

加味歸茸湯이 생쥐의 免疫細胞에 미치는 影響

韓在敬* · 金允姬** · 柳同烈***

* 大田大學校 韓醫科大學 小兒科專攻

** 大田大學校 附屬 韓方病院 小兒科

*** 大田大學校 韓醫科大學

Effect of Kami-Kwiryong-Tang on immune cells in BALB/c Mice

Han Jae-Kyung, O. M. D. and Kim Yun Hee, O. M. D, Ph. D. and Yoo Dong Yeol, O. M. D., Ph. D.

*Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dae Jeon University

The purpose of this research was to investigate the effects of Kami Kwiryong Tang (KKT) on the immune cells in BALB/c mice. KKT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. KKT decreased the proliferation of thymocytes, but did not affect the proliferation of splenocytes. KKT enhanced the subpopulation of Th (CD4+CD8- single positive cells) cells in splenic T-lymphocytes, but decreased the subpopulation of Th cells in thymocytes. KKT enhanced the production of γ -interferon and interleukin-2, but did not affect the production of interleukin-4 in mice serum. KKT did not affect the production of nitric oxide, but enhanced the phagocytic activity in peritoneal macrophages.

These results suggest that KKT is a potent prescription on immune response via the production of cytokines from splenic Th1 cells and the increase of phagocytic activity in vivo.

I. 緒 論

歸茸湯¹⁾은 李가 鹿茸을 酒蒸하고 當歸를 酒浸한 후 各等分 細末하여 烏梅肉으로 和丸하고 精血枯渴 面色黧黑 耳聾 目暗 口乾 多渴 腰痛 脚弱 小便白濁 上

燥下寒 等 諸虛證에 使用할 目的으로 立方하였는데, 許²⁾의 《東醫寶鑑》에서는 歸茸元이라 하여 虛勞에 活用하였다.

加味歸龍湯³⁾의 構成은 歸茸湯¹⁾에 白朮, 黃芪, 人蔘, 龍眼肉, 唐木香, 貢砂仁, 甘草, 神麩, 鷄內金, 生薑, 大棗를 加味한 處方으로 眞陰을 補하여 先天不

足を補하고腎水を滋養하여成長發育을促進시키고脾胃機能을圓滑히하여營養作用과新陳代謝를도와小兒의諸虛弱證을治療할目的으로作方되었다.

小兒의虛證에 대하여陳⁴⁾은“小兒之病虛者十之九實者十之一故藥宜補爲善”이라하여小兒의病은90%가虛證이라하였고,楊⁵⁾은邪氣와正氣와의關係에 대하여病邪가人體內에侵入하여正氣가病邪와 더불어抵抗하면서邪氣와正氣의 힘이公히旺盛할 때를實證이라하고正氣가抵抗하지 못하고虛弱해진狀態를虛證이라하였다.正氣는眞氣와衛氣를包括한 것으로人體生命活動의基本物質이며現代醫學에서 말하는免疫의概念과關聯性을 찾을 수 있다.

면역이란 초기에는 어떤 전염성질환의 재감염에 대한 방어반응 즉 특정한 전염성 질환에 대하여 특이적인 저항성이 부여된 숙주의 능력을 의미하는 것에서 지금에 이르러서는 면역 개념이 확대되어 어떤 종류의 전염성 질환에 대하여 선천적으로 가지고 있는 저항성도 포함시켜서 이를 선천성 혹은 자연면역이라 하여 매우 중요시하고 있으며 면역치료에 있어서도扶正祛邪法을 자주 응용하고 있다⁶⁾.

최근 면역에 대한 실험연구로金⁷⁾은四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 prednisolone으로誘發된 생쥐의免疫反應低下에 미치는影響을,元⁸⁾은補兒湯이免疫反應에 미치는影響을,沈⁹⁾은錢氏白朮散이 생쥐의體液性免疫反應과細胞性免疫反應에 미치는影響을報告하였으나,加味歸茸湯이免疫細胞에 미치는 영향에 관한 보고는 아직 접하지 못하였다.

