

Original Article

독활 물 추출물이 대식세포 면역 활성화에 미치는 영향

이종한, 김운상, 임은미

경원대학교 한의과대학 부인과학교실

Effects of *Angelicae Pubescentis Radix* Water Extract on Immune Property in RAW 264.7 Macrophages

Jong-Han Lee, Yoon-Sang Kim, Eun-Mee Lim

Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Objectives: The purpose of this study was to investigate the effects of *Angelicae pubescentis Radix* water extract (ACE) on immune properties in macrophage cells.

Methods: The cells were divided into two groups: As a control, the first was not treated with ACE, and the other was treated with ACE. Together with the cell viability, productions of nitric oxide (NO) and cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α by treating of ACE were monitored.

Results:

1. There was no decrease of the cell viability after 24 hr incubation, but a significant decrease after 48 hr incubation with all four concentrations (25, 100, 200, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of ACE.
2. A significant increase in the production of NO was observed in the concentrations above 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ACE after 24 hr incubation.
3. Further, after 48 hr incubation, the critical concentration of ACE for the increase was reduced to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. The production of IL-1 β significantly increased with the ACE concentrations of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 24 hr incubation.
5. The production of IL-6 significantly increased with the ACE concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 24 hr incubation.
6. A significant increase in the production of TNF- α was detected with ACE concentrations of 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after 24 hr incubation.

Conclusions: These show that ACE increases mouse macrophage NO production at concentrations above 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) at concentrations above 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. These results suggest that ACE improves macrophage immune property.

Key Words : *Angelicae pubescentis radix*, cytokine, immune property, macrophage, nitric oxide

서론

부인과에서 면역력의 저하는 산후 감염, 자궁경부암 등의 중앙질환 및 각종 생식기 감염질환 등에서 중요한 문제이다¹⁾.

한의학에서는 “正氣在內 邪不可干”, “邪氣所湊 其氣必虛²⁾” 라고 하여, 發病機制를 “邪正鬪爭”으로 보아 正氣는 면역기능에 대한 조절로 해석할 수 있다³⁾.

독활은 辛溫發散, 祛風勝濕하는 效能이 있어 부인

• Received : 20 December 2010 • Revised : 30 December 2010 • Accepted : 30 December 2010

• Correspondence to : 김운상(Yoon-Sang Kim)

인천광역시 남동구 구월동 1200-1번지 경원대학교 부속 길한방병원 한방부인과

Tel : +82-32-468-0330, Fax : +82-32-468-4033, E-mail : komy@kyungwon.ac.kr

과에서 風濕痺痛을 치료하고, 熟地黃, 當歸, 川芎, 續斷, 杜沖, 白芍藥 및 桑寄生 등을 配合하여 産後身痛, 下肢痛에 사용하며⁴⁾, 강활과 비교하여 羌之氣清 行氣而發散營衛之邪, 獨之氣濁 行血而溫養營衛之氣, 羌有發表之功, 獨有助表之力⁵⁾이라 하여 독활의 효능을 인체의 질병에 대한 邪正鬪爭에서 正氣를 도와서 邪氣를 내친다^{6,7)}는 개념으로 보았다.

부인과에서 면역에 대한 기존 연구는 艾葉, 淫羊藿 등 개별한약재와 처방으로 구성된 연구가 있었지만⁸⁻²⁰⁾ 독활의 면역활성동에 대한 보고는 없었다. 이에 본 연구에서는 독활이 대식세포 면역 활동에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 열수 추출하여 얻은 추출물(이하 ACE)로 마우스 대식세포에 전처리 후 배양하여 cell viability와 NO 생성을 관찰하였고, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 cytokine 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 獨活(Angelicae Pubescentis Radix; root of *Aralia continentalis* KITAGAWA, 음니허브, Korea)은 2008년 11월에 구입(NO: 2008-11-0009)하였고, 약재는 사용 전에 초음파 세척기(ultrasonic cleaner)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 mouse 대식세포는 Raw 264.7 cell line(한국 세포주 은행, Korea)을 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 ethyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), methyl alcohol(Samchun Chemical, Korea), DMSO(Sigma, USA), DMEM(Sigma, USA), 1 \times phosphate

