

원 저

補陰免疫丹의 免疫 增強 效果

김태균, 문석재, 원진희, 김동웅, 이종덕¹⁾, 문구
원광대학교 한의과대학 비계내과학교실, 광주원광병원 방사선과¹⁾

Immune Enhancing Effect of *Boummyunyuck-dan*

Tae-Gyun Kim, Seok-Jae Moon, Jin-Hee Won, Dong-Woung Kim, Jong-Deok Lee¹⁾, Goo Moon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Department of Radiology of Gwangju Wonkwang Hospital¹⁾

Objective : To investigate immune enhancing effects of *Boummyunyuck-dan* (BMD)

Methods : In this study I investigated the effect of BMD on cell proliferation and viability. In addition, I investigated production of cytokines (IL-2, IL-4 and IFN- γ), NO, and TNF- α in human T-cell leukemia, MOLT-4 cells. The cells were cultured for 24h in the presence or absence of BMD.

Result : BMD increased the cell viability by 15% ($P<0.05$) and enhanced IL-2, IL-4 and IFN- γ production compared with media control in a dose-dependent manner ($P<0.01$) at 24h. BMD also increased mRNA and protein expression levels of IFN- γ in MOLT-4 cells. In addition, I also assessed the effects of BMD on production of NO and TNF- α from the peritoneal macrophages because NO and TNF- α as a potent macrophage-derived immune reaction regulatory molecule has received increasing attention. However, BMD had no effect on NO and TNF- α production in the cells.

Conclusion : These data indicate that BMD has some immune-enhancing effect, and that its action may be due to the proliferation and cytokine production of T cells. (*J Korean Oriental Med 2003;24(1):54-64*)

Key Words: *Boummyunyuck-dan*, immune-enhancing effect, cytokines, NO, TNF- α

서론

최근 현대의학에서 난치성 아토피성 피부염에 IFN- γ 를 투여하여 치료하고, 만성 B형 간염이나 C형 간염에 IFN- α 를 투여하여 치료하며, 면역이 저하된 암환자에 항암제와 면역증강제를 함께 투여하여 치료하는 등 항생제나 면역 억제제 등을 투여하는 방법에서 벗어나 면역력을 증강시켜 질병을 치료하는

면역요법에 대한 관심이 증대되고 있다^{1,2)}.

면역이란 생체가自己和非自己를 식별하는 機構로서 외부로부터 침입하는 각종 미생물, 同種의 組織, 체내에 생긴 불필요한 산물들을 非自己的인 항원으로 인식하고 특이하게 반응하여 항체를 만들고 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상으로 크게 자연면역(innate immunity)과 특이면역(specific immunity)으로 구분할 수 있다. 그 중 특이면역은 다시 체액성 면역(humoral immunity)과 세포 매개 면역(cell mediated immunity)으로 나뉜다^{3,5)}.

면역반응에 관여하는 림프계세포, 염증세포 그리고 이외 조혈계세포들은 서로 다른 기능을 가진 세

· 접수 : 2002년 10월 15일 · 채택 : 2003년 1월 18일
· 교신저자 : 김태균, 원광대학교 광주한방병원 3내과
(Tel. 062-670-6527, Fax. 062-670-6529, E-mail: jungup@hanmail.net)
· 이 논문은 2002년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

포들이 직접 접촉을 하거나 이들 세포들이 분비하는 단백질에 의하여 자극을 전달하여 효율적인 기능을 가지게 되는데 이들 세포들이 분비하는 분자량이 작은 단백을 cytokine이라 한다. 세포 매개 면역 중 T 세포와 cytokine은 면역반응의 특성과 크기를 결정하는 중요한 인자가 된다^{4,5)}.

한의학에서 면역에 대한 개념은 《素問·刺法論》에서 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, 《素問·評熱病論》에서 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하였으며⁶⁾, 《靈樞·百病始生篇》에서 “風雨寒暑 不得虛 邪不能獨傷人”이라 하여⁷⁾ 正氣가 왕성하면 正邪鬪爭의 과정 중에서 능히 外邪를 물리칠 수 있다고 하는데서 찾아볼 수 있다. 正氣와 免疫, 正邪相爭과 免疫反應은 서로 유사하다 할 수 있고, 正氣와 邪氣의 盛衰관계는 病機나 虛와 實을 결정하여 正邪盛衰의 정도에 따라 扶正祛邪를 통해 질병을 치료하게 된다^{6,17,21)}.

한의학에서 면역기능과 관련된 처방에 관한 실험적 연구로는 金 등⁹⁾에 의해 四君子湯, 四物湯, 八物湯, 六味地黃湯, 右歸飲, 加味升陽湯, 麥蔘白朮散, 舉元煎, 歸脾湯, 加味大補湯 등이 면역력 증강 효과가 있다는 보고가 있다.

補陰免疫丹은 圓光大學校 脾系內科學教室에서 악성종양 환자들이 있어서 방사선요법, 화학요법으로

발생하는 부작용을 감소시키고 健脾益氣, 補陰, 清熱 작용으로 인체의 면역력을 회복시키기 위해 만든 처방으로 扶正祛邪에 입각한 처방이다.

