

生薑甘草湯 및 生薑, 甘草가 생쥐 비장세포의 활성화에 미치는 영향

이 매, 김진주¹, 정희재, 정승기

경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실, ¹경희대학교 약학대학 한방생리학 교실

Effects of *Senggang Gamcho-tang* (SG), *ZingiberisRhizoma* (ZR) and *Glycyrrhizae Radix* (GR) extracts in *Senggang Gamcho-tang* (SG) on Activity of Murine Splenocytes

Mei Lee, Jin-ju Kim¹, Hee-jae Jung, Sung-ki Jung

Division of Allergy, Immune & Respiratory System,
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University
¹Dept. of Oriental Physiology, College of Pharmacy, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : *Zingiberis Rhizoma* (ZR) and *Glycyrrhizae Radix* (GR) have been widely used to prevent or treat allergic diseases. However, relatively little research has been conducted on the immune response to *Senggang Gamcho-tang* (SG) in a mixture of ZR and GR. The purpose of this study was to determine antiallergic effects of *Senggang Gamcho-tang* (SG) extracts ZR and GR on activity of murine splenocytes.

Methods : This study was performed to investigate the effect of SG in mice, using *in vitro* experiments. Cells were treated with SG extract (1 μ g/ml, 10 μ g/ml and 100 μ g/ml) plus Con A (2 μ g/ml) and ZR (6.6 μ g/ml and 66 μ g/ml), GR (3.3 μ g/ml and 33 μ g/ml) respectively for 48 hrs. The production of IFN- γ and IL-4 were determined by ELISA.

Results : No toxicity was found in splenocytes treated with SG extract for 48 hrs at the concentration of 0 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml and 100 μ g/ml, respectively. The production of IFN- γ increased to 23,968.7 pg/ml ($p < 0.001$) while that of IL-4 significantly decreased to 14.1 pg/ml ($p < 0.05$) only at the SG concentration of 100 μ g/ml. With the GR concentration of 33 μ g/ml in SG extract, the production of IFN- γ rose to 32,102.2 pg/ml ($p < 0.001$) while that of IL-4 ($p < 0.05$) declined to 34.2 pg/ml. However, there was no significant observation with regard to the effect of ZR on production of IFN- γ and IL-4.

Conclusions : This study suggests an antiallergic effect of *Senggang Gamcho-tang*, which leads to the implication that SG extract may be used to enhance human immune function.

Key words : allergy, cytokine, *Senggang Gamcho-tang* (*Shengjianggancao-tang*), IFN- γ , IL-4, *Zingiberis Rhizoma*, *Glycyrrhizae Radix*

1. 서론

최근 생활환경의 변화로 찬 음식, 냉 음료 등의 섭취가 많아지면서 위 기능의 저하로 인한 痰飲과

관련된 질환이 많아지고 있다. 체내에 있는 수분이 대사 장애를 일으켜 병적 변화를 나타내게 것을 痰飲症이라고 한다. 이러한 痰飲은 알레르기 질환을 악화시키는 요인으로 작용한다.

일반인들이 생활 속에서 손쉽게 접할 수 있는 한약재 중에 하나인, 生薑(*Zingiberis Rhizoma*)은 胃經에 들어가서 溫中시키고 降逆시켜 止嘔시키는 要藥으로 嘔家의 聖藥이라 하여 胃寒이나 痰濕이

· 교신저자: 정승기 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 부속한방병원 한방5내과 의사실
TEL: 02-958-9147 FAX: 02-958-9148
E-mail: jskes@gmail.com

中洲에 阻滯되어 나타나는 胃氣上逆의 惡心嘔吐에 모두 효과가 있으며, 胃熱嘔吐에도 配伍하기도 한다¹. 生薑은 실험적으로 위액분비 촉진 및 항균작용⁶이 확인되었으며, 류²등은 생강분획에 따른 추출물이 마우스의 비장세포와 사이토카인 생성량에 미치는 영향 등과 같은 알레르기 효과에 대하여도 보고 하였다.

甘草(*Glycyrrhizae Radix*)는 諸藥을 調和하는 효능이 있어 응용범위가 광범위하여 通行十二經하는 약물로 지칭하기도 한다¹. 甘草는 복합 처방에 다빈도로 사용 되고 있다. 甘草와 관련된 연구를 살펴보면, 김³은 甘草의 항염증작용을, 한⁴ 등은 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 효과를, 송⁵ 등은 甘草의 폐 조직 내 사이토카인 생성에 미치는 효과를 보고하였다. 또한 Wang⁶ 등은 甘草가 천식환자의 기도과민성을 감소시킨다고 보고하여 알레르기 관련 질환에 응용할 수 있는 근거를 제시하였다. 生薑과 甘草 각각의 약물에 관한 알레르기 효과에 관한 실험 연구는 많았으나, 生薑과 甘草의 복합처방에 관한 연구는 아직 없다. 生薑과 甘草 두 가지 약물이 모두 포함된 처방 중에 張仲景의 《金匱要略》에 소개된 처방인 千金生薑甘草湯을 참고로 본 연구를 진행하기로 하였다. 千金生薑甘草湯은 生薑, 人參, 甘草, 大棗로 구성 되어있다. 폐위(肺痿)로 인해 기침하면서 연말(涎沫)을 토하는 것을 치료한다⁷.

