

究原心腎丸이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

최순호^{1,2}, 강석봉¹, 최선미², 이연경¹

¹대구한의대 한의과대학 신계내과교실, ²한국한의학연구원

The Effect of *Kuwonsimsin-hwan* on Immunosuppression Induced by Methotrexate in Rat

Soon-ho Choi^{1,2}, Seok-bong Kang¹, Sun-mi Choi², Yeon-kyeong Lee¹

¹Dept. of Oriental Internal Medicine, Daegu Haany University, ²Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : In the present study, the effect of *Kuwonsimsin-hwan* (KSS) was tested in methotrexate (MTX)-induced immunosuppressed SD rats.

Methods : Methotrexate was fed to white rats once a day for 4 days. After the immune responses of the rats deteriorated, dried extracts of *Kuwonsimsin-hwan* mixed in water was fed to the rats once a day for 14 days. We then measured the number of lymphocytes in peripheral blood and the percentage of B-cells, T-cells, CD3+CD4+ T-cells, CD3+CD8+ T-cells and IL-2 productivity sampled from spleen and peripheral region.

Results :

① The number of lymphocytes and the percentage of T-cells and CD3+CD4+ T-cells in peripheral blood increased significantly in the KSS group as compared with the control group.

② The percentage of B-cells, CD3+CD8+ T-cells, and CD4+/CD8+ T-cells in peripheral blood were not different statistically.

③ The percentage of T-cells in spleen and IL-2 productivity of spleen cells increased significantly in the KSS group as compared with the control group.

④ The percentage of CD3+CD4+ T-cells in spleen increased in KSS the group as compared with the control group but without statistical significance.

⑤ The percentage of B-cells, CD3+CD8+ T-cells, and CD4+/CD8+ T-cells in spleen were not different statistically.

Conclusion : It is concluded that *Kuwonsimsin-hwan* has immunostimulating effect on MTX-induced immunosuppressed SD rats.

Key Words : *Kuwonsimsin-hwan*, methotrexate, immunosuppression, immunostimulation

緒論

· 접수 : 2007년 5월 3일 · 논문심사 : 2007년 5월 6일
· 채택 : 2007년 5월 30일
· 교신저자 : 이연경, 대구 상동 165 대구한의대 부속한방
병원 신계내과
(Tel : 053-770-2178, Fax : 053-770-2169,
E-mail : calm2000@hanmail.net)

면역이란 미생물과 단백질, 다당류와 같은 거대 분자를 포함하는 외래물질에 대한 생체의 반응과 그 반응에 의해 초래되는 생리학적, 병리학적 결과까지를 포함하고 있으며¹⁾, 인체 조직을 손상시키는 유기물과 화학물질로부터 방어 작용을 수행

하여 생체의 항상성을 유지하고 저항력을 증가시키는 것이 면역계의 기능이다^{2,3)}.

韓醫學에서는 《黃帝內經》의 <素問·刺法論>⁴⁾에서 “正氣存內 邪不可干”, <素問·評熱病論>⁴⁾에서 “邪之所湊 其氣必虛”, <靈樞·口問>⁵⁾에서는 “邪之所在 皆爲不足”라 하여 正氣의 虛弱이 疾病發生의 根源이 되며 疾病을 正氣와 邪氣간의 抗爭으로 인식하여 왔다. 이러한 正氣의 疾病에 대한 抵抗能力은 현대의 면역기능과 유사하며 특히 氣表를 保衛하고 外邪의 침입을 방어하는 기능을 수행하는 衛氣와 관련하여 그 유사성을 인식할 수 있다⁶⁾. 이러한 연관성에 근거하여 최근 人蔘⁷⁾, 黃芪⁸⁾, 何首烏⁹⁾, 十全大補湯¹⁰⁾ 등의 藥物과 處方들이 면역기능에 미치는 영향에 관한 연구들이 이루어져 왔으나 究原心腎丸에 관한 연구는 아직까지 없었다.

