

十全大補湯加味方の 免疫調節效果에 관한 實驗的 研究

林東注 · 金東熙*

Abstract

Immunomodulatory effects of Kamishipjundaebotang(KSDBT)

Lim Dong-joo O.M.D., Kim Dong-hee O.M.D., Ph.D.

Dept of Oriental Medicine Pathology,

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

This study was done to evaluate the immunomodulatory effects of KSDBT. KSDBT significantly enhanced the lymphocyte proliferation through 3H thymidine uptake and also increased T and T helper cell. It upregulated IL-2, IL-12(p35, p40) and INF- γ . NO and carbon clearance were significantly increased by KSDBT. These results indicate KSDBT exert antitumor activity by immunomodulation of cytokines.

I. 緒論

老化란 人間の 生成과 成長 및 成熟 過程 後 形態的, 機械的으로 衰退하여 死亡에 歸着되는 生理的인 現象^{1,2)}으로 免疫能 減少와 더불어 이루어짐으로써 多様な 疾病의 基本 培地를 提供하게 된다.

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機構으로써 外部로부터 侵入하는 各種 微生物, 同種의 組織, 體內에 생긴 不必要한 産物들과 特異하게 反應하여 抗體를 만들고 이것을 排除하여 그 個體의 恒常性을 維持하는 現象^{3,4)}인데, 韓醫學에서는 이러한 免疫 概念이 元氣, 原氣, 眞氣로 指稱되는 正氣와 六淫 및 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 發病

因子間의 相爭過程으로 說明^{5,6)}되어지고 있다.

最近 複雜한 社會 構造로 인한 스트레스, 飲酒, 過勞와 有害性 化學物質로 인하여, 상기한 免疫機能의 低下로 많은 疾病이 發生하고, 特히 難治性 疾患의 發生이 急速히 增加되고 있어 社會 問題로 까지 擡頭되고 있다⁷⁾.

이에 本 研究는 現在 豫防的 次元에서 免疫을 增強시켜 疾病 發生을 未然에 防止함으로써, 國民 健康에 寄與할 수 있는 韓方 處方 開發을 위해, 民間 및 臨床에서 가장 많이 이용되고 生脈散과 十全大補湯을 合方한 후, 人蔘을 紅蔘으로 代用하고 桑寄生을 가하여 이들의 免疫 調節作用을 實驗的으로 糾明하고자 하였다.

* 大田大學校 韓醫科大學 病理學教室

II. 研究內容 및 方法

1. 材料

1) 動物

動物은 雄性 4주령의 BALB/c 및 20개월 된 Sprague-Dawley계(SD) 雌性 白鼠를 使用하였으며, 實驗 當日까지 固形飼料(조단백질 22.1%이하, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%, 인 0.4%이상, 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 充分히 供給하고 室溫 22±2 ℃, 相對濕度 50±10%, 照明 時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300 Lux로 設定하여 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 藥物

本 實驗에 使用한 藥物은 大田大學校 附屬韓方 病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였고, 紅蔘은 正官藏을 使用하였다.

□ Prescription of KSDBT □

| 藥物名 | 生 藥 名 | 用量(g) |
|-----|---|-------|
| 黃 芪 | <i>Astragali Radix</i> | 6 |
| 白 朮 | <i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i> | 6 |
| 紅 蔘 | <i>Ginseng Radix</i> | 6 |
| 白茯苓 | <i>Poria</i> | 6 |
| 甘 草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 6 |
| 熟地黃 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 6 |
| 當 歸 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 6 |
| 川 芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 6 |
| 白芍藥 | <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 6 |
| 肉 桂 | <i>Cinnamomi Cortex</i> | 6 |
| 麥門冬 | <i>Liriopsis Tuber</i> | 4 |
| 五味子 | <i>Schizandrae Fructus</i> | 4 |
| 桑寄生 | <i>Taxilli Ramulus</i> | 6 |
| 生 薑 | <i>Zingiberis Rhizoma Recens</i> | |
| 大 棗 | <i>Jujubae Fructus</i> | |
| 總 量 | | 74 |

3) 試藥 및 機器

試藥은 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS), sodium dodecyl sulfate (SDS), penicillin-streptomycin, sodium hydroxide, formaldehyde, lysophosphatidic acid, trypan blue,

phenol red, sodium azide 및 isopropanol 등은 Sigma 製品, ethanol, HCl은 Merck 製品, sodium bicarbonate는 Gibco 製品, acetic acid는 Glicial 製品을 使用하였다. 抗酸化 試藥으로 2-thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA), 5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), hydrogen peroxide (H₂O₂), ethylene-diaminetetraacetic acid(EDTA), chloroform, hematoxylin, potassium phosphate monobasic(KH₂PO₄), potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄) 등은 Sigma社(Sigma Chem. Co., U.S.A.), ferric sulfate(FeSO₄), batanol, sulfosalicylic acid는 Junsei社(Junsei Chem. Co., Japan), glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT), glutamate-pyruvate transaminase (GPT), alkaline phosphatase(ALP) 測定 kit은 Hitachi社(Hitachi Co., Japan)로부터 購入하여 使用하였다. Proliferation assay에 使用된 ³H- Thymidine은 Amersham社에서 購入하였다.

