

인삼 · 당귀 혼합추출물 경구투여가 생쥐 비장세포 및 대식세포의 활성화에 미치는 영향

강성용 · 은재순^{1*}

락강한의원, 1: 우석대학교 약학대학

Effects of the Administration of Mixed Extract of Ginseng Radix and Angelicae gigantis Radix on Activity of Murine Splenocytes and Macrophages

Sung Ryung Kang, Jae Soon Eun^{1*}

Lacan Oriental Medicine Clinic, Kunsan, Korea, 1: College of Pharmacy, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate effects of mixed extract of Ginseng Radix and Angelicae gigantis Radix on activity of murine splenocytes and macrophages. GAE (300 mg/kg) was administered *p.o.* for 7 days. GAE decreased the viability of murine splenocytes *in vivo*. Also, GAE enhanced the population of Thy1⁺ cells in splenocytes and the population of splenic CD4⁺ cells. Furthermore, GAE increased the production of γ -interferon from splenocytes. GAE enhanced the production of nitric oxide and the phagocytic activity of peritoneal macrophages. These results suggest that GAE regulates the immune response *via* activation of splenic Th1 cells and peritoneal macrophages.

Key words : Ginseng Radix and Angelicae gigantis Radix, splenocytes, macrophages

서론

補益藥이란 인체의 精氣를 補益하고 虛弱을 扶持하여 虛症을 치료하는 약물로서 임상에서 중요하게 사용하고 있으며, 補益藥은 病後에 정기가 허약한 경우에 정기를 보조함으로써 증상을 개선시키거나, 邪盛精虛 또는 정기가 허약하여 病邪가 미진한 경우 扶正祛邪의 방법으로 질병을 치유하는데 사용하고 있다¹⁾. 精氣虛弱은 일반적으로 氣虛, 血虛, 陽虛, 陰虛로 나눌 수 있으며 정기를 보익하는 약물도 효능과 응용범위에 따라서 補氣藥, 補血藥, 補陽藥, 補陰藥으로 나누어진다.

補氣藥이란 五臟六腑 중 脾氣, 肺氣, 心氣 등을 보익하여 기허한 증상을 개선하는 약물로 신체활동 능력의 감퇴가 주된 증상으로 食慾不振, 體倦神疲, 肌肉消瘦, 臟器下垂 (子宮下垂, 脫肛), 血의 統攝機能 상실로 인한 出血, 短氣, 聲音低微, 虛汗, 心氣虛로 인한 心悸, 脈微 등의 증상을 나타낸다. 임상에 응용할 때는 이러한 증상에 따라 약물을 선택하여 補氣·補血藥 등을 함께

응용한다. 氣가 왕성하면 生血 할 수 있으며, 氣는 血을 統攝하는 특징이 있어 補氣藥으로 補血과 止血의 증상에 사용한다.

補血藥은 血虛한 증상을 개선하는 약물로 체내의 精血과 津液의 耗損으로 面色萎黃, 眩暈, 耳鳴, 心悸, 失眠, 健忘, 月經遲延과 少量, 經閉 등의 증상을 나타내며 이는 五臟六腑중 특히 心肝脾三經과 밀접한 관계로 血의 生化와 輸布에 영향을 가지고 있음을 알 수 있다. 補血藥의 기능은 生血을 滋養하고 心肝兩經의 기능을 조절하여 造血한다. 血虛와 陰虛는 종종 병의 기전에 있어서 상호 인과관계가 있으므로 동시에 증후가 나타난다. 또한 기와 血의 관계가 밀접하므로 氣虛를 겸하는 경우에는 “補氣生血”의 방법을 약물을 함께 사용한다. 그러므로 補氣 補血 補陽 補陰은 임상에서 함께 쓰이는 경우가 많이 있으며, 특히 氣血이 兩虧하거나 陰陽이 모두 虛하면 반드시 氣血과 陰陽을 함께 살펴서 약물을 함께 응용한다. 비록 단독 처방으로 인삼과 당귀를 사용하는 경우는 없으나 임상에서 항상 약물의 배합에 氣血과 陰陽을 보강하는 대표적 약물로 사용하고 있다²⁻⁴⁾.