이에 저자는 《醫學入門》<用藥賦·諸虛門>¹¹⁾과 《東醫寶鑑》<虛勞門>¹²⁾에서 “調陰陽 補心腎虛 溫寒燥濕最效”, “治虛勞 水火不交濟”의 효능이 있다고 언급되어 있으며, 대부분이 補肝腎, 補氣, 補血의 효능을 지닌 藥物로 구성된 究原心腎丸이 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 면역억제제인 methotrexate (MTX)를 흰쥐에 투여하여 면역기능을 저하시킨 뒤, 究原心腎丸을 투여한 후 末梢血液과 脾臟내의 B 細胞率과 T 細胞率, 末梢血液과 脾臟내의 CD3+CD4+ T 細胞率과 CD3+CD8+ T 細胞率, IL-2 生産能 등의 변화를 관찰하여 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 動物

體重 200±20g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 固形飼料(構成成分: 조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6%)

와 물을 充分히 供給하면서 實驗室 環境에서 2週以上 적응시킨 후 사용하였다.

2) 藥材

本 實驗에 사용한 藥材는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 실험에 사용한 究原心腎丸 處方은 《東醫寶鑑》¹²⁾에 수록된 處方으로 그 내용과 1劑의 分量은 Table 1과 같다.

2. 實驗方法

1) 檢液의 準備

上記한 究原心腎丸 半劑 分量을 5,000 cc의 등근 플라스크에 3,000 cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2 μ m filter로 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80 $^{\circ}$ C deep freezer(SANYO, Japan)에서 한 시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결 건조하여 82.0g의 분말을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50 ml conical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

2) 實驗動物群 分離

正常群(normal group), 對照群(control group), 實驗群(KSS group)으로 구분하여, 한 군에 6마리씩 配定하였다. 正常群은 固形飼料과 물만을 充分히 供給하였고, 對照群은 正常群과 同一한 環境에서 MTX를 투여하였고, 實驗群에 투여하는 검액과 같은 양의 생리식염

수를 경구 투여하였다. 實驗群은 對照群과 同一한 方法으로 MTX를 투여하고 究原心腎丸 건조액 기스를 증류수에 녹여서 경구 투여하였다.

3) MTX를 이용한 免疫低下

MTX粉末을 2mg/kg으로 조정하여 생리식염수

Table 1. Composition of *Kuwonsimsin-hwan*

| Herbs | Scientific Name | Dose(g) |
|-------|---|---------|
| 免絲子 | <i>Cusutae Semen</i> | 112.5 |
| 牛膝 | <i>Achyranthis Bidentatae Radix</i> | 37.5 |
| 熟地黃 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 37.5 |
| 肉蓯蓉 | <i>Cistanches Herba</i> | 37.5 |
| 鹿茸 | <i>Cervi Pantotrichum Cornu</i> | 37.5 |
| 附子 | <i>Aconiti laterialis Preparata Radix</i> | 37.5 |
| 人蔘 | <i>Ginseng Radix</i> | 37.5 |
| 遠志 | <i>Polygalae Radix</i> | 37.5 |
| 白茯苓 | <i>Poria</i> | 37.5 |
| 黃芪 | <i>Astragali Radix</i> | 37.5 |
| 山藥 | <i>Dioscoreae Rhizoma</i> | 37.5 |
| 當歸 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 37.5 |
| 龍骨 | <i>Fossilia Ossis Mastodi</i> | 37.5 |
| 五味子 | <i>Schizandrae Fructus</i> | 37.5 |
| Total | | 600 |

에 녹여 1회/일 1ml씩 4일간 경구 투여하였다.

4) 檢液 投與

MTX투여로 免疫低下를 유발한 다음 이틀째 되는 날부터 究原心腎丸 건조엑기스를 마리 당 273.0 mg/200g씩 증류수에 녹여서 實驗群의 흰쥐에 1日 1회씩 14日間 일정한 시각에 경구 투여하였다. 對照群은 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다.

5) 採血

Serum은 15일째 心臟穿刺를 통해 얻었다. Chloroform으로 마취하고 心臟穿刺하여 혈액을 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt)가 들어 있는 병에 넣어 잘 섞어서 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

6) 脾臟細胞의 준비

心臟採血 후 腹部를 70% alcohol로 완전히 도포한 후 무균적으로 脾臟을 적출한 다음, 脾臟 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4℃ RPMI-1640 (GibcoBRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어있는 petri dish에서 작은 해부

가위로 脾臟을 잘게 자르고 멸균된 유리막대로 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 부유시켰다. 이 부유액을 스테인레스 철망(mesh No. 100: 청계상공사, 한국)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 細胞덩어리를 제거하고 RPMI-1640으로 1회, HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Cat. No. 21250-089, GibcoBRL, USA)로 2회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10×HBSS로 2회 세척하고 RPMI-1640배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 脾臟細胞를 재 부유하였다.