이에 저자는 면역 및 알레르기 반응에 대한 효과를 생쥐의 비장세포의 사이토카인을 이용하여 '生薑甘草湯'과 生薑, 甘草 각각의 처방 내에서의 역할에 대한 항 알레르기 효능을 규명하고자 생쥐 비장세포에 生薑甘草湯 및 生薑과 甘草 각각을 처리하여 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 *in vitro* 에서 측정하여 나타난 결과를 보고 하는 바이다.

II. 실험

1. 材 料

1) 동 물

6주령의 Balb/C 생쥐를 오리엔트(Seungnam, Kyunggido, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2) 시 약

RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute medium) 배지, FBS(fetal bovine serum)과 penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin(10,000 U/ml)는 Hyclone (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA)회사 제품을 사용하였으며, IFN- γ 와 IL-4 측정에 필요한 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit 는 BD Pharmingen(San Diego, CA, USA) 회사 제품을 사용하였다. 또한 red blood cell lysing buffer 와 concanavalin A(Con A)는 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3) 시료준비

生薑甘草湯의 구성약물인 生薑과 甘草는 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 生薑甘草湯 10배수의 증류수에 100 °C에서 2시간 煎湯 추출한 뒤 동결 건조하여 사용하였다. 生薑甘草湯 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Contents of *Senggang Gamcho-tang*

Herber name	Sientific name	Weight (g)
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	8
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
Total amont		12

2. 方 法

1) 세포 생존율 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 6주령의 Balb/C 생쥐(Orient, KOREA)를 희생하여 비장을 얻어 멸균된 2장의 슬라이드를 이용하여 조직을 갈아 세포부유액을 얻었다. 이를 Red blood cell lysing buffer (Sigma, St Louis, MO, USA)를 이용하여 적혈구

를 제거하고 완전세포배양액(10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 4.05 mM L-glutamine 이 포함된 RPMI 1640)에 부유시켜 3회 세척한 후 세포 수를 세고 96-well plate(5×10^4 cell/well) 농도로 접종한 후 각 well 에 Con A(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 와 시료를 투여하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 48시간 배양하였다. MTT 용액(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하고 4시간 후 상등액을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μl 를 넣어 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro plate reader로 580 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

2) 生薑甘草湯의 비장세포 처리

6주령의 Balb/C 생쥐의 비장세포에서 적혈구를 제거하고 세척한 후 24 well flat bottom 배양 plate 에 2 X 10⁶/ml 농도의 비장세포를 분주하였다. 모든 well은 Con A(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 각각의 약제 生薑甘草湯(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 生薑(6.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 66 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 甘草(3.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 48시간 배양하였다. 그 후 각 well로부터 상층액을 얻어 -20 °C에서 보관하였다가 실험에 사용하였다.

3) IFN- γ 와 IL-4 생성량 측정

배양한 세포 주를 Con A 단독 또는 한약제 추출물과 같이 배양한 상층액을 48시간 후에 회수하여 ELISA kit(BD Pharmingen, CA, USA)로 상층액에 포함된 IFN- γ 와 IL-4의 양을 측정하였다. Anti-mouse IFN- γ monoclonal antibody 또는 anti-mouse IL-4 monoclonal antibody를 250배 희석하여 96well plate(Corning, NY, USA)에 100 μl 씩 넣고 4 °C에서 overnight하였다. Washing buffer (PBS containing 0.05 % tween 20)로 3번 washing 후, 2 % bovine serum albumin(BSA)인 PBS를 200 μl 씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 3번 washing 후, standard와 50배 희석한 sample 들을 100 μl 씩 넣고 2시간 반응 후 다시 5번 washing 하였다. 그 후 working detector washing buffer로 250배 희석한 detection antibody와 streptavidin-

horseradish peroxide-conjugated detection antibody 를 100 μl 씩 넣고 1시간 반응한다. 7번 washing 후, tetramethylbenzidine(TMB) substrat reagent A와 B를 동량 섞은 것을 100 μl 씩 넣고 어두운 곳에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 1M H₂SO₄를 각 50 μl 씩 넣고 즉시 ELISA reader(EL800, Bio-Tek, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량은 표준 곡선을 만들어 측정하였으며, 이때 측정 한계치는 15.6 ng/mL이었다.

4) 통계

통계 처리는 Prism 5 software(GraphicPad Software Inc., CA, USA)을 사용하여 post test(Dunnett)을 포함한 one-way ANOVA test로 유의성을 측정하였다. 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였고, 통계적 유의성 차이는 *p<0.05, **p<0.001로 정의하였다.

III. 결 과

1. 비장세포에 대한 生薑甘草湯의 독성

生薑甘草湯의 비장세포에 대한 세포 독성을 조사하기 위하여 生薑甘草湯을 Con A(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양 한 후에 Con A 단독 처리군을 100% 으로 하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과, 48시간 배양 시 生薑甘草湯 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 93.9 \pm 3.4 %, 96.2 \pm 1.2 % 그리고 104.0 \pm 3.9 % 를 나타내어 生薑甘草湯 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 48시간 배양 시 독성을 나타내지 않았다.

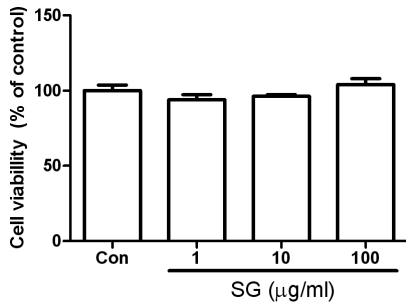


Fig. 1. Effect of *Senggang Gamcho-tang* (SG) extract on the toxicity of splenocytes.

