

加味六味地黃湯의 抗疲勞와 免疫 增強 效果에 대한 연구

김현희 · 박은정 · 김종열¹ · 주종천^{2*}

원광대학교 한의과대학 소아과학교실, 1: 한국한의학연구원 의료연구부, 2: 원광대학교 한의과대학 사상의학교실

Study on the Anti-Fatigue and Immune-Enhancing Effects of Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

Hyun Hee Kim, Eun Jung Park, Jong Yeol Kim¹, Jong Cheon Joo^{2*}

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine,

2: Department of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The Korean formula medicine, *Gami-Yukmi-Jihwang-Tang* (GYJT) has been used for growing slowly, short of stature, incomplete development, fatigue, weak child, growing pain of child. However, it is still unclear how GYJT has an effect on experimental models. In the present study, the author investigated the immune-enhancing effect of GYJT. Forced swimming test (FST) was performed as a model of activity test in mice and measured blood urea nitrogen (BUN), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactic dehydrogenase (LDH), glucose (Glc) and total protein (TP) in the serum. GYJT (1, 0.1 and 0.01 g/kg) were orally administered to mice, once per day for 7 days using a feeding atraumatic needle. After 3 days, on FST, the immobility time was significantly decreased in the GYJT (0.01g/kg/day)-fed group (120.75±5.71s) in comparison with the saline-fed group (153.80±10.74s). After 7 days, the immobility time was significantly decreased in the GYJT (0.1 and 0.01g/kg/day)-fed group (125.67±5.36s and 107.67±3.71s) in comparison with the saline-fed group (167.67±12.99s). In addition, the contents of BUN and Glc in the blood serum were significantly decreased and the contents of AST, ALT and LDH were also decreased in the GYJT (1g/kg/day)-fed group. However, the content of TP was not changed. The present results suggest that GYJT may be useful for the anti-fatigue and immune-enhancing agent. Also, the author investigated the effect of GYJT on the production of cytokines in human T-cell line, MOLT-4 cells. However, GYJT has not affected the production of IFN- γ , IL-2, IL-4. These results suggest that GYJT has immune-enhancing effect but does not affect T cell-mediated production of cytokines in the immune function improvement.

Key words : *Gami-Yukmi-Jihwang-Tang*, forced swimming test, anti-fatigue, immune-enhancing, cytokine

서 론

六味地黃湯은 張仲景 『金匱要略』의 八味地黃丸에서 肉桂와 附子를 뺀 처방으로, 錢乙의 『小兒藥證直訣』에서 地黃圓이라는 이름으로 '小兒胎怯, 稟受先天不足, 并肝疳白膜遮睛, 瀉血失音, 身瘦瘡疥, 腎怯語遲解齲行遲'에 사용되었다. 이는 腎肝不足으로 인한 五遲, 五軟, 疳證, 腦水腫, 腦性麻痺 등의 소아질환에 해당된다. 최근에는 소아의 성장과 발달을 촉진시키고 뇌 기능을

활성화시켜 知能의 발달을 돕고, 항체 존재의 시간을 연장시키고 세포 면역 기능을 증가시켜 소아의 면역 기능을 향진시키는데 응용하고 있으며, 임상적으로 뇌하수체와 부신피질, 성선 등의 내분비계의 부전으로 인한 병태를 조절하는데 사용되고 있다¹⁾. 加味六味地黃湯은 六味地黃湯에 補氣益氣하는 人蔘, 黃芪, 白朮 등과 補血行血하는 當歸, 白芍藥, 川芎 등과 健脾理氣하는 木香, 枳實, 山查 등과 強筋骨하는 骨碎補, 枸杞子, 狗脊 등과 清熱補陰하는 黃芩, 天花粉, 五味子 등의 약물을 가미한 처방으로 소아의 성장장애, 발육부진, 영양실조, 피로, 허약아, 저신장증, 성장통 등에 응용하는 처방이다.

소아과 외래 환자의 주소증은 양방 의료기관의 경우에는 기

* 교신저자 : 주종천, 전남 순천시 조례동 544, 원광대학교 순천한방병원

· E-mail : jchoo@wonkwang.ac.kr, · Tel : 061-720-7522

· 접수 : 2004/07/25 · 수정 : 2004/09/27 · 채택 : 2004/11/07

침, 발열 등 호흡기계의 응급 증상이 가장 많은 비율을 차지하고 있으나, 한방 의료기관의 경우에는 허약, 식욕부진, 피로 등 면역 또는 기초 체력의 약화에서 비롯되는 증상이 가장 많은 비율을 차지하고 있으므로 이들에 대한 많은 연구가 필요한 상황이다²⁾. 강제수영부하실험(Forced swimming test, FST)은 항우울제 효과를 관찰하기 위한 설치류에 대한 행동실험에서 시작되어 최근에는 약물의 지구력에 관한 효과, 항피로 효과, 면역 증강 효과를 검증하는 실험에도 이용되고 있어 본 연구의 평가 방법으로 선택하였다^{3,4)}.