機器는 CO₂ incubator (Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench (Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge (Beckman Co.,GS-6R), inverted microscope (Nikon Co, Japan), bright microscope (UFX-DX, Nikon), liner accelerator (Varian Co, U.S.A.), ELISA-reader (Emax, U.S.A), FACScalliber (Becton dickin son, U.S.A), rotary vaccum evaporator (Büchi 461), autoclave (Hirayama, Japan), micro-pipet (Gilson, U.S.A), autostill WG25 (Japan), titer plate shaker (Labline Inst., U.S.A) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

十全大補湯加味方(KSDBT) 2첩에 蒸溜水 1,500 ml을 添加하여 熱湯 抽出器에서 3時間 동안 抽出하여 抽出液을 얻고, 이를 吸入 濾過하여 濾液을 減壓蒸溜裝置(Rotary evaporator, Buchi 461, switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, FDU-540, Eyela, USA)를 이용하여 完全 乾燥하여 冷凍 保管하였으며, 實驗에 適當 溫度로 溶液을 製造하여 使用하였다.

2) 脾臟細胞 培養

脾臟細胞를 分離하고 RPMI 배지를 添加하여 細胞懸濁液을 만들었다. 이 懸濁液을 4℃에서 10 분간 靜置한 후 上層液을 취하고 3회 水洗하여 組織切片과 細胞 덩어리를 除去하고, 이를 10ml의 cold RPMI 배지에 懸濁시켰다. 이 懸濁液을 ficoll (Pharmacia) 溶液 3ml 위에 가볍게 올려놓고, 2,000 r.p.m 에서 20분간 遠心分離하여, ficoll 溶液 層 위에 걸려 있는 細胞를 回收하여 培地로 3회 水洗 後 細胞 數字를 計算하였다. 이 脾臟 細胞를 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cells씩 添加하고, 檢液과 Con A를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37℃에서 48時間 培養하였다.

3) 淋巴球의 增殖反應 測定⁸⁾

檢液과 mitogen 등을 處理한 細胞의 增殖程度를 測定하기 위하여 各 群의 生쥐의 脾臟細胞를 96 well plate의 각 well에 5×10^5 cell씩 添加하고, 檢液과 Con A를 濃度別로 處理한 後 細胞를 37℃에서 48시간 培養 後 50uCi/ml의 [methyl -3H] Thymidine 을 添加하고 다시 18時間 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線 同位元素의 量을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集器(Cell harvester)를 使用하여 유리섬유 여지(Glass microfiber filter, Whatman)위에 捕獲하고 乾燥한 후 放射線 測程器(Liquid scintillation counter)를 使用하여 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

4) 流細胞 螢光分析器(FACS)를 이용한 免疫 調節作用 分析

(1) 脾臟 淋巴球 懸濁液 造製

BALB/c mouse를 cervical dislocation으로 致死시킨 후 脾臟을 摘出하고 Scheme 1, 2에서와 같이 脾臟 淋巴球 懸濁液을 製造하였다. 細胞 處理 및 螢光染色用 緩衝液으로는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어 있지 않은 staining buffer를 사용하였다. 摘出한 脾臟을 100 mesh (sigma)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 組織을 粉碎하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson)에 옮겨 약 5분간 放置하여 組織 덩어리를 沈澱시킨 후 上

層液을 取해 2회 洗滌하고 0.83 % NH_4Cl 溶液을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 溶血시켰다. 다시 2회 洗滌하고 RPMI 1640-2% FBS(Sigma) 로 5×10^6 cells/ml가 되도록 稀釋하였다.

(2) 免疫 螢光染色 (immunofluorescence staining)

免疫 螢光染色은 全 過程을 0-4 ℃에서 실시하였고, 培養한 脾臟 細胞를 回收하여 PBS로 3회 洗滌한 후 5ml FACS tube (Becton Dickinson, U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 遠心分離(1300 r.p.m, 5min)하였다. 各 各의 1 차 抗體 culture sup.을 100 μ l 씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 얼음에서 反應시켰다. 使用한 1차 抗體는 3회 洗滌 後, fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat IgF(ab)₂ fragment 1:100 (Tago, U.S.A) 稀釋液 50 μ l을 가하여 40분간 反應시키고, 3회 洗滌 後 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACS can(Becton dickinson, U.S.A)으로 分析하였다.

(3) 免疫細胞 分析

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer 에 부유시켜 FACS-can(Becton dickinson, U.S.A)을 利用하여 분석하였다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며, consort 30 프로그램을 利用하여 분석하였다. data의 분석은 forward scatter (FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 利用한 dot plot상에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 비율(gated,%)을 산출하였다.