SG extract was treated for 48 hrs as concentration of 0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml and 100 µg/ml, respectively plus Con A (2 µg/ml). Con was treated with distilled water. The effect of these on the toxicity of cell was checked by MTT analysis method. The result was shown as the mean ± S.E.M.

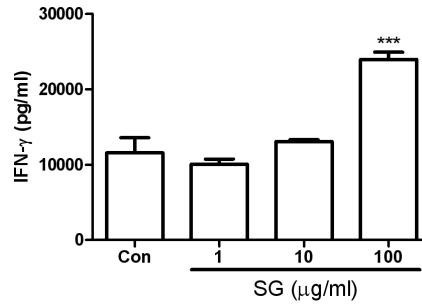


Fig. 2. Effects of *Senggang Gamcho-tang* (SG) extract on Con A-induced IFN-γ production in splenocytes.

Cells were treated with SG extract (1 µg/ml, 10 µg/ml and 100 µg/ml) plus Con A (2 µg/ml) for 48 hrs. Con was only treated with Con A (2 µg/ml). The production of IFN-γ was determined by ELISA. Results are presented as mean ± S.E.M. *** $p < 0.001$ compared with Con A alone.

2. IFN-γ 생성에 대한 生薑甘草湯의 영향

비장세포에서 生薑甘草湯이 Con A에 의해 유도되는 IFN-γ의 생성에 영향을 주는 지 알아보기 위하여 1 µg/ml, 10 µg/ml와 100 µg/ml 의 농도로 生薑甘草湯을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 상층액을 모아 IFN-γ를 측정하였다(Fig. 2). IFN-γ는 生薑甘草湯에 의해 약물농도 10 µg/ml 에서는 증가가 있으나 유의성은 나타나지는 않았으나(13,056 ± 258.4 pg/ml) 100 µg/ml 의 농도에서는 23,969 ± 955.5 pg/ml로 유의성 있는 증가를 나타내었다 ($p < 0.001$). 이는 약물을 처리하지 않고, Con A 단독 자극에 의해서 생성된 IFN-γ의 11,528 ± 2018 pg/ml 보다 약 2배정도 증가한 수치이다. 生薑甘草湯은 비장세포에서 IFN-γ 증가시키는 것을 확인하였다.

3. IL-4 생성에 대한 生薑甘草湯의 영향

비장세포에서 生薑甘草湯이 Con A에 의해 유도되는 IL-4의 생성에 영향을 주는 지 알아보기 위하여 1 µg/ml, 10 µg/ml와 100 µg/ml 의 농도로 生薑甘草湯을 처리하여 48시간 동안 배양한 후 상층액을 모아 IL-4의 농도를 측정하였다(Fig. 3). 生薑甘草湯에 의해 1 µg/ml과 10 µg/ml의 농도에서는 (21.63 ± 2.365 pg/ml 과 21.61 ± 3.056 pg/ml) 감소를 보였으나 유의성을 나타내지 않았고, 100 µg/ml 의 농도에서는 14.12 ± 699 pg/ml로 유의성($p < 0.05$)있는 감소를 나타내었다. 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IL-4의 37.07 ± 8.301 pg/ml 보다 약 0.6 배정도 감소하였다. 生薑甘草湯은 비장세포에서 IL-4를 감소시키는 것을 확인하였다.

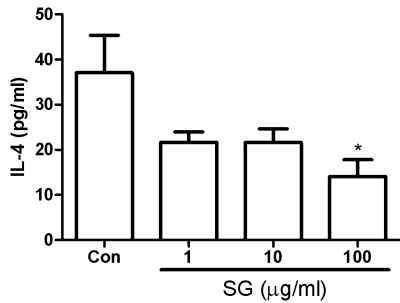


Fig. 3. Effects of *Senggang Gamcho-tang* (SG) extract on Con A-induced IL-4 production in splenocytes.

Cells were treated with SG extract (1 µg/ml, 10 µg/ml and 100 µg/ml) plus Con A (2 µg/ml) for 48 hrs. Con was only treated with Con A (2 µg/ml). The production of IL-4 was determined by ELISA. Results are presented as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ compared with Con A alone.

4. IFN-γ 생성에 대한 生薑, 甘草의 영향

IFN-γ를 증가시킨 生薑甘草湯(10µg/ml과 100 µg/ml)의 구성약물인 生薑과 甘草 각각의 비장세포에 대한 효과를 알아보기 위하여, Con A와 구성약물인 生薑(6.6 µg/ml과 66 µg/ml)과 甘草(3.3 µg/ml과 33 µg/ml)를 함께 처리하여 48시간 배양한 후, 배양액 중 비장세포가 생산한 IFN-γ 농도를 측정하였다. 甘草에 의해 3.3 µg/ml과 33 µg/ml에서는 농도 의존적으로 증가하였으며 33 µg/ml의 농도에서 32102±726.7 pg/ml로 유의성($p < 0.01$)있는 증가를 나타내었다. 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IFN-γ의 19,243±2952 pg/ml보다 약 1.6배정도 증가하였다. 또한 生薑에 의해서는 66 µg/ml의 농도에서 감소하는 경향 12,136±1888 pg/ml)을 보였으나 유의성을 나타내진 않았다.