여러 가지의 혈중 생화학적 지표 물질 중에서 피로의 평가에 활용될 수 있는 물질은 blood urea nitrogen (BUN), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactic dehydrogenase (LDH), glucose (Glc), total protein (TP) 등이 있다^{5,6)}. 세포활성물질 (cytokine)은 IL-2, IFN- γ 등을 분비하는 Th1 형과 IL-4, IL-5 등을 분비하는 Th2형으로 나눌 수 있으며, 이들은 생체 면역 반응을 조절하는 중요한 biomarker이다⁷⁾.

六味地黃湯에 대한 실험적 연구로는 박 등⁸⁾은 六味地黃湯加減方-1, 2가 학습과 기억능력에 미치는 영향에 관한 임상연구를, 최 등⁹⁾은 六味地黃湯加味方이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향을, 신 등¹⁰⁾은 六味地黃湯加味方이 골형성 관련 유전자인 TG2와 BMP4의 전사활성에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 저자는 加味六味地黃湯의 효능을 강제수영부하실험, 피로 관련 혈중 생화학 지표 물질, 세포활성물질 등의 측면에서 확인하고자 본 연구를 시행하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Avidin-peroxidase, Thioglycolate, 2'-AZINO-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) substrate는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. RPMI 1640, ampicillin, streptomycin과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Anti-human IFN- γ , IL-2, IL-4, biotinylated anti-human IFN- γ , IL-2, IL-4와 recombinant (r) human IFN- γ , IL-2, IL-4는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 기기로는 VERSAmix™ Tunable Microplate Reader (Sunnyvale, California)를 사용하였다.

2. 실험동물

본 연구에 사용한 실험동물은 썬타코 바이오코리아 (오산, 한국)에서 구입한 수컷 ICR계 (4 weeks) 마우스로 대조군과 각 실험군은 5마리씩 구성하였다. 마우스는 구입 후 환경 적응을 위해 구입 후 일주일 이 지난 후부터 실험을 진행하였고, 사육조건은 22±1℃의 온도와 40-60%의 습도를 유지시켰으며 사료와 생리식염수는 자유롭게 섭취하도록 했다. 마우스는 『Guide for the Care and Use of Laboratory Animals』와 국내 현행법에 따라 다뤘다¹¹⁾.

3. 처방 및 전탕액 추출

본 실험에 사용한 한약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하였다. 33종의 준비된 약재를 증류수에 3시간 동안 끓인 후 추출물을 취하여 이를 여과한 후 동결 건조하여 4℃에 냉장 보관하였다. 전체 약물 용량에 대한 엑스 분말의 비율은 8% 정도였다. 추출한 분말은 각각 1g/mL, 0.1g/mL, 0.01g/mL 농도로 생리식염수에 녹여 0.2 μ m 여과지로 여과했다. 본 실험에 사용한 처방의 구성과 1침 중의 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Amount and Component Ratio of ^aGYJT (Pack Ingredients)*.

Korean Name	Chinese Name	Pharmaceutical Name	Amount (g)	Component Ratio (%)
숙지황	熟地黃	Rehmanniae, Rhizoma	6	4.69
산수유	山茱萸	Corni, Fructus	4	3.13
산약	山藥	Dioscoreae, Rhizoma	6	4.69
백복령	白茯苓	Poria	4	3.13
택사	澤瀉	Alismatis, Rhizoma	3	2.34
목단피	牡丹皮	Moutan Radicis, Cortex	3	2.34
황기	黃芪	Codonopsis, Radix	8	6.25
백출	白朮	Atractylodis Macrocephalae, Rhizoma	6	4.69
갈근	葛根	Spirodela, Herba	4	3.13
감초	甘草	Glycyrrhizae, Radix	4	3.13
골쇄보	骨碎補	Davalliae, Rhizoma	4	3.13
구기자	枸杞子	Lycii, Fructus	4	3.13
구척	狗脊	Cibotii, Rhizoma	4	3.13
길경	桔梗	Magnoliae, Cortex	4	3.13
녹각	鹿角	Cervi, Cornu	4	3.13
당귀	當歸	Angelicae Gigantis, Radix	4	3.13
모과	木瓜	Chaenomelis, Fructus	4	3.13
육두구	肉豆蔻	Myristicae, Semen	4	3.13
백芍약	白芍藥	Paeoniae Lactiflorae, Radix	4	3.13
사인	砂仁	Amomi, Fructus	4	3.13
산사	山查	Crataegi, Fructus	4	3.13
오미자	五味子	Schizandrae, Fructus	4	3.13
우슬	牛膝	Sappan, Lignum	4	3.13
천화분	天花粉	Trichosanthis	4	3.13
파고지	破古紙	Psoraleae, Semen	4	3.13
목향	木香	Saussurea, Radix	3	2.34
지실	枳實	Immaturus Ponciri, Fructus	3	2.34
천궁	川芎	Cnidii, Rhizoma	3	2.34
홍화	紅花	Carthami, Flos	3	2.34
방풍	防風	Ledebouriae, Radix	2	1.56
오매	烏梅	Mume, Fructus	2	1.56
인삼	人蔘	Ginseng, Radix	2	1.56
황금	黃芩	Scutellariae, Radix	2	1.56
Total			128	100.00