Table 1. Monoclonal antibody used for immunofluorescence staining

| Immune cell types | Markers | Monoclonal antibody |
|-------------------|--|---------------------|
| T cells | Thy1,2 | J1j |
| helper T cells | CD4 | G.K.1.5 |
| Second antibody | F(ab') ₂ FITC-goat anti rat Ig (Pharmingen) | |

ICR mouse

Sacrifice of mouse by cervical dislocation
Excise the spleen out

Spleen

Transfer onto a prewetted 100 mesh stainless-steel screen
Cut into pieces
Squeeze through the screen
Transfer to a 15ml conical tube
Keep it for 5 min on ice
Take the upper layer
Wash 2 times with buffer (PBS w/o Ca²⁺&Mg²⁺)
Hemolysis with 0.83 % NH₄Cl
Adjust the cell concentration to 5x10⁶ cells/ml in 10% FCS-RPMI 1640

Splenic leukocyte suspension

Scheme 1. Preparation of splenic leukocyte suspension

Cell culture

Pool the cells into 5 ml tube
Wash 3 times with the staining buffer
Resuspend in 0.5ml of the staining buffer

Cell suspension (80μl)

Add 80μl of the primary Ab
Incubate for 30 min
Wash 3 times with the staining buffer

mAb-bound cells

Add 50μl of F(ab)₂ fragment of FITC-conjugated goat anti-rat Ig
Incubate for 30min on ice
Wash 2 times with the staining buffer
Resuspend in 0.5ml of staining buffer

IF-stained cell

Scheme 2. Staining with fluorescein conjugated antibody

5) RT-PCR을 이용한 遺傳子 發顯 分析⁹⁾

(1) IL-12, INF-γ 遺傳子 發顯 探索

① RNA의 抽出

脾臟을 培養 終了後 24 well plate의 上層液을 除去한 後 RNazol^B (Tel-Test, Inc.)를 이용하여

製造會社에서 提供하는 方法에 따라서 total RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 處理한 20μl의 蒸溜水에 녹여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 使用하였다.

② 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)

逆轉寫(reverse transcription) 反應은 準備된 total RNA 3μg에 該當하는 양을 75 °C에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denatured total RNA 3μg에 2.5μl의 10 mM dNPTs mix, 1μl의 random sequence hexanucleotides(25 pmol/25 μl), RNA inhibitor로서 1μl의 RNasin(20 U/μl), 1μl의 100 mM DTT, 4.5μl의 5×RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 섞은 후, 1μl의 M-MLV RT(200U/μl)를 더하고 DEPC 處理된 蒸溜水로서 最終 부피가 20μl가 되도록 하였다. 이 20μl의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 spin down하여 37°C 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95°C에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 재빨리 얼음으로 옮겼다. 이렇게 合成이 完了된 first-strand cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 使用되어졌다.

③ cDNA의 PCR 增幅

PCR은 water bath 方式의 turbo thermalcycler TM(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 修行하였다. 反應은 이미 合成된 3μl의 first-strand cDNA가 주형으로 使用되어 졌으며, Table 2에서와 같이 주형에 대한 primer는 β-actin, IL-18을 增幅하기 위하여 sense primer(10 pmol/μl)와 antisense primer(10 pmol/μl)를 混合 後 1μl씩 넣어주고, 여기에 3μl의 2.5 mM dNTPs, 3 μl의 10×PCR buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.3, 500mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18μl의 Taq. polymerase (5U/μl)를 添加한 뒤, 蒸溜水로서 最終 부피가 30 μl가 되게 하여 PCR을 修行하였다. PCR 條件은 predenaturation (95°C, 5분)한 다음, annealing (57°C, 1분), elongation(72°C, 1분), denaturation(95°C, 1분)을 30 cycles 한 뒤 post elongation을 72°C에서 3분 동안 해주었다. 各各의 PCR products

는 20 μ l씩 1.2%의 agarose gel상에 loading하여 전기 영동을 통해 分析하였다. Internal control로서 β -actin이 使用되어졌으며, 增幅되는 PCR product 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 測定하였다.

(2) 脾臟細胞內 cytokine 發顯 探索

正常 BALB/c 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟 細胞를 分離한 後 우태아 혈청 결핍 RPMI-1640 培養液에서 1시간 동안 培養한 後 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 농도의 試料를 處理하고 3時間 동안 培養器(37 $^{\circ}$ C, CO₂, Napco, USA)에 培養하였다. 培養한 後 2,000 r.p.m에서 5分間 遠心 分離하여 上層液을 除去한 後 RNAzol^B를 利用하여 細胞膜을 터트린 後 RNA를 抽出하는 方法을 택하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다. Oligonucleotide의 鹽基 配列은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Oligonucleotide sequence of primers

| Gene | Primer | Sequence |
|----------------|-----------|----------------------------------|
| β -actin | Sense | 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' |
| | Antisense | 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' |
| IL-12 | Sense | 5'-ATCTGCTGCTCCACAAGAAG-3' |
| | Antisense | 5'-TGATGAAGAAGCTGGTGCTG-3' |
| INF- γ | Sense | 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3' |
| | Antisense | 5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3' |

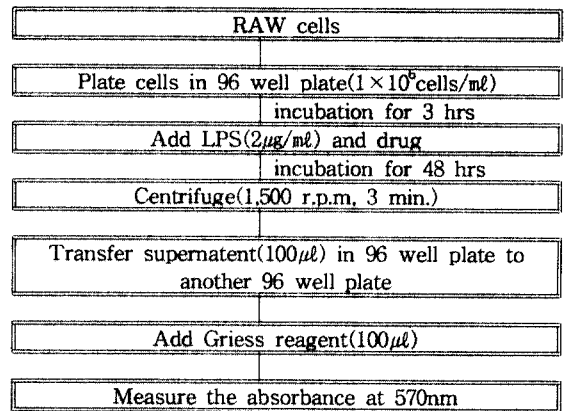
PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, U.S.A)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 測定하였다.