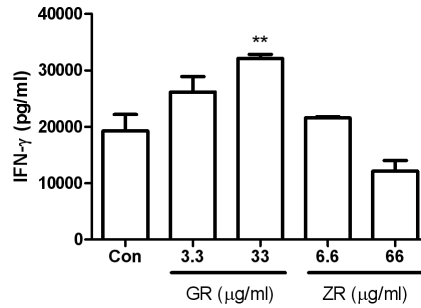


Fig. 4. Effects of *Glycyrrhizae Radix* (GR) and *Zingiberis Rhizoma* (ZR) extracts in *Senggang Gamcho-tang* on Con A-induced IFN-γ production in splenocytes.

Cells were pretreated with *Senggang Gamcho-tang* contents extracts (*Glycyrrhizae Radix* GR; 甘草 3.3 µg/ml and 33 µg/ml, *Zingiberis Rhizoma* ZR; 生薑 6.6 µg/ml and 66 µg/ml) plus Con A(2 µg/ml) for 48 hrs. Con was only treated with Con A(2 µg/ml). The production of IFN-γ was determined by ELISA. Results are presented as mean ± S.E.M. ** $p < 0.01$ compared with Con A alone.

5. IL-4 생성에 대한 生薑, 甘草의 영향

IL-4를 감소시킨 生薑甘草湯의 구성약물인 生薑과 甘草 각각의 비장세포에 대한 효과를 알아보기 위하여, Con A와 구성약물인 生薑 (6.6 µg/ml 과 66 µg/ml)과 甘草 (3.3 µg/ml 과 33 µg/ml)를 함께 처리하여 48시간 배양한 후, 배양액 중 비장세포가 생산한 IL-4 농도를 측정하였다. 甘草에 의해 33 µg/ml의 농도에서 34.16± 8.603 pg/ml로 감소를 나타내었다. 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IL-4의 73.14±5.900 pg/ml 보다 약 0.5배정도 감소하였으나 유의성을 나타내지 않았다. 生薑에 의해서는 6.6 µg/ml과 66 µg/ml의 농도 모두에서 감소하는 경향은(50.17±7.214 pg/ml, 49.85±14.56 pg/ml) 있으나 유의성을 나타내진 않았다.

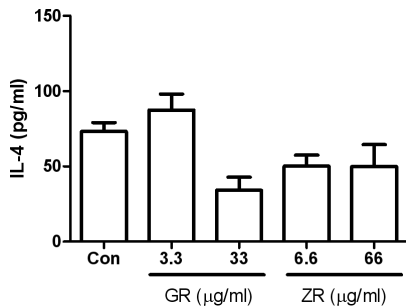


Fig. 5. Effects of *Glycyrrhizae Radix* (GR) and *Zingiberis Rhizoma* (ZR) extracts in *Senggang Gamcho-tang* on Con A-induced IL-4 production in splenocytes.

Cells were pretreated with *Senggang Gamcho-tang* contents extracts (*Glycyrrhizae Radix*; GR; 甘草 3.3 $\mu\text{g/ml}$ and 33 $\mu\text{g/ml}$, *Zingiberis Rhizoma*; ZR ; 生薑 6.6 $\mu\text{g/ml}$ and 66 $\mu\text{g/ml}$) plus Con A (2 $\mu\text{g/ml}$) for 48 hrs. Con was only treated with Con A (2 $\mu\text{g/ml}$). The production of IL-4 was determined by ELISA. Results are presented as mean \pm S.E.M.

IV. 고찰

면역과 장부관계에 대해 한의학에서는 氣의 생성과 연관된 脾肺腎을 주요장기로 인정하고 있지만 서양의학에서는 면역계로서 五臟 모두의 관련성을 언급하고 있었다⁸. 한의학에서는 알레르기 질환을 면역 기관인 肺, 脾, 腎 의 기능약화와 관련이 있다고 보고 있으며, 폐장 뿐 아니라 비장의 역할을 중요시 여겨 中氣가 부족해지면 여러 가지 형태의 알레르기 질환이 나타나게 된다고 보고 있다. 이와 관련하여 脾胃 기능을 회복시켜 인체의 正氣, 생리 기능을 유지시켜 알레르기 반응을 억제한다는 여러 연구가 보고 되고 있다^{9,10}. <素問 刺法論>¹¹에서 “正氣内存 邪不可干”이라 하여 正氣는 각종 장부, 조직, 기관의 기능 활동에 있어서 외부환경에 대한 적응력과 병인에 대한 저항력을 지칭하는 것으로 면역기능에 대한 개념을 내포하고 있다고 볼 수 있고, 正氣의 저항력 약화와 사기의 침해로 인한 인체 생리기능의 실조가 allergy 반응을 유발

한다고 할 수 있다¹².

生薑(*Zingiberis Rhizoma*)은 性溫하고 냄새를 잘 제거하며, 神氣를 밝히고 胃를 열며 嘔吐, 痰咳를 다스린다. 熱함이 필요하면 去皮하고 冷함이 필요하면 그냥 쓴다. 生薑은 生薑科인 生薑의 신선한 뿌리줄기로, 味辛하고 性溫하여 肺經으로 들어가 風寒의 邪氣를 散하여 解表하는데 辛散解表하는 효력은 비교적 약하나 感冒의 輕證에 사용되어 外感風寒으로 인한 惡寒發熱, 頭痛鼻塞 등의 증상을 치료한다¹. 生薑은 감기, 두통 발한제와 해독제 등에 대한 치료제로 널리 이용되고 있다.

