서 구입하였다. ELISA에 사용한 anti-mouse TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 antibodies, 재조합 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, GM-CSF는 R&D Systems(Minneapolis, MN, U.S.A.)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 실험동물

C57BL/6 mouse 6주령 암컷을 (주)오리엔트바이오(성남 경기도, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 제조

실험에 사용된 止帶方(Table 1) 물 추출물은 3첩 분량인 120 g을 1 ℓ의 3차 증류수로 2시간 30분 전탕한 후 동결 건조시켜 용매를 제거하고 3.36 g의 분말을 얻었다. 그 얻어진 분말을 농도별로 녹인 후 실린지 필터로 여과하여 실험에 사용하였다.

2) 세포독성 측정

골수유래수지상세포(BMDCs)에 止帶方 추출물을 농도별(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존률을 측정하였다.

3) BMDCs 배양

C57BL/6 mouse의 tibia와 femur에서 골수를 채취한다. 채취한 골수를 single 세포로 만든 후 nylon mesh로 거른다. 이 세포를 원심분리 한 후에 상층액을 버리고 0.165M NH<sub>4</sub>Cl을 넣고 적혈구를 제거한다. 다시 원심분리 한 후 상층액을 버리고 여기에 RPMI1640 complete(10% FBS, 항생제)를 넣는다. 이 세포를 petri dish에 넣고 37°C · CO<sub>2</sub>배양기에 3시간 정도 배양한다. 3시간 후에 가볍게 pipetting을 한다. 이 과정에서 dish 바닥에 붙어 있는 세포는 거의 대부분이 macrophage이다. 상층액을 채취하여 원심분리 한 후 상층액을 버리고, GM-CSF를 넣고 배양한다. 이틀마다 배지를 버리고 6일째 되는 날에 실험한다. 이 6일째 되는 세포는 거의 대부분이 iDC이거나 DC precursor이다.

4) Flow cytometry analysis

세포를 모은 후 cold PBS로 2번 씻는다(1,500 rpm, 5분). Ab와 FACS buffer (PBS + 2% FBS + 0.1% sodium azide)를 혼합하여 세포를 염색한다(4°C, 30분). FACS로 분석한다.

5) Total RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol(Invitrogen, U.S.A.) 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 止帶方 추출물 또는 LPS를 처리하고 24시간 배양한 뒤 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한다. 이것을 원심분리 하여 위의 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포에 Tri-zol 용액 1 ml를 넣어서 용해시킨 후 100  $\mu$ l의 chloroform 용액을 가하고 두세 번 잘 섞어준 뒤 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후

2-propanol과 1:1로 섞고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액은 버리고 남은 침전물을 80% ethanol로 2회 씻은 뒤 건조시켰다. 그 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다.

#### 6) RT-PCR

Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA(1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70°C 에서 10분간 변성시켰다. 그 후 1 x single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase를 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1 x PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 30초를 30 cycle 반복하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

*TNF- $\alpha$*  (276bp): ATG AGC ACA GAA  
AGC ATG ATC (forward)

TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT  
(reverse)

*IL-6* (463bp): CAT CCA GTT GCC  
TTC TTG GGA (forward)

CAT TGG GAA ATT GGG GTA  
GGA AG (reverse)

*IL-12* (110bp): AGG CGA GAC TCT  
GAG CCA C (forward)

CTT CAC ACT TCA GGA AAG TCT  
(reverse)

*$\beta$ -actin* (514bp): TGT GAT GGT GGG  
AAT GGG TCA G (forward)

TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C

(reverse).

PCR반응이 끝난 후 1 x 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10  $\mu$ l씩 넣고 전기영동 한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

7) Cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) 측정  
止帶方 추출물이 BMDCs의 cytokine의 생산에 미치는 영향을 검증하기 위해 iBMDCs에 LPS(500 ng/ml) 또는 止帶方 추출물을 24시간 처리한 뒤 생산된 cytokine을 세포 상층액에서 ELISA로 정량하였다.

#### 8) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 student's *t*-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 세포독성에 미치는 영향

止帶方 추출물의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 BMDCs에 止帶方 추출물을 농도 의존적(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존률을 측정하였다. 止帶方 추출물은 어떤 농도에서도 BMDCs에 독성을 나타내지 않았다(data not shown).

#### 2. 止帶方이 BMDCs의 세포표면 수용체 class II MHC와 CD40에 미치는 영향

止帶方 추출물이 iBMDCs의 세포표면 수용체 발현에 미치는 영향을 알아보았다.

정상군은 iBMDCs에 아무것도 처리하지 않았고 대조군은 LPS(500 ng/ml)를

처리하였으며 실험군은 止帶方 추출물 (1.0 mg/ml)을 처리하였다.

FACS로 세포표면 수용체 발현 정도를 조사한 결과, 정상군에 비해 실험군과 대조군은 비슷한 정도로 class II MHC와 CD40의 발현을 증가시켰다(Fig. 1).