6) 大食細胞 活性에 미치는 影響

(1) Nitric oxide(NO) 生成量 測定¹⁰⁾

Macrophage를 活性化시키는 物質인 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma 社에서 購入하였다. RAW cell을 1회용 滅菌 注射器(26gauge, Boin Medica Co., Korea)를 利用하여 單一細胞(single cell) 狀態의 細胞 懸濁液을 만들어 96 well plate의 各 well에 1 $\times 10^6$ cells/ml의 細胞懸濁液 100 μ l씩

加한 後 3시간 培養하였다. 檢液은 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml 濃度로 稀釋한 後에 96 well plate의 各 well plate에 20 μ l씩 넣었고, 同時에 各 well plate에 2 μ g/ml의 LPS를 加하였으며, 48時間 培養한 後 1,500 r.p.m에서 3分동안 遠心分離하여 細胞浮遊物만을 100 μ l 取한 다음 새로운 96 well plate에 옮겨 놓고 griess reagent를 100 μ l씩 添加하였다. 10分後 ELISA leader을 통하여 570nm에서 吸光度를 測定하였다(Scheme 3).



Scheme 3. The experimental scheme on NO production in RAW cells stimulated by lipopolysaccharide

(2) Carbon clearance의 測定¹¹⁾

Carbon clearance는 생쥐에 10日間 試料를 經口 投與한 後 thorbecke 等の 方法에 準하여 測定하였으며, carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 retroorbital venous plexus로부터 heparin 處理된 capillary로 25 μ l씩 1分, 5分 동안 각각 採血하여 各 血液 sample을 0.1% sodium carbonate 2ml에 溶血시켜 spectrophotometer (UV2100, Shimadzu, Japan)를 使用하여 625nm에서 carbon의 濃度를 測定하였다. Carbon clearance는 아래 의 公式에 의해 phagocytic index인 K값을 구했다.

$$\text{Phagocytic index } K = \log C_1 - \log C_2 / T_2 - T_1$$

C₁은 T₁ 시간에서의 sample 血中の carbon 濃度이고, C₂는 時間 T₂에서의 sample 血中の carbon 濃度이다.

III. 實驗 結果

1. 淋巴球의 增殖 反應에 對한 效果

[3H] Thymidine uptake assay를 통하여 KSDBT의 免疫細胞에 對한 作用을 檢索한 結果에서는, 陰性對照群(negative control)에서 430 ± 11.2 (CPM)로 나타난 반면, Con A를 處理한 陽性對照群(positive control)에서 $3,900 \pm 23.4$ (CPM)으로 增加하였고, KSDBT만을 處理한 實驗群에서는 $1,100 \pm 12.3$ (CPM)으로 나타나 陰性對照群에 비하여 增加하였고, Con A와 KSDBT를 同時에 處理한 實驗群에서는 $11,400 \pm 32.7$ (CPM)으로 나타나, 陰性, 陽性 對照群에 비하여 큰 폭의 有意한 淋巴球 增殖效果를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of KSDBT on Proliferation of Splenic Lymphocyte by Thymidine Uptake

| Group | thymidine uptake(CPM) |
|------------------------|-------------------------|
| Control(negative con.) | 430 ± 11.2 |
| Con A(positive con.) | $3,900 \pm 23.4^{***}$ |
| KSDBT | $1,100 \pm 12.3^{***}$ |
| Con A + KSDBT | $11,400 \pm 32.7^{***}$ |

* P-value : Statistically significant as compared with data of negative control group (**P<0.001)

2. 脾臟 免疫細胞에 미치는 效果

BALB/c 생쥐의 脾臟細胞를 FACS calib를 이용하여 流細胞를 分析한 結果, helper T cell에 對한 效果에서는 對照群이 5.7(% positive cell)인데 비하여, KSDBT $100 \mu\text{g/ml}$ 投與群이 19.2(% positive cell)로 對照群에 비하여 增加하였다(Fig. 1).

T cell에 對한 效果에서는 對照群이 2.1(% positive cell), KSDBT $100 \mu\text{g/ml}$ 投與群이 7.4(% positive cell)로 이 역시 對照群에 비하여 3배 이상 增加하였다(Fig. 1).