이에著者は臨床에서小兒의虛弱體質에多用되고 있는加味歸茸湯이免疫系를 조절하는지의與否를 관찰하기 위해,生體에서免疫系를 조절하는 중요한 세포인,胸腺세포(thymocytes), 비장세포(splenocytes) 및 대식세포(macrophages)에 대한 작

용을 관찰하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

本實驗에使用한 생쥐는8週齡 BALB/c系 수컷을大韓實驗動物에서購入하여,溫度 20±2 oC, 濕度 50±5%, dark/light 12時間의條件下에서1週日以上實驗室에適應시킨 후使用하였으며,固形飼料과 물을자유스럽게攝取하도록하였다.

2) 試藥 및 器具

實驗에使用한試藥은Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS), γ -interferon(γ -IFN), lucigenin, MTT, zymosan, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine·2HCl은Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin은Gibco Co., mouse γ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2(IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는Dainippon seiyaku Co. 등을使用하였으며, 기타試藥은cell culture用 및 1級試藥을使用하였다. 使用機具는culture flask(Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader(Dynatech MR5000), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus(ILSIN), flow cytometer(Coulter

EPICS-XL), luminometer(Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

本實驗에 使用한 加味歸茸湯의 構成은 《大田大學校 附屬韓方病院 處方集》³⁾에 準하였으며, 使用한 藥材들은 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選하여 使用하였고 그 內容과 分量은 다음과 같다.

加味歸茸湯(Kami-Kwiryoung-Tang)의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量(g)
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	8
黃 耆	<i>Astragali Radix</i>	8
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	8
人 蔘	<i>Ginseng Radix Alba</i>	6
龍眼肉	<i>Longanae Arillus</i>	6
木 香	<i>Saussureae Radix</i>	4
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
神 麩	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	4
鷄內金	<i>Galli Stomachichum Corium</i>	4
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	12
大 棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	8
鹿 茸	<i>Cornu Cervi Parum</i>	3
合 計		79

處方 3貼 分量을 증류수 2,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 餘液을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 57.5 g(수득율 24.3%)을 얻어(以下 KKT라 칭함), 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

2) 胸선세포, 비장세포 및 대식세포 분리

생쥐의 胸선세포 및 비장세포 분리는 Wysocki¹⁰⁾ 및 Mizel¹¹⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1 군으로 하여 KKT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적절한 胸선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), 胸선세포 및 비장세포 부유액으로 하였다.

대식세포의 분리는 KKT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여하는 과정중에서 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 注入하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ 배양기(incubator)에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 대식세포를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 胸선세포, 비장세포 및 대식세포는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

3) 胸선세포 및 비장세포의 증식능 측정

분리한 胸선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 KKT의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann¹²⁾이 개발하여 Kotnik 등¹³⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 胸선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1.2x10⁶ cells/ml 농도로 분주하여 胸선세포는 concanavalin A(Con A)

5 $\mu\text{g/ml}$ 를, 비장세포는 lipopolysaccharide(LPS) 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 후, 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl 를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

4) 흉선세포 및 비장세포의 subpopulation 측정

분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 세포의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B 세포의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm(FITC), 575 nm(PE))로 subpopulation을 측정하였다¹⁴⁾.

5) 혈청 중 Cytokines 측정

생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 KKT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐의 심장으로부터 혈액을 채취하여 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 혈청 50 μl 를 취하여 각각의 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 혈청 50 μl 에 assay diluent 50 μl 를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 배양한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 μl 를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회

세척하고 substrate solution 100 μl 를 혼합하여 30 분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μl 를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

6) 복강 대식세포로부터 nitric oxide(NO) 생성량 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells을 분주한 후 macrophage로부터 생성되는 NO의 양을 Griess법¹⁵⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100 μl 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylendiamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μl 를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37°C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂-의 농도를 환산하였다.

7) 복강 대식세포의 식균작용 (phagocytic activity) 측정

분리한 macrophage를 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 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정하였다^{16,17)}. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 대식세포 부유액 50 μl 와 lucigenin 용액 50 μl 및 zymosan 용액 30 μl 를 첨가하여 최종 volume이 200 μl 가 되도록

한 후 넣고 37°C에서 15분간 전처리한 후 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과들은 Mean±SE로 나타내었고 통계 처리는 student t-test를 실시하여 P(0.05)를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 加味歸茸湯 (KKT)이 흉선세포 및 비장 세포의 증식에 미치는 효과

대조군의 흉선세포에 concanavalin A(Con A)를 처

리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 72.4±1.7%로 감소하였으며, KKT를 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 93.0±1.2%로, Con A를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 63.5±1.3%로 대조군에 비해 감소하였다 (Table I).