### 3. 止帶方이 BMDCs의 세포표면 수용체 CD80과 CD86에 미치는 영향

정상군에 비해 止帶方 추출물(1.0 mg/ml)을 처리한 실험군과 대조군은 비슷한 정도로 CD80과 CD86의 발현을 증가시켰다(Fig. 2).

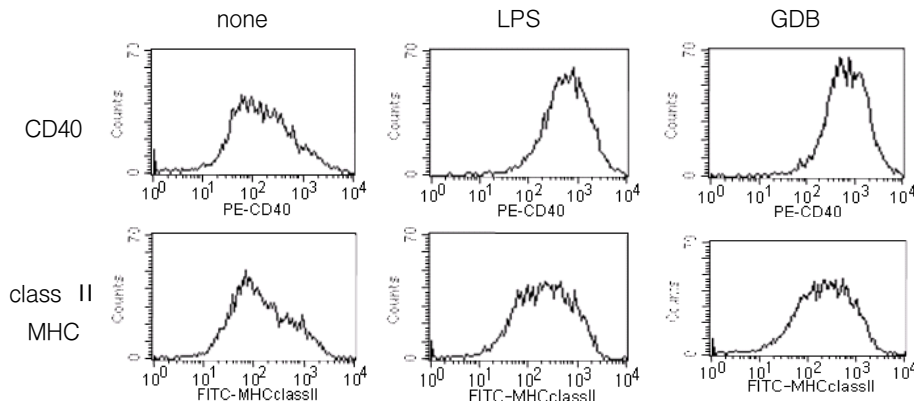


Fig. 1. GDB upregulated the expression of CD40 and class II MHC on BMDCs. iBMDCs were stimulated with LPS(500 ng/ml) or GDB(1.0 mg/ml). After 24 hours incubation, BMDCs were harvested and analyzed by flow cytometry. The numbers indicate the mean fluorescence intensity. The results are representative of three independent experiments.

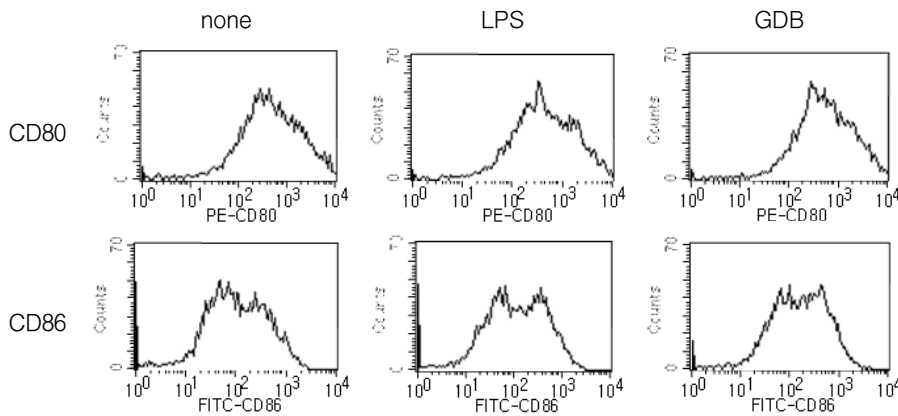


Fig. 2. GDB upregulated the expression of CD80 and CD86 on BMDCs. iBMDCs were stimulated with LPS(500 ng/ml) or GDB(1.0 mg/ml). After 24 hours incubation, BMDCs were harvested and analyzed by flow cytometry. The numbers indicate the mean fluorescence intensity. The results are representative of three independent experiments.

### 4. 止帶方이 BMDCs의 cytokine mRNA 발현에 미치는 영향

止帶方 추출물이 mRNA 수준에서 cytokine

생성을 조절하는지 알아보았다.

정상군은 iBMDCs에 아무것도 처리하지 않았고 대조군은 LPS(500 ng/ml)를

처리하였으며 실험군은 止帶方 추출물을 농도별(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 처리하였다.

RT-PCR로 cytokine의 mRNA 발현 여부와 그 정도를 조사한 결과, 정상군에 비해 대조군은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 mRNA 발현을 모두 증가시켰으며 실험군은 IL-12 mRNA 발현만을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 3).

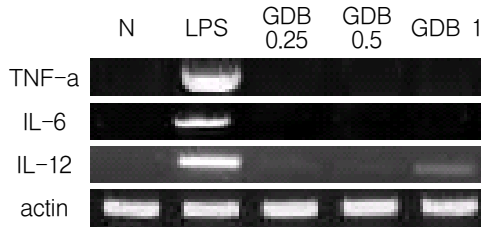


Fig. 3. GDB induced cytokine mRNA expression on BMDCs. After the development of BMDCs(on day 6),  $2 \times 10^5$  cells/ml were cultured with LPS(500 ng/ml) or GDB for 24 hours. The level of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-12 mRNA were determined by RT-PCR.