* : Pharmaceutical terminology from Sin¹²⁾, ^a : Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

4. FST

마우스를 높이 25cm, 지름 10cm, 물높이 15cm, 수온 23-25℃인 실린더에 떨어뜨리면 물에 빠진 마우스는 처음에는 빠져나가려 활발히 움직이지만 시간이 경과하면 서서히 활동이 느려지면서 수면위로 머리만 내미는 부동자세를 취하게 된다. 총 6분 동안 이와 같은 방법을 되풀이하여, 2분이 지난 후 남은 4분 동안 부동시간을 측정하였다. 실험에 들어가기 전에 각 그룹간의 부동시간의 평균을 유사하게 하기 위해 실험에 사용되는 모든 마우스의 부동시간을 측정 후 부동시간의 평균값이 비슷하도록 그룹핑하였다¹³⁾.

5. 혈청 분석

FST가 끝난 후 마우스를 마취시켜, 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취했다. 혈액은 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리했다. 분리한 혈청으로 BUN, AST, ALT, LDH, Glc, TP의 level을 각각 측정했다.

6. MOLT-4 세포배양

인간 T 세포주인 MOLT-4 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

7. IFN-γ, IL-2, IL-4의 측정과 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

IFN-γ, IL-2, IL-4의 측정은 Scuderi 등¹⁴⁾이 기술한 방법에 준하여 약간 변형된 ELISA 방법으로 실시하였다. 즉 anti-human IFN-γ, IL-2, IL-4 capture 단클론 항체를 96-well plate에 1μg/mL로 코팅하고 4°C에서 12시간 방치하였다. 코팅 후 비특이적 결합부위를 막기 위하여 2% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 phosphate-buffered saline (PBS)으로 구성된 blocking buffer를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척 후 recombinant (r) human IFN-γ, IL-2, IL-4 표준액과 각 검체의 배양 상등액을 각 well에 100μL씩 부가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척 후 biotinylated anti-human IFN-γ, IL-2, IL-4는 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 0.05μg/mL 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 washing buffer로 7회 세척한 후 avidin-conjugated enzyme를 2.5μg/mL 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C에서 30분 방치한 후 7회 세척하였다. ABTS 기질액을 각 well에 100μL씩 가하여 10분간 발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 405nm 파장에서 IFN-γ, IL-2, IL-4의 양을 측정하였다.

8. 통계학적 분석

모든 자료는 mean±S.E.M.으로 나타냈고, 통계분석은 SPSS 10.0을 사용했으며, 평균치의 분석은 student's t-test, Mann-Whitney U, ANOVA, Kruskal-Wallis H test 등을 통해 P < 0.05인 것을 유의하다고 판정했다.

연구결과

1. FST에서의 가미육미지황탕의 효과

전체적으로 대조군에 비해 加味六味地黃湯의 농도가 낮을수록 부동시간이 감소하는 경향을 보였다. 加味六味地黃湯을 투여한 지 3일후 실험에서 0.01g/kg을 투여한 군 (120.75±5.71s)에서 대조군에 비해 유의한 부동시간 감소가 있었다. 加味六味地黃湯을 투여한 지 7일후 실험에서 0.1과 0.01g/kg을 투여한 군 (125.67±5.36과 107.67±3.71s)에서 대조군에 비해 유의한 부동시간 감소가 관찰되었다 (Fig. 1, Table 2).

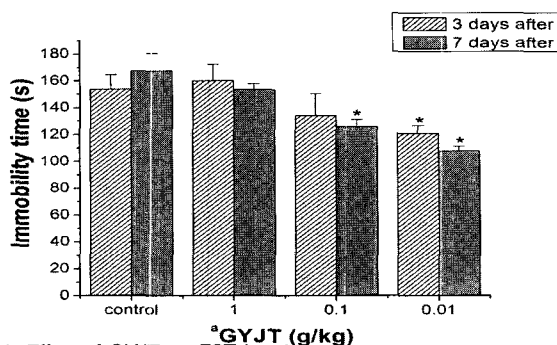


Fig. 1. Effect of GYJT on FST in mice. The day after the first measurement of immobility, the administration of GYJT (1, 0.1 and 0.01g/kg/day, p.o.) was started; it was totally continued for 7 days. 3 days after the first administration(the 4th day), the second measurement of immobility was made. The day after the last administration (the 8th day), the third measurement of immobility was made. Values are the mean±S.E.M. * : P < 0.05 ^a ; Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

Table 2. Effect of ^aGYJT on FST in Mice.