buffered saline(PBS, Sigma, USA), EDTA(Sigma, USA), acetic acid(Sigma, USA), isopropanol(Sigma, USA), trypsin-EDTA(Sigma, USA), NO assay kit (Oxford Biomedical Research, USA) 및 Bio-Plex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (NUAIRE, USA), pulverizer(Rong tsong, Taiwan), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(Omni, USA), research microscope (Becton dickinson, USA), centrifuge(Hanil, Korea), fume hood(Hanil, Korea), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA), microplate reader(Bio-Rad, USA), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(iNtRON biotech, Korea), ice-maker (Vision Scientific Co, Korea) 및 Bioplex-200(Bio-rad, USA) 등이다.

2. 방법

1) ACE의 제조

獨活 50 g을 정확하게 측정하고, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣어 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열 추출한 다음 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)로 감압 여과하고 이 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였고, 동결건조 추출물은 11.46 g을 얻었으며, 수율은 22.91%이었다.

2) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 U/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml) 등이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어준 뒤 50 ml flask 당 1

ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 ml culture flask)에 옮겨 1:2의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포독성 검사(MTT assay)

Raw 264.7 cells에 나타내는 세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 Mosmann 등²¹⁾의 방법을 응용하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 0, 25, 50, 100, 200 및 400 μg/ml 등의 시료를 각 well에 처리하고 24 혹은 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1 μg/ml MTT(Sigma, USA)를 100 μl씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 뒤 2 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μl 처리하고 37°C에서 2시간 방치 다음 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Viability}(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC - absorbance of control.

AT - absorbance of tested extract solution.

4) NO 생성 측정

세포로부터 생성되는 NO의 양은 Weissman 등²²⁻²⁴⁾의 방법을 응용, 세포배양액 중에 존재하는 NO를 Griess 시약을 이용하여 측정하였고, NO의 농도를 추정하기 위해 microplate reader를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성 정도를 비교하였다. 0, 25, 50, 100, 200 및 400 μg/ml 등의 다양한 시료를 배지에 담아 각 well에 처리하고 24 혹은 48

시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 세포배양 상등액 60 μl을 채취하여 여기에 Griess 시약 100 μl을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 NO 생성은 다음 공식으로 계산 되었다.

$$\text{Productions of NO}(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC - absorbance of control.

AT - absorbance of tested extract solution.

5) Cytokine 생성 측정

면역단백질 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등²⁵⁾의 방법을 응용하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 0, 50, 100 및 200 μg/ml 등의 다양한 농도의 시료와 함께 배지에 담아 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상등액을 채취하여 Bio-Plex Suspension Assay System을 이용, Quantitative Multiplexed Cytokine/Chemokine Assay를 실시하여 IL-1β, IL-6 및 TNF-α 등의 마우스 대식세포 cytokine 생성에 대한 시료의 영향을 계산, 비교하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean ± SD로 나타냈으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value가 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포생존율의 변화

ACE가 마우스 대식세포 생존율에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리 시 생존율의 변화는 없었다(Table 1, fig. 1).

Table 1. Effects of ACE on Cell Viability in RAW 264.7 Cells for 24 hr Incubation.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell Viability(% of normal)
Normal	100.00 \pm 15.47
25	99.58 \pm 11.43
50	91.82 \pm 10.08
100	97.70 \pm 11.50
200	97.56 \pm 10.78
400	104.03 \pm 13.96

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments. Normal : Not treated with ACE.

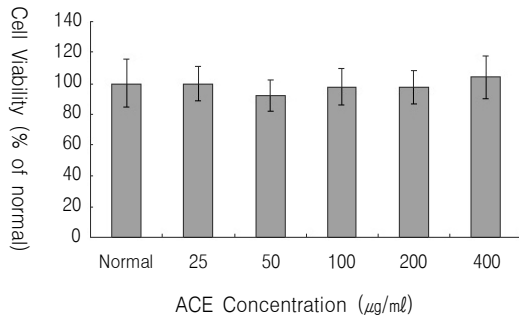


Fig. 1. Effects of ACE on cell viability in RAW 264.7 cells for 24 hr incubation.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.