5. 止帶方이 BMDCs가 생산하는 cytokine 종류와 생산량에 미치는 영향

止帶方 추출물이 cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 생산에 미치는 영향을 알아보았다.

ELISA법으로 각각의 cytokine 생산량을 측정한 결과, TNF- $\alpha$ 의 생산량은 정상군에서  $0.13 \pm 0.005$  ng/ml, 대조군에서  $5.78 \pm 0.58$  ng/ml로 나타났으며, 止帶方 추출물을 농도별(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 처리한 실험군에서는 각각  $0.32 \pm 0.31$  mg/ml,  $0.54 \pm 0.01$  mg/ml,  $0.58 \pm 0.08$  mg/ml로 나타났다.

IL-6의 생산량은 정상군에서  $0.23 \pm 0.08$  mg/ml, 대조군에서  $9.78 \pm 1.32$  mg/ml로 나타났으며, 실험군에서는 농도별로 각각  $1.15 \pm 0.06$  mg/ml,  $1.28 \pm 0.04$  mg/ml,

$1.64 \pm 0.13$  mg/ml로 나타났다.

IL-12의 생산량은 정상군에서  $0.02 \pm 0.04$  mg/ml, 대조군에서  $5.87 \pm 0.89$  mg/ml로 나타났으며, 실험군에서는 농도별로 각각  $1.23 \pm 0.03$  mg/ml,  $2.32 \pm 0.43$  mg/ml,  $2.98 \pm 0.24$  mg/ml로 나타났다.

실험결과, TNF- $\alpha$ , IL-6의 생산량 변화는 유의성이 없었고 IL-12의 생산량은 정상군에 비해 止帶方 추출물 농도에 따라 유의성 있게 증가하였음을 알 수 있다(Fig. 4)( $p < 0.05$ ).

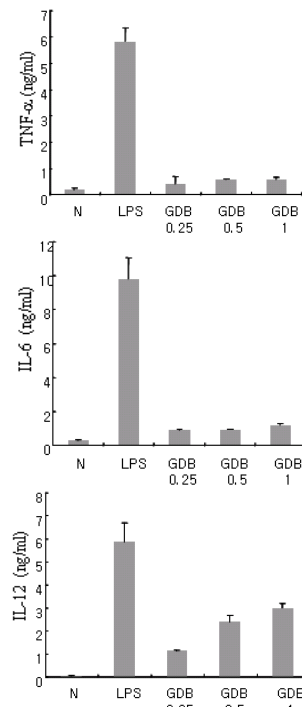


Fig. 4. GDB induced cytokine production in BMDCs. After the development of BMDCs(on day 6),  $2 \times 10^5$  cells/ml were cultured with LPS(500 ng/ml) or GDB for 24 hours. The production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 were determined by ELISA.

IV. 考 察

止帶方은 清代 醫學家인 陸懋修<sup>1)</sup>의 《世補齋·不謝方》에 “止帶 止者以通爲止也. 甚者須蒼朮厚朴. 有寒宜炮薑附子並須茵陳. 此證寒濕濕熱皆有之.”<sup>2,3)</sup>라고 처음 收載된 이후 濕熱로 인한 帶下를 治療하는데 多用되었다<sup>4-11,23-26)</sup>.

止帶方은 茵陳蒿, 黃柏, 山梔, 赤芍藥, 牡丹皮, 牛膝, 車前子, 豬苓, 茯苓, 澤瀉로 구성되어 있으며 《世補齋·不謝方》에 구성약물의 용량에 대한 文句는 없으나 마지막 부분에 “總之醫家用藥 隨證重輕 臨時酌量 豈有一定.”이라고 언급하였다<sup>3)</sup>. 止帶方 구성약물 각각의 작용을 살펴보면, 茵陳蒿는 清利濕熱 退黃등의 효능이 있고, 茵陳 추출물은 염증성 cytokine에 의한 NO의 생성을 저해하여 소염, 진통 효과가 있다<sup>27,28)</sup>. 黃柏은 清熱燥濕 瀉火解毒 清退虛熱 등의 효능이 있고, 黃柏 추출물은 항산화 및 항암효과가 있다<sup>27,29)</sup>. 山梔는 瀉火除煩 清熱利濕 涼血止血 등의 효능이 있고 梔子 추출물은 진균과 세균에 대한 항균 효과가 있다<sup>27,30)</sup>. 赤芍藥은 清熱涼血 活血祛瘀 消癰散腫 등의 효능이 있다<sup>27)</sup>. 牡丹皮는 清熱涼血 活血行瘀 등의 효능이 있고, 牡丹皮 추출물은 항균 및 항염 효과가 있다<sup>27,31-33)</sup>. 牛膝은 活血祛瘀 通利關節 引血引火下行 등의 효능이 있다<sup>27)</sup>. 車前子는 利水通淋 등의 효능이 있다<sup>27)</sup>. 豬苓은 滲濕利水 등의 효능이 있고, 豬苓추출물은 B cell 활성화, 혈액 내 백혈구 수 증가 등을 통하여 암세포에 대해 면역 활성을 증강시켜 항암효과가 있다<sup>27,34)</sup>. 茯苓은 利水滲濕 健脾補中의 효능이 있고, 茯苓의 추출물은 항균효과가 있고 B cell의 항체형성능력과 macrophage의 NO 분비능력을 증강시켜 면역 활성화에 효과

가 있다<sup>27,35,36)</sup>. 澤瀉는 利水 滲濕 泄熱 清腎火 등의 효능이 있고, 澤瀉추출물은 항균효과 및 항산화효과가 있다<sup>27,37,38)</sup>.