대조군의 비장세포에 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 75.8±1.4%로 감소하였으며, KKT를 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 98.3±1.7%로, LPS를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 74.3±2.1%로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table II).

Table I. Effect of Kami-Kwiryong-Tang Water Extract (KKT) on the Proliferation of Murine Thymocytes

Samples	Cell Proliferation (%)	
	Treated of Concanavalin A	Non-treated of Concanavalin A
Control	100.0±1.1	72.4±1.7
KKT	93.0±1.2*	63.5±1.3*

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A. The data represents the mean±SE of 5 mice. *; Significantly different from control group ($p < 0.05$).

Table II. Effect of KKT on the Proliferation of Murine Splenocytes

Samples	Cell Proliferation (%)	
	Treated of Lipopolysaccharide	Non-treated of Lipopolysaccharide
Control	100.0±1.5	75.8±1.4
KKT	98.3±1.7	74.3±2.1

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide. The data represents the mean±SE of 5 mice.

2. KKT가 흉선세포 및 비장세포의 sub-population에 미치는 효과

대조군의 흉선세포 중 CD4 single positive(CD4⁺) 세포는 11.5±0.3% 이었으며, CD8 single positive(CD8⁺) 세포는 2.7±0.3%이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 흉선세포의 CD4⁺ 세포는 10.5±0.4%로 대조군과 별 차이가 없었으나, CD8⁺ 세포는 1.5±0.2%로 대조군에 비해 감소하였다 (Table III).

대조군의 비장세포 중 Thy1 positive 세포(Thy1⁺)는 39.7±1.6% 이었으며, B220 positive 세포(B220⁺) 세포는 23.2±1.4% 이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 비장세포 중 Thy1⁺ 세포는 43.0±1.2%로 B220⁺ 세포는 21.6±1.2%로 대조군과 별 차이가 없었다. 한편 비장 T 림프구 중 대조군의 CD4⁺ 세포는 13.8±1.3%, CD8⁺ 세포는 3.7±0.2% 이었으나, KKT를 투여하고 분리한 생쥐 비장 T 림프구 중 CD4⁺ 세포는 17.7±1.0%로 대조군에 비해 증가하였으나, CD8⁺ 세포는 3.9±0.2%로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table IV).

Table III. Effect of KKT on the Subpopulation of Murine Thymocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)	
	CD4+	CD8+
Control	11.5±0.3	2.7±0.3
KKT	10.5±0.4	1.5±0.2*

KKT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 oC. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (p<0.05).

Table IV. Effect of KKT on the Subpopulation of Murine Splenocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	Thy1+	B220+	CD4+	CD8+
Control	39.7±1.6	23.2±1.4	13.8±1.3	3.7±0.2
KKT	43.0±1.2	21.6±1.2	17.7±1.0*	3.9±0.2

KKT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 oC. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (p<0.05).

3. KKT가 혈청 중 Cytokines의 분비에 미치는 효과

대조군의 혈청 중 γ -interferon 및 interleukin-2의 양은 각각 32.7 ± 3.9 및 45.6 ± 3.5 pg/ml 이었으나, KKT를 투여한 군은 52.7 ± 3.6 , 60.5 ± 4.2 로 대조군에 비해 증가하였으며, interleukin-4의 양은 대조군에서 45.2 ± 1.0 pg/ml 이었으며 KKT를 투여한 군은 44.0 ± 3.8 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table V).

4. KKT가 복강 대식세포로부터 NO의 생성에 미치는 효과

대조군의 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 생성량은 24 시간 후에 1.2 ± 0.2 μ M

이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 생성량은 12.1 ± 0.2 μ M로 증가하였다. KKT를 투여하고 분리한 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 11.3 ± 0.3 μ M로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table VI).

5. KKT가 복강 대식세포의 식균작용에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 식작용이 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 대조군의 대식세포로부터 생성되는 CL의 양 보다 KKT를 투여하고 분리한 대식세포에서 생성되는 CL 양이 증가하였다(Fig.1).