7) 末梢血液내의 림프구수 측정

EDTA를 사용하여 응고 방지한 혈액에 동량의 PBS를 섞은 것과 脾臟細胞 부유액에 Lymphoprep (1.077±0.0001 g/ml, Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)를 첨가한 것을 25분 동안 2000 rpm에서 원심분리하여 상층을 버리고, 중간에 하얗게 부유해 있는 임파구를 분리하였다. 분리된 임파구를 PBS에 부유 시켜서 2000 rpm에서 10분간 2회 원

심세척한 후 RPMI-1640 배지에 부유 시키고, 광학현미경을 이용하여 Trypan blue exclusion으로 세포 수를 관찰하였다.

8) 末梢血液과 脾臟내의 B 細胞率과 T 細胞率 측정

EDTA tube에 담긴 혈액과 비장세포 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣었다. 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 μ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody (Caltag Laboratories)를 0.5 μ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석하였다.

9) 末梢血液과 脾臟내의 CD3+CD4+ T 細胞率 측정

EDTA tube에 담긴 혈액과 비장세포 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣었다. 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 μ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 0.5 μ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 lysing solution (FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2 ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000 rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000 rpm, 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 500 μ l의

PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer (Becton dickinson, USA)로 분석하였다.

10) 末梢血液과 脾臟내의 CD3+CD8+ T 細胞率 측정

EDTA tube에 담긴 혈액과 비장세포 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣었다. 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 μ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 0.5 μ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 lysing solution (FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2 ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석하였다.

11) Interleukin-2 生産能 측정

준비된 비장세포를 FBS가 10% 첨가된 RPMI-1640 혼합배지에 1 \times 10⁶cell/ml의 농도로 재부유하고, 여기에 concanavalin-A(Sigma, USA)를 100 μ g/ml의 농도로 가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 상층액을 수거하여 interleukin-2(IL-2)의 생산량을 고품상 면역효소 측정법을 이용한 mouse IL-2 측정용 ELISA Kit 인 Intertest-2X kit(Endogen, USA)로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 검체내의 IL-2양을 측정하였다. 96 well plate의 각 well에 시료를 10 μ l씩 분주하고 덮개로 덮은 후 36 $^{\circ}$ C에서 40분간 배양하였고 배양이 끝난 후 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척한후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 biotinylated polyclonal antimouse IL-2를 100 μ l씩 분주하고 덮개로 덮은후 37 $^{\circ}$ C에서 40

분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate에서 paper towel로 습기를 제거하고 각 well에 streptoavidin-peroxidase를 100 μ l씩 분주한 뒤 다시 덮개로 덮은 후 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 배양하였다. 다시 well의 반응용액을 제거하고 세척용 buffer로 4번 세척 후 plate towel로 습기를 제거하고 각 well에 substrate mix를 100 μ l씩 분주하여 다시 덮개로 덮은 후 상온에서 10분간 배양하였다. 다시 각 well에 정지용액을 100 μ l씩 분주한 후 ELISA판독기로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 standard curve 상에서 측정된 흡광도에 해당하는 IL-2의 농도를 읽었다.

3. 統計分析

모든 統計分析은 윈도우용 SPSS(ver. 11.0)를

이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 \pm 표준오차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons(Duncan's method)로 분석하였다. 유의수준은 0.05로 하였다.

實驗成績

1. 末梢血液内の 림프구수에 미치는 影響

對照群의 림프구수는 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 1).

2. 末梢血液内の B 細胞率에 미치는 影響

末對照群의 B 細胞率は 正常群에 비하여 유의

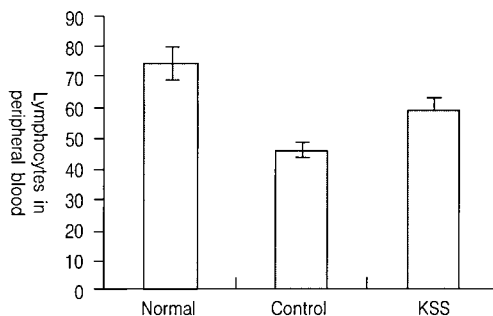


Fig. 1. Effect of KSS on the lymphocytes of peripheral blood in rat.