生薑에 대한 면역 관련 연구로 류¹³등은 인체 내에서도 生薑의 섭취를 통하여 면역세포, 특히 비장세포의 증식과 대식세포의 활성화를 유도함으로써 체내 면역기능을 증강시킬 수 있는 가능성이 있음을 보고하였다. 또한 生薑의 생리활성 성분이 항균 작용¹⁴, 항염작용¹⁵, 항산화작용¹⁶을 나타내는 것으로 보고되었으며, 生薑의 올레오레진(oleoresin), 진저롤(gingerol), 쇼가올(shogaol) 분획이 자연 살해 세포기능을 활성화 시켜 면역기능 증진에 효과^{17,18}가 있다고 보고되었다.

甘草는 傷寒論 처방 113방중 74방에 들어있으며 고방 뿐 아니라 후세방 에서도 많은 처방에 배합되는 중요한 한약재로 임상에 널리 활용 되고 있다. 性味는 甘平하며 脾 胃 肺經으로 歸經하고 和 中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 효능이 있다. 甘草는 純甘하니 能補脾之陰하고 能益胃之陽이라 或生用 하고 或熟用하고 或以和百藥 하나니 固無不宜라¹⁹하였다. 甘草는 옛날부터 동서를 막론하고 자주 사용된 생약으로 고대 그리스, 로마, 중국의 각종 문헌에 甘草가 각종 질환에 탁월한 치료효과가 있는 것으로 기술되어 있으며, 15세기 유럽에서는 甘草는 소화 장애의 치료제로 사용되었다^{20,21}. 甘草가 면역에 미치는 영향에 관한 연구에서 甘草는 세포 면역반응을 억제시키고 B세포 항체 생성능력을 조절²²하였다고 보고하였다. 甘草의 면역조절작용이 주로 甘草의 glycyrrhizin에 의함을 시사하고, glycyrrizin

acid가 세포성 면역반응을 일부 증강시키고 체액성 면역반응을 억제²³한다고 보고되었다. 정²⁴은甘草에 항균 물질이 있다고 보고 하였고, 심²⁵은甘草의 면역증강작용이 있음을 보고 하였다. 국외의 경우 최근甘草의 구성성분인 glycyrrhizin을 재료로 한 여러 연구 결과들이 발표되고 있다²⁶⁻²⁸.

본 연구에서는 生薑과甘草가 배합된 '生薑甘草湯'에 대한 항알레르기 효능을 규명하고자 마우스 비장세포에 生薑甘草湯을 처리하여 비장세포의 생존율과 IFN- γ , IL-4 생성량에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 처방 구성 약물인 生薑과甘草 각각의 효능을 알아보고자 生薑甘草湯의 구성 비율에 따라 용량을 정하여 동일한 실험을 진행하였다.

生薑甘草湯의 비장세포에 대한 세포 독성을 조사하기 위하여 生薑甘草湯을 Con A(2 μ g/ml)와 함께 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 그리고 100 μ g/ml의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양 한 후에 Con A 단독처리군을 100%로 하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 48시간 배양 시 生薑甘草湯 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 그리고 100 μ g/ml 농도에서 각각 93.9 \pm 3.4%, 96.2 \pm 1.2 %, 그리고 104.0 \pm 3.9%를 나타내어 生薑甘草湯 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 그리고 100 μ g/ml 농도에서 48시간 배양 시 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

Th림프구는 cytokine 의 분비양상에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어진다²⁹. Th1림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며 지연형 과민반응 (delayed type hypersensitivity), 결핵균이나 마이코박테리아에 대한 방어 작용, 종양에 대한 숙주 반응에 관여한다. Th2림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 알레르기성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 관여한다. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 나타내어 Th1 림프구의 기능이 증가되면 Th2 림프구의 기능이 억제되는 현상이 관찰되고 있다³⁰. IFN- γ 는 Th1 림프구에서 생성되어 항바이러스 작용을 가지고 있을 뿐 아니라 Class II MHC

생산물을 증가시키고 CD23의 표현을 감소 시킨다³¹. 또한 IL-4의 작용을 길항하여 IgE생성을 억제하는 것으로 알려져 있다³². IL-4 는 Th2 림프구에서 생성되어 B림프구를 활성화시켜 IgE의 생성을 증가시킨다고 보고되었으며³³ 이러한 IL-4 의 기능은 알레르기 반응의 주조절인자로서 중요하다. 인체 내에서 Th림프구가 Th1 림프구로 분화를 하게 될지 아니면 Th2 림프구로 분화를 하게 될지 결정되는 데에는 항원의 양, 항원제공세포의 종류, 유도되는 cytokine의 종류 등 여러 가지 요소가 관여하는 것으로 알려져 있다³⁴. Th1 세포가 과도하게 많아지면 류마티스 관절염이나 루프스와 같은 자가 면역 질환이 발생하며, Th2 세포가 상대적으로 많아지면 이들 세포가 분비하는 IgE라는 항체를 과도하게 형성함으로써 알레르기 질환이 발생하게 된다. 이와 관련한 최근 연구로는 不換金正氣散이 알레르기성 염증에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구에서 마우스 면역세포의 Th1, Th2 반응을 통해 不換金正氣散이 불균형한 Th 세포들의 반응을 교정하면서 항 알레르기 작용을 가진 것으로 추정함을 보고 하였다³⁵. 또 다른 연구에서는 분자생물학적 방법을 이용하여 기관지 천식환자와 정상인간의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 를 비교하고 기관지 천식 치료에 유효한 小青龍湯을 통하여 혈청 내 IL-4, IL-5, IFN- γ 의 변화를 살펴본 결과, Th1 림프구와 Th2 림프구의 변화를 기대하였으나 유의한 결과를 관찰할 수 없음을 보고 하였다³⁶. 또한 香附子の 천식치료 효과를 확인하기 위하여 IFN- γ 와 IL-4 분비량을 ELISA 방법으로 측정하여 비교분석하여 香附子が Th1 세포감소와 Th2 세포의 증가라는 천식의 병리상태에 미치는 영향을 분석하는 방법으로 실험을 진행하였다. In vitro상에서 香附子が Th2 세포 분화로 인한 알레르기 반응에 중요한 조절능력이 있음을 입증 할 수 있었고 Th1/Th2 형에 관한 사이토카인 변화를 통해 알레르기 반응에 의해 유발되는 천식의 염증반응을 억제하는 효능을 관찰할 수 있었다³⁷. 실제로 알레르기 천식환