이상을 종합하면 止帶方은 健運脾氣, 清熱, 燥濕, 利水, 活血, 항균, 면역 활성 증강, 소염, 진통 등의 효과가 있어 여성 생식기계 염증성 질환인 질염의 치료에 적합하다고 할 수 있다.

질염은 질의 감염 또는 염증상태이며 폐경여성을 제외한 여성에서 발생하는 질염의 90% 이상은 세균성 질증(40-50%), 질 칸디다증(20-25%), 트리코모나스 질염(15-20%) 등이나, 이는 단순히 원인균의 감염만으로 발병되는 것은 아니다<sup>12,13)</sup>.

질 내부는 특징적인 생리적 방어기전이 있는데, 이는 정상적으로 많은 종류의 세균군이 생태적 균형을 이루고 있다는 것이다. 이중 90%를 차지하는 유산균(lactobacillus)은 유산을 분비하여 질 내를 pH4.5이하로 유지하고 질 미생물들 사이에 균형을 유지하여 병균에 대한 저항성을 지니게 한다<sup>12,13)</sup>.

현재까지 질염의 주된 서양 의학적 치료는 항진균제와 항생제의 복용이다<sup>12,13,39-44)</sup>. 그러나 임상에서 모든 질염의 증상은 비특이적어서 오용되거나 남용되기 쉽다<sup>45-49)</sup>. 또한, 적절한 약물 복용은 과증식된 원인균을 효과적으로 박멸할 수 있으나 질 내 생태유지에 필수적인 유산균의 수적 감소 및 기능약화를 초래하며, 이는 쉽게 복원되지 않아 질염의 재발 및 만성화를 초래한다. Pirotta<sup>48)</sup> 등은 항생제 치료 후 질 내 세균군에서 칸디다 원인이 차지하는 비율이 증가함을 보고하였으며, Boris<sup>50)</sup> 등은 세균성 질증의 항생제 치료 후 관찰 결과, 6년 후에는 50%이상이 재발하며 그 중 대부분이 1

년 이내에 재발한다고 보고하였다.

이와 같이 질 내부는 반복적이고 지속적으로 감염되기 쉬우며, 이는 결국 질염에 이환된 여성의 질 내부 면역기전을 약화시켜 항원에 대한 반응성을 감소시키고 효과적인 방어 작용을 저하시킨다. 따라서 질 내부의 근본적인 면역기능의 강화는 질염의 치료와 재발 및 만성화 예방에 중요하다고 할 수 있다.

질 내에 미생물이 침입하면 점막상피는 물리적·화학적 장벽 역할을 하며 항미생물 작용이 있는 펩티드를 생산한다. 점막상피에 있는 neutrophil, macrophage, NK cell 등은 미생물을 포식하고 DCs는 미생물의 항원을 세포표면에 제시한다. 또한 보체, cytokine 등 화학 유인 물질에 의하여 염증 세포들이 감염된 부위에 보충되어 포식·살균작용이 촉진되고 염증반응이 일어난다. 이와 같은 초기 선천면역에서 방어에 실패할 경우 지속적으로 활성화된 위 세포들에 의해 cytokine 분비가 더욱 증가되고 이는 적응면역을 자극한다. 이렇게 초기 선천면역에서 적응면역으로 개시·발달될 때 DCs의 항원제시 능력은 매우 중요하다. 초기 면역단계에서 성숙된 DCs가 적응면역의 B cell과 T cell의 활성화에 주도적인 역할을 하기 때문이다. 이렇게 유도된 적응면역은 특정 항원에 대해 특이적으로 반응하여 최적화된 효과적인 방어 작용을 하므로 숙주의 미생물에 대한 방어에 중요하다고 할 수 있다<sup>15)</sup>.