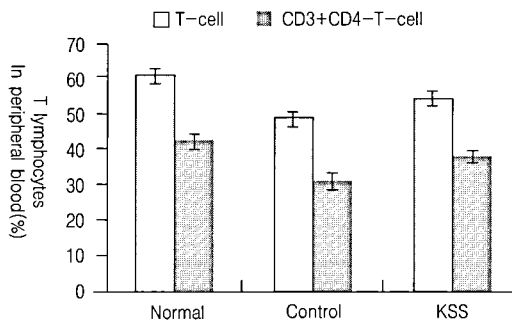


Fig. 2. Effect of KSS on the percentage of T-cell and CD3+CD4+ T-cell of peripheral blood in rat.

한 감소를 보였고, 實驗群과 對照群은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. 末梢血液내의 T 細胞率과 CD3+CD4+ T 細胞率에 미치는 影響

對照群의 T 細胞率과 CD3+CD4+ T 細胞率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 2).

4. 末梢血液내의 CD3+CD8+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 細胞比率에 미치는 影響

집단간 CD3+CD8+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 細胞比率은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

5. 脾臟내의 B 細胞率에 미치는 影響

집단 간 B 細胞率은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

6. 脾臟내의 T 細胞率과 CD3+CD4+ T 細胞率에 미치는 影響

對照群의 T 細胞率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 3). 반면, 對照群의 CD3+CD4+ T 細胞率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3).

7. 脾臟내의 CD3+CD8+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 細胞比率에 미치는 影響

집단간 CD3+CD8+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 細胞比率은 통계적으로 有意한 차이를 보이지 않았다.

8. IL-2 生産能에 미치는 影響

對照群의 IL-2 生産能은 正常群에 비하여 유의

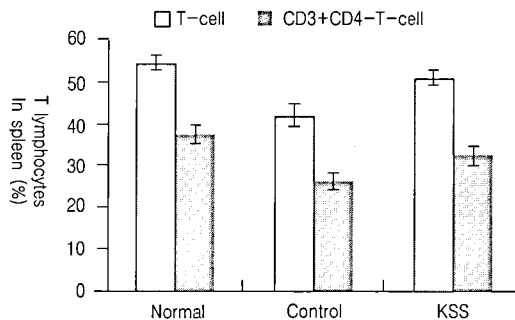


Fig. 3. Effect of KSS on the percentage of T-cell and CD3+CD4+ T-cell of spleen in rat.

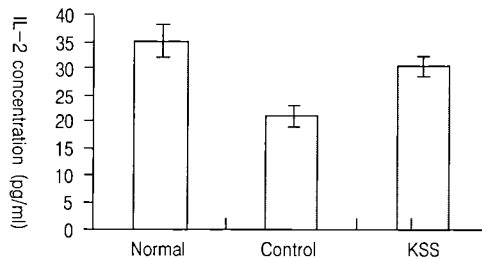


Fig. 4. Effect of KSS on the IL-2 productivity in rat.

한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 12).

考 察

면역은, 생물이 만드는 갖가지 유기물질의 하나 하나를 미세한 구조의 차이로서 식별할 수 있는 고도로 분화된 세포집단인 림프구를 축으로 하여, 이 림프구에 통제되어 동원되는 탐식세포와 보다 광범위의 세포가 나타내는 생체방어의 작동이라고 정의되기도 한다¹³⁻⁴⁾.

이러한 인체의 면역반응은 先天免疫(innate immunine)과 適應免疫(adaptive immunine)의 두 종류로 분류되며, 先天免疫은 상피와 상피 표면에서 분비되는 항 미생물 물질과 같은 物理的 化學的 장벽, 포식세포와 자연 살해세포, 보체계의 구성 성분, 염증반응의 기타 매개자들을 포함하는 혈액 단백질과 세포들의 활성을 조절하는 사이토카인(cytokine)이라 불리는 단백질을 구성되어 미생물에 대한 빠르고 일차적인 방어를 담당한다. 適應免疫은 體液性 免疫(humoral immunity)과 細胞性 免疫(cellular immunity)으로 구분된다. 體液性 免疫은 B 림프구에 의해 생성된 抗體에 의해 매개되며, 항체가 세균과 결합함으로써 세포의 미생물이나 미생물이 분비하는 독소에 대한 방어 작용을 담당한다. 細胞性 免疫은 T 림프구에 의해 매개된다. 바이러스나 일부 박테리아와 같은 세포 내 미생물은 다른 숙주 세포내에서 순환 항체와 접촉함이 없이 생존하고 증식할 수 있다. 그러한 감염에 대한 방어를 細胞性 免疫이 담당하여 포식 세포 내에 있는 미생물을 파괴하거나 혹은 감염된 세포를 용해시킨다¹⁻³⁾.