48시간 처리 시 25, 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도 군에서 유의한 감소를 보였다(Table 2, fig. 2).

2. NO 생성량의 변화

ACE가 마우스 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리 시 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다 (Table 3, Fig. 3).

48시간 처리 시 모든 농도 군에서 유의한 증가를 보였다(Table 4, Fig. 4).

Table 2. Effects of ACE on Cell Viability in RAW 264.7 Cells for 48 hr Incubation.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cell Viability(% of normal)
Normal	100.00 \pm 8.88
25	89.42 \pm 8.72*
50	95.25 \pm 9.92
100	83.85 \pm 8.77*
200	75.96 \pm 9.21*
400	72.17 \pm 7.26*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * $p < 0.05$ compared to normal.

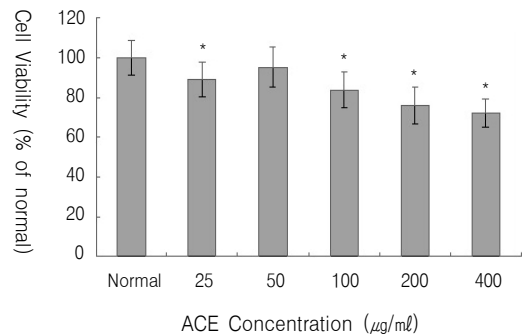


Fig. 2. Effects of ACE on cell viability in RAW 264.7 cells for 48 hr incubation.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments. Normal : Not treated with ACE.
 * $p < 0.05$ compared to normal.

3. IL-1 β 생성량의 변화

ACE가 마우스 대식세포의 IL-1 β 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리 시 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다(Table 5, Fig. 5).

4. IL-6 생성량의 변화

ACE가 마우스 대식세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리 시 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다(Table 6, Fig. 6).

Table 3. Effects of ACE on NO Production of RAW 264.7 Cells for 24 hr Incubation.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	NO production(% of normal)
Normal	100.00 \pm 1.74
25	99.56 \pm 1.96
50	111.80 \pm 2.55*
100	127.89 \pm 2.42*
200	136.05 \pm 4.22*
400	142.01 \pm 3.40*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

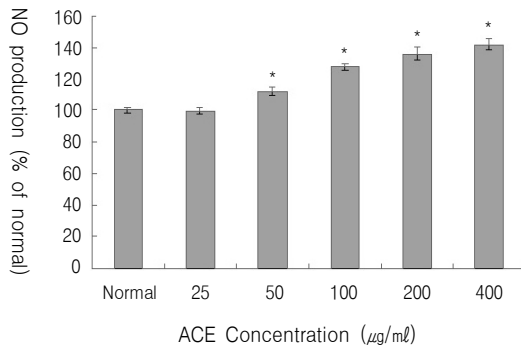


Fig. 3. Effects of ACE on NO production of RAW 264.7 cells for 24 hr incubation.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

5. TNF- α 생성량의 변화

ACE가 마우스 대식세포의 TNF- α 생성에 미치는 영향을 비교한 결과 24시간 처리 시 모든 농도 군에서 유의한 증가를 보였다(Table 7, Fig. 7).

고 찰

인체가 자신의 조직을 손상시키려는 유기물이나 독소에 대해 방어하는 능력을 면역이라 하고, 최근

Table 4. Effects of ACE on NO Production of RAW 264.7 Cells for 48 hr Incubation.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	NO production(% of normal)
Normal	100.00 \pm 4.73
25	106.96 \pm 5.53*
50	142.83 \pm 9.13*
100	211.85 \pm 19.90*
200	292.61 \pm 16.02*
400	340.43 \pm 18.55*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