따라서 본 연구자는 止帶方으로 帶下를 치료하는 기전을 究明하기 위하여 止帶方이 iDCs의 활성화에 미치는 영향에 관한 실험적 연구를 하였다. 본 실험에서는 mouse의 tibia와 femur의 골수에서

채취한 BMDCs를 사용하였으며, LPS로 자극한 iBMDCs를 대조군으로 설정하였다.

iDCs가 외부항원에 의해 자극되면, iDCs는 mDCs로 성숙되고 세포표면에 각각의 항원에 특이적으로 class II MHC, CD40, CD80, CD86 등의 여러 수용체를 발현하게 된다. 내독소인 LPS는 그람음성균의 세포벽에 존재하며 지질 성분에 다당류가 결합된 형태를 가진다. 다당류 부분은 변화가 많으며 적응면역에 의해 인식되고, 지질 부분은 변화가 적고 선천면역에 의해 인식되는 분자 형태를 하고 있다. LPS는 iBMDCs를 성숙시켜 class II MHC, CD40, CD80, CD86의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다<sup>15)</sup>.

MHC는 펩티드로 분해된 항원을 결합하여 세포표면에 발현하고, 이를 naive T cell에게 제시함으로써 effector T cell (CD4<sup>+</sup> T cell, CD8<sup>+</sup> T cell)로 활성화시킨다. 이때, 세포질로 침입한 항원은 class I MHC가 CD8<sup>+</sup> T cell에게 제시하며, 세포내 소포로 이입된 항원은 class II MHC가 CD4<sup>+</sup> T cell에게 제시한다<sup>15)</sup>.

CD80과 CD86는 cosimulatory molecule으로써 항원과 함께 DCs의 표면에 제시되어 T cell을 자극한다. 자극을 받은 T cell은 표면에 CD40L을 발현하고 cytokine을 생산한다.<sup>15)</sup>

CD40은 DCs, B cell 및 macrophage에서 발현되며, T cell의 CD40L와 결합하여 cosimulatory molecule와 adhesion molecule 등 수용체 발현을 증가시키므로 DCs의 항원제시능력의 증진과 B cell, T cell, macrophage의 활성을 더욱 자극한다<sup>15)</sup>.

본 실험에서는 LPS(500 ng/ml) 처리군과 비교하여, 止帶方 추출물(1.0 mg/ml)



처리군에서 iBMDCs의 class II MHC, CD40, CD80, CD86 발현 증가 여부와 그 정도를 flow cytometry analysis를 통해 분석하였다(Fig. 1, 2). 실험결과, LPS (500 ng/ml) 처리군은 iBMDCs를 성숙시켜 class II MHC, CD40, CD80, CD86 발현을 증가시켰다. 또한 止帶方 추출물 (1.0 mg/ml) 처리군은 LPS(500 ng/ml) 처리군과 비슷하게 class II MHC, CD40, CD80, CD86 발현을 증가시켰다.

본 실험에 사용한 止帶方은 물 추출물이어서 polysaccharide의 함유 가능성을 완전히 배제할 수 없지만, Fig. 4와 5에서 알 수 있듯이 止帶方 단독에서는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6를 유도하지 않았다. 따라서 본 실험에서 止帶方 추출물 처리군에 관한 실험결과는 polysaccharide에 의한 효과로 보기가 힘들다.

이를 종합하면, 止帶方은 LPS와는 다른 방법으로 iDCs를 성숙시켜 class II MHC, CD40, CD80, CD86 등의 세포표면 수용체를 발현시키며, 이는 DCs, B cell, T cell 및 macrophage 등의 활성을 더욱 자극하여 숙주의 면역기능을 강화시킬 수 있음을 의미한다.

또한, iDCs는 외부항원에 의해 자극되면 각각의 항원에 특이적으로 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 등의 각종 cytokine을 생산하게 된다.

TNF- $\alpha$ 는 주로 macrophage와 T cell에서 생산되며, neutrophil과 monocyte를 활성화시키며 감염부위의 보충을 촉진시킨다. 그런데 중증의 감염에서 TNF가 많이 생산되면 전신적으로 발열, 악액질 등의 병리학적인 비정상상을 야기하게 된다<sup>15,51)</sup>.

IL-6은 주로 macrophage, endothelial

cell 및 T cell에서 생산되며, 선천면역과 적응면역 모두에서 기능을 하는 cytokine이다. IL-6은 선천면역에서는 간세포의 급성단계 단백질의 합성을 자극하며 적응면역에서는 항체의 생산자로 분화된 B cell의 성장을 자극한다<sup>15,51-53)</sup>.

IL-12는 세포 내 미생물에 대한 초기 선천면역 동안 생산되어 적응면역을 매개하는 cytokine이다. IL-12는 주로 macrophage와 DCs에서 생산되며, IL-12의 가장 중요한 기능은 CD4<sup>+</sup> T cell에 의한 IFN- $\gamma$  생산을 자극하여 CD4<sup>+</sup> T cell을 T<sub>H</sub>1로 분화되도록 하는 것이다<sup>15,54-56)</sup>.