저자는 補陰免疫丹의 면역증강 효과를 알아보기 위해 T세포의 증식과 생존율, Th1 세포로부터 유도되는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 및 Th2 세포로부터 유도되는 IL-4의 생성과 NO의 생성에 미치는 영향을 연구한 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용한 藥材는 圓光大學校 光州韓方病院에서 구입한 후 精選하여 사용하였다. 補陰免疫丹은 圓光大學校 脾系內科 處方에 의거하였으며 한 貼의 분량은 다음과 같다.(Table 1)

2) 試藥

Avidin peroxidase, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)tablets substrate (ABTS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)등은 Sigma 회사 (St. Louis, MO, USA)로부터 직접 구입하여 사용하였다. 그리고

Table 1. Prescription contents of Bouummyunyk-dan Per Pack

本草名	生藥名	學名	分量(g)
白花蛇舌草	<i>Herba oldenlandiae diffusae</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	8
黃芪	<i>Radix astragali</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE.	6
白芍藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflora</i>	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	6
當歸	<i>Radix angelicae gigantis</i>	<i>Angelica sinensis</i> DIELS.	4
麥門冬	<i>Radix ophiopogonis</i>	<i>Ophiopogon japonicus</i> KER-GAWL.	4
白朮	<i>Rhizoma atractylodis macrocephalae</i>	<i>Atractylodes maceocephala</i> KOIDZ.	4
沙蔘	<i>Radix adenophorae</i>	<i>Adenophora triphylla</i> var <i>japonica</i> HARA.	4
生地黃	<i>Rhizoma reh mamiiae</i>	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	4
鷄血藤	<i>Mucunae caulis</i>	<i>Spatholobus suberectus</i> Dunn.	4
陳皮	<i>Pericarpium citri onbilis</i>	<i>Citrus unshin</i> MARCOR.	4
麥芽(炒)	<i>Fructus hordei germinatus</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.	4
鷄內金(炒)	<i>Corium stomachicum galli</i>	<i>Callus gallus domesticus</i> BRISSON.	4
榆根白皮	<i>Cortex ulmi pumilae</i>	<i>Ulmus pumila</i> L.	4
知母(鹽水炒)	<i>Rhizoma anemarrhenae</i>	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> BGE.	2
黃柏(鹽水炒)	<i>Cortex phellodendri</i>	<i>Phellodendron amurense</i> RUPRECHT.	2
甘草	<i>Radix glycyrrhizae</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	2
Total amount			66

단 클론 항체 IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α 와 재조합 IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , 2차 항체 IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α 는 R&D systems Ins. (USA)로부터 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), RPMI 1640 배지, ampicillin 과 streptomycin은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. ^3H thymidine은 Amersham Pharmacia Biotech (UK)으로부터 구입하였다.

2. 方法

1) 檢液調製

補陰免疫丹 한貼 분량인 66g을 증류수 800ml로 2시간 煎湯 후 Whatman filter paper로 抽出液을 여과하여 freeze dryer로 동결건조시키고, 동결 건조한 한약재는 4℃에서 보관하였다. 동결건조된 한약재는 다시 filter 해서 멸균된 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

2) 세포배양

Human cutaneous T cell lymphocyte line으로 써 peripheral blood로 부터 유래된 mature T cell 세포주인 MOLT-4 세포는 37℃, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. MOLT-4는 BMD를 처리하기 전에 30분 동안 안정화시킨 후 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후에 cytokine들을 정량하기 위해 세포들을 400×g, 4℃에서 5분 동안 원심분리 하였다.

3) 세포증식 및 MTT assay

세포증식은 ^3H thymidine을 사용하여 분석하였다. T 세포(3×10^5)를 0.5% FBS에서 24시간 동안 배양하여 세포 주기를 정지시켰다. 세포주기를 일정하게 맞추어 준 후 FBS가 첨가된 배양액을 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 BMD를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포증식을 측정하기 3시간 전에 ^3H thymidine 2 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 를 첨가하였다. 배양한 후에 두 세 번 정도 반응하지 않은 ^3H thymidine을 없애기 위해 10% trichloroacetic acid(TCA)로 씻어줬다. 세포는 0.2M NaOH, 0.1% SDS(sodium dodesyl sulfate)와 2M Na₂CO₃가 혼합된 용액에서 30분 동안 안정화시킨 후 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

세포의 생존능력을 관찰하기 위하여 MTT assay를 실행하였다. 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin이 들어간 RPMI 1640 배지에 3×10^5 이 되는 세포를 96 well plate에 plating 한 다음 37℃에서 20시간동안 배양하였다. 배양된 배지를 버리고 난 다음 신선한 배지를 넣었다. MTT(10 $\mu\text{l}/\text{well}$: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하고 4시간동안 다시 배양한 다음 DMSO 100 μl 로 MTT를 녹인 다음 540nm에서 ELISA reader로 읽었다.

4) Cytokine(세포활성물질)의 정량

배양된 상층액 중의 세포활성물질의 단백질 수준을 조사하기 위해 96 well plate에서 duplicate로 ELISA를 실시하였다²⁾. Cytokine에 대한 단클론 항체를 PBS(pH 7.4)로 희석하여, 96 well plate에 100 μl 씩 각각 코팅한 다음, 4℃에서 12시간 동안 방치하였다. 이 plate를 0.05% Tween이 포함된 PBS로 씻어낸 다음 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃를 함유한 PBS로 1시간동안 blocking하였다. 몇 번을 씻어낸 다음, 원심분리하여 얻은 상층액과 표준 cytokine을 첨가한 후 37℃에서 2시간 동안 방치한 후, 각 well을 다시 씻어내고 biotin이 결합된 cytokine 2차 항체를 첨가하여 다시 37℃에서 2시간 동안 방치하였다. well을 씻어낸 다음 avidin peroxidase를 첨가하고 37℃에서 30분동안 방치하고 well을 다시 씻은 다음에 기질인 ABTS 용액을 첨가하고, 발색반응을 ELISA reader를 사용하여 405nm에서 측정하였다.

5) RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 분석

전체 RNA는 easy-BLUE™ RNA extraction kit (iNtRON Biotech)를 사용하여 MOLT-4세포로부터 분리하였다. PCR은 다음과 같은 프라이머를 사용하여 수행하였다. IFN- γ 센스, 5' AGT TAT ATC TTG GCT TTT CA 3'; 안티센스, 5' ACC GAA TAA TTA GTC AGC TT 3', β -actin 센스, 5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3'; 안티센스, 5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG 3'. IFN- γ , (30 사이클, annealing 온도 52℃)와 β -actin, (30 사이클, annealing 온도 60℃)의 PCR 생성물은 IFN- γ 와 internal control인 β -actin이 각각 356 bp와

661 bp이었으며 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

6) Western blot 분석

세포를 harvest하여 PBS로 씻은 다음, lysis buffer를 넣고 vortexing한 후, 4℃에서 1시간 반응시킨 후 15,000×g로 원심 분리한 다음, 상층액을 BCA(bicinchoninic acid solution) 용액으로 정량하였다. 50µg 단백질을 12% 겔에서 전기영동한 후, nitrocellulose paper에 transfer하고 10% skim milk로 1시간동안 blocking 시켰다. IFN-γ에 대한 항체를 1시간 처리하고 PBS-Tween으로 세정하였다. 각각에 대한 2차 항체를 30분간 처리하고 세정한 후, ECL(enhanced chemiluminescence) solution kit로 검출하였다.

7) NO (산화질소) 생성량 측정

NO의 생성실험은 생쥐 대식세포를 이용하였다. 대식세포는 대한실험동물센터(대전)에서 구입한 8-12주 사이의 C57BL/6계 수컷 마우스로부터 분리하였다. 대식세포에서 발생된 NO의 양은 배지에 축적된 NO의 산화물인 nitrite를 Griess 반응으로 정량하였다. 즉 0.1% naphthylethylene diaminedihydrochloride와 1% sulfanilamide를 동량 섞은 Griess reagents 100µl와 배양액 100µl를 섞은 다음 10분 후에 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도계산은 sodium nitrite를 표준물질로 사용하여 결정하였다.

8) 통계학적 분석

모든 자료는 means±S.E.M으로 나타내었으며, 통계학적 분석은 SPSS program을 이용하여 Student's t-test로 행하였다. 유의성 검증은 대조군과 비교하여 결정하였으며, 유의수준은 P<0.05로 하였다.

실험성적

1. 세포증식 및 세포 생존에 있어서 補陰免疫丹(BMD)의 효과

補陰免疫丹이 중요한 면역기능을 담당하고 있는 T 세포의 증식과 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 ³[H]thymidine incorporation과 MTT assay를 수행

하였다. T 세포주인 MOLT-4 세포를 3×10⁵씩 각각 4 well에 seeding한 후에 補陰免疫丹을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 補陰免疫丹의 농도가 증가할수록 세포수가 증가하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성있는 효과를 나타냈다(*P<0.05).

2. IL-2의 생성에 있어서 補陰免疫丹의 효과

IL-2는 Th1 세포 유래 세포활성물질로 면역증강력의 지표가 된다. 본 연구에서는 補陰免疫丹이 처리된 배양액과 처리되지 않은 배양액으로부터 IL-2의 수준을 ELISA방법을 사용하여 정량하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼 補陰免疫丹 0.1mg/ml를 처리한 군(0.29±0.01ng/ml)과 1mg/ml를 처리한 군(0.4±0.02ng/ml)에서 농도의존적으로 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1mg/ml를 처리한 군에서 처리되지 않은 군(0.08±0.01ng/ml)에 비해 최대 5배 정도의

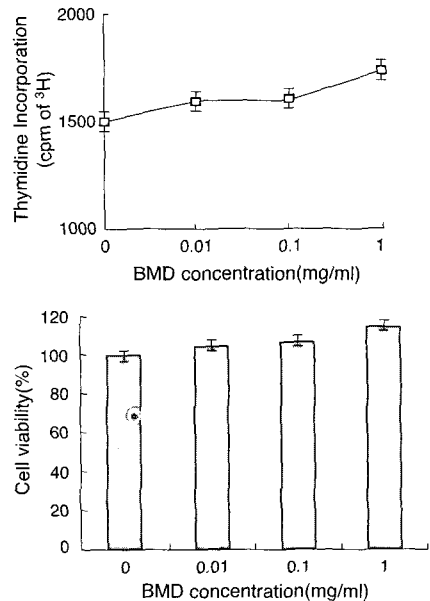


Fig. 1. Effect of BMD on the cell proliferation and viability. MOLT-4 cells (3×10⁵) were treated with various concentration of BMD for 24h. Cells were then collected and assessed for viability using ³[H]thymidine (A) and MTT (B). Values are the mean ± S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run (*P<0.05).

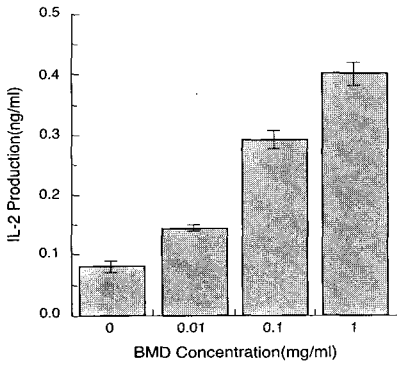


Fig. 2. Effect of BMD on the IL-2 production. Culture supernatants were collected from none and BMD treated MOLT-4 cells which were cultured for 24h. IL-2 levels in culture supernatants was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run (* P <0.01).

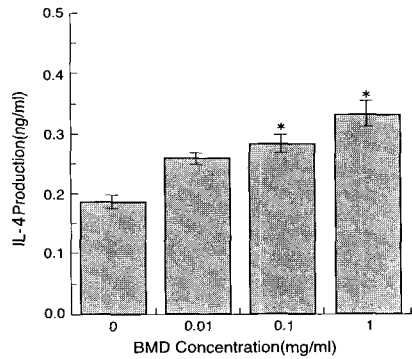


Fig. 3. Effect of BMD on the IL-4 production. Culture supernatants were collected from none and BMD treated MOLT-4 cells which were cultured for 24h. IL-4 levels in culture supernatants was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run (* P <0.01).