Table V. Effect of KKT on the Production of Cytokines in Mice Serum

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	32.7 ± 3.9	45.6 ± 3.5	45.2 ± 1.0
KKT	$52.7 \pm 3.6^{**}$	$60.5 \pm 4.2^*$	44.0 ± 3.8

KKT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the production of cytokines was determined in separated serum with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *Significantly different from control group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

Table VI. The Production of Nitric Oxide from Peritoneal Macrophages in KKT-administered Mice

Samples	Nitric oxide (μ M)
Control	12.1 ± 0.2
KKT	11.3 ± 0.3

KKT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI1640 media in the presence LPS and γ -interferon.

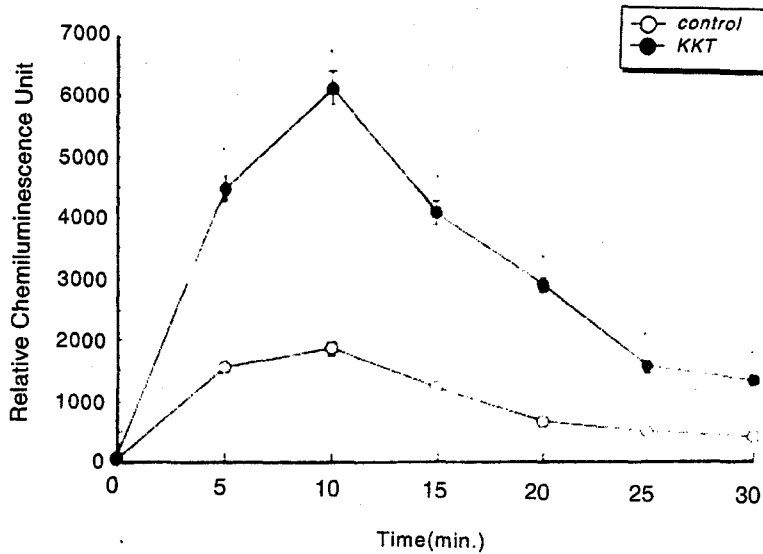


Fig. 1. Effect of KKT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages.

KKT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th days. Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured in DME media (without phenol red) containing opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 30 min. Other procedures were described as detailed in the materials and method section. Each point represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

VI. 考 察

歸茸湯¹⁾은 李가 鹿茸을 酒蒸하고 當歸를 酒浸한 후 各 等分 細末하여 烏梅肉으로 和丸하고 精血枯渴 面色黧黑 耳聾 目暗 口乾 多渴 腰痛 脚弱 小便白濁 上燥 下寒 等 諸虛證에 使用할 목적으로 立方하였는데, 許²⁾의 《東醫寶鑑》에서는 歸茸元이라 하여 虛勞에

活用하였다.

加味歸龍湯³⁾의 構成은 補氣血, 補虛損하는 鹿茸과 養血하는 當歸를 合劑한 歸茸湯¹⁾에 白朮, 黃芪, 人蔘, 龍眼肉, 唐木香, 貢砂仁, 甘草, 神麩, 鷄內金, 生薑, 大棗를 加味한 處方으로 眞陰을 補하여 先天不足을 補하고 腎水를 滋養하여 成長 發育을 促進시키고 脾胃機能을 圓滑히 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 小兒의 諸虛弱證을 治療할 목적으로 作方되었

다.