	Control group		GYJT group (g/kg)	
	Saline	1	0.1	0.01
3 days after (s)	153.80±10.74	160.00±12.44	134.20±16.13	120.75±5.71 [†]
7 days after (s)	167.67±12.99	153.33±4.41	125.67±5.36*	107.67±3.71 [†]

Values are expressed as mean±S.E.M. * : P < 0.05 ^a ; Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

2. 혈중 생화학적 지표 물질에 대한 가미육미지황탕의 효과

BUN 수치는 1g/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. AST 수치는 1g/kg 투여군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 0.1과 0.01g/kg 투여군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. ALT 수치는 1g/kg 투여군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 0.1과 0.01g/kg 투여군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. LDH 수치는 1과 0.1g/kg 투여군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 0.01g/kg 투여군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. Glc 수치는 1과 0.1g/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. TP 수치는 모두에서 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다 (Table 3).

Table 3. Effect of ^aGYJT on Blood Biochemical Parameters in Mice.

	Control group		GYJT group (g/kg)	
	Saline	1	0.1	0.01
BUN(mg/dL)	27.5±0.2	24.2±0.1*	25.1±1.9	25.0±4.2
AST(IU/L)	103.3±19.9	96.5±12.0	103.5±21.9	199.0±125.9
ALT(IU/L)	29.3±2.6	24.50±2.1	30.0±2.8	48.0±14.1
LDH(IU/L)	1381.2±628.1	993.3±165.3	831.7±216.1	1731.3±610.5
Glc(mg/dL)	214.0±1.4	189.0±7.1*	178.6±11.8*	194.5±17.7
TP(g/dL)	4.9±0.3	4.4±0.0	4.6±0.07	4.6±0.1

Saline and GYJT (1, 0.1 and 0.01g/kg/day, p.o. for 7 days) was administered to mice. The analyzer determined each level. Values are expressed as mean±S.E.M. * : P < 0.05 versus saline-fed group. ^a : Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

3. 세포활성물질 생성에 대한 가미육미지황탕의 효과

1) IFN-γ 생성에 대한 가미육미지황탕의 효과

MOLT-4 세포에서 대표적 면역증강 마커로 알려진 IFN-γ의 생성 변화를 비교 분석해본 결과 加味六味地黃湯 0.001, 0.01, 0.1, 1mg/mL에서 각각 0.44±0.012, 0.50±0.014, 0.42± 0.016, 0.52±

0.013ng/mL로 나타나 유의한 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 2).

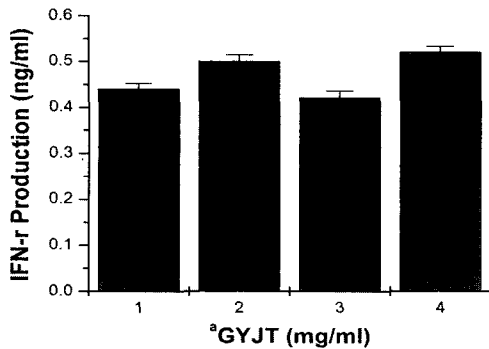


Fig. 2. Effect of GYJT on IFN- γ production in the MOLT-4 cells. Culture supernatant was collected from none or GYJT treated MOLT-4 cells, which were cultured for 24h. Cytokines levels in culture supernatant was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. 1 : 0.001 mg/mL, 2 : 0.01 mg/mL, 3 : 0.1 mg/mL, 4 : 1 mg/mL ¹⁾ : Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

2) IL-2 생성에 대한 가미육미지황탕의 효과

MOLT-4 세포에서 또 하나의 중요한 면역 증강 마커인 IL-2의 생성에 미치는 효과를 분석하기 위해 加味六味地黃湯 0.001, 0.01, 0.1, 1mg/mL를 처리한 결과 각각 0.30 \pm 0.015, 0.28 \pm 0.014, 0.32 \pm 0.016, 0.20 \pm 0.01ng/mL로 나타나 유의한 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3).