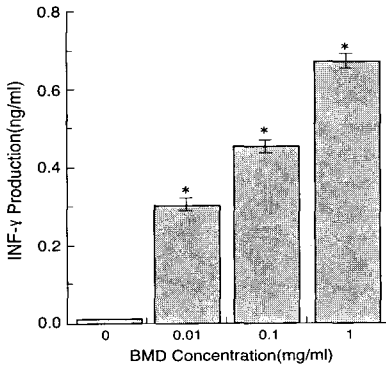


Fig. 4. Effect of BMD on the IFN- γ production. Culture supernatants were collected from none and BMD treated MOLT-4 cells which were cultured for 24h. IFN- γ levels in culture supernatants was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run (* P <0.01).

0.02ng/ml)에서 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1mg/ml을 처리한 군에서 IL-4의 최고 생성량을 보였다(* P <0.01).

4. IFN- γ 의 생성에 있어서 補陰免疫丹의 효과

補陰免疫丹의 면역증강 효과 확인을 위한 주요한 지표인 IFN- γ 의 생성을 ELISA방법을 사용하여 조사하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 補陰免疫丹 0.01mg/ml을 처리한 군(0.3 \pm 0.02ng/ml), 0.1mg/ml을 처리한 군(0.45 \pm 0.01ng/ml), 1mg/ml을 처리한 군(0.67 \pm 0.019ng/ml) 모두에서 농도의존적으로 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1mg/ml을 처리한 군에서 IFN- γ 의 최고 생성량을 보였다(* P <0.01).

IL-2 생성 증가를 보였다(* P <0.01).

3. IL-4의 생성에 있어서 補陰免疫丹의 효과

다음으로 Th2 세포 유래 세포활성물질 중 대표적인 IL-4의 생성을 조사하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 IL-4의 생성은 補陰免疫丹의 농도에 비례하여 증가하였고, 補陰免疫丹 0.1mg/ml을 처리한 군(0.282 \pm 0.0145ng/ml)과 1mg/ml을 처리한 군(0.331 \pm

5. IFN- γ 의 발현에 있어서 補陰免疫丹의 효과

補陰免疫丹이 IFN- γ 의 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 RT-PCR방법과 Western blotting 방법으로 MOLT-4 세포내의 IFN- γ 의 발현 수준을 조사하였다. 補陰免疫丹 1mg/ml으로 자극한 세포에서 IFN- γ 의 mRNA수준(Fig. 5A)과 단백질 수준(Fig. 5B)이 모두 증가하였다.

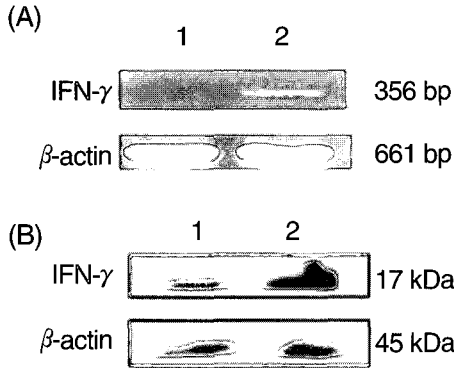


Fig. 5. Effect of BMD on the IFN- γ expression. MOLT-4 cells were treated with BMD (1mg/ml) for 8h. Total RNA was extracted and analyzed using a RT-PCR for the expression of IFN- γ mRNA(A). MOLT-4 cells were treated with BMD for 24h. IFN- γ protein was analyzed by Western blotting as described in the experimental procedures(B). 1. unstimulated cells; 2. BMD(1mg/ml).

Table 3. Effect of BMD on the TNF- α production

Addition ^a		TNF- α secretion
rIFN- γ (10 U/ml)	BMD(mg/ml)	(ng/ml) ^b
-	0	0.012 \pm 0.005
-	0.01	0.011 \pm 0.008
-	0.1	0.016 \pm 0.002
-	1	0.020 \pm 0.006
+	0	0.186 \pm 0.074
+	0.01	0.190 \pm 0.210
+	0.1	0.199 \pm 0.088
+	1	0.240 \pm 0.490

^a Peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/well) were stimulated with rIFN- γ or BMD + rIFN- γ .

^b The amount of TNF- α secreted by peritoneal macrophages was measured by ELISA method after 24h incubation. Values are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run.

6. NO와 TNF- α 의 생성에 있어서 補陰免疫丹의 효과
 마지막으로 補陰免疫丹이 NO와 TNF- α 생성에 미치는 효과를 알아보기 위해, IFN- γ 자극으로 priming 된 세포에 補陰免疫丹을 농도별로 처리하였다. 48시간을 처리한 후 상층액을 얻어 대식세포로부터 생성된 NO와 TNF- α 의 양을 측정하였다. 그 결과, Table 2와 3에 보인 것처럼 補陰免疫丹은 TNF- α 의 생성에 약간의 효과를 나타냈지만, NO와 TNF- α 생성에 유의적인 영향을 미치지 못하였다.

Table 2. Effect of BMD on the NO production

Addition ^a		Nitrite concentration
rIFN- γ (10 U/ml)	BMD(mg/ml)	(μ M) ^b
-	0	10.1 \pm 0.6
-	0.01	10.9 \pm 1.5
-	0.1	11.1 \pm 4.1
-	1	12.7 \pm 2.5
+	0	19.8 \pm 4.5
+	0.01	18.9 \pm 2.0
+	0.1	20.9 \pm 7.2
+	1	22.5 \pm 2.5

^a Peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/well) were stimulated with rIFN- γ or BMD + rIFN- γ .