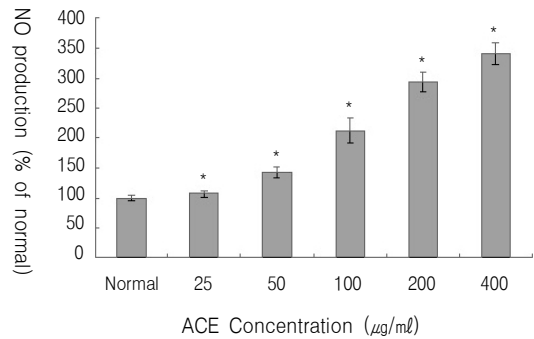


Fig. 4. Effects of ACE on NO production of RAW 264.7 cells for 48 hr incubation.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

부인과에서는 종양의 발생 기전, 산후 질환 및 갱년기 질환치료 등과 관련하여 면역에 대한 관심이 증가하는 추세이며¹⁾, 특히 한약이 생체 활성 조절 물질로서 면역과 관련된 치료제로 활용 여부에 대한 관심도 많다.

韓醫學에서는 “正氣在內 邪不可干”, “邪氣所湊 其氣必虛²⁾”라고 하여, 發病機制를 “邪正鬪爭”으로 보았고, 正氣와 邪氣의 투쟁과정에서 正氣가 虛하여 적응력과 항병력이 감소하면 邪氣의 침입이 용이해져 질병이 발생한다고 보았다²⁶⁾. 이와 더불어 한의

Table 5. Effects of ACE on IL-1 β Production of RAW 264.7 Cells.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-1 β production(pg/ml)
Normal	4.3 \pm 0.50
50	4.8 \pm 0.50
100	7.0 \pm 0.82*
200	15.4 \pm 2.69*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

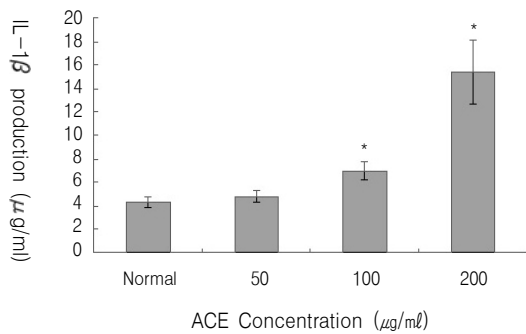


Fig. 5. Effects of ACE on IL-1 β production of RAW 264.7 cells.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

학적 치료법 중 “正虛者扶正, 邪實者祛邪”라는 치료 원칙은 면역학적 입장에서 正氣와 邪氣의 상황을 동시에 고려한 좋은 치료 방안이었음을 입증하는 연구가 많이 보고되었다^{3,27}). 扶正法은 인체의 안정성을 증강시키기 위한 항병력 조절과 면역효능을 높이는 치료 방법으로 볼 수 있는 반면, 祛邪法은 면역효능 감소의 원인을 제거하는 치료법으로 볼 수 있는데, 正氣虛弱과 면역기능저하의 상관성, 祛邪法을 통한 면역균형의 도모 및 扶正과 祛邪의 비율 조절을 통한 면역저하와 면역과민의 치료법 선택 등의 연구들이 기준에 보고된 바 있다^{26,28}). 또 다른 연구들을 살펴보면 扶正의 방법은 면역반응을 촉진시켜 益衛氣

Table 6. Effects of ACE on IL-6 Production of RAW Cells.

ACE Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-6 production(pg/ml)
Normal	395.8 \pm 74.47
50	418.9 \pm 56.87
100	469.9 \pm 11.47
200	1237.5 \pm 215.88*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

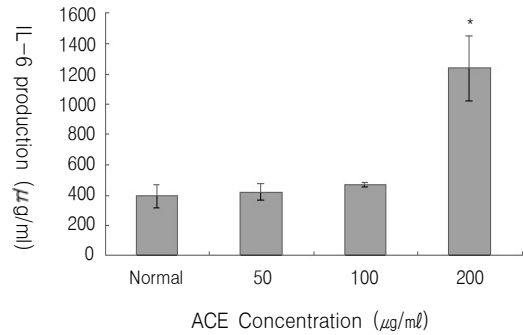


Fig. 6. Effects of ACE on IL-6 production of RAW cells.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