한의학에서 면역에 대한 개념은 正氣 확설과 관련하여 肺, 脾, 腎 三臟에서 찾을 수 있는데, 肺는 신체의 표면에서 病邪에 대한 방어 작용을 담당하고, 腎은 先天之本으로 正氣와 衛氣의

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2006/12/11 · 채택 : 2007/02/01

생성에 관여하며, 脾는 後天之本으로 정기와 위기의 물질적 기반이 된다. 또한 脾胃의 손상은 元氣의 부족을 초래하므로 모든 병의 발생 원인이 될 수 있다는 점에서 脾胃의 氣는 인체의 방어기능에서 중요한 역할을 수행한다고 볼 수 있다^{5,6)}.

따라서 본 실험에서는 면역능을 증강시켜 줄 수 있는 기능성식품을 개발하고자 인삼과 당귀를 1 : 1 비율로 혼합하여 인삼과 당귀의 혼합 추출물을 제조하여, 생쥐에 7일간 경구투여한 후 생쥐의 비장세포 및 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 측정하고 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷 20 ± 2 g을 다물사 이언스에서 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5 %, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 교형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium, lucigenin, zymosan, MTT, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, lipopolysaccharide, γ -interferon은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum, trypsin은 Gibco Co., mouse γ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated E. coli particle은 Molecular Probes Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기기는 microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

인삼 및 당귀는 한의유통사업단에서 구입하여 사용하였으며, 각 100 g을 증류수 1,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 인삼·당귀 혼합추출물 58.0 g (수득률; 29.0 %, 이하 GAE라 함)을 얻어, 동물실험을 할 때는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

4. 비장세포 및 대식세포의 분리

생쥐의 비장세포 분리는 Wysocki⁷⁾ 및 Mizel⁸⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 GAE 300 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A

로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리) 비장세포 부유액으로 하였다. 복강 대식세포의 분리는 GAE 300 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3 % thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 대식세포를 분리하여 사용하였다. 세포 배양을 할 때 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10 % FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

5. 비장세포의 증식능 측정

세포증식능 측정은 Mosmann⁹⁾이 개발하여 Kotnik 등¹⁰⁾이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 비장세포를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100 μ l (1×10⁷ cells/ml)를 접종하고 lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37 °C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10 %-SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

6. 비장세포의 subpopulation 측정

분리한 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로, T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다¹¹⁾.

7. Cytokines 측정

비장세포 배양액 중 cytokine의 측정은 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 GAE 300 mg/kg을 1일 1회씩 5일간 경구투여한 다음 생쥐의 비장으로부터 비장세포를 분리하여, 2×10⁷ cells/ml로 조제한 다음 96 well plate에 200 μ l 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500 rpm, 2분, 4 °C) 한 다음, 상등액 50 μ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokine의 양을 측정하였다. 즉 sample 50 μ l에 assay diluent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 μ l를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양

하였다. Stop solution 100 μ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다¹²⁾.

8. 복강 대식세포로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells을 분주한 후 대식세포로부터 생성되는 nitric oxide (NO)의 양을 Griess법¹³⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48 시간 배양한 후, 배양액 100 μ l와 Griess 시약 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10 분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

9. 복강 대식세포로부터 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 대식세포를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다^{14,15)}. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l 및 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 최종 volume이 200 μ l가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

10. 복강 대식세포의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated E. coli particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 μ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 대식세포를 RPMI1640 배지로 1×10^5 cells/ml 되도록 조정 후, 100 μ l를 96 well에 분주하고 E. coli 현탁액 25 μ l를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다¹⁶⁾.

11. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean \pm S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. 비장세포의 증식능에 미치는 효과

대조군의 비장세포에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100 %로 하였을 때, LPS를 처리

하였을 때 세포생존율은 129.5 \pm 1.7 %로 증가하였으며, GAE를 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 89.8 \pm 1.5 %로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 106.8 \pm 1.4 %로 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 1).

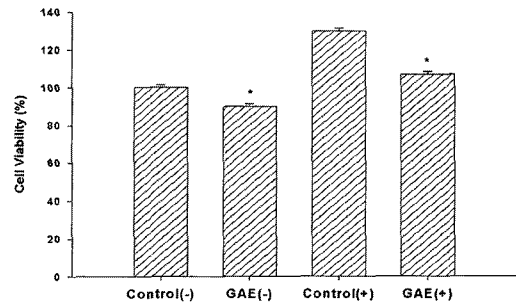


Fig. 1. Effects of the administration of GAE on the cell viability of mitogen treated murine splenocytes. GAE (300 mg/kg) were administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide (LPS). The data represents the mean \pm S.E. of 5 mice. (-): Lipopolysaccharide non-treated group, (+): Lipopolysaccharide treated group ; Significantly different from control group (p<0.001).