^b The amount of nitrite released by peritoneal macrophages was measured after 48h by the Griess method. Values are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments duplicate in each run.

고 찰

최근 유전자 재조합 기법(recombinant DNA technology)의 발전에 의해 다량으로 순수한 인터페론(interferon, IFN)의 생산이 가능해짐에 따라 1957년 발견된 항바이러스 효과, 항암효과 및 면역조절기능을 지니는 단백질인 인터페론을 이용해 면역력을 증진시킴으로써 아토피성 피부염, 간염, 종양 등의 난치성 질환을 치료하려는 연구가 활발히 진행중이다^{1,2}. 안²은 아토피 피부염 환자에 있어 T 림프구에서 IL-4의 생산은 증가되어 있으나 IFN- γ 의 생산은 감소되어있어, 아토피성 피부염 환자에게 IFN- γ 를 투여하여 아토피성 피부염이 호전될 수 있음을 보고한 바 있다. 이처럼 최근의 현대의학에서 면역력을 억제하거나 바이러스를 사멸시켜 질병을 치료하려는 방향에서 벗어나 면역력을 증진시켜 질병을 치료하려는 움직임이 활발해지고 있다.

한의학에서 “免疫”이라는 단어는 明代《免疫類方》에 최초로 기재되어 있으며⁸, 그 뜻은 疫病의 危害를 제거한다는 뜻이었다. 면역에 대한 의미는 《內經》의《素問·刺法論》에서 “正氣存內 邪不可干, 避其毒氣”라하였고,《靈樞·口問篇》에서 “邪氣所在, 皆爲不足”,《素問·評熱病論》에서 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하였으며,《靈樞·百病始生篇》에서 “風雨寒暑不得虛 邪不能獨傷人”이라하여^{6,7}, 疾病은 正氣가 虛弱하여 邪

氣가 虛를 틈타 들어 올 때 발생함으로 正氣가 왕성하면 正邪鬪爭의 과정 중에서 능히 外邪를 물리칠 수 있다고 하는데서 찾아볼 수 있다.

正氣는 생명기능을 총칭하며, 인체의 질병에 대한 방어, 저항 및 재생기능을 주관하는 것으로 볼 수 있고, 邪氣는 六淫, 七情, 飮食, 勞倦 및 瘀血, 痰飲 등 일체의 발병요인을 가리킨다. 正邪盛衰는 질병과정 중에서 병을 이르게 하는 邪氣와 인체의 正氣간의 盛衰變化를 의미하며 한의학에서는 환자의 正邪盛衰의 정도에 따라서 扶正祛邪를 통해 질병을 치료한다¹⁷⁾.

한의학에서 항암치료는 일반적으로 종양초기에는 正氣가 허약하지 않으므로 祛邪위주의 치료법을 사용하고 病程의 발전에 따라 종양이 중·말기에 이르고 正氣가 허약해졌을 때는 攻補兼施의 방법을 사용한다. 특히 종양환자가 종양 절제수술을 받았거나 혹은 방사선요법이나 화학요법을 받았을때는 종양은 비록 제거 혹은 억제되었지만 인체 역시 일정정도의 손상을 받았으므로 扶正을 위주로 치료하여야 한다. 그러나 수술이나 방사선, 화학요법 후에도 여전히 邪氣가 남아 있어 재발이나 전이가 발생할 수 있으므로 祛邪를 겸하여야 좋은 치료를 거둘 수 있다¹⁾.

補陰免疫丹은 악성종양 환자들에 있어서 방사선요법, 화학요법으로 발생하는 부작용을 감소시키고, 健脾胃氣, 補陰, 清熱作用으로 인체의 면역력을 회복시키기 위해 圓光大學校 脾系內科學教室에서 만든 處方으로 扶正培本에 清熱解毒을 兼한 處方이다.

약물구성을 살펴보면 白花蛇舌草, 榆根白皮, 知母, 黃柏, 生地黃은 清熱解毒, 消癰解毒, 滋陰降火하고, 黃芪, 白朮, 麥芽, 鷄內金, 陳皮, 甘草는 消食和中, 健脾胃氣하며, 白芍藥, 當歸, 麥門冬, 沙蔘, 鷄內金은 養陰潤肺, 生津, 補血하여 종합적으로 扶正祛邪하는 처방이다^{23,24)}.

補陰免疫丹 구성약물의 면역학적 효능에 대한 연구를 살펴보면 白花蛇舌草에 대해 金 등^{18,19)}이 抗癌 및 抗轉移 효과를, 黃芪에 대해 吳 등^{20,21)}이 면역반응의 증가를 보고하였으며, 當歸에 대해 吳²⁰⁾는 면역반응의 증가를, 甘草에 대해 韓²²⁾은 면역조절작용이 있음을 보고한 바 있다.

세포 매개 면역 중 T 세포는 면역계 중 가장 중요한 부분을 차지하고 있으며, 백혈구로서 외부로부터 침입하는 바이러스, 박테리아, 기생충에 대해 저항력을 가지고 대항할 수 있도록 한다. T 세포는 항체를 생산하는 B 세포에 작용하여 항체를 만들도록 하며, 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키기도 하고, CTL(cytotoxic T lymphocytes)에 작용하여 그들을 활성화시킨다.

면역반응의 조절에 관여하는 대부분의 helper T cell은 세포표면에 TCR(T cell receptor)외에 CD4 분자를 공통적으로 가지고 있으며, 직접 다른 세포를 죽이는 기능을 가지고 있는 CTL은 TCR외에 CD8 분자를 가지고 있기 때문에 각각 CD4 T cell 또는 CD8 T cell이라 하고, 말초혈액에 있는 T cell의 약 30%는 CD8 T cell이며, 나머지는 CD4 T cell인 것으로 알려져 있다.