小兒의 虛證에 대하여 陳⁴⁾은 “小兒之病 虛者十之九 實者十一 故 藥宜補爲善”이라 하여 小兒의 病은 90%가 虛證이라 하였고, 楊⁵⁾은 邪氣와 正氣와의 關係에 대하여 病邪가 人體內에 侵入하여 正氣가 病邪로 더불어 抵抗하면서 邪氣와 正氣의 힘이 公히 旺盛할 때를 實證이라 하고 正氣가 抵抗하지 못하고 虛弱해진 狀態를 虛證이라 하였으며, 《靈樞》〈百病始生篇〉¹⁹⁾에서는 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”이라 하고, 《素問》〈評熱病論〉¹⁹⁾에서는 “邪之所湊 其氣必虛”이라 하여 韓醫學에서는 疾病의 發生과 進展을 人體의 正氣와 發病因子인 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 過程으로 發病의 成立過程에서 그 關鍵은 致病素因인 邪氣라기 보다는 오히려 防禦 因子인 正氣에 달려 있어서 精氣의 虛損을 더욱 重視하였다. 이는 現代 免疫學에서 自然抵抗性을 重要視하는 것과 一致한다고 볼 수 있으며^{20,21)}, 《素問》〈刺法論〉¹⁹⁾에서는 “正氣存內 邪不可干”이라 하였는데 이때 正氣란 臟腑, 經絡, 營衛, 氣血의 正常生理機能을 包括한 人體內의 모든 抗病能力을 뜻하며 正常免疫機能의 概念과 有關하다²²⁾. 이는 章²³⁾의 虛證과 實證 病人의 免疫狀態에 대한 報告에서 正氣가 虛한 患者의 免疫機能이 低下되어 있음을 나타낸 것과 相通한다고 볼 수 있다. 正氣의 生成과 分布는 脾, 肺, 腎 三臟과 有關하므로 脾, 肺, 腎은 免疫과 關聯된다고 볼 수 있는데²⁴⁾, 先天之氣는 元氣에 屬하며 元氣는 腎에 藏하여 生命活動의 原動力이 되며, 穀氣는 水穀之氣로서 水穀은 胃의 納氣作用과 脾의 運化作用으로 營衛氣血을 化生하므로 脾肺腎과 免疫과는 密接한 位置에 있는데 그 중에서 根本이 되는 것은 腎이라고 볼 수 있으며 腎陽腎陰으로 하여금 全身의 陰陽을 滋助하고 調節하며 平衡機能을 圖謀하는 것이 곧 免疫機能의 調節이 되게 하고 있는 것이다. 脾는 水穀精微를 運化하여 氣血營衛의 바탕으로 後天의 根本이 된

다. 한편 肺는 皮毛를 主管하는데 皮毛란 皮膚 粘膜 肌肉 汗腺 毛髮 등을 包括하여 外邪의 侵入經路가 되므로 防禦機關이 된다. 그러므로 이 三臟의 虛實 如何에 따라 免疫機能이 左右될 수 있다²⁵⁾.

또한 《黃帝內經》¹⁹⁾에서 “不治已病 治未病”이라 하여 疾病除去의 意味뿐만 아니라 豫防을 爲主로 하는 思想을 內包하는 것과 關聯지을 수 있는데, 이는 現代 醫學에서 말하는 免疫의 概念과 關聯性을 찾을 수 있다.

加味歸茸湯³⁾을 構成하는 個別藥物 및 效能을 살펴 보면 鹿茸은 溫, 甘鹹하여 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨, 當歸는 溫, 甘辛하여 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸, 白朮은 溫, 苦甘하여 補脾, 益胃, 燥濕, 和中, 黃芪는 溫, 甘하여 生用時에는 益衛固表, 利水消腫, 托毒, 生肌, 炙用時에는 補中益氣, 人蔘은 微溫, 甘微苦하여 大補元氣, 固脫生津, 安神, 龍眼肉은 溫, 甘하여 補益心脾, 養血安神, 木香은 溫, 辛苦하여 行氣止痛, 溫中和胃, 砂仁은 溫, 辛하여 化濕開胃, 溫脾止瀉, 理氣安胎, 甘草는 平, 甘하여 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥, 神麩은 溫, 甘辛하여 健脾和胃, 消食調中, 鷄內金은 平, 甘하여 消積滯, 健脾胃, 生薑은 溫, 辛하여 解表散寒, 溫中止嘔, 化痰止咳, 大棗는 溫, 甘하여 補脾和胃, 益氣生津, 調營衛, 解諸毒하는 效能이 있다²⁶⁾.

以上에서 살펴 본 바와 같이 加味歸茸湯은 全體의 眞陰을 補하여 先天不足을 補하고 腎水를 滋養하여 小兒의 成長 發育을 促進시키고 脾胃機能을 圓滑히 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 生氣를 만들어 免疫機能을 키워주는 方劑라고 思料된다.