止帶方 추출물이 iBMDCs의 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RT-PCR을 이용하여 각각의 cytokine에 해당하는 mRNA 발현 여부와 정도를 측정하였으며, ELISA법으로 그 생산량을 측정하였다(Fig. 3, 4). 실험결과, LPS(500 ng/ml) 처리군은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 mRNA 발현을 모두 증가시켰으나, 止帶方 추출물 처리군은 IL-12 mRNA 발현만을 농도 의존적으로(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml) 증가시켰다(Fig. 3). 또한, LPS(500 ng/ml) 처리군은 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 생산량을 모두 증가시켰으나, 止帶方 추출물 처리군은 IL-12 생산량만을 농도 의존적으로(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml) 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 4)( $p < 0.05$ ).

이를 종합하면, 止帶方이 mRNA 수준에서의 발현증가로 IL-12 생산량을 증가시킬 수 있으며, 이는 CD4<sup>+</sup> T cell을 활성화시켜 T<sub>H</sub>1로 분화·증식시킬 수 있음을 의미한다.

CD4<sup>+</sup> T cell의 T<sub>H</sub>1 또는 T<sub>H</sub>2로 분화하는 mDCs가 각각의 항원을 특이적으로

인식하여 다른 종류의 cytokine을 생산함으로써 그 방향이 결정된다. mDCs가 IL-12를 생산하면 CD4<sup>+</sup> T cell은 IFN- $\gamma$ 를 분비하여 T<sub>H</sub>1 분화를 촉진하고, macrophage의 세균살해 능력과 NK cell과 CD8<sup>+</sup> T cell의 세포용해기능이 증강되고, TNF를 분비하게 하여 neutrophil을 활성화시킨다. 이로써 숙주는 항원을 효과적으로 제거할 수 있게 된다. 그런데 mDCs가 IL-10을 생산하면 CD4<sup>+</sup> T cell들은 IL-4, IL-10 등을 분비하는데, IL-4는 T<sub>H</sub>2 분화를 촉진하고 IL-10은 T<sub>H</sub>1 발달을 억제한다. 따라서 숙주는 항원을 효과적으로 제거할 수 없게 되고 감염은 만성화된다<sup>15,57</sup>.

현재까지 연구된 바에 의하면, 세균성 질증과 질 칸디다증의 주요 면역기전은 세포매개면역(CMI)이며, 숙주가 정상적인 면역기전을 가지고 있다면 질 내의 iDCs는 원인균들에 의해 성숙되어 IL-12를 생산함으로써 CD4<sup>+</sup> T cell의 T<sub>H</sub>1 분화를 촉진하여 효과적인 방어 작용을 수행하게 한다. 그러나 질 내부의 반복적이고 지속적인 감염은 DCs를 무력화시켜 항원에 대한 반응성이 감소되며, IL-12의 생산은 감소되고 IL-10의 생산은 증가하여 결국 T<sub>H</sub>2 분화를 촉진함으로써 효과적인 방어 작용을 감소시킨다<sup>12,13,15,58-60</sup>.

트리코모나스 질염은 기생충인 anaerobic *Trichomonas vaginalis* 원충에 의해 발생된다. 기생충은 숙주의 초기면역에 잘 저항하도록 적응하였고 두꺼운 외피를 가지고 있어 숙주의 만성적인 감염을 유발한다. Scott<sup>57</sup> 등은 *Trichomonas vaginalis*가 DCs의 활성화 및 cytokine의 생산을 억제하며, IL-12가 아닌 IL-10 만을 생산하게 하여 숙주의 방어기전에 저항한

다고 보고하였다. 그러므로 트리코모나스 질염에서 염증의 만성화 경향성은 DCs가 CD4<sup>+</sup> T cell을 T<sub>H</sub>1이 아닌 T<sub>H</sub>2로 분화·증식하도록 하여 발생한다고 할 수 있다<sup>12,13,15,57</sup>.

그러므로 세균성 질증, 질 칸디다증, 트리코모나스 질염에 대한 숙주의 방어기전에서 IL-12를 생산하여 CD4<sup>+</sup> T cell을 T<sub>H</sub>1로 분화·증식시키는 것은 원인균의 효과적인 제거에 중요하다고 할 수 있다. 앞에서 止帶方은 iDCs를 성숙시킬 수 있으며, iDCs의 성숙 결과 생산되는 cytokine은 IL-12이므로 CD4<sup>+</sup> T cell을 T<sub>H</sub>1로 분화·증식시킬 수 있음을 언급하였다. 따라서 止帶方은 질염의 원인균에 대하여 질 내부의 면역기전을 강화시켜 질염을 효과적으로 치료할 수 있으며 재발 및 만성화를 예방할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구는 한약 추출물로 자극한 mouse iBMDCs의 제한된 종류의 수용체 발현과 cytokine 생산에 관한 in vitro 실험으로써, 한약이 인체의 면역기능조절에 미치는 영향을 밝히는 연구의 기초가 될 것으로 생각된다. 그러나 최근 다른 연구에서는 동일한 항원에 대하여 mouse의 iBMDCs와 인간의 iBMDCs가 활성화되었을 때 생산하는 cytokine에 차이가 있는 것으로 보고되고 있으며, in vitro와 in vivo의 실험에서도 차이가 보고되고 있다<sup>57</sup>. 또한 iDCs는 미생물 종류에 따라 각각 다르게 항원인식을 하여 표면에 발현하는 수용체 및 생산되는 cytokine의 종류가 달라진다. 따라서 止帶方이 iDCs를 활성화시켜 여성의 질 내 면역기능 향상에 영향을 미치는지에 대하여 알기 위해서는, 止帶方이 인간의 iDCs를