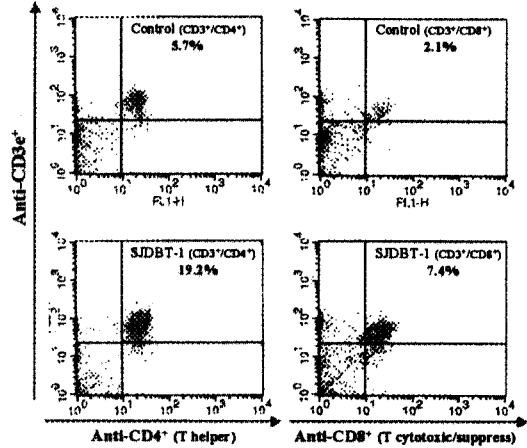


Fig. 1. Effects of KSDBT-1 on the T cell and T helper cell in Splenic Cell Culture

3. IL-2 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-2의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β -actin이 使用되었는데, NC(C) Ht값은 11로 나타났고, Con A 投與群은 $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度에서 220으로 나타났다. 이에 비해 KSDBT $100 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 각각 185, 79, 50으로 나타나 濃度依存的으로 增加하였다(Fig. 2).

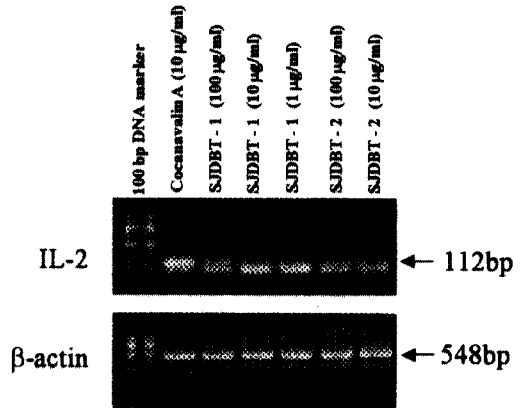


Fig. 2. Effects of KSDBT on IL-2 gene expression in splenic cell culture.

Reverse transcription reactions were carried out 20 ml reaction volume containing with 3 mg total RNA and oligo d(T). And 3 ml of resulting products were analyzed by PCR

analysis. Synthesized b-actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M ; 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

4. IL-12(p35) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-12(p35)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β -actin이 使用되었는데, NC(C) Ht값은 15로 나타났고, 陽性 對照群인 Con A 投與群은 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 169로 나타났다. 이에 비해 KSDBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 170으로, 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 49로, 1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 12로 나타나, 高濃度인 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 比較對照群보다 높게 나타났다. (Fig. 3).

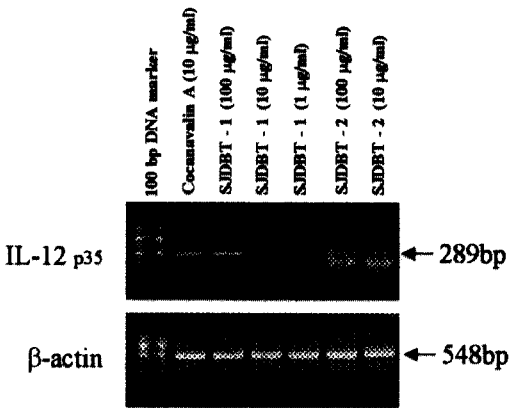


Fig. 3. Effects of KSDBT on IL-12(p35) gene expression in splenic cell culture.

5. IL-12(p40) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-12(p40)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β -actin이 使用되었다. IL-12(p40) NC(C) Ht값은 17로 나타났고, 陽性 對照群인 Con A 投與群은 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 224로 나타났다. 100 $\mu\text{g/ml}$ KSDBT 濃度 投與群에서는 215, 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 182, 1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 59로 나타났다(Fig. 4).

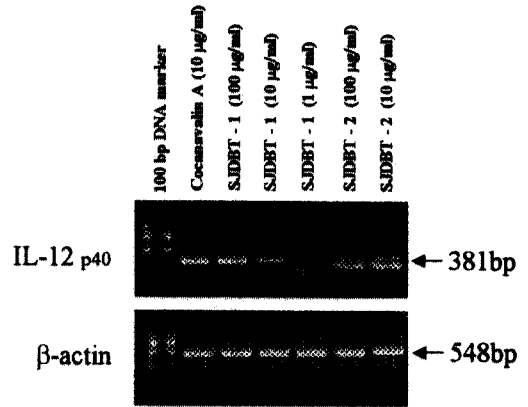


Fig. 4. Effects of KSDBT on IL-12(p40) gene expression in splenic cell culture.

6. IFN- γ 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IFN- γ 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β -actin이 使用되었다. IFN- γ NC(C) Ht값은 24로 나타났고, 陽性 對照群인 Con A 投與群은 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 233으로 나타났으며, KSDBT 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 216으로, 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 201로, 1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 投與群에서는 167로 나타났다(Fig. 5).

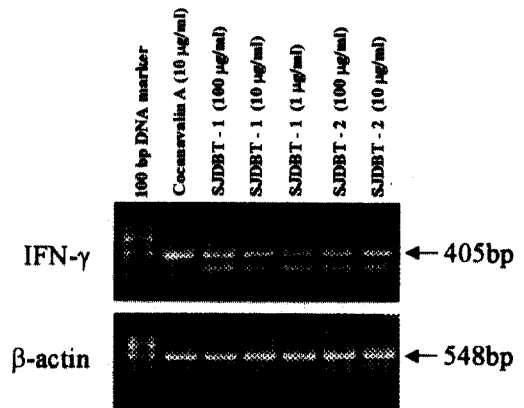


Fig. 5. Effects of KSDBT on IFN- γ gene expression in splenic cell culture.