면역이란 초기에는 어떤 전염성질환의 재감염에 대한 방어반응 즉 특정한 전염성 질환에 대하여 특이적인 저항성이 부여된 숙주의 능력을 의미하는 것에서 지금에 이르러서는 면역 개념이 확대되어 어떤 종류의 전염성 질환에 대하여 선천적으로 가지고 있

는 저항성도 포함시켜서 이를 선천성 혹은 자연면역이라 하여 매우 중요시하고 있으며 면역치료가 있어서도 扶正祛邪法을 자주 응용하고 있다⁶⁾.

면역이란 생체가 자기와 비자기를 식별하는 기구로써 외부로부터 침입하는 각종 미생물, 동종의 조직, 체내에 생긴 불필요한 산물들과 특이하게 반응하여 항체를 만들고 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이며, 면역반응이란 비자기를 항원으로 인식하고 특이하게 항체를 생산하여 이에 대처하고 처리하는 연쇄적인 반응을 말한다²⁷⁾.

생체의 면역반응은 대식세포가 관련된 비특이적인 선천성 면역 (non-specific immunity)과 T 및 B 림프구가 관련된 특이적인 후천성 면역 (specific immunity)의 두가지로 분류되는데, 후천성 면역이 면역의 실체로써 특이성, 다양성, 기억작용, 자가조절 및 이물질에 대한 인지작용의 특성을 갖고 있다²⁸⁾.

이러한 면역반응에 관여하는 세포중, T 림프구는 흉선에서 유래하여 세포면역반응을 매개하며 면역반응을 조절하는데 표면 항원에 따라 Ts(억제), Th(조력), Te(작용), Tc(세포독성) 등으로 나뉘고 CD4⁺Th를 cytokine분비 유형에 따라 Th1과 Th2로 나누며, B 림프구도 T 림프구처럼 골수내에서 주위 세포들과의 상호작용을 통해 자기와 비자기를 구별할 수 있는 성숙 B세포로 분화하여 말초로 배출되며, 한편 대식세포는 세포매개성 면역반응에 중요한 구성세포로 T 림프구에 항원을 제공하여 활성화시키고 Th1에 의해 조절받는다.

이러한 면역반응은 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나누어지는데, 체액성 면역반응은 세균을 둘러싸서 식균작용을 하도록 도와주고 세균독소와 결합하는 항체를 생산하여 혈액 및 기타 혈액중으로 방출하는 반응으로 항원특이적인 항체에 의해서 이루어지고 세포보다는 혈청내에 존재하고 이러한 항

체는 T 림프구의 도움을 받아 B 림프구에 의해 생산되며, 세포성 면역반응은 세균내의 증식성 미생물을 방어하는 감작임파구를 만드는 반응으로 주로 T 림프구에 의하여 이루어지며 경우에 따라서는 T 림프구도 B 림프구도 아닌 임파구, 다형핵백혈구, 대식세포 등에 의하여 이루어진다²⁹⁾.

면역반응은 병원성 항균에 대한 생체의 방어기전에 중요한 수단일 수도 있지만 이러한 면역반응으로 인하여 때로는 생체에 해로운 질병을 일으킬 수도 있다. 즉 면역반응의 결과가 숙주에 대해서 유익한 때를 면역성이라고 하고 유해한 때를 과민성 혹은 알레르기라고 한다³⁰⁾.

면역질환의 치료에 있어서도 면역부족질환은 扶正法을 주로하여 正充邪自祛하고 면역과반응은 祛邪法을 주로 하여 祛邪正自安시키되 扶正과 祛邪의 비율을 적절히 응용하여 扶正하되 留邪시키지 않고 祛邪하되 傷正하지 않도록 하여야 하며³¹⁾, 생체내에서 병원소에 대한 방어작용을 생체의 항상성을 유지하여 저항력을 증강시켜주는 것이 면역계³²⁾라고 할 때 小兒 補氣血劑에 속하는 加味歸龍湯은 면역기능 증진효과에 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 KKT를 투여하였을 때 흉선세포의 세포생존율은 감소되었으나, 비장세포의 세포생존율은 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과는 KKT가 흉선세포에 의한 면역반응을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

흉선세포는 흉선의 피질 및 수질에서 증식 및 분화 과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, 분화된 Th1 세포는 γ -interferon (γ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 분비하여 다른 T 림프구, B 림프구 및 대식세포의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T 림프구는 종양 세포(tumor cell)의 용해(lysis)를 일으키

며 대식세포를 활성화시킨다³³⁾.