補元氣 養血氣 益肺健脾 補腎機能을 포괄하고, 祛邪의 방법은 면역반응을 억제하며, 祛散風邪 清熱解毒 活血化癥 滌痰化濁등을 포괄한다²⁹)고도 보는 한편 약물분류 중 補氣 補血 補陰 補陽하는 약물들은 대부분 면역 강화작용이 있으며, 實證에 사용하는 祛風除濕 清熱解毒 活血化癥 毒性攻堅의 효능이 있는 약물은 대부분 면역 억제작용이 있다는 보고도 있었다²⁸).

獨活은 오가과(五加科 두릅나무과 Araliaceae)에 속한 독활 *Aralia continentalis* KITAGAWA(*Aralia cordata* THUNB.)의 뿌리를 건조하여 사용하며³⁰), 정유 성분 1~2%, 스테아린산 0.07%, 수지, 살리실산과, 디테르펜산, 구리, 망간 및 니켈 등이 함유되

Table 7. Effects of ACE on TNF- α Production of RAW 264.7 Cells.

ACE Concentration($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α production(pg/ml)
Normal	14.3 \pm 3.40
50	263.0 \pm 47.45*
100	907.5 \pm 125.75*
200	2216.3 \pm 411.70*

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

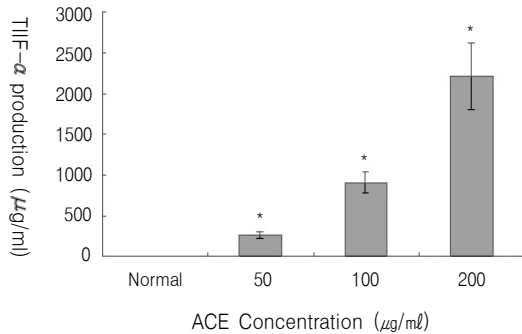


Fig. 7. Effects of ACE on TNF- α production of RAW 264.7 cells.

ACE : Water extract of *Angelicae Pubescentis Radix*.
 Values are the mean \pm SD of the three independent experiments.
 Normal : Not treated with ACE.
 * p < 0.05 compared to normal.

어 있다³¹⁾. 性은 溫 無毒하고, 味는 辛苦하며³⁰⁾, 辛 溫發散, 祛風勝濕하는 效能으로 熟地黃, 當歸, 川芎, 續斷, 杜沖, 白芍藥 및 桑寄生등을 配合하여 婦인과 임상에서는 産後 身痛과 下肢痛의 治療에 사용해 왔다⁴⁾. 羌活(羌活)과 비교하여 羌之氣清 行氣而發散營衛之邪, 獨之氣濁 行血而溫養營衛之氣, 羌有發表之功, 獨有助表之力⁷⁾이라 하여, 독활에 대한 기존 연구는 독활의 항염증작용³²⁾, 항균활성에 대한 연구³³⁾와 다수³⁴⁻⁴⁶⁾의 연구는 있었지만 독활의 면역활성에 대한 연구는 없었다.

위에서 살펴본 正氣와 邪氣의 투쟁 관점은 오늘날 면역 이론과 유사한 개념으로 보이며, 한의학의

正氣와 면역 조절 작용에 대한 연구도 있었다⁴⁷⁻⁴⁹⁾. 또한 한의학에서 正氣는 면역기능에 대한 조절로 해석할 수 있다고 했다³⁾. 그래서 저자는 독활의 辛溫發散, 祛風勝濕의 작용을 인체의 질병에 대한 邪正鬪爭에서 正氣를 도와서 邪氣를 내치는 효능으로 생각하고, 독활이 대식세포와 관련된 효소에 어떤 영향을 미치는지 관심을 가지게 되었다.

본 연구에서는 獨活을 물 추출하여 얻은 시료 ACE로 마우스 대식세포를 이용하여 cell viability, NO 생성, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 cytokine 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

ACE의 마우스 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 24시간 동안 배양한 경우에는 유의한 변화가 나타나지 않았으나, 48시간의 배양에서는 25, 100, 200 및 400 $\mu\text{g/ml}$ 등의 농도 군에서 유의한 감소를 나타내었다.