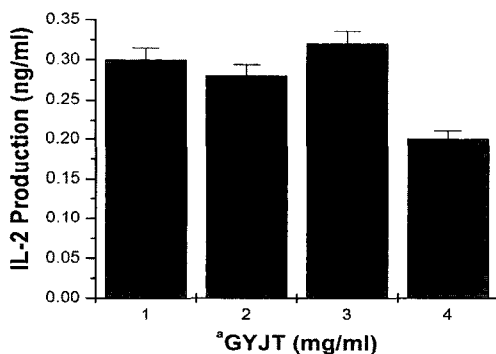


Fig. 3. Effect of GYJT on IL-2 production in the MOLT-4 cells. Culture supernatant was collected from none or GYJT treated MOLT-4 cells, which were cultured for 24h. Cytokines levels in culture supernatant was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. 1 : 0.001 mg/mL, 2 : 0.01 mg/mL, 3 : 0.1 mg/mL, 4 : 1 mg/mL ¹⁾ : Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

3) IL-4 생성에 대한 加味六味地黃湯의 효과

마지막으로 MOLT-4 세포에서 대표적 Th2형 세포활성물질인 IL-4의 생성에 끼치는 영향을 알아보기 위해 加味六味地黃湯 0.001, 0.01, 0.1, 1mg/mL를 처리한 결과 각각 0.30 \pm 0.014, 0.28 \pm 0.0125, 0.32 \pm 0.013, 0.20 \pm 0.014ng/mL로 나타나 역시 유의한 차이를 확인할 수 없었다 (Fig. 4).

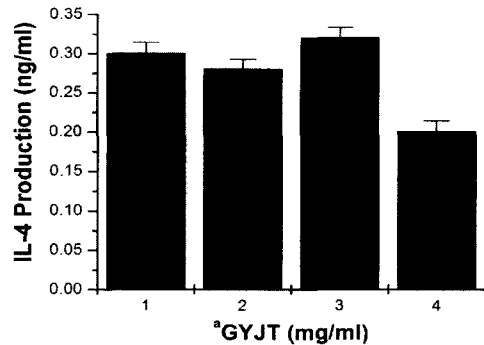


Fig. 4. Effect of GYJT on IL-4 production in the MOLT-4 cells. Culture supernatant was collected from none or GYJT treated MOLT-4 cells, which were cultured for 24h. Cytokines levels in culture supernatant was measured using ELISA. Values are the mean \pm S.E.M. 1 : 0.001 mg/mL, 2 : 0.01 mg/mL, 3 : 0.1 mg/mL, 4 : 1 mg/mL ¹⁾ : Gami-Yukmi-Jihwang-Tang

고 찰

加味六味地黃湯은 六味地黃湯에 면역 강화, 성장 촉진, 두뇌 발달 등의 효능을 가진 약물들이 가미된 처방으로 각 구성약물에 대해서는 면역학적으로 많은 연구가 있었다. 補血, 滋陰하는

熟地黃은 기억 증진, 면역 증강 등에 유의한 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{15,16)}. 補益肝腎, 滋精하는 山茱萸는 면역 촉진과 항암 작용, 항알러지 효과 등이 있으며 그 기전은 TH세포의 증가와 대식세포의 탐식능 증가와 관련되어 있다¹⁷⁾. 補脾胃, 益肺腎하는 山藥은 파골세포의 기능을 억제하여 골다공증에 유의한 효과가 있으나 성장과 관련된 효능에 대해서는 연구가 필요하다¹⁸⁾. 清熱涼血하는 牡丹皮, 利水滲濕, 寧心安神하는 茯苓, 利水滲濕, 泄熱하는 澤瀉는 직접적인 면역 증진 효과는 확인되지 않았으나 다른 약물의 효능을 배가시키거나 부작용 방지에 대한 효능이 있으리라 생각된다. 가미 약물 중 大補元氣, 補脾益氣하는 人蔘, 補氣升陽, 固表止汗하는 黃芪, 補脾益氣, 燥濕利水하는 白朮 등은 T세포 활성화, 면역기능의 활성화, 항노화, 항산화 등의 효능을 가지고 있다¹⁹⁻²²⁾. 活血通經, 祛瘀止痛의 효능을 가진 紅花는 조혈 작용에 유의한 효과가 있으며²³⁾, 柔肝止痛, 養血斂陰하는 白芍藥, 活血行氣, 祛風止痛하는 川芎은 면역학적 효능에 대해서는 연구가 필요하다. 消食肉積, 散瘀行滯하는 山楂는 Alzheimer's disease의 치료에 유의한 효능이 있으며²⁴⁾, 破氣行瘀, 散積消痞하는 枳實, 補脾益氣, 清熱解毒하는 甘草, 宣肺祛痰, 排膿理氣하는 桔梗은 과항진된 면역기능인 알러지의 치료나 면역세포에 의해 일어나는 부작용 치료에 효능이 있으며²⁵⁻²⁷⁾, 行氣止痛, 健脾消食하는 木香, 瀉腸止瀉, 溫中行氣하는 肉豆蔻, 斂肺, 瀉腸, 生津하는 烏梅, 調中行氣, 溫脾止瀉하는 砂仁, 開胃下食, 升陽止瀉하는 葛根 등의 면역학적 효능에 대해서는 연구가 필요하다. 滋補肝腎, 益精明目하는 枸杞子是 면역 기능 활성화에 유의한 효능이 있으며²⁸⁾, 補肝腎, 壯腰育하는 狗脊은 흰쥐의 성장촉진에 유의한 효능이 있으며²⁹⁾, 散瘀活血, 消腫益腎하는 鹿角膠, 舒筋活絡, 和胃化濕하는 木瓜, 補腎, 續絕傷, 活血하는 骨碎補, 活血祛瘀, 通利關節하는 牛膝, 補腎壯陽하는 破古紙, 祛風解表, 勝濕解痙하는 防風 등은 더 많은 연구가 필요하다. 清血燥濕, 止血安胎하는 黃芩은 학습 및 기억에 바람직한 작용을 미치는 것으로 연구되었으며³⁰⁾, 清熱生津, 清肺化痰하는 天花粉, 斂肺滋腎, 生津斂汗하는 五味子 등은 면역학적 효능에 대한 규명이 필요하다. 총괄적으로 加味六味地黃湯은 성장 촉진, 면역 증강, 항피로의 효능을 갖춘 고루 갖춘 처방이라고 할 수 있다.