활성화시켜 다양한 종류의 표면 수용체 발현과 cytokine의 생산을 유도할 수 있는가에 관한 in vitro와 in vivo의 실험이 추가로 필요하며 止帶方 구성약물 각각의 추출물이 iDCs에 미치는 영향에 관한 실험도 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

수지상세포(dendritic cell, DCs)에서 止帶方이 T 세포 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BMDCs에 止帶方(1.0 mg/ml)을 처리했을 때 CD40과 class II MHC의 발현이 증가되었다.
2. BMDCs에 止帶方(1.0 mg/ml)을 처리했을 때 CD80과 CD86의 발현이 증가되었다.
3. RT-PCR에서 止帶方을 농도별(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 처리했을 때 IL-12의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가되었다.
4. ELISA에서 止帶方을 농도별(0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 처리했을 때 IL-12의 생산량이 농도 의존적으로 증가되었다.(p<0.05)

이상의 결과에서 止帶方은 iDCs를 성숙시켜 IL-12의 생산량을 증가시키고 CD4<sup>+</sup> T cell을 TH1로 분화·증식시킴으로써 세포매개면역(CMI)을 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 止帶方은 질내의 면역 기능을 향상시켜 질염을 치료

하고 재발 및 만성화를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

- 투 고 일 : 2010년 4월 28일
- 심 사 일 : 2010년 5월 4일
- 심사완료일 : 2010년 5월 12일

## 參 考 文 獻

1. 王異凡. 不謝方釋評. 山東中醫雜誌. 1982 ;3:129.
2. 王異凡, 王道屏. 不謝方釋評(續六). 山東中醫雜誌. 1996;15(11):520-1.
3. 裘沛然. 中國醫學大成三編 4. 長沙:岳麓書社. 1994:854.
4. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 I. 서울:정담. 2007:292.
5. 楊思澍 等 主編. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1993:619, 620.
6. 劉敏如, 吳克明. 世界傳統醫學婦科學. 科學出版社, 1999:251.
7. 夏桂成. 中醫臨床婦科學(第2版). 北京:人民衛生出版社. 2007:343-4.
8. 夏桂成. 實用婦科方劑學. 北京:人民衛生出版社. 1997:303-5.
9. 安載福. 東醫診療大全. 서울:서원당. 1992 :181, 182, 490-1, 669.
10. 劉敏如. 中醫婦產科學. 北京:人民衛生出版社. 2002:427-8, 435.
11. 羅元愷. 中醫婦科學. 北京:人民衛生出版社. 1994:173.
12. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학(제4판). 서울:고려의학. 2007 :147-61.
13. 조성남. 난치성 질염의 최신 치료법. 대한산부회지. 2005;48(2):261-8.

14. 김동일. 대하진단의 객관화에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2001;14(3):101-9.
15. 세포분자면역학 교재연구회 역. 세포분자면역학(6판). 서울:이퍼블릭. 2008;357-82, 407-27, 429-50, 469-70, 473-99.
16. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.
17. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
18. 전경희 등. 간암 환자의 수지상세포 배양 및 면역치료. 고신대학교 의학부 학술지. 2002;17(1):18-24.
19. 신정옥 등. 자궁 경부암에서 c-erbB-2 발현과 S-100 양성 수지상세포의 분포에 관한 연구. 대한부인종양·콜포스코피학회. 2000;11(4):397-403.
20. 김도순 등. 고려홍삼의 수지상세포 활성화 효과. *J Ginseng Res.* 2006;30(3):117-27.
21. 김태규. 수지상세포를 이용한 종양 면역치료. 암심포지움. 가톨릭대학교 가톨릭암센터. 2006;1:41-2.
22. 한만용. 알레르겐 인식과 반응에서 수지상세포의 역할. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2005;15(2):87-97.
23. 徐玲春. 止帶方合蛇床子散熏洗坐浴治療帶下過多30例. 內蒙古中醫藥(Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine). 2008;3:37.
24. 周亞娟. 止帶方加減治療濕熱帶下療效觀察. 黑龍江中醫藥(Heilongjiang Journal of Traditional Chinese Medicine). 2007;6:40-1.
25. 黃曉清. 波姆光療儀并中藥止帶方治療宮頸糜爛180例. 福建中醫藥(Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine). 1998;29(2):30-9.
26. 宋玉春. 止帶方配合微波治療盆腔炎150例療效觀察. 吉林中醫藥(Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine). 2007;27(11):31.
27. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000:688-90, 405-7, 372-4, 242-4, 385-7, 525-7, 669-71, 655-7, 649-52, 657-8.
28. 김시나 등. 인진 추출물의 소염진통 작용. 생약학회지. 2005;36(4):338-43.
29. 李文祚 등. 황백 열수추출물의 항산화활성과 아질산염 소거작용에 관한 연구. 동의병리학회지. 1999;13(1):112-8.
30. 류응주, 조성환. 치자추출물의 항균 특성 및 안정성 검사. 농업생명과학연구. 2004;38(4):11-9.
31. 박희준, 최무영. 목단피 정유에서 분리된 paeonol과 그 유도체 Methylpaeonol의 in vitro 항염효과. 생약학회지. 2005;36(2):116-20.
32. 권오근 등. 목단피로부터 항균활성 성분의 분리. 생약학회지. 1999;30(3):340-4.
33. 노영득 등. 목단피의 항염효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2004;19(3):13-24.
34. 오윤희 등. 저령의 균핵에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과. *The Korean Journal of Mycology.* 2004;32(1):23-30.
35. 이상달 등. 복령 균핵의 알칼리추출물에서 정제한 면역활성 증강물질의 작용과 화학구성. *The Korean Journal of Mycology.* 1999;27(4):293-8.
36. 이국성 등. 복령의 항균력에 관한 연구. 한국균학회지. 1982;10(1):27-31.
37. 김세은 등. 택사 메탄올 추출물과 주