NO는 일종의 세포신호전달물질로 NO 합성효소(nitric oxide synthase; NOS)에 의해 체내에서 생산되고, NOS에 의해 만들어진 NO는 혈압을 감소시키는 혈관확장과 혈소판 활동을 조절하며, 면역반응에도 기여함으로써 신경전달조절과 세포분화에 관여하고 있으며 새로운 염증매개물질로 주목하고 있다⁵⁰⁾. ACE는 24시간의 배양에서는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도 군에서, 48시간의 배양에서는 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 모든 농도 군에서 대식세포의 NO의 생성을 유의하게 증가시켰다.

IL-1 β 는 TNF- α 와 그 기능이 유사하며, 적절히 발현되면 생체방어기능으로서 B림프구와 T림프구의 증식과 분화를 촉진시키며 항염증반응, 항종양작용 및 조혈작용 등을 하나, 과잉 또는 장기적인 생성이 일어나게 되면 생체침습작용으로 발열반응, 염증, 조직파괴, 쇼크 등을 일으킬 수도 있다⁵⁰⁾. ACE는 24시간의 배양에서 마우스 대식세포의 IL-1 β 생성을 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 군에서 유의하게 증가시켰다.

IL-6은 T림프구, B림프구, macrophage, 골수 기질 세포, 섬유아세포 및 내피세포 등에서 기원하며,

T림프구와 B림프구 기능을 조절하여 생체 내 염증의 초기반응과 조혈에 작용하며, 면역반응과 골 흡수에도 관여한다⁵⁰⁾. ACE는 24시간의 배양에서 마우스 대식세포의 IL-6생성을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 군에서 유의하게 증가시켰다.

TNF- α 는 활성화된 macrophage, fibroblast 등에 의해 분비되는 cytokine으로 염증반응을 매개하는데, neutrophils, endothelial cell 및 B세포 등을 자극하여 chemokines, prostaglandins, proteases 및 growth factors 등을 분비하도록 하며 많은 양의 cytokine이 분비되면 패혈성 쇼크가 발생하기도 한다⁵⁰⁾. ACE는 24시간의 배양에서 마우스 대식세포의 TNF- α 생성을 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도 군에서 유의하게 증가시켰다.

이러한 결과는 ACE가 대식세포의 NO, IL-1 β , IL-12 및 IL-6 등의 면역 반응의 매개체를 증가시키며, 이러한 면역매개인자를 이용한 침입성병원체 및 노화세포잔존물 제거 등의 대식세포 면역 활성을 증진시키는 효능이 있다고 볼 수 있다. 이는 한의학적인 正氣와 邪氣의 개념으로 볼 때 獨活은 正氣를 도와서 邪氣를 내쳐 인체 내 면역기능의 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 보인다.

결론

본 연구에서는 獨活을 물 추출하여 얻은 시료 ACE로 마우스 대식세포를 24시간, 48시간 배양하여 cell viability와 NO생성을 관찰하였고, 24시간 배양하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 cytokine 생성에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포생존율을 측정할 결과 24시간 배양한 군에서는 유의한 변화가 없었고, 48시간 배양한 군에서는 25, 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도에서 유의한 감소를 보였다.
2. 마우스 대식세포의 NO 생성은 24시간 배양한 군에서는 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도에서 유의한 증가를 보였다.
3. 마우스 대식세포의 NO 생성은 48시간 배양한

- 군에서는 모든 농도에서 유의한 증가를 보였다.
4. 마우스 대식세포의 IL-1 β 생성은 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다.
5. 마우스 대식세포의 IL-6 생성은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다.
6. 마우스 대식세포의 TNF- α 생성은 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 등의 농도 군에서 유의한 증가를 보였다.