7. NO 生成量에 對한 效果

KSDBT 投與群이 大食細胞 活性에 미치는 影響을 알아보기 위하여 NO assay를 實施한 結果,

陰性對照群(negative control)에서는 17 ± 2 (uM/L)로 나타났는데, LPS만 投與한 陽性對照群(positive control)에서는 32 ± 5 (uM/L)로 陰性對照群에 比하여 增加하였으나 有意性은 나타나지 않았고, KSDBT와 LPS의 併用 投與群은 37 ± 3 으로 나타나 陰性對照群에 比하여 有意性있는 結果가 나타났다(Table 4).

Table 4. Effect of KSDBT on the NO Production in RAW 264.7 Cells

| Stimulus | NO Production(uM/L) |
|------------------------|---------------------|
| Control(negative con.) | 17 ± 2 |
| LPS(positive con.) | 32 ± 5 |
| LPS+KSDBT | $37 \pm 3^*$ |

* RAW 264.7 cells were incubated with $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ LPS and $0.25 \text{mg}/\text{ml}$ KSDBT at 37°C for 48hr. The result were expressed as micromoles per liter and mean \pm SE of triplicated cultures.

* P-value : Statistically significant as compared with data of control group (* : $P < 0.05$)

8. Carbon clearance에 對한 效果

Carbon 16mg을 생쥐의 尾靜脈에 注射한 다음 1분, 5분 후 採血하여 carbon의 濃度를 測定한 結果, phagocytic index K가 對照群에서는 2.231 ± 0.188 로 나타난 反面 KSDBT 投與群은 5.121 ± 0.341 로 對照群에 比하여 有意性있는($p < 0.01$) 增加를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effect of KSDBT on Phagocytic Index K in BALB/C Mice

| Group | K | α |
|---------|------------------------|-------------------|
| Control | 2.231 ± 0.188 | 3.221 ± 0.452 |
| KSDBT | $5.121 \pm 0.341^{**}$ | 5.224 ± 1.524 |

$K = \log \text{ODt1} - \log \text{ODt2}/t2 - t3$

$\alpha = \sqrt[3]{K \times \text{body weight}/(\text{spleen} + \text{liver})\text{weight}}$

* P-value : Statistically significant as compared with data of control group (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

IV. 考 察

本 試料의 基本方인 十全大補湯은 《太平惠民和劑局方》¹²⁾에서 “治諸虛不足, 五勞七傷, 不進飲食, 久病虛損 …… 五心煩熱等.”으로 最初로 收載된 以後 氣血虛損으로 나타나는 諸症狀을 治療하는 基本方으로 認識되어 왔다. 아울러 最近에는 十全大補湯에 多樣한 藥物을 加味하여 各種 難治性 疾患 等에 免疫療法으로써의 活用 可能性에 對한 研究가 深度있게 進行되고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

生脈散은 生脈飲 혹은 人蔘生脈散으로 불리기도 하며 《內外傷辨惑論》¹²⁾에서 “…益氣斂汗 養陰生津 治熱傷元氣 肢體倦怠 氣短口渴 汗出不止…”로 最初로 收載되었으며, 最近 強心 升壓 作用 등이 實驗的으로 糾明된 바가 있다¹²⁾.

加味된 藥物인 桑寄生은 《神農本草經》¹⁶⁾에 “主腰痛, 小兒背強, 癱腫, 安胎, 充肌膚, 堅髮, 齒, 長髮尾”라 記載된 이래 補肝腎, 強筋骨, 固齒長髮, 祛風濕, 通經絡, 益血, 安胎 등의 效能으로 주로 筋骨系 疾患에 多用되고 있으며¹⁷⁾, 中樞抑制作用, 利尿作用, 降壓作用, 鎮靜作用, 抗癌作用 등이 實驗的으로 糾明된 바가 있다^{18,19)}.

이에 本 研究는 現在 豫防的 次元에서 免疫을 增強시켜 疾病 發生을 未然에 防止함으로써, 國民 健康에 寄與할 수 있는 韓方 處方 開發을 위해, 民間 및 臨床에서 가장 많이 이용되고 上記 作用이 있는 生脈散과 十全大補湯을 合方한 후, 人蔘을 紅蔘으로 代用하고 桑寄生을 가하여 이들의 免疫 調節作用을 實驗的으로 糾明하였다.

一般的으로 림프구는 末梢血液, 白血球中 正常에서는 약 20%를 차지하며 機能上 대개 T 림프구, B 림프구 및 null 細胞로 分類되고 있어⁴⁾, 本 實驗에서는 淋巴球의 增殖 反應을 檢討한 結果 KSDBT만을 處理한 實驗群과 Con A와 KSDBT를 同時에 處理한 實驗群에서 陰性, 陽性 對照群

에 비하여 큰 폭의 有意性 있는($p < 0.001$) 淋巴球 增殖效果를 나타내었다(Table 3).