2. 비장세포의 subpopulation에 미치는 효과

비장세포 중 대조군의 B220 positive 세포 (B220⁺) 세포는 35.3 \pm 1.5 % 이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1⁺)는 21.7 \pm 1.5 % 이었다. GAE를 투여하고 분리한 비장세포 중 B220⁺ 세포는 34.6 \pm 1.8 %로 대조군과 별 차이가 없었으나, Thy1⁺ 세포는 27.6 \pm 1.2 %로 대조군에 비해 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4⁺ 세포는 15.2 \pm 0.4 % 이었고, CD8⁺ 세포는 6.3 \pm 0.3 % 이었으며, GAE를 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4⁺ 세포는 17.1 \pm 0.4 %로 대조군에 비해 증가하였으나, CD8⁺ 세포는 6.8 \pm 0.5 %로 대조군과 별 차이가 없었다(Table 1).

Table 1. Effects of the administration of GAE on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	B220+	Thy1+	CD4+	CD8+
Control	35.3 \pm 1.5	21.7 \pm 1.5	15.2 \pm 0.4	6.3 \pm 0.3
GAE	34.6 \pm 1.8	27.6 \pm 1.2*	17.1 \pm 0.4*	6.8 \pm 0.5

GAE (300 mg/kg) were administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm S.E. of 5 mice. ; Significantly different from control group (p<0.01).

3. Cytokines 분비에 미치는 효과

Splenocytes 배양액 중 γ -interferon의 양은 대조군에서 587.3 \pm 18.7 pg/ml 이었으며, GAE를 투여한 군은 676.8 \pm 20.3 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-2양은 대조군에서 352.3 \pm 17.8 pg/ml 이었으며, GAE를 투여한 군은 333.9 \pm 19.5 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 108.2 \pm 13.5 pg/ml 이었으며, GAT를 투여한 군은 98.5 \pm 7.8 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Effects of GAE on the production of cytokines from murine splenocytes

Samples	γ -Interferon (pg/ml)	Interleukin-2 (pg/ml)	Interleukin-4 (pg/ml)
Control	587.3 \pm 18.7	352.3 \pm 17.8	108.2 \pm 13.5
GAE	676.8 \pm 20.3*	333.9 \pm 19.5	98.5 \pm 7.8

GAE (300 mg/kg) were administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 hr in RPMI1640 medium. The production of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean \pm S.E. of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

4. 복강 대식세포로부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과

대조군의 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide (NO) 생성량은 48 시간 후에 1.7 \pm 0.2 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 대조군의 NO 생성량은 15.9 \pm 1.1 μ M로 증가하였으며, GAE를 투여하고 분리한 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 21.7 \pm 1.8 μ M로 대조군에 비해 증가하였다(Table 3).

Table 3. Effects of the administration of GAE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages

Samples	Nitric oxide (μ M)	
	γ -IFN + LPS (-)	γ -IFN + LPS (+)
Control	1.7 \pm 0.2	15.9 \pm 1.1
GAE	-	21.7 \pm 1.8#

GAE (300 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycolate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 hr adherence period were cultured for 48 hrs. in the presence or in the absence of LPS and γ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. γ -IFN + LPS (-); γ -interferon and lipopolysaccharide non-treated group, γ -IFN + LPS (+); γ -interferon and lipopolysaccharide treated group. #: Significantly different from γ -interferon and lipopolysaccharide non-treated group ($p < 0.001$). *: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

5. 복강 대식세포의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 대식세포의 phagocytic activity는 GAE를 투여하였을 때 대조군에 비해 증가하였으며(Fig. 2), FITC-conjugated *E. coli* particle의 탐식 실험에서도 동일한 결과를 나타내었다(Fig. 3).