림프구는 모든 혈액세포와 마찬가지로 골수의 줄기세포(stem cell)로부터 생성되는데, B 림프구는 골수에서 비 림프구성 지지세포의 도움을 받아 발달하며, 성숙 B 림프구로의 마지막 발달은 비장과 같은 이차 림프기관에서 주로 일어나고, T 림

프구는 흉선으로 이동하여 항원 림프구를 발현하는 동안 복잡한 성숙단계를 거쳐 성숙한 세포의 기능적 특성을 획득하게 된다. 현재 명명법은 림프구의 분화 단계를 확인하는데 사용되는 단일 클론 항체의 군에 의해 인식되는 분자를 의미하는 ‘분화의 군(cluster of differentiation)’ 즉 CD란 약칭을 쓰고 있다. T 림프구가 골수에서 생겨 흉선으로 이동한 뒤 성숙하는 동안 서로 다른 세포막 단백질들이 발현하는 과정은, 초기의 흉선세포는 CD4도 CD8도 발현하지 않는 CD4-CD8- 또는 더블 네가티브(Double Negative)에서 CD4+CD8+ 혹은 더블 포지티브(Double Positive)의 단계로 되었다가, 마지막 단계에서 CD4+CD8- 혹은 CD4-CD8+인 싱글 포지티브(Single Positive)의 세포로 발달해 가는데, 세포성 면역반응에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려진 대부분의 보조 T 림프구는 CD4라는 표면단백질을, 또 대부분의 세포독성 T 림프구는 다른 표지인 CD8이라는 표면단백질을 발현하며, 아직 논란의 여지가 많으나 많은 실험적 방법들에 의하면 면역반응을 억제하는 세포는 CD8+이며, CD8+ 세포의 감소가 말초혈액에서 항원에 대한 T 림프구의 반응성을 증가시킨다는 보고가 있다. 항원의 자극에 대한 반응으로 보조 T 림프구가 분비하는 사이토카인 중 IL-2는 T 림프구에 대한 주된 자가 분비적 성장인자로, 활성화된 CD4+ T-cell에 의해 합성되는 IL-2의 양은 T 림프구 의존적 면역반응의 크기를 결정하며, 자연 살해세포의 성장을 자극하여 세포 용해성 기능을 증진시키기도 하고 B 림프구에 성장인자와 항체 생산을 위한 자극 인자로 작용하기도 하고 활성화된 T 림프구에 대한 자살인자로 작용하기도 한다^{1,3,15-17)}.

이러한 역할을 하는 림프구 표면의 표지 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역력을 정량할 수 있으며, 체내의 B 세포율과 T 세포율 및 T 세포 아집단들의 세포율 측정이 면역 기능 검사들 중의 하나이고, 末梢血液내의 CD4+ T 細胞率과 CD4+

/CD8+ T 세포비율은 免疫缺乏性 疾患이나 자가 면역질환 등을 평가하는데 응용되는 면역 기능 검사방법이다^{3,18-23}).

생체의 면역반응은 항암제이자 면역억제제인 MTX를 투여하면 저하되는데, 이는 MTX가 folic acid와 구조상 유사하여 folic acid의 길항물질로 작용하므로 folic acid에서 folinic acid로의 전환에 관여하는 folic acid reductase를 저해하여 folic acid로 환원되는 것을 억제함으로써 DNA 합성을 방해하기 때문이며, 생체에 있어서는 folic acid 결핍을 초래하여 세포분열작용으로 골수를 억제하여 백혈구 감소현상이 나타나며, 신장독성이 강하다^{24,5}).