FST는 생체내 실험으로 항피로, 지구력 증강, 면역 증강 등의 효능을 평가할 수 있는 매우 적합한 실험 모델이므로^{5,31)} 加味六味地黃湯의 항피로와 면역 증강 효과를 직접적으로 검증해보기 위하여 본 연구의 주된 실험 방법으로 선택하였다. 연구결과에서는 加味六味地黃湯을 투여한 군에서 saline을 투여한 군에 비해 부동시간의 유의한 감소가 관찰됐다. 3일간 투여후 측정된 군에서는 0.1g/kg에서만 유의한 부동시간 감소가 있었으며, 7일간 투여후 측정된 군에서는 0.1g/kg과 0.01g/kg에서 유의한 부동시간 감소가 있었다. 이는 약물의 누적 복용량이 증가함에 따라 항피로와 면역 증강 효과가 더욱 확실하게 나타난다는 것을 간접적으로 입증하고 있다. 그러나 흥미로운 점은 加味六味地黃湯의 1일 투여량이 적을수록 부동시간이 감소하는 경향을 보였다는 것이다. 이는 처방의 1회 투여량 또는 1일 투여량은 체중 또는 생체의 전신 상태에 따라 적절한 량을 투여해야 본 처방의 효과가 발휘되며 용량이 필요 이상으로 많을 경우에는 오히려 효과를 반감시켜 본래의 의도한 효능이 발휘되지 못할 수도 있다는 것을 나타내는 결과로 볼 수 있다.

FST를 시행한 후에는 피로와 관련된 혈중 생화학적 지표 물질의 농도에 변화가 발생하는 것으로 알려져 있는데^{32,33)}, 여러 지표 물질 중에서 본 연구에서 선택한 물질은 BUN, AST, ALT, LDH, Glc, TP 등이었다. 연구결과에서는 加味六味地黃湯 투여군에서 BUN, Glc 수치가 유의하게 감소했고 AST, ALT, LDH, TP 등은 감소하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. BUN은 신기능이 저하될 때 증가하는데 본 연구에서 관찰된 加味六味地黃湯에 의해 BUN 함량이 유의하게 감소하였다는 것은 신기능 보정 등과 관련지어 연구해 볼 가치가 있다. 또한 본 연구에서 유의한 감소를 보인 Glc는 일반적으로 운동시에 에너지원으로 사용되어 운동직후 급속히 감소하는 경향을 나타내는데, 加味六味地黃湯 투여군에서 감소한 것으로 볼 때 대조군에 비해 加味六味地黃湯 투여군에서 운동량이 더 많았다는 것을 알 수 있다. 이는 加味六味地黃湯이 육체적인 피로에 대한 내성을 증가시켜 더 많은 운동을 할 수 있게 한 것으로 생각된다.

加味六味地黃湯의 작용 기전에는 이러한 대사산물 외에 면역 세포활성물질이 관여할 가능성이 있다. 본 연구에서 조사한 IFN- γ , IL-2, IL-4 등은 주로 T 세포에서 분비되는 세포활성물질로, IFN- γ 와 IL-2는 Th1 세포에서 분비되며, 여러 다양한 림프구 집단의 성장과 분화를 조절하는 역할을 하며 T 세포 의존성 면역 반응의 활성화 단계에서 중요한 역할을 수행한다. IL-4는 Th2 세포에서 분비되며 주로 단핵구 (monocyte), 호중구 (neutrophil), 호산구 (eosinophil)와 같은 염증세포의 기능을 조절하거나 활성화시킨다^{34,36)}.