Helper T cell에는 Th1과 Th2 아형이 있고, 두 아형이 분비하는 cytokine은 서로 다르며 그 기능도 다르다²⁵⁾. 면역 기능의 저하는 이런 Th1과 Th2 세포에서 유래한 cytokine 분비의 불균형에서 그 원인을 찾아볼 수 있다²⁶⁾. Th1 세포부터 분비되는 cytokine에는 IL-2와 IFN- γ , TNF- α 가 대표적이며 일차적으로 여러 다양한 림프구 집단의 성장과 분화를 조절하는 역할을 하고 T 세포 의존성 면역반응의 활성화단계(activation phase)에서 중요한 역할을 수행한다. Th2 세포로부터 분비되는 IL-4, IL-6 등의 cytokine들은 주로 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophil), 그리고 호산구(eosinophil)와 같은 염증세포의 기능을 조절하거나 활성화시킨다^{27,28)}. T 세포에서 분비되는 이런 cytokine들은 세포성 면역반응의 실행단계(effector phases)에서 작용을 나타내며, 면역세포와 염증계간의 신호 전달과정에서도 중요한 역할을 한다.

면역반응의 활성화단계에서 중요한 역할을 하는 IL-2는 활성화된 보조 Th1 세포에서 생성되며 T 세포의 주된 자가 분비적 성장 인자로 T 세포 의존적 면역반응의 크기를 결정한다. IL-2는 또한 IFN- γ 의 합성도 자극한다. 생체내에서 적절한 양의 IL-2가 합성되지 못하면 항원특이적 무반응의 원인이 된다²⁹⁾.

IFN- γ 는 T 세포에 작용하여 Th1 세포의 분화를 촉진시키고 동시에 Th2 세포의 증식을 억제한다. 또한 IFN- γ 는 B 세포를 활성화시켜 IgE 항체를 생성하게 하는 IL-4의 생성을 조절한다. IL-4와 IFN- γ 에 의한 인체 면역 체계의 불균형이 여러 질환이 일으키는 원인이 되기도 한다^{30,31)}.

TNF- α 는 또한 Th1 세포로부터 생성되는 cytokine으로 단핵구 및 다른 형태의 세포를 자극하여 백혈구의 보충에 한 역할을 담당하는 chemokine을 분비토록 하며 또한 염증성 백혈구를 활성화시켜 미생물을 죽이도록 한다. 특히 TNF- α 는 호중구 활성화 기능이 강하여 호산구 및 단핵식균세포에도 영향을 미친다. TNF- α 가 저농도로 계속 생성되는 경우, 조직의 재배열(tissue remodeling)이 일어나며, TNF- α 는 새로운 혈관의 형성을 유도하는 혈관생성인자(angiogenesis factor) 및 결합조직의 침착(deposition)을 야기하는 섬유아세포 성장인자로서도 작용한다³²⁾.

산화질소(nitric oxide, NO)는 매우 불안정하며 반응성이 강한 물질로서 생체내에서 신경전달, 혈관 확장 또는 면역반응 등 다양한 작용을 하며 IFN- γ 와 LPS(lipopolysaccharide)등에 의해 대식세포 등으로부터 활성화되어 아질산염(nitrite, NO₂⁻)과 질산염을 발생시키며, 이러한 산화질소는 대식세포의 항 미생물 작용과 항암작용의 중요한 매개물이라는 사실이 밝혀졌다³³⁾.

이에 저자는 본 연구에서 補陰免疫丹(BMD)의 면역증강 효과를 알아보기 위해 T세포의 증식과 생존율, Th1 세포로부터 유도되는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 및 Th2 세포로부터 유도되는 IL-4의 생성과 NO의 생성에 미치는 영향을 연구하였다.

본 연구에서 T세포주인 MOLT-4세포를 이용하여 補陰免疫丹의 면역증강 효과를 실험하였다. MOLT-4세포를 補陰免疫丹으로 자극한 결과 Th1 세포활성물질인 IL-2와 IFN- γ 의 생성이 증가한 것을 알 수 있었으며 Th2 세포활성물질인 IL-4 생성도 증가하였다. 그러나 NO와 TNF- α 생성에는 영향을 미치지 않았다.

말초혈액의 성숙된 T 세포가 MHC(major histocompatibility complex)와 항원의 복합체를 인식하게

되면, T 세포 클론의 증식과 분화가 시작되어, 특정한 T 세포의 수가 늘어난다. 이와 같이 활성화된 T 세포가 helper T cell이면 면역반응을 촉진시키게 되고, CTL이면 표적 세포 살해와 같은 세포면역반응이 나타난다³⁴⁾. 본 연구에서는 補陰免疫丹에 의해 MOLT-4세포의 증식 및 세포 생존의 증가를 확인하였으며 이러한 결과는 補陰免疫丹이 생체내 주요한 면역반응을 담당하는 T 세포의 증식을 증가시킴으로써 면역증강에 효과적임을 암시하였다(Fig. 1).

IL-2는 T 세포를 G1(합성전기) 상태에서 S phase(합성기)로 전환시키는 T 세포 growth factor로서, CD4 T 세포에 의해 생성된다. IL-2는 autocrine 또는 paracrine factor로 작용하는 분자량 14~17kDa의 단백질로 NK 세포에 작용하여 성장을 촉진하며, 그것의 살해능력을 강화하며 LAK(lymphokine activated killer cells)와 B 세포 등에 작용하여 그 성장을 촉진하기도 한다³⁵⁾. IL-4는 CD4 T 세포와 activated mast 세포에 의해 만들어지는 약 20kDa크기의 단백질로서 B 세포 성장인자로 작용한다. IL-4는 또한 B 세포의 면역글로블린 클래스 전환에 관여하는 분화인자로 작용하며, CD4 T 세포, 비만세포, 대식세포 등을 활성화시킨다³⁶⁾. IL-4는 Th2 세포활성물질로 염증성 세포활성물질로서 인식되어져왔지만 최근에는 IL-4의 면역증강효과에 대한 직접적인 증거가 제시되었다³⁷⁾. 본 연구에서 補陰免疫丹에 의해 IL-2 및 IL-4의 생성이 증가된 결과는 補陰免疫丹이 생체에 유익한 cytokine의 생성을 증가시킴으로써 면역증강 효과에 기여하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, 3).