이 중 helper T cell, T cell은 모두 脾臟 免疫細胞를 통하여 살펴보았던 바 對照群에 비하여 3배 이상 增加함으로써(Fig. 1), 上記한 淋巴球의 增殖反應 結果와 附合되었다.

淋巴球를 비롯한 免疫細胞들은 lymphokine 또는 cytokine을 分泌하여 각 細胞에 信號를 보내면서 細胞間에 相互情報를 傳達하거나 仲介하여 細胞增殖 및 細胞分化에 關與함으로써 免疫調節에 參與한다는 점²⁰⁾에서 免疫實驗에서 重要한 尺度로 使用되어, 本 實驗에서는 IL-2, IL-12(p35, p40), IFN- γ 遺傳子 發顯에 미치는 效果를 檢索하였다.

T 細胞, NK 細胞와 LAK (lymphocyte activated killer) 細胞의 活性化에 關與하고, 活性化된 B 細胞의 增殖과 Ig 分泌를 增進²¹⁾시키는 것으로 알려진 IL-2의 發顯量 檢索에서는 濃度依存的으로 增加하였다(Fig. 2).

IL-12 역시 NK 細胞, LAK 細胞 및 cytotoxic T 細胞를 活性化시키는데²¹⁾. 本 實驗에서는 p35에 對하여서는 陽性對照群과 더불어 모든 濃度에서 큰 폭으로 遺傳子 發顯이 增加하였고(Fig. 3), p40에서는 10 μ g/ml 이상의 濃度에서 對照群에 비하여 큰 폭으로 增加하였다(Fig. 4).

IFN- γ 는 T 細胞와 NK 細胞에서 生産되고 Class II MHC 發顯과 B細胞 增殖分化, 大食細胞의 活性化에 關與하며 IL-2 및 IL-4의 生産을 抑制하고 IgE 抗體와 IgG₁ 抗體를 抑制하나 IgG_{2a} 抗體 生産은 促進하는 것으로 알려져 있는데²²⁾, 本 實驗에서는 모든 濃度에서 對照群에 비하여 큰 폭의 增加를 나타내었다(Fig. 5).

마지막으로 大食 細胞의 免疫 作用의 指標인 nitric oxide(NO)와 carbon clearance를 통하여 免疫調節作用을 檢索하였다.

Nitric oxide(NO)는 L-arginine에 NO-synthetase (NOS)가 作用하여 生成되는 것으로, toxic free-radical gas의 可能性을 가지고 있고, macrophage에서 많이 生成된다^{23,24)}. 生體內에서는 免疫調節의 2次 信號傳達物質로, 大食細胞의 微生物의 除去過程에서, 食菌된 細胞의 殺害作用의 一部가

窒素酸化物生成에 의한 酸化作用으로 認識^{23,24)}되고 있는 까닭에 免疫實驗에 基本的으로 使用된다.

本 試料의 NO 生成量에 對한 效果에서는, KSDBT와 LPS의 併用 投與群에서 陰盛對照群에 비하여 有意性 있는($p < 0.05$) 結果가 나타났다(Table 4).

Macrophage의 貪食能을 評價하는 實驗方法인 carbon clearance 測定은 注入된 carbon이 細網內皮系(RES)에 의하여 貪食되는 程度를 評價하는 方法으로¹¹⁾, 本 實驗에서는 phagocytic index K가 對照群에 비하여 有意性 있는($p < 0.01$) 增加를 나타내었다(Table 5).

以上の 모든 結果로 보아 十全大補湯加味方은 T cell, T helper cell 및 macrophage 등의 多様な 免疫細胞를 活性化시키고 同時に 이와 關聯된 cytokine 등의 調節을 통해 免疫 增強效果를 發揮하는 것으로 보인다. 그러나 既存의 補益 處方과의 相互 比交 檢討가 되지 않아, 加味十全大補湯만이 지니는 特殊한 免疫 作用 機轉에 대한 解釋이 되지 않는다. 따라서 向後 多様な 補益 處方에 대한 同一한 實驗 方法을 통한 比交 研究가 이루어져야 할 것으로 보인다.

IV. 結 論

十全大補湯加味方(KSDBT)의 免疫調節作用을 評價하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 淋巴球의 增殖 反應에 對한 效果에서는 Con A와 KSDBT를 同時に 處理한 實驗群에서 陰性, 陽性 對照群에 비하여 큰 폭의 有意한 淋巴球 增殖效果를 나타내었다.
2. FACS에 의한 脾臟 免疫細胞 測定에서는 KSDBT 投與群에서 helper T cell, T cell의 陽性 流細胞數가 對照群에 비하여 3배 이상 增加하였다.
3. IL-2 遺傳子 發顯에 미치는 效果에서는 KSDBT 投與群에서 對照群에 비하여 濃度依存的으로 큰 폭으로 增加하였다.
4. IL-12(p35) 遺傳子 發顯에 미치는 效果에서

는 KSDBT의 投與群 모두 對照群에 비하여 發顯量이 增加하였고, 特히 KSDBT 100 μ g/ml, 投與群에서는 比交對照群보다 增加하였다.