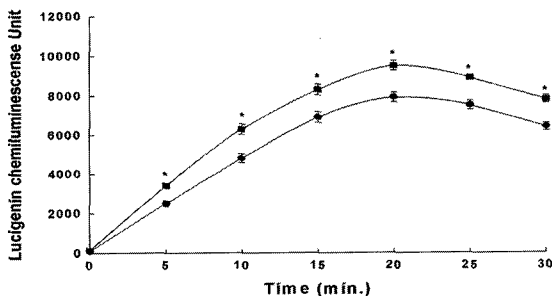


Fig. 2. Effects of the administration of GAE on the production of lucigenin chemiluminescence from murine peritoneal macrophages. GAE (300 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

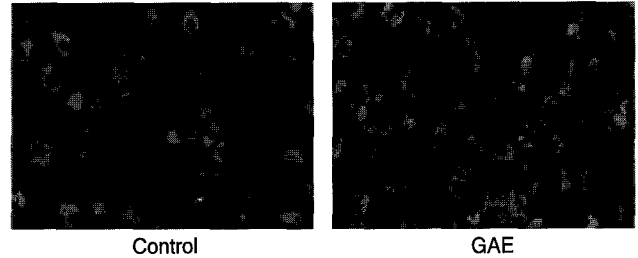


Fig. 3. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from GAE-administered mice. Photographs (taken at 200 \times magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and GAE (300 mg/kg)-administered mice (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

고찰

人蔘은 甘·微苦하고 微溫·無毒하여 補氣하는 대표 약물이며, 生化의 원천인 脾氣의 전신의 氣를 주관하는 肺氣를 보해 줌으로서 전신의 氣를 왕성하게 하여 大補元氣, 固脫生津, 勞傷虛損, 大便滑泄, 虛咳喘促, 自汗暴奪, 驚悸, 健忘, 頭痛, 眩暈, 頻尿, 消渴, 崩漏 등 一切氣血津液不足에 응용한다. 當歸는 甘補, 辛散, 苦泄, 溫通하고 辛香善走하기 때문에 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸으로 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 打撲損傷 등의 증상에 응용한다¹⁸⁾.

면역이란 생체가 자기 성분 이외의 이물질, 즉 각종 병원성 미생물, 이종단백질, 다당류, 지질, 수혈이나 동종 조직이식 등이 생체의 항상성을 깨뜨리거나 자기를 위협하는 물질을 배제하기 위해 일어나는 일련의 생체방어반응을 의미한다. 이러한 면역계는 항체의 합성 및 분비에 의한 체액성면역 (humoral immunity)과 T-lymphocyte에 의해 주도되는 세포성면역 (cell-mediated immunity)으로 분류하며, 또한 T- 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역과 대식세포가 관련된 비특이적 면역으로도 분류한다. 생체의 면역 반응을 일으키는 실체는 임파구이며 외부로부터 항원이 들어오면 임파구가 감작하여 두 가지 형태의 면역반응을 일으킨다. 첫째는 항원의 공격을 숙주의 조직에는 손상을 일으키지 않고 제거하거나 국소염증반응만을 일으키는 정상적인 면역반응이다. 둘째는 면역반응이 지나치게 증가되거나 원하지 않는 방향으로 진행되어 인체에 병적인 상태를 유발하는 과격한 반응을 일으키는 알레르기 (allergy) 또는 과민반응 (hypersensitivity)이다. 따라서 면역반응은 생체방어와 알레르기라는 양면성을 지니게 되며, 그 비중에 따라 생체에 있어서 의미가 전혀 다르게 나타나게 된다. 흉선세포는 thymus의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (CD4+) 및 cytotoxic T lymphocyte (CD8+)로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는 γ -IFN 및 IL-2가, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 T, B 임파구 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 한편 B 임파구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

GAE를 투여하였을 때 splenocytes의 생존율은 감소하였으며, splenocytes의 B220+ 세포의 population은 대조군과 별 차이

가 없었으나, $Thy1^+$ 세포의 population은 증가하였다. $Thy1^+$ 세포의 population 증가가 어느 세포에 기인된 것인가를 확인하기 위해 splenic $CD4^+$ 및 splenic $CD8^+$ 세포의 population을 측정된 결과 주로 splenic $CD4^+$ 세포의 population이 증가되었음을 확인하였다. Splenic $CD4^+$ 세포의 population 증가가 $Th1$ 및 $Th2$ 세포 중 어느 세포에 기인된 것인가를 검토하기 위해 $Th1$ 세포에서 분비되는 cytokines인 γ -IFN, IL-2 및 $Th2$ 세포에서 분비되는 IL-4의 양을 측정하였다. GAE를 투여하고 분리한 비장세포에서 분비되는 γ -IFN 양은 대조군에 비해 증가하였으나, IL-2 및 IL-4의 양은 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 이 결과는 GAE가 비장세포의 $Th1$ 세포를 활성화하여 면역능을 조절하고 있음을 의미하는 것이다.