- 성분의 항산화작용. 생약학회지. 2007;38(4):372-5.
38. 도정애. 택사의 항균 및 항진균 작용에 관한 연구. 생약학회지. 1996;27(4):378-82.
39. 박문일. 임신부의 세균성질증에서 Clindamycin 질크림의 임상효과. 대한산부인과학회지. 1995;38(2):230-8.
40. 안진섭 등. Candida성 질염에 대한 Fluconazole의 임상적 치료 효과. 대한산부인과학회지. 1992;35(11):1613-20.
41. 김준현 등. 진균성질염에 대한 Fluconazole 1 회 경구요법의 치료효과. 대한산부인과학회지. 1992;35(9):1309-16.
42. 고재환. 트리코모나스 질염에서 메트로니다졸 1.5gm 단일 요법의 치료 효과. 인제의학. 1999;20(1):337-47.
43. Taha TE et al. Intermittent Intravaginal Antibiotic Treatment of Bacterial Vaginosis in HIV-Uninfected and -Infected Women: A Randomized Clinical Trial. PLoS Clin Trials. 2007;2(2):e10.
44. Austin MN et al. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. J clin Microbiol. 2005;43(9):4492-7.
45. Roy S et al. Improving appropriate use of antifungal medications: the role of an over-the-counter vaginal pH self-test device. Infect Dis Obstet Gynecol. 2003;11:209-16.
46. Lauren B et al. Vaginitis: Making Sense of Over-the-counter treatment Options. Infect Dis Obstet Gynecol. 2007;97424.
47. Cerikcioglu N, Beksac MS. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12:13-6.
48. Pirotta MV, Garland SM. Genital Candida Species Detected in Samples from Women in Melbourne, Australia, before and after Treatment with Antibiotics. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3213-7.
49. Glover DD, Larsen B. Relationship of fungal vaginitis therapy to prior antibiotic exposure. Infect Dis Obstet Gynecol. 2003;11:157-60.
50. Boris J, Pahlson C, Larsson PG. Six years observation after successful treatment of bacterial vaginosis. Infect Dis Obstet Gynecol. 1997;5(4):297-302.
51. Akira S et al. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). FASEB J. 1990;4(11):2860-7.
52. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. Cytokine & Growth Factor Rev. 2002;13(4-5):357-68.
53. Sehgal PB. Interleukin-6: molecular pathophysiology. Journal of Investigative Dermatology. 1990;94(6):2S-6S.
54. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 1995;13:251-76.
55. Macatonia SE et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development

- of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 1995;154(10):5071-9.
56. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:297-322.
57. Karen S et al. Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology.* 2005 ;116:245-54.
58. Elizabeth P, St John et al. Dendritic cell Activation and maturation Induced by Mucosal Fluid from Women with Bacterial Vaginosis. *Clin Immunol.* 2007;125(1):95-102.
59. Bernardis F et al. Phenotypic and Functional Characterization of Vaginal Dendritic Cells in a Rat Model of *Candida albicans* Vaginitis. *Infection and Immunology.* 2006;74(7):4282-94.
60. Santoni G et al. Immune Cell-Mediated Protection against Vaginal Candidiasis: Evidence for a Major Role of Vaginal CD4<sup>+</sup>T Cells and Possible Participation of Other Local Lymphocyte Effectors. *Infection and Immunology.* 2002;70(9):4791-7.