5. IL-12(p40) 遺傳子 發顯에 미치는 效果에서는 KSDBT 投與群은 10 μ g/ml 이상의 投與群에서 對照群에 비하여 發顯量이 10배 이상 增加하였다.
6. IFN- γ 遺傳子 發顯에 미치는 效果에서는 KSDBT 投與群에서 對照群에 비하여 濃度依存的으로 增加하였다.
7. NO 生成量에 미치는 效果에서는 KSDBT와 LPS의 併用 投與群에서 陰性對照群에 비하여 有意性있는 結果가 나타났다.
8. Carbon clearance에 미치는 效果에서는 KSDBT 投與群에서 對照群에 비하여 有意性있는 增加를 나타내었다.

以上的 모든 結果로 보아 加味十全大補湯은 T cell, T helper cell 및 macrophage 등의 多様な 免疫細胞를 活性化시키고 同時에 이와 關聯된 cytokine 등의 調節을 통해 免疫 增強效果를 發揮하는 것으로 보인다. 그러나 既存의 補益 處方과의 相互 比交 檢討가 되지 않아, 加味十全大補湯만이 지니는 特殊한 免疫 作用 機轉에 대한 解釋이 되지 않는다. 따라서 向後 多様な 補益 處方에 대한 同一한 實驗 方法을 통한 比交 研究가 이루어져야 할 것으로 보이며, 이와 더불어 抗酸化 效果에 대한 檢索을 통하여 疾病의 豫防 및 老化防止에 대한 客觀的 資料 確保가 要求된다

參 考 文 獻

1. 徐舜圭 : 成人病 老人醫學, 서울, 高麗醫學, pp. 10-13, 225-228, 1992.
2. 이정복 : 장수학, 서울, 의성당, pp. 1325-1388, 1993.
3. 金周德 譯 : 免疫學入門, 醫齒學社, pp. 22-80, 207-235, 273-300, 1983.
4. 양용태 : 體液免疫 機轉에 의한 宿主防禦, 大韓醫學協會誌, 21(7), pp. 74-578, 1978.
5. 趙鍾寬 : 免疫에 관한 東洋醫學의 考察, 東洋醫學, p. 23, 1985.
6. 蔡禹錫 : 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察, 大韓醫學會誌, 11(2), pp. 54-58, 1990.
7. 李淵台 : 最新免疫學, 集文堂, p. 1, 76, 81, 88, pp. 52-53, 1985.
8. Onogi N., Okuno M. : Antiproliferative effect of catotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid, Nutr Cancer, 32(1) : 20-4, 1998.
9. Schrader, J. W., and I. Clark-Lewis : A T cell-derived factor stimulating multipotential hematopoietic stem cells : molecular weight and distinction from T cell growth factor and T cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Immunol. 129 : 30-35, 1982.
10. Katsuyama K., Shichiri M. : NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18(11) : 1796- 802, 1998.
11. Thobcke, G. T. et al. : The affinity of the reticulo-endothelial system various serum proteins, Brit. J. Exp. path., 41(2) : pp. 190-198, 1960.
12. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 臺北, 旋風出版社, p. 318, 1975.
13. 朴聖浩 : 少陰人 十全大補湯이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1991.
14. 張寧根 外 : 少陰人 十全大補湯과 局方 十全大補湯이 陽虛病症에 미치는 影響, 四象醫學會誌, 7(1) : 155, 1992.
15. 黃奎東 外 : 十全大補湯, 瓦松 및 十全大補湯加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1) : 1, 1996.
16. 孫星衍, 孫馮翼 輯 : 神農本草經, 臺北, 五州出版社, p. 41, 1985.

17. 黃宮繡：本草求真，臺北，宏業書局有限公司，p. 16, 1981.
18. 汪認庵：本草易讀，北京，人民衛生出版社，p. 306, 1987.
19. 王裕生 主編：中藥藥理與應用，北京，人民衛生出版社，pp. 930-933, 1983.
20. Farrar, J. J., W. R. Benjamin, M. L. Hilfiker, M. Howard, W. L. Farrar and J. Fuller-Farrar : The biochemistry, biology and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* 63 : 129-166, 1982.
21. Podlasky FJ, Nanduri VB, Hulmes JD, Pan YCE, et al : Molecular characterization of a novel cytokine : Cytotoxic lymphocyte maturation factor. *J Cell Biochem Supplement* 15 F Abstracts, 20th Annual Keystone Symposium, p. 78, 1991.
22. Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL : IL-12 and IFN- γ in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men : *Current Opinion in Immunology*, Vol. 11, No. 3, pp. 346-351, 1999.
23. Lieberman, M. D., Nishioka, K., Redmond, P. and Daly, J. M. : Enhancement of IL-2 immunotherapy with L-arginine. *Ann. Surg.*, 215(2) : 157, 1991.
24. Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. : Nitric oxide ; a Pathogenic factor in autoimmunity. *Immunology Today*, 13 : 157, 1992.