자에 있어 IL-4, IL-5 는 증가되어 있고, IFN- γ 는 감소되어 있음이 여러 연구에서 보고되었다³⁸.

Con A로 자극된 비장세포에서 生薑甘草湯에 의해 유도되는 사이토카인 IFN- γ 와 IL-4 생성에 영향을 주는 지 알아보기 위하여 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 와 100 μ g/ml의 농도로 生薑甘草湯을 처리하여 48 시간 동안 배양한 후 상층액을 모아 IFN- γ 와 IL-4의 농도를 측정하였다.

IFN- γ 의 경우 生薑甘草湯에 의해 1 μ g/ml에서는 감소되었고, 10 μ g/ml 에서는 증가는 있었으나 유의성은 나타나지 않았다. 100 μ g/ml 의 농도에서 유의성 있는 증가를 나타내었다($p < 0.001$). 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IFN- γ 의 생성량 보다 약 2배정도 증가한 수치이다(Fig. 2).

IFN- γ 생성을 증가시킨 生薑甘草湯(10 μ g/ml 과 100 μ g/ml)의 구성약물인 生薑과 甘草 각각의 비장세포에 대한 효과를 알아보기 위하여, Con A 에 生薑 6.6 μ g/ml 과 66 μ g/ml 그리고 甘草 3.3 μ g/ml과 33 μ g/ml를 각각 처리하여 48시간 배양한 후, 배양액 중 비장세포가 생산한 IFN- γ 농도를 측정하였다. IFN- γ 는 甘草에 의해 3.3 μ g/ml과 33 μ g/ml 에서는 농도 의존적으로 증가하였으며 33 μ g/ml의 농도에서 유의성($p < 0.01$)있는 증가를 나타내었다(Fig. 4). 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IFN- γ 의 생성량 보다 약 1.6배정도 증가하였다. 또한 生薑에 의해서는 66 μ g/ml 의 농도에서 감소하는 경향을 보였으나 유의성을 나타내진 않았다. 즉, 生薑甘草湯은 비장세포에서 IFN- γ 를 유의적으로 증가시켰다. 각각의 구성 약물 중 生薑은 IFN- γ 를 감소시키거나 유의성이 없었고, 甘草는 유의성 있는 IFN- γ 상승효과를 나타내었다. 따라서 生薑甘草湯의 IFN- γ 상승시키는 작용은 甘草에 의한 효과로 추측된다. 生薑甘草湯은 비장세포의 IFN- γ 를 약 2배 증가시켰고, 甘草는 IFN- γ 를 약 1.6 배 증가시켰다. 生薑甘草湯과 甘草는 IFN- γ 를 유의적으로 증가시켰지만 甘草 보다 生薑甘草湯의 IFN- γ 상승효과가 더 크다는 것을 알 수 있었다. 이는 복

합 처방을 통하여 단미제제 약물의 효능을 극대화시킬 수 있다고 생각된다.

IL-4의 경우 生薑甘草湯에 의해 1 μ g/ml과 10 μ g/ml에서 감소하였고 100 μ g/ml 의 농도에서 유의성($p < 0.05$)있는 감소를 나타내었다. 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IL-4의 생성량 보다 약 0.6 배정도 감소하였다(Fig. 3). 生薑甘草湯은 비장세포의 IL-4를 유의적으로 감소시켰음을 알 수 있었다.