IFN- γ 는 type II interferon이라고도 하며, CD4 T 세포나 CD8 T 세포에 의해 만들어져 면역반응을 조절하기 때문에 immune interferon이라고도 부른다. IFN- γ 는 T 세포, B 세포, neutrophils, NK 세포, vascular endothelial 세포에 작용하여 그들을 활성화시킬 수 있으며, macrophage activating factor로 작용하여 Class I 과 II MHC 발현을 증가시키기도 한다. IFN- γ 도 다른 interferon처럼 바이러스의 증식을 억제할 수 있다³⁸⁾. 본 연구에서 補陰免疫丹은 IFN- γ 의 생성을 증가시켰으며(Fig. 4), RNA 및 단백질 수준도 증가시

킨 것(Fig. 5)을 알 수 있었다. 따라서 補陰免疫丹에 의해 생성된 IFN- γ 는 생체내 면역반응의 증강에 주된 역할을 할 것으로 생각된다.

NO는 유도성 산화질소합성효소(inducible NO synthase, iNOS)로부터 guanidine nitrogen을 이용해 합성되며 생체내에서 강력한 활성을 나타낸다. 대식세포로부터 생성된 NO는 박테리아, 기생충, 암 등을 사멸시키는 강력한 활성을 갖는 물질로 주목받고 있고, 암세포 사멸에 관한 최초의 발견은 암세포와 대식세포를 함께 배양했을 때 대식세포를 자극함으로써 암세포가 사멸되는 현상을 통해 밝혀진³³⁾ 생체 방어에 대단히 중요하다. 하지만 본 연구에서 補陰免疫丹은 NO 생성에는 유의성있는 영향을 미치지 못했다(Table 2). 또한 주로 그람음성세균 감염에 의해 세균의 세포막에 있는 내독소(bacterial endotoxin)인 LPS(lipopolysaccharide) 등에 의해 활성화된 림프구에 의해 생성되고, 종양세포에 작용하여 세포고사(apoptosis)를 유도³⁴⁾하기도 하는 TNF- α 는 유의성있게 생성되지 않았다(Table 3). 하지만 TNF- α 는 생체내에서 양면적인 특성을 가지고 있는데, 본 연구에서 補陰免疫丹은 적은 양이지만 TNF- α 생성을 증가시켰다. 이런 결과는 TNF- α 의 소량 생성이 생체내 면역반응에 이로운 역할로 작용할 수 있음을 암시하고 있다.

결론적으로 본 연구에서는 補陰免疫丹이 면역증강과 밀접한 T세포 증식 및 cytokine의 생성을 증가시키는 것을 관찰하였다. 또한 補陰免疫丹이 cytokine의 생성을 촉진하는 것도 발견하여 생체의 면역력 증가에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 장차 더욱더 상세한 기전 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

補陰免疫丹 (BMD)의 면역증강 효과를 알아보기 위해 T세포의 증식과 생존율, Th1 세포로부터 유도되는 IL-2, IFN- γ , TNF- α 및 Th2 세포로부터 유도되는 IL-4의 생성과 NO의 생성에 미치는 영향에 관한

연구를 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 補陰免疫丹은 ³[H]thymidine incorporation과 MTT assay에서 농도의존적으로 T 세포수가 증가하였으며, 1mg/ml의 농도에서 유의성있는 효과를 나타냈다($P<0.05$).
2. 補陰免疫丹 0.1mg/ml와 1mg/ml을 처리한 군에서 IL-2의 수준이 농도의존적으로 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1 mg/ml에서 처리되지 않은 군에 비해 최대 5배 정도의 IL-2 생성 증가를 보였다($P<0.01$).
3. 補陰免疫丹 0.1mg/ml와 1mg/ml을 처리한 군에서 IL-4의 수준이 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1 mg/ml에서 IL-4의 최고 생성량을 보였다($P<0.01$).
4. 補陰免疫丹 0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1mg/ml을 처리한 군 모두에서 IFN- γ 의 생성이 농도의존적으로 유의성있는 증가를 나타냈으며, 補陰免疫丹 1mg/ml을 처리한 군에서 IFN- γ 의 최고 생성량을 보였다($P<0.01$).
5. 補陰免疫丹 1mg/ml을 처리한 군에서 MOLT-4 세포내의 IFN- γ 의 발현 수준을 조사한 결과 IFN- γ 의 mRNA수준과 단백질 수준이 모두 증가하였다.
6. 補陰免疫丹은 IFN- γ 자극으로 priming된 세포에 농도별로 처리하고 48시간 후 대식세포로부터 생성된 NO와 TNF- α 의 양을 측정된 결과 補陰免疫丹은 NO와 TNF- α 생성에 유의성있는 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과들을 종합하면 補陰免疫丹은 면역증강과 밀접한 T세포 증식 및 cytokine의 생성과 발현을 증가시킬 수 있으며 이를 통해 補陰免疫丹이 생체의 면역력 증가에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

감사의 말씀

이 논문은 2002년도 원광대학교 교비지원에 의해 연구됨.