IFN- γ 는 T 세포에 작용하여 Th1 세포의 분화를 촉진시키고 동시에 Th2 세포의 증식을 억제한다. 또한 B 세포를 활성화시켜 IgE 항체를 생성시키게 하는 IL-4의 생성을 조절한다. 인체 면역 체계를 구성하는 IL-4와 IFN- γ 등에 불균형 상태가 발생하면 여러 질환 또는 질병이 발생할 수 있다^{37,38)}. IL-2는 면역반응의 활성화 단계에서 중요한 역할을 하며, 활성화된 보조 Th1 세포에서 생성된다. 또한 T 세포의 주된 자가 분비적 성장 인자로 T 세포

의존적 면역 반응의 크기를 결정하며, IFN- γ 의 합성도 자극한다. 생체내에서 적절한 양의 IL-2가 합성되지 못하면 항원특이적 무반응의 원인이 된다³⁹⁾. IL-4는 CD4⁺ T 세포와 활성화된 비만세포 등에서 생성되는 20kDa의 단백질로서 B 세포 성장인자로 작용한다. IL-4는 B 세포의 면역글로불린 클래스 전환에 관여하는 분화인자로 작용하여 형질세포에서 IgE를 생성시켜 알레르기반응을 유발하는데 주로 관여하는 물질로 잘 알려져 있지만, 면역 증강 효과에 대한 직접적인 증거도 제시된 바 있다⁴⁰⁾.

본 연구에서는 加味六味地黃湯에 의한 IFN- γ , IL-2, IL-4 등 주요 세포활성물질 생성에 미치는 영향을 분석했으나 유의한 결과를 얻지 못하였다. 향후 다양한 실험조건에서 더욱 세심한 검토가 필요할 것으로 사료된다. 결론적으로 본 연구에서는 임상적으로 예상할 수 있는 加味六味地黃湯의 항피로 및 면역 증강 효능을 생체내 실험동물모델을 활용하여 경구투여에 의한 행동 변화를 관찰하고, 그에 따른 관련 인자들의 양적변화를 확인함으로써, 그 효능을 입증하였다. 하지만 향후 본 연구를 바탕으로 加味六味地黃湯의 항피로 및 면역 증강 효능에 대한 다양하고 상세한 기초 연구와 적합한 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서 저자는 加味六味地黃湯의 항피로 및 면역 증강 효능을 조사하기 위해 FST와 그에 따른 혈중 생화학적 지표 물질들의 변화 및 T 세포주에서 IFN- γ , IL-2, IL-4 등의 세포활성물질 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味六味地黃湯은 FST의 부동시간을 감소시켰다. 加味六味地黃湯 투여 3일째에는 0.01g/kg 투여군에서, 투여 7일째에는 0.1과 0.01g/kg 투여군에서 유의한 결과가 관찰됐다. 加味六味地黃湯은 FST 후 여러 혈중 생화학적 지표 물질 중 BUN과 Glc의 수치를 유의하게 감소시켰다.

MOLT-4 세포에 加味六味地黃湯을 0.001-1mg/mL의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 상등액에서 IFN- γ 생성을 측정된 결과 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. MOLT-4 세포에 加味六味地黃湯을 0.001-1mg/mL의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 상등액에서 IL-2 생성을 측정된 결과 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. MOLT-4 세포에 加味六味地黃湯을 0.001-1mg/mL의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 상등액에서 IL-4 생성을 측정된 결과 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 볼 때, 加味六味地黃湯은 피로 관련 질환 또는 면역기능의 저하와 관련된 소아에게 유용하게 활용될 수 있다는 것을 알 수 있다. 향후 이러한 효능이나 주치증에 대한 확인과 기전의 규명이 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 이진용, 김영신, 배정화, 정규만. 六味地黃丸의 소아질환치료