韓醫學에서는 疾病이 外邪의 侵入, 正氣의 不足, 陰陽의 失調로 발생한다고 보았고, 이러한 변화를 正氣와 邪氣의 抗爭 과정으로 설명하여 왔다. 이러한 연관성에서 正氣와 邪氣의 관계를 통하여 면역현상을 설명할 수 있을 것으로 생각하며, 특히 氣表를 保衛하고 外邪의 침입을 방어하는 기능을 수행하는 衛氣와 관련하여 그 유사성을 인식할 수 있다. 이에 대하여 《黃帝內經》 <素問·刺法論>⁴⁾에서 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, <素問·評熱病論>⁴⁾에서는 “邪之所湊 其氣必虛”, <靈樞·口問>⁵⁾에서는 “邪之所在 皆爲不足”이라 하여 正氣가 虛弱하면 疾病이 發生한다고 인식하였고, <素問·通評虛實論>⁴⁾에는 “邪氣盛則實 正氣奪則虛”라고 하여 正氣와 邪氣의 勢力均衡을 통하여 虛實이 分別됨을 말하였다.

또한 그 치법은 <素問·四氣調神大論>⁴⁾에서 “不治已病而治未病”이라고 한 바와 같이 예방위주의 治法을 행하며, 정기를 복돋우고 사기를 제거하는 扶正祛邪를 대원칙으로 삼았다²⁶⁾. 특히 腎은 先天之氣인 元氣를 장하며 모든 생명활동의 원동력이 되므로, 虛해진 腎陽腎陰을 보하여 전신의 음양을 조절하는 것이 곧 면역기능조절의 근본이 된다고 볼 수 있다.

최근 韓藥, 鍼灸, 藥鍼液 등이 면역기능에 미치

는 영향에 관련된 연구들로 崔²⁷⁾, 周²⁸⁾, 宋²⁹⁾ 등은 鍼灸療法 및 溫鍼, 레이저침이 면역기능에 미치는 영향에 대하여 연구하였고, 夏⁷⁾, 宋⁸⁾, 黃¹⁰⁾, 金³⁰⁾, 鄭³¹⁾ 등은 人蔘, 黃芪, 十全大補湯, 歸茸湯, 香砂六君子湯, 加味補兒湯 등의 면역효과에 관해 보고를 하였으며, 특히 金⁹⁾은 何首烏가 MTX로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 일정한 효과가 있음을 보고하였으나, 究原心腎丸이 면역기능에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았다.

究原心腎丸은 《醫學入門》 <用藥賦·諸虛門>¹¹⁾에서 “調陰陽 補心腎虛 溫寒燥濕最效”라고 하였고, 《東醫寶鑑》 <虛勞門>¹²⁾에서는 “治虛勞 水火不交濟”을 효능을 지닌다고 하였다. 究原心腎丸의 구성 약물들의 효능을 살펴보면, 免絲子是 補肝腎, 益精髓하고, 牛膝은 補肝腎, 強筋骨하며, 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓하고, 肉苁蓉은 補腎益精하며, 鹿茸은 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨한다. 附子是 回陽補火, 散寒除濕하고, 人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神之 효능을 지녔으며, 遠志는 寧心安神시키며, 白茯苓은 寧心, 安神, 利水の 효능을 가졌다. 黃芪는 益衛固表, 補中益氣하고, 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하며, 當歸는 補血和血하고 龍骨은 鎮驚安神, 固精하며, 五味子是 斂肺, 滋腎, 生津, 澁精의 효능을 지녔다³²⁾. 대부분이 補肝腎, 補氣, 補血의 효능을 지닌 약물들로 구성되어 인체의 면역기능의 증강에 일정한 효과가 있을 것으로 생각되며 특히 肝腎虛寒하고 기혈이 모두 쇠한 노약자나 중병을 앓고 있는 자에게 유효한 면역증강효과가 기대된다.

이에 MTX를 경구 투여하여 면역기능을 저하시킨 흰쥐에게 究原心腎丸 건조엑기스를 증류수에 녹인 검액을 경구 투여한 후, 면역기능의 지표가 되는 末梢血液과 脾臟내의 B 細胞率과 T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率과 CD3+CD8+ T 細胞率, IL-2 生産能 등을 측정하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

末梢血液내의 림프구수는 對照群에서 正常群에

비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보여 MTX로 인해 저하된 말초혈액의 림프구를 증가시켰음을 알 수 있었다.

末梢血液내의 B 細胞率은 對照群에서 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 末梢血液내의 對照群의 T 細胞率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보여 究原心腎丸 이 MTX로 인해 감소된 末梢血液내의 림프구수를 증가시키며 특히 B 림프구에 대한 증가효과는 별무하나 T 림프구의 수를 증가시키는 효능이 현저함을 알 수 있었다.