참고문헌

1. 문구, 정병학, 김병주. 암 동서의 결합치료. 익산:원광대학교 출판국. 1999:450-465.
2. 정진호, 김규한, 박경찬, 윤재일, 방형돈, 안필수. 아토피피부염에서 재조합 감마 인터페론의 치료효과. 대한알레르기학회지. 1996;16 (3):291-298.
3. 李淵臺. 最新免疫學. 서울:집문당. 1985:31-35.
4. 김세종. 면역학. 서울:고려의학. 1994:4,12,13,148-150.
5. 김광혁 외. 세포·분자 면역학. 서울:정문각. 1988:30, 31,273,298-302.
6. 홍원식. 黃帝內經 素問. 서울:동양의학연구원. 1981: 11,131,163,285.
7. 홍원식. 黃帝內經 靈樞. 서울:동양의학연구원. 1981: 11,213,317.
8. 황의욱 외. 면역학에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1989;10(1):193-226.
9. 金聖勳. 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 prednisolone으로 유발된 생쥐의 면역반응저하에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1987;2:42-59.
10. 邊文壽. 六味地黃湯 煎湯液의 투여가 마우스의 체액성 및 세포성 면역 반응에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1991.
11. 安在吉. 右歸飲 煎湯液의 투여가 마우스의 선천적 및 후천적 면역 반응에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1991.
12. 유동열, 진천식. 加味升陽湯이 조혈 및 면역조절에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2000;13 (1):402-445.
13. 李漢哲. 蔘苓白朮散 煎湯液 투여가 mouse의 생체 및 시험관내 면역반응에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1992.
14. 元秦喜. 舉元煎이 마우스 및 랫트의 면역반응에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1993.
15. 朴恩貞. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 과민반응 및 면역세포의 기능에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1990.
16. 정진홍, 이충현. 加味大補湯이 면역조절작용에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):225-252.
17. 전국한의과대학 병리학교실. 동의병리학. 서울:일증사. 1998:187-193.
18. 김성훈. 백화사설초로 부터 분리된 항암활성물질에 관한 연구. 대전대학교 한의학연구소논문집. 1996; 4(2):273-297.
19. 노훈정, 문구, 문석재, 원진희, 문영호, 박래길. 백화사설초 메탄올 추출물의 항종양 효과 및 항암 기전에 관한 연구. 대한한방중약학회지. 2000;6(1):81-97.
20. 吳旻哲. 황기 및 당귀의 면역증강작용에 관한 연구. 경희대학교 대학원. 1986.
21. 陣善斗. 황기의 투여가 생체 및 시험관 내에서 면역세포의 기능에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1995.
22. 韓宗鉉. 감초의 면역조절작용에 관한 연구. 전주우석대학교 대학원. 1990.
23. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 1994:169-173,175-177,221-224,229,230,232,277,278,297,298,312,313, 380,381,421,422,425,426,614,615,688.
24. 김창민 외. 국역 중약대사전. 서울:정담. 1998:89-103,233-235,287-290,1159-1168,1648-1657,1660-1663,2179-2189,2215-2228,2254-2256,5095-5103,6513-6525.
25. Dorfman JR, Germain RN. MHC-dependent survival of naive T cells? A complicated answer to a simple question. Microbes Infect. 2002;4(5):547-554.
26. Soltész P, Aleksza M, Antal-Szalmas P, Lakos G, Szegedi G, Kiss E. Plasmapheresis modulates TH1/TH2 imbalance in patients with systemic lupus erythematosus according to measurement of intracytoplasmic cytokines. Autoimmunity. 2002;35(1):51-56.
27. Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(9):6198-6203.
28. Marzo AL, Vezys V, Williams K, Tough DF, Lefrancois L. Tissue-level regulation of Th1 and th2 primary and memory CD4 T cells in response to listeria infection. J Immunol. 2002;168(9):4504-4510.
29. O' Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. Nature Rev Immunol. 2002;2(1):37-45.
30. Chang TT, Stevens SR. Atopic Dermatitis. The Role of Recombinant Interferon-gamma Therapy. Am J Clin Dermatol. 2002;3(3):175-183.
31. Xie QM, Chen JQ, Shen WH, Bian RL. Correlative changes of interferon-gamma and interleukin-4 between cortical layer and pulmonary airway of sensitized rats. Acta Pharmacol Sin. 2002;23(3):248-252.
32. Kiemer A K, Vollmar A M. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory

- mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(3):68-70.
33. Jeong HJ, Koo HN, Oh EY, Chae HJ, Kim HR, Suh SB, Kim CH, Cho KH, Park BR, Park ST, Lee YM, Kim HM. Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor-kappaB activation. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(11):923-933.
34. Altes HK, Wodarz D, Jansen VA. The dual role of CD4 T helper cells in the infection dynamics of HIV and their importance for vaccination. *J Theor Biol.* 2002;214(4):633-646.
35. Curiel RE, Garcia CS, Farooq L, Agüero MF, Espinoza-Delgado I. Bryostatin-1 and IL-2 synergize to induce IFN-gamma expression in human peripheral blood T cells: implications for cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2001;167(9):4828-4837.
36. Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Miller S, Dickinson AM. Expression and production of interleukin 4 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 2001;42(4):689-698.
37. Boothby M, Mora AL, Aronica MA, Youn J, Sheller JR, Goenka S, Stephenson L. IL-4 signaling, gene transcription regulation, and the control of effector T cells. *Immunol Res.* 2001;23(2-3):179-191.
38. Kim KA, Kim S, Chang I, Kim GS, Min YK, Lee MK, Kim KW, Lee MS. IFN gamma/TNF alpha synergism in MHC class II induction: effect of nicotinamide on MHC class II expression but not on islet-cell apoptosis. *Diabetologia.* 2002;45(3):385-393.
39. Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide requires the activation of the transcription factor NF-kB to protect endothelial cells from TNF-alpha mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;5.