- 에 대한 문헌적 고찰. 대한한방소아과학회지 4(1):51-65, 1990.
2. 이승연. 소아 외래환자의 주소증에 관한 임상적 고찰. 대한한방소아과학회지 15(1):203-216, 2001.
 3. Coombes JS, McNaughton LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 40(3):240-246, 2000.
 4. Dorchy H. Sports and type I diabetes: personal experience. *Rev Med Brux* 23(4):A211-217. Review. French. 2002.
 5. Koo HN, Lee JK, Hong SH, Kim HM. Herbkinases increases physical stamina in mice. *Biol Pharm Bull* 27(1):117-119, 2004.
 6. Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC Jr, Jones RM, Portoghese PS, Carlezon WA Jr. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305(1):323-330, 2003.
 7. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787-793, 1996.
 8. 박은혜, 정명숙, 박창범, 지상은, 이영혁, 배현수, 신민규, 김현택, 홍무창. 육미지황탕가감방-1, 2가 학습과 기억능력에 미치는 영향에 관한 임상연구. 동의생리병리학회지 16(5):976-988, 2002.
 9. 최보엽, 배현수, 신민규, 홍무창. 육미지황탕가미방이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16(5):1025-1034, 2002.
 10. 신용욱, 박용일, 김홍렬, 이응세. 육미지황탕가미방이 골형성 관련 유전자인 TG2와 BMP4의 전사활성에 미치는 영향. 대한한의학회지 23(2):190-197, 2002.
 11. National Research Council: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, The 7th Ed. National Academy Press, Washington D.C. 1996.
 12. 신민교(Sin MG): 임상본초학. 영림사, 서울. 2002.
 13. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604):730-732, 1977.
 14. Scuderi P, Sterling KE, Lam KS, Finley PR, Ryan KJ, Ray CG, Petersen E, Slymen DJ, Salmon SE. Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 2(8520):1364-1365, 1986.
 15. 박승원, 이진우, 배현수, 신민규, 홍무창. 숙지황이 기억과 망각 속도에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 17(1):57-63, 2003.
 16. 황영명. 생지황, 건지황, 숙지황이 세포성 면역반응 및 체액성 면역반응에 미치는 영향. 대한한의학회지 8(2):82-83, 1987.
 17. 이원범, 정한솔, 권진, 오찬호, 이광규. 산수유의 면역조절작용. 동의생리병리학회지 16(2):267-271, 2002.
 18. 황귀서, 이대영. Estrogen 결핍성 골다공증에 미치는 산약 추출물의 영향. 대한예방의학회지 7(1):55-66, 2003.
 19. 강희, 배연수, 안규석. 황기에 의한 Helper T 세포의 생존 및 활성 증가. 동의생리병리학회지 15(4):560-565, 2001.
 20. 송봉근. 황기가 면역세포의 기능에 미치는 영향. 대한본초학회지 13(2):115-128, 1998.
 21. 김영희, 안규석, 송동근, 위명복. 흰쥐에서 노화관련 생리적 변화들에 미치는 인삼 및 황기의 효과. 대한한의학회지 10(2):26-46, 1989.
 22. 나영걸, 김광호. 백출과 구기자가 생쥐의 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 영향. 경희대논문집 10:579-587, 1987.
 23. 서영배, 이용구, 이영철, 민평기. 홍화의 조혈작용에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지 17(1):13-28, 2003.
 24. 정인철, 이상룡. 산사육이 Alzheimer's disease 병태 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16(2):279-288, 2002.
 25. 송봉근, 김형균, 이연정, 권용택, 황광호, 주흥현. 지실의 항알러지 작용에 대한 연구. 대한한방내과학회지 21(1):156-161, 2000.
 26. 권문현, 김형균, 이연정. 감초와 뇌공동합제 전탕액이 마우스의 면역억제에 미치는 영향. 원광대 논문집 4(1):337-359, 1994.
 27. 정욱, 정희재, 정승기, 이형구. 행인과 길경이 Asthma model 내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 21(1):31-38, 2000.
 28. 임강현, 부영민, 박선영, 이동환, 김호철. 구척이 흰쥐 성장호르몬 분비에 미치는 영향. 대한본초학회지 17(2):133-138, 2002.
 29. 임강현, 김호철. 구척이 흰쥐의 장골 길이 성장에 미치는 영향. 대한본초학회지 16(2):49-55, 2001.
 30. 김지현, 황혜정, 김현영, 함대현, 이해정, 심인섭. 황금과 천마의 학습 및 기억에 미치는 영향. 대한한의학회지 23(2):125-138, 2002.
 31. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Kim JB, Lee EM, Park EJ, Jang CH, Hong SH, Kim HM. Immune-enhancement effect of the herbal combination Allergina. *Clin Chim Acta* 337(1-2):77-84, 2003.
 32. De-Mello MA. Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. *Braz J Med Biol Res* 27(10):2461-2466, 1994.
 33. Moriura T, Matsuda H, Kubo M. Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE. V. anti-fatigue effect of the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats. *Biol Pharm Bull* 19(1):62-66, 1996.
 34. 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 U S A* 99(9):6198-6203, 2002.
 35. 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* 168(9):4504-4510, 2002.
36. Ying S, Kikuchi Y, Meng Q, Kay AB, Kaplan AP. TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J Allergy Clin Immunol* 109(4):694-700, 2002.
37. Chang TT, Stevens SR. Atopic dermatitis: the role of recombinant interferon-gamma therapy. *Am J Clin Dermatol* 3(3):175-83, 2002.
38. 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* 23(3):248-52, 2002.
39. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2(1):37-45, 2002.
40. Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Miller S, Dickinson AM. Expression and production of interleukin 4 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 42(4):689-698, 2001.