대조군의 흉선세포 중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 11.5%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 2.7%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4⁺CD8⁻ cells 은 약 12%, CD4⁻CD8⁺ cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며³⁴⁾, KKT 투여시 Tc 세포는 대조군에 비해 감소하였다.

대조군의 흉선세포 중 T 림프구 (Thy1 positive cell) 및 B 림프구 (B220 positive cell)는 39.7% 및 23.2% 이었으며, KKT 투여시 대조군과 별 차이가 없었으나, 비장 T 림프구 중 Th 세포는 KKT 투여시 증가되었다. 이 결과는 KKT가 생체에 투여되었을 때 흉선세포 중 Tc 세포의 population은 감소시키나, 비장 T 림프구 중 Th 세포의 population은 증가시켜 비장세포에 의한 면역반응을 조절할 수 있음을 시사하는 것이다. KKT 투여시 Th 세포가 흉선세포에서는 대조군에 비해 변화가 없었으나, 비장 T 림프구 중 Th 세포의 population이 증가되었다는 것은 KKT가 T 림프구 분화시 Th 세포로의 분화를 촉진하고 있음을 시사하는 것이다.

Cytokine은 세포간 의사소통의 필수적인 전달물질로서 바이러스의 감염, 염증반응, 면역성 및 혈구세포의 형성과정등 많은 생물학적 과정에 중요한 역할을 수행하는 세포활성물질을 말한다³⁵⁾.

혈청 중 Th1 세포에서 분비되는 cytokine인 γ -IFN과 IL-2를 Th2 세포에서 분비되는 IL-4의 양을 측정된 결과 KKT 투여시 Th1 세포로부터 분비되는 cytokine 양이 대조군에 비해 증가하였으나, Th2 세포에서 분비되는 IL-4의 양은 변화가 없었다. 이 결과는 흉선세포의 Th 세포는 변화가 없었으나, 비장 T 림프구의 Th 세포는 증가하였다는 앞의 실험 결과와 비교할 때 이들 Th 세포에서 분비되는 cytokines의 증가는 비장 T 림프구의 Th 세포의 증가에 기인된 것이라 추정되지만 자세한 기전은 추후 연구되어

야 할 것이다.

Nitric oxide(NO)는 T 림프구가 생성하는 cytokine을 조절하며, in vivo에서 T 림프구의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다³⁶⁾. 또한 NO는 helper T 림프구의 증식을 억제하며³⁷⁾ 자기 면역계를 억제하는 것으로 보고³⁸⁾되었다. 본 실험에서 KKT 투여시 대조군에 비해 NO 양이 변화되지 않았다. 이러한 결과는 KKT에 의한 흉선세포의 증식이 억제되고 비장 T 림프구 중 Th 세포의 population이 증가된 현상에 NO가 관여하고 있지 않음을 시사하는 것이다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 대식세포가 활성화되어 식작용이 촉진된다. 이러한 식작용은 다형핵성 백혈구 (polymorphonuclear leukocytes)에서도 일어난다. 식작용은 면역적인 측면에서 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 대식세포의 식균 작용을 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 대식세포가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 식균 작용이 진행되는 것을 확인하는 것이다³⁹⁾. 대식세포로부터 생성되는 chemiluminescence(CL)를 측정된 결과 KKT 투여에 의해 CL 양이 증가하였다. NO는 활성화된 대식세포의 위족(pseudopodia) 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾. 본 실험에서 KKT가 NO 생성에 변화를 주지 않고 식균 작용을 증가시켰다는 결과는 KKT가 대식세포의 식균 작용을 증가시키는데 NO가 아닌 다른 물질이 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과 KKT는 생체에 투여되었을 때, 비장 T 림프구의 Th1 세포로부터 cytokine의 분비를

촉진함과 동시에 대식세포의 식균작용을 촉진하는 면역증강작용이 있다고 사료된다.

V. 結 論

加味歸茸湯 (KKT)을 투여한 생쥐의 면역세포 변화는 다음과 같다.

1. 흉선세포의 세포생존율은 감소하였으나, 비장세포의 세포생존율은 변화가 없었다.
2. 흉선세포 중 Tc 세포의 population은 감소하였다.
3. 비장 T 림프구 중 Th 세포의 population은 증가하였다.
4. 혈청 중 γ -IFN, IL-2의 양은 증가하였으나, IL-4의 양은 변화가 없었다.
5. 복강 대식세포로부터 생성되는 NO의 양에는 변화가 없었다.
6. 복강 대식세포의 식균 작용은 증가하였다.