생체에서 분비되는 cytokines들은 macrophage를 조절하는 것으로 알려져 있기 때문에²⁰⁾ 복강 macrophages에서 분비되는 nitric oxide 및 phagocytic activity를 측정하였다. 외부로부터 이 물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다. 이러한 탐식능은 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. 탐식능은 면역학적인 측면에서도 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 macrophages의 phagocytic activity를 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocytose하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다²¹⁾.

GAE를 투여하였을 때 nitric oxide (NO)의 양이 대조군에 비해 증가하였으며, 대식세포의 탐식능도 증가하였다. 이를 확인하기 위해 FITC-conjugated E. coli를 이용하여 대식세포의 engulfment를 측정된 결과 동일한 실험결과를 나타내었다. GAE 투여에 의한 대식세포의 탐식능 증가작용이 $Th1$ 세포로부터 γ -interferon의 분비가 증가되어 나타나는 결과인지는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

인삼·당귀 혼합추출물에 의한 $Th1$ 세포 및 대식세포의 활성화 작용이 인삼 또는 당귀 단독 추출물의 효능인지 아니면 인삼·당귀 혼합물의 효능인지를 비교하는 실험을 추후 진행할 예정이다.

결 론

인삼·당귀 혼합추출물을 생쥐에 투여하였을 때 생쥐의 비장세포 생존율은 감소되었고, splenic $CD4^+$ 세포의 population 및 γ -interferon의 분비가 증가되었다. 또한 복강 대식세포로부터 nitric oxide의 생성이 증가되었고 대식세포의 탐식능이 증가되었다. 이러한 결과는 인삼·당귀 혼합추출물이 $Th1$ 세포 및 대식세포를 활성화하여 면역능을 조절할 수 있음을 시사하는 것이다.

감사의 글

"이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임"(지방연구중심대학

육성사업/헬스케어기술개발사업단)

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學敎. 本草學. 서울, 영림사, pp 530-533, 578-580, 1994.
2. 신민교. 臨床本草學. 서울, 남산당, pp 166-167, 221-223, 1986.
3. 한종현, 김기영. 韓方藥理學. 서울, 의성당, pp 458-465, 479-483, 2004.
4. 진존인. 圖說韓方醫藥大辭典(권3). 동경, 청담사, pp 120-123, 228-231, 1982.
5. 심승향. 中醫與免疫. 浙江中醫學院學報, 14: 6-7, 1990.
6. 서증명. 脾與免疫系統關係研究近況. 四川中醫, 1: 16-18, 1993.
7. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2844, 1978.
8. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol. 120: 1497, 1979.
9. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65: 55, 1983.
10. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129: 23, 1990.
11. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179: 873-879, 1994.
12. Eun, J.S., Jeon, Y.K., Lee, K.A., Leem, J.Y., Kwon, J., Jang, I.S. and Song, J.M. Effect of Bopaewon-tang on immune reaction. Kor. J. Orient. Phys. Path. 20(1):125-130, 2006.
13. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immunity, 59(9):3280, 1991.
14. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174: 259, 1994.
15. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112: 163, 1988.
16. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immunol. Methods, 162(1), 1993.
17. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 45(1), 1984.
18. 韓國生藥學敎授協議會. 本草學, (8)大韓藥師會, p 732, 781, 2001.

19. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 2ed. Saunders, pp 5, 279-282, 1994.
20. Miceli, M.C. and Parnes, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53: 59, 1993.
21. Charles, A.J., Paul, T., Mark, W. The immune system in health and disease. 4ed, Garland Pub. p 463, 2000.
22. Channon, J.Y., Leslie, C.C. and Johnston, Jr. R.B. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.* 41: 450-455, 1987.