末梢血液내의 CD3+CD4+ T 細胞率은 對照群에서 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보여 究原心腎丸이 末梢血液내의 보조 T 림프구를 증가시킨다고 볼 수 있으므로 細胞性 免疫의 증강에 일정한 역할을 할 것으로 여겨진다.

末梢血液내의 CD3+CD8+ T 細胞率을 살펴본 결과 각각의 집단간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

MTX로 인해 증가될 것으로 기대했던 말초 혈액내 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화가 유의하지 않으므로, 究原心腎丸이 면역억제제의 투여로 인한 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구에 대한 억제 효과는 이 실험에서 밝혀내지 못하였다.

末梢血液내의 CD4+/CD8+ T 細胞比率을 살펴본 결과, 각각의 집단간에는 통계적으로 有意한 차이가 없었다.

脾臟내의 B 細胞率을 살펴본 결과, 각각의 집단간에서 통계적으로 유의한 차이가 드러나지 않아, MTX의 면역억제 효과는 주로 T 림프구의 억제를 통해서 일어남을 확인할 수 있었다.(F=2.024, p=0.167, ANOVA test)

脾臟내의 T 細胞率을 살펴본 결과 對照群에서 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은

對照群에 비하여 유의한 증가를 보여, 脾臟내에서도 MTX로 인해 저하된 T 림프구를 일정하게 증가시켰음을 알 수 있었다.

脾臟내의 CD3+CD4+ T 細胞率을 살펴본 결과 對照群에서 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않아, 보조 T 림프구에 대한 효과는 말초혈액에 비하여 현저하지 않았지만 脾臟내에서도 보조 T 림프구수를 증가시키므로, 細胞性 免疫에 일정한 영향을 끼칠 것으로 생각한다.

脾臟내의 CD3+CD8+ T 細胞率을 살펴본 결과 각각의 집단간에 통계적으로 유의한 차이가 없어, 비장 내에서도 MTX로 인해 증가될 것으로 여겨졌던 脾臟내의 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화가 유의하지 않으므로, 究原心腎丸의 MTX 투여로 인한 脾臟내의 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구에 대한 억제 효과는 이 실험에서도 밝혀내지 못하였다.

脾臟내의 CD4+/CD8+ T 細胞比率을 살펴본 결과 T 細胞比率 또한 통계적으로 有意한 차이가 없었다.

IL-2의 生産能을 살펴본 결과 對照群에서 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보여, 究原心腎丸이 MTX로 인해 저하된 IL-2의 生産能을 증가시키므로 B 림프구, 포식세포와 기타의 세포뿐만 아니라 T 림프구의 증식과 분화를 자극하여 면역효과를 증강시킬 것을 예상할 수 있다.

以上の 實驗結果로 보아 究原心腎丸이 MTX로 저하된 T 림프구수를 증가시키며, 특히 CD3+CD4+ T 細胞率을 증가시키는 효과가 현저하며, 이는 脾臟보다는 末梢血液내에서 그 효과가 더 우수하게 드러났다. 즉 究原心腎丸은 CD3+CD4+ T 細胞率을 증가시키므로 細胞性 免疫의 주요 성분인 보조 T 림프구의 수를 증가시켜 인체의 면역기능 중 細胞性 免疫機能을 回復 增進시키는데 유의한 효과가 있을 것으로 생각한다.

結 論

究原心腎丸이 免疫機能에 미치는 影響을 관찰하기 위하여, MTX로 免疫機能低下가 유발된 흰쥐에게 究原心腎丸 추출물을 투여한 후, 末梢血液 내의 림프구수, 末梢血液과 脾臟내의 B 細胞率, T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率과 IL-2 生産能의 變化를 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 末梢血液내의 림프구수, T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率은 實驗群이 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.
2. 末梢血液내의 B 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率, CD4+/CD8+ T 細胞比率은 유의한 차이를 보이지 않았다.
3. 脾臟내의 T 細胞率과 IL-2 生産能은 實驗群이 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.
4. 脾臟내의 CD3+CD4+ T 細胞率은 실험군이 대조군에 비하여 증가하기는 하였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.
5. 脾臟내의 B 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率, CD4+/CD8+ T 細胞比率은 유의한 차이를 보이지 않았다.

以上の 實驗結果로 보아 究原心腎丸이 MTX로 免疫機能의 低下가 유발된 흰쥐에서 免疫機能을 回復시키는 효과가 있으며 細胞性 免疫의 回復과 增強에 유의한 효과가 있을 것으로 생각한다.