이상의 실험결과 加味歸茸湯은 비장 T 림프구의 Th1 세포로부터 cytokine의 분비를 촉진함과 동시에 대식세포의 식작용을 촉진하는 면역증강작용이 있는 약물이라 사료된다.

參 考 文 獻

1. 李 槌 : 醫學入門. 서울, 翰成社, pp.195-197, p.524. 1980.

2. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.448, 1972.
3. 大田大學校 韓方病院 : 韓方病院 處方集, 大田, 韓國出版社, p.371, 1992.
4. 陳士澤 : 石室秘錄, 서울, 杏林書院, p.164, 1973.
5. 楊維傑 : 黃帝內經素問, 서울, 成輔社, p.235, 1980.
6. 金德鎬 : 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 第6卷 第2號, pp.55-63, 1985.
7. 金聖勳 : 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 東醫 病理學會誌, pp.42-52, 1987.
8. 元鐘勳 : 補兒湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 서울, 大韓韓方小兒科學會誌 卷七5號, p.13, 19, 21, 1986.
9. 沈文敬 : 錢氏白朮散이 생쥐의 體液性 免疫反應과 細胞性 免疫反應에 미치는 效果, 서울, 大韓韓方小兒科學會誌, 卷八, p.39-58, 1994.
10. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2844, 1978.
11. 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.
12. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.* 65, 55-63, 1983.
13. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine

- hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*. 129, 23, 1990.
14. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873-879, 1994.
 15. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9), 3280, 1991.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Breheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 45, 1, 1984.
 19. 洪元植編 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, p.37, 55, 57, 61, 69, 78, 82, 87, 122, 137, 169, 213, 249, 256, 292, 326, 336, 340, pp.118-119, 304-305, 318-319, 347-348, 1981.
 20. 趙鍾寬 : 免疫에 관한 東洋醫學의 考察, 東洋醫學, 12(1) :20, 1986.
 21. 嚴宗正 : 正邪論新釋, 新中醫, 6 :5-6, 1984.
 22. 傅芳 : 中醫免疫思想及成就, 中醫雜誌, 北京, 11 : 55-57, 1984.
 23. 章育正 等 : 實驗研究 虛證和實證病因의 免疫狀態, 中醫藥雜誌, 上海, 6 : 44-46, 1984.
 24. 金完熙 等 : 臟腑辨證論治, 成輔社, 서울, pp.50-55, 1985.
 25. 具本泓 : 免疫과 알레르기, 大韓韓醫學會誌, 11(2) : 9-10, 1990.
 26. 康秉秀 外 : 本草學, 서울, 永林社, pp.545-546, 578-580, 536-537, 534-536, 531-533, 585-586, 353-354, 294-296, 540-541, 370-371, 374-375, 542-543, 136-137, 1991.
 27. 李文鎬 : 內科學, 서울, 금강출판사, pp.167-168, 1989-1999, 1979.
 28. 李文憲 編著 : 新編實用鍼灸學, 香港藝美圖書公司, p.118, 1970.
 29. 李淵台 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, p.1, 76, 81, pp.52-53, 1985.
 30. 李文鎬 : 內科學, 서울, 금강출판사, pp.167-168, 1979.
 31. 蔡禹錫 : 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察, 서울, 大韓韓醫學會誌 第11卷 第2號, pp.54-58, 1990.
 32. 元鐘勳 : 補兒湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 서울, 大韓韓方小兒科學會誌 卷七 5號, p.13, 19, 21, 1986.
 33. 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.
 34. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.
 35. Cohen, S : The role of cell-mediated immunity in the induction of inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 88: 502-509, 1977.

36. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W.: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Instit.*, 84(11), 828-831, 1992.
37. Okkuda, Y., Sakada, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T.: Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. *Immunology Letters*, 52, 135, 1996
38. Albina, J.E., Abate, J.A. and Henry, W.L.: Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. *J. Immunol.*, 147(1), 144-148, 1991
39. 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
40. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.* 18, 635-644, 1996