이러한 결과는 ACE가 대식세포의 NO, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 등의 면역매개인자의 생성을 촉진함으로써, 생성된 면역매개인자를 이용한 침입성병원체 및 노화세포잔존물 제거 등의 대식세포 면역 활성을 증진시키는 효능이 있을 것으로 보인다.

감사의 글

“이 연구는 2010년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.”

참고문헌

1. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회. 부인과학. 2nd. Seoul: 칼빈서적. 1997;132.
2. 陳夢雷等. 醫部全錄. 北京:人民衛生出版社. 1982;1冊: 894, 320.
3. 문준전 등. 동의병리학. 서울: 고문사. 1990;78-86.
4. 임은미. 여성분초학. 서울: 전국의학사. 2005;165-6.
5. 신풍문편집부. 신편중약대사전. 臺北: 신풍문출판공사. 1982;2534-8.
6. 송병기. 한방부인과학. 서울: 행림출판. 1990;17-8.
7. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학. 서울: 정담. 2002;3.
8. Lee EH, Kim TH. Effects of Boheo-tang and Bohe-tang plus Cervi Pantotrichum Cornu: on Immune Response in Postpartum mice. The journal of Oriental OB&GY. 2009;22(3):25-36.
9. Ko JM, Choe CM, Cho HB, Kim SB. Anti-arthritis Effect of Jeonsaenghwalhyeoltanggamibang through Immune Modulation. The journal of

- Oriental OB&GY. 2009;22(2):1-25.
10. Song JS, Shin SM, Kim SM, Kim EI, Lee JE, Yoo DY. Gamibojoongikkitang on Immune response in C57BL/6 Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2006;19(4):1-16.
 11. Min GH, Kim JY, Kim SB, Cho HB. Effect of Chokyungjongoktang on Immune System by Immobilization Stress in C57BL/6J Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2004;17(4):1-15.
 12. Park KM, Yoo DY. Efect fo Gamiinsamyang-young-tang on Immune Response and Blood Formation. The journal of Oriental OB&GY. 2004;17(4):1-16.
 13. Park CH, Kim DN, Cho HB, Yoo SK. Effect of Gaewooljongoktang Serum Levels of Hormone and Immune Response after Immobilization Stress in Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2004;17(1):88-110.
 14. Son JH, Shin KS, Lee BR, Jung JH, Yoo DY. Effect of Saeng-Maek-San-Gamibang on Immune Response in Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2003;16(3):162-78.
 15. Hong SE, Park JM, Park KM, CHo HB, Yoo SK. Effect of Soyosan after Immobilization Stress in Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2003; 16(3):101-27.
 16. Choi JK, Sin YW, Jung JH, Yoo DY. Effect of Sutaehwan on Immune Response in Pregnant BALB/C Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2003;16(2):1-11.
 17. Lee JN, Park KM, Jung JH, Yoo DY. Effect of Gmi-Daebo-Tang on Immune Response in BALB/c Mice. The journal of Oriental OB&GY. 2002;15(3):16-29.
 18. Ryu HW, Kim YS, Lim EM. Fermented Artemisiae Argyi Folium and Epimedii Herba Mixture Effect on Macrophage Activity. The journal of Oriental OB&GY. 2009;22(2):79-93.
 19. Jeong JH, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Anti-tumor Metastatic Effect and Activation of Innate Immunity by Extra of *Mori Radicis Cortex*. The journal of Oriental OB&GY. 2009;22(1):31-41.
 20. Kim YG, Kim DI, Lee TK. Studies on Dose-dependent anticancer and immune-enhancing activity of *Phellodendri Cortex*. The journal of Oriental OB&GY. 2002;15(1):19-30.
 21. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature. 1987;330: 662-4.
 22. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J Immunol Methods. 1990;131(2):165-72.
 23. Weissman BA, Gross SS. Measurement of NO and NO synthase. Curr Protoc Neurosci. 2001; 7(7):13.
 24. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. Methods Enzymol. 2008;440:361-80.
 25. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod. 2007;22(11):2928-35.
 26. 정유열. 한방병리학. 전주: 삼진사. 1988;15-7, 94-5.
 27. Kim EM, Lee SH. The meaning of immunity in the documents of oriental medicine. J Korea Instit Oriet Med Inform. 2006;12(1):129-45.
 28. 戴新民. 中醫免疫學. 台北:啓業書局. 1985;1-58.
 29. 落和生. 免疫と漢方. 東京:谷口書店. 1988;51-60.
 30. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會 編著. 本草學. 서울: 영림사. 1991;260-1.
 31. Perry LM, J Metzger. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Cambridge: MIT press. 1980;620.