參考文獻

1. Abbas, Lichtman, Pober. 세포분자면역학. 서울:범문사. 2002:3-38
2. 최명애, 김주현, 박미정, 최스미 이경숙 공저. 生理學. 서울:현문사. 1997:113-26.
3. 전남대학교 의과대학 면역 및 알레르기학 편찬위원회. 면역 및 알레르기학. 광주:전남대학교 출판부. 1999:1-12, 58-60.
4. 裴秉哲 注解. 黃帝內經讀解. 서울:成輔社. 2000: 12,19,150,168,388.
5. 裴秉哲 譯. 今釋黃帝內經靈樞. 서울:成輔社. 1995: 277.
6. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울:高文社. 1993:118-21.
7. 하대유. 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구 (제Ⅲ보). 대한면역학회지. 1979;1(1):45-52.
8. 宋峰根, 李彥政, 金炯均, 陣善斗, 金成宰, 金東赫. 黃芪가 免疫細胞의 기능에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1998;13(2):115-28.
9. 김일영, 이상재, 김광호. 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한예방의학학회지. 2000; 4(2):152-169.
10. 黃奎東 外3人. 十全大補湯 및 十全大補湯加 瓦松의 抗癌효과와 면역반응에 관한 연구. 대한한방중앙학회지. 1996;2(1):1-24.
11. 李槇原著. 原本 編註醫學入門 券二. 서울 : 大星文化社. 1990:383.
12. 許浚原著. 東醫寶鑑 雜病篇. 서울 : 大星文化社. 1992:223.
13. 타다 토미오. 免疫의 意味論. 서울 : 한울. 1998: 117-21.
14. 김우호. 免疫. 춘천 : 강원대학교 출판부. 1993: 1-4.
15. 해리슨 번역 편찬위원회 편. HARRISON'S 내과학Ⅱ. 서울:정담. 1997:1665,1670.
16. 김주덕, 성인화 등. 로이트 必須免疫學. 서울 : 고문사. 1991:97-114.
17. 김태규, 박수정, 서영훈, 신동건, 엄현석, 이정림, 정낙균, 정대철, 정태준, 진종률, 한치화 역. 면역생물학(5th). 서울:라이프사이언스. 2002:3-33.
18. Robert E. Anderson et al. Use of β 2-microglobulin level and CD4+ lymphocyte count to predict development of AIDS in persons with HIV infection. Arch Intern Med. 1990;150:73-7.

19. Everaus H. Hormones and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1992;8(6):483-9.
20. Ferguson A. et al. Spectrum of expression of intestinal cellular immunity: proposal for a change in diagnostic criteria of celiac disease. *Ann Allergy*. 1993;71(1):29-32.
21. Maarten Koot et al. Prognostic Value of Hiv-1 Syncytium-inducing Phenotype for Rate of CD4+ T-cell Depletion and Progression to AIDS. *Arch Int Med*. 1993;118:681-8.
22. McDyer J.F. et al. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T-cell counts have impaired Th1 responses. *J Immunol*. 1997;158(1):492-500.
23. Stein D.S. Korvic J.A. Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis*. 1992;165: 352-63.
24. 홍사석. 이우주의 약리학강의. 서울 : 의학문화사. 1993:622,646-8.
25. 대한임상약학회. 임상약리학총서 I 임상약학 개론. 서울 : 회성출판사. 1991:180, 770.
26. 낙화생. 면역과 한방. 서울 : 열린책들. 1998: 19-20,46-7.
27. 崔旻燮. 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 관한 고찰. *대한침구학회지*. 1993;10(1):61-74.
28. 송윤희. 온침이 한냉에 노출된 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *경희대한의대논문집*. 1992;15:297-311.
29. 송윤희. 온침이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응저하에 미치는 영향. *경희대한의대논문집*. 1989;12:301-13.
30. 김덕호, 김병운. 歸茸湯이 면역반응에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 1985;6(2):55-63.
31. 정연희, 이한철, 류동렬. 加味補兒湯이 면역기능 증진효과에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지*. 1997;11(1):159-82.
32. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:도서출판 영림사. 2000:568-9,427-8,580-1, 550-1,545-6,331-3,531-3,496-7,302-4,534-6,5 37-8,578-80,491-2,622-3.