IL-4를 감소시킨 生薑甘草湯(10 μ g/ml 과 100 μ g/ml)의 구성약물인 生薑과 甘草 각각의 비장세포에 대한 효과를 알아보기 위하여, Con A에 生薑 6.6 μ g/ml 과 66 μ g/ml 과 甘草 3.3 μ g/ml 과 33 μ g/ml 를 각각 처리하여 48시간 배양한 후, 배양액 중 비장세포가 생산한 IL-4 농도를 측정하였다. 비장세포의 IL-4는 甘草에 의해 33 μ g/ml 의 농도에서 감소를 나타내었다. 이는 Con A 단독에 의해서 나타난 IL-4의 생성량 보다 약 0.5배정도 감소하였으나 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 5). 한⁴등은 감초에 대한 면역 유세포 분석 연구에서 과립구, CCR3, CD4, IgE, CD69 의 생성을 감소시켰다고 보고 하였고, 송⁵등의 천식모델 생쥐 플라즈마내 히스타민과 폐 조직 내 실험을 통해 혈장내 histamine과 폐 조직 내 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13의 생성을 유의성 있게 감소시키고, IL-10 생성을 유의성 있게 증가시켰음을 보고 하였다. 生薑甘草湯의 구성 약물인 甘草는 IFN- γ 를 유의성 있게 상승시켰고, IL-4는 유의성이 인정되지 않았지만 감소 효과는 확인하였다. 또한 生薑에 의해서는 6.6 μ g/ml과 66 μ g/ml 의 농도 모두에서 감소하는 경향은 있으나 유의성을 나타내진 않았다(Fig. 5). 류^{2,39}는, 생강분획에 따른 추출물 in vitro 실험을 통해 생강이 주요 면역기관의 기능을 향진시켜, 염증 반응에 대한 반응 속도를 상승시키고, 항원에 대한 항체 생성능을 증강시켰으므로 면역증강 효과를 보일 것으로 보고하였다. 또한 생강의 면역증강 효과 연구에서 생강추출물 투여가 IL-10, IFN- γ 의 분비능을 급격하게 변화시키기보다, 일정한 수준으

로 균형을 이룰 수 있도록 조절하는 작용이 있음을 보고하였다. 生薑甘草湯은 자극된 비장세포의 IL-4 분비를 감소시켰고, 生薑甘草湯의 구성약물인 生薑과 甘草는 유의성은 없었지만 비장세포의 IL-4를 감소시키는 경향을 나타내었다. 生薑甘草湯의 IL-4의 감소 효과는 生薑甘草湯의 구성약물인 生薑과 甘草의 효능이 함께 증대된 효과라고 생각된다.

生薑甘草湯은 100 µg/ml의 농도에서 알레르기 반응을 촉진시키는 IL-4는 유의적인 감소를 보였고, 알레르기 반응을 억제시키는 IFN-γ는 유의적인 증가를 보였다. 이는 生薑甘草湯을 알레르기 질환의 예방 및 치료에 활용 가능할 수 있다고 생각된다. 生薑甘草湯의 구성 약물인 甘草와 生薑을 처방 비율대로 분리하여 각각 실험한 결과, IFN-γ의 상승은 甘草가 주도하였고, IL-4 감소는 甘草와 生薑의 처방 내 상승 작용으로 추측된다. 生薑과 甘草의 효능을 단순히 약리학적으로 본 것은 아니며, 生薑甘草湯 內에서 각각의 효능과 역할을 분석하였던바, 生薑과 甘草의 각각의 단독 투여보다는 복합투여가 의미 있을 것이라 생각 된다. 이상의 결과를 종합하면, 인체에서도 生薑甘草湯을 통하여 체내 면역기능을 조절시킬 수 있을 가능성이 있다고 보여 진다. 본 실험은 복합방제를 구성하고 있는 약물의 조합을 통하여 구체적으로 어떤 약물이 항 알레르기 효능이 있는지를 알 수 있었고, 앞으로 단미 제제에 관한 연구를 기초로 알레르기 질환 관련 복합 방제의 효능을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되어야 할 것을 시사한다. 또한 처방을 구성하고 있는 단미 제제가 복합 방제를 통하여 효능이 증대 할 수 있다는 점을 확인 할 수 있었다. 生薑甘草湯이 알레르기 질환 처방 시 다른 처방과 더불어 임상에 적극 응용 할 수 있을 것이라고 기대해본다.

V. 결 론

生薑甘草湯과 生薑, 甘草 각각의 약물에 대한 항 알레르기 효능을 규명하고자, 생쥐 비장세포에 Con A로 자극 후 약물을 처리하여 비장세포의 생존율과 IFN-γ, IL-4 생성량에 미치는 영향을 in vitro에서 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 生薑甘草湯을 1 µg/ml, 10 µg/ml 그리고 100 µg/ml의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 결과 독성을 나타내지 않았다.
2. 生薑甘草湯은 100 µg/ml 의 농도에서 IFN-γ의 유의성(p<0.001)있는 증가를 나타내었다.
3. 生薑甘草湯은 100 µg/ml 의 농도에서 IL-4의 유의성(p<0.05)있는 감소를 나타내었다.
4. 甘草는 33 µg/ml 의 농도에서 IFN-γ의 유의성(p<0.01) 있는 증가를 나타내었으며, IL-4의 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다.
5. 生薑은 66 µg/ml 의 농도에서 IFN-γ의 감소를 나타내었고, 6.6 µg/ml, 66 µg/ml 농도에서 IL-4의 감소를 나타내었으나 IFN-γ와 IL-4 모두 유의성은 나타나지 않았다.