32. Park HJ, Hong MS, Lee JS, Leem KH, Kim CJ, Kim JW et al. Effect of *Aralia continentalis* on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother Res.* 2005;19:511-3.
33. Oh SJ, Jeong SI, Km JY. Antibacterial Activity of Continentalic Acid from *Aralia continentalis*. The Korean oriental medical O&O&D society. 2008;19(2):161-7.
34. Kim JS, Kang SS, Lee MW, Kim OK. Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Kor J Pharmacogn.* 1995;26:239-43.
35. Kim JS, Kang SS, Choi JS, Lee MW, Lee TS. Antioxidant components from *Aralia continentalis*. *Kor J Pharmacogn.* 1998;29:13-7.
36. Han WS. Isolated of the antimicrobial compounds from *Aralia cordata* Thunb Extract. *korean J Medicinal Crop Sci.* 2005;13:182-5.
37. Jeong SI, Han WS, Yun YH, Jim KJ. Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res.* 2006;20:511-4.
38. Dang NH, Zhang XF, Zheng MS, Son KH, Chang HW, Kim HP et al. Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* thunb. *Arch. Pharmacol.* 2005;48:566-72.
39. Shin MS, Han HS, Lee YJ. Comparative Studies on the Anti-oxidation Activities of *Aralia continentalis* Root and *Angelica pubescens* Root. *Journal of Korean herbology.* 2009;24(2):67-76.
40. Yang SA, Il NK, Jhee KH, Lee IS. Effects of *Aralia continentalis* Kitagawa on Antiplatelet and Antioxidative Activities. *Journal of Life Science.* 2008;18(3):357-62.
41. Yu HH, Moon HDA, Whang JY, Kim SY, Jeong SI, Jeon BH et al. Isolation of Anti-cariogenic Agent, Stigmasterol, from *Aralia continentalis*. *Korean Journal Oriental Physiology & Pathology.* 2007;21(1):70-5.
42. Park SY, Kim JW. Cytotoxic Polyacetylenes from *Aralia cordata*. *Yakhak Hoeji.* 1995;39(6):681-8.
43. Yu HH, Seo SJ, Kim YH, Lee HY, Gum GC, Na JC et al. Effects of Methanol Extract of *Aralia Continentalis* on the Growth, Acid Production, Adhesion, and Insoluble Glucan Synthesis of *Streptococcus Mutans*. *Korean Journal Oriental Physiology & Pathology.* 2005;19(1):87-91.
44. Kim HJ, Kim JY, Choi GY, Jeong SG, Ju YS. A Study on Internal-External Morphology and Pattern Analysis in *Angelicae Pubescentis Radix*. *Koran Journal of Oriental Medicine.* 2006;12(3):101-15.
45. Yu HH, Seung IJ, Su YJ, Hae DM, Young H, Han SJ et al. Continentalic acid, isolated from *Aralia continentalis*, inhibits cariogenic properties. *Korean Journal Oriental Physiology & Pathology.* 2006;20(3):617-22.
46. Park JB. Protoplast Fusion of *Panax Ginseng* Callus and *Aralia Continentalis* Mesophyll. *Journal of the Environmental Sciences.* 2008;17(2):163-70.
47. 채우석. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察. *대한한의학회지.* 1990;11(2):54-91.
48. 황의옥 등. 면역학에 관한 문헌적 고찰. *대한한의학회지.* 1989;10(1):193-226.
49. 조종관. 면역에 관한 동양의학적 고찰. *동양의학.* 1986;12(1):19-23.
50. 대한미생물학회. 면역학. 서울: 이퍼블릭. 2008; 315-39.