참고문헌

1. 전국한외과대학 본초학교수공편. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p. 136-7, 540-1.
2. 류혜숙. 생강분획에 따른 추출물이 마우스의 비장세포와 Cytokine(IL-1β, IL-6, TNF-α)의 생성량에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 2007; 20(2):125-33.
3. 김미경. 감초가 selectin-매개성 호산구 및 호중구의 유착에 미치는 길항능. 천식 및 알레르기학회지 1998;18(1):61-8.
4. 한영주, 박양춘. 감초가 천식모델 생쥐의 BALF 내 면역세포 및 사이토카인에 미치는 효과. 대

- 한한방내과학회지 2004;25(3):408-17.
5. 송상진, 배한호, 박양훈. 감초가 천식모델 생쥐의 플라즈마내 히스타민과 폐조직내 사이토카인 생성에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 2004;18(3):841-5.
 6. Wang H, Chang B, Wang B. The effect of herbal medicine including *astragalus membranaceus (fish)* bge, *codonopsis pilosula* and *glycyrrhiza uralensis fisch* on airway responsiveness. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1998;21(5):287-8.
 7. 蘇寶剛. 金匱要略講義. 北京: 學苑出版社; 2000, p. 86.
 8. 채우석. 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지 1990;11(2):54-91.
 9. 강경화, 최영현, 최병태, 이용태. 알레르기 반응에 미치는 建中湯의 효과. 동의생리병리학회지 2003;17(6):1487-92.
 10. 강대성, 감철우, 박동일. 補中益氣湯이 알레르기 반응에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. *J Life Science* 2003;13(1):73-82.
 11. 왕기. 黃帝內經. 서울: 정보사; 1983, p. 42-8, 145-9, 163-6, 409-19.
 12. Yu JJ, Woo HM. Chinese Immunology. Sacheonseong Jungkyeong publishing company; 1983, p. 9-11.
 13. 류혜숙, 김진, 박상철, 김현숙. 생강추출물투여에 의한 마우스 비장세포 및 대식세포 활성화 효과. 한국영양학회지 2004;37(9):780-5.
 14. Sheo HJ. The antibacterial action of galic, onion, ginger and red pepper juice. *J. Kor. soc. Food Sci. Nutr* 1999;18:94-9.
 15. Thomson M, Al-Qattan K, Al-Sawan M. The use of ginger as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67(6):475-8.
 16. Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts on *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998; 27:1204-10.
 17. Nurahman ZR, Prangdimurt E. Antioxidant and immunoenhancemeng activities of giger extrats and compunds in in vitro and in vivo mouse and human system. *Nutraceuticals & Food* 2003;8:96-104.
 18. Mc Cartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. Suppression of arthritis bt an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1993;178:749-54.
 19. 윤창렬, 이남구, 김선호 엮음. 본초문답. 대전: 주민출판사; 1999, p. 62.
 20. Susumu H, Tsutsumi T. Function and skin depigmental activity of crude drugs. *Fragrance J* 1990;6:59-66.
 21. Isao K, Kazuyuki H. Chemical constituents of licorice roots. *현대동양의학* 1993;14:80-9.
 22. 한중현, 오찬호, 은재순. 감초가 면역반응에 미치는 영향 (I)-50% 메탄올 엑스의 면역조절 작용. *대한약학회지* 1991;35(3):154-64.
 23. 한중현, 오찬호, 은재순. 감초가 면역반응에 미치는 영향 (II) Glycyrrhizin 및 Glycyrrhetic acid의 면역조절 작용. *대한약학회지* 1991;35(3):174-81.
 24. 정재록. 당귀와 감초의 열 추출물이 주요 장내 세균에 미치는 영향. *자원과학연구논문집* 1994; 2(1):93-104.
 25. 심호기, 박무희, 최청, 배만중. 감초 추출물이 면역응답에 미치는 영향. *한국식품영양학회지* 1997;10(4):533-8.
 26. Ismail MG, Stanca C, Ha HR, Renner EL, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Interactions of glycyrrhizin with organic anion transporting polypeptides of rat and human liver. *Hepatol Res* 2003;26(4):343-7.

27. Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabeau H, Doerr HW. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* 2003;361(9347):2045-6.
28. Subramanian S, Bowyer MW, Eqan JC, Knolmayer TJ. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury with selectin inhibition in a rabbit model. *Am J Surg* 1999;178(6):573-5.
29. Holgate ST. Asthma and allergy-disorders of civilization?. *QJM* 1998;91(3):171-84.
30. 정승원, 이미애, 하대유. 사이토카인이 Th1 세포의 Mitogens에 대한 증식반응에 미치는 영향. *Korean J Immunol* 1997;19(1):73-82.
31. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted production. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
32. Erb KJ, Le Gros G. The role of Th2 type CD4+ T cells and Th2 type CD8+T cell in asthma. *Immunol Cell Biol* 1996;74(2):206-8.
33. Snapper CM, Paul WE. BSF-1/IL-4 prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;139(1):10-7.
34. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, et al. Purified protein derivatives of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen of Toxocara canis expand human T cells with stable and opposite (Type 1 T Helper of Type 2 T Helper) profiles of cytokine production. *J Clin Invest* 1991;88(1):346-50.
35. 임강민, 강희, 박성민, 심범상, 김성훈, 최승훈, 등. 不換金正氣散이 마우스 Th1/Th2 분화 및 알레르기 염증반응 조절에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 2006;20(6):1467-76.
36. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 小青龍湯이 기관지 천식 환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 변화에 미치는 영향. 대한한의학회지 2002;23(2):70-7.
37. 염종훈, 이형구, 정승기, 정희재. 香附子가 천식 관련 Th1 / Th2 세포관련 cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2009;30(3):451-64.
38. Boushey HA, Fahy JV. Targeting cytokines in asthma therapy : round one. *Lancet* 2000;356(9248):2114-6.
39. 류혜숙. 생강추출물 투여가 전구염증성 사이토카인 IFN- γ 와 항염증사이토카인IL-10에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 2007;20(3):259-64.