

대표적인 태음인 처방의 면역 활성화 비교 연구

정다영 · 하혜경 · 이호영 · 이진아 · 이남현 · 이준경 · 황대선 · 신현규

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Abstract

Stimulation of the Immune Response by Herbal Formulas for Taeumin

Da Young Jung, Hyekyung Ha, Ho-Young Lee, Jin-Ah Lee, Nam-Hun Lee,
Jun Kyoung Lee, Dae Sun Huang, Hyeun-Kyoo Shin

Herbal Medicine EBM Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

1. Objectives

Three herbal formulas (Yuldahanso-tang, Chungsimyonja-tang, and Taeumjowi-tang) for Taeumin were applied to investigate the immunological activities on antigen (Ag)-specific or Ag-non-specific immune responses in murine macrophage cell line (RAW 264.7) and ovalbumin (OVA)-immunized mice.

2. Methods

This study was carried out in nitric oxide (NO) synthesis in RAW 264.7 cells and cellular proliferation in mouse splenocytes according to three herbal formulas. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with OVA/aluminium (100 μ g/200 μ g/mouse) on day 1, 8, and 15. Three herbal formulas were administered to mice orally for 3 weeks from day 1. On day 22, OVA-, lipopolysaccharide (LPS)-, and concanavalin A (Con A)-stimulated splenocyte proliferation and antibodies (OVA-specific antibodies of the IgG, IgG1, and total IgM classes) in plasma were measured.

3. Results

Yuldahanso-tang and Chungsimyonja-tang increased NO synthesis in RAW 264.7 cells. Three herbal formulas significantly enhanced cellular proliferation by LPS and Con A in splenocytes from OVA-immunized mice ($p < .001$). Three herbal formulas for Taeumin also significantly enhanced plasma OVA-specific IgG, IgG1, and total IgM levels compared with the OVA/Alum group.

4. Conclusion

These results suggested that three herbal formulas for Taeumin could be used as stimulator of immune response.

Key Words : Yuldahanso-tang (Reduohanshao-tang), Chungsimyonja-tang (Qingxinlianzi-tang), Taeumjowi-tang (Taiyintiaowei-tang), Immune response

• 접수일 2010년 05월 07일; 심사일 2010년 05월 07일; 승인일 2010년 05월 27일

• 교신저자: 신현규

대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약EBM연구센터
Tel : +82-42-868-9464 Fax : +82-42-864-2120

E-mail : hkshin@kiom.re.kr

* 본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준한방처방 EBM 구축사업'에 의해 수행되었다.

I. 緒論

四象醫學은 李濟馬 선생이 그의 저서 『東醫壽世保元』, 『格致叢』에서 우리나라만의 독자적인 체질의학으로 사람의 체질을 체격, 얼굴형태, 성격, 정서 및 약물에 대한 반응 등을 종합적으로 검사하여 太陽人, 太陰人, 少陽人, 少陰人의 4가지 형으로 구분하였다^{1,2}. 이들 사상체질에 따라 각 사상 처방들이 증상에 따라 투여되고 있지만, 본 연구에서는 대표적으로 동일한 태음인 처방중 증상과 치료 목표의 질병과 관련이 없이 熱多寒少湯과 太陰調胃湯, 清心蓮子湯 3종 처방을 선정하여 면역 활성을 비교 연구하고자 하였다.

생체는 외부 환경변화에 대응하여 최적의 생존 조건을 맞추면서 항상성을 유지하며 생존해 나간다. 이런 항상성과 생존에 필요한 인체 면역은 외부 침입물질(항원)에 대해 저항하여 생체를 보호하기 위한 시스템이지만 활성화 되지 않은 상태의 native T cell 이나 native B cell은 항원에 대한 반응이 매우 적거나 반응하지 않는다³. 따라서 생체 내에서 면역세포들이 다양한 항원에 대한 면역 기능을 발휘하기 위해서는 먼저 활성화 과정을 반드시 거쳐야 한다^{4,5}. 대표적인 면역반응으로 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성은 대식세포 활성화의 지표로 NO는 침입한 병원체를 없애고 기본적인 숙주 방어체계를 작동시키는 역할을 하며 특히 Th 세포의 분화단계 중 Th0 세포가 Th1 세포와 Th2 세포로 분화할 때, Th1 세포로의 분화를 돕는 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{6,7}. 또, 脾臟은 생체 내 면역방어기능을 담당하고 있는 이차 면역기관으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 초기 면역반응을 담당하고 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 주요기관이다⁸. Ovalbumin (OVA)을 항원으로 사용한 OVA 감작 생쥐 모델이 외부항원에 대한 면역 반응 활성화 영향을 검증하는 방법으로 주로 적용된다⁹.

이들 태음인 대표 3종 처방이 동일 태음인 체질 내에서 다양하게 반응하겠지만, 인체 正氣를 보존하고 항상성을 유지하는 가장 기본적인 면역 활성화에서 대식세포 및 비장세포의 증식 효과, 면역글로불린의 생성량 변화를 통해, 이들 태음인 체질 처방 3개를

비교하여 향후 동일 태음인에게 투약 시 면역반응에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 처방추출

열다한소탕, 청심연자탕, 태음조위탕의 처방 구성 약재들은 (주)옴니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 각각 구입하였다. 각각의 처방에 따른 구성비는 Table 1과 같다. 이들 처방 구성 약재를 배합하고 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (추출기: 경서메디텍 COSMOS660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 sieve를 사용하여 거르고 동결건조기 (일신 동결건조기 PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 분말을 얻었으며 수득율은 Table 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 대식세포의 활성화 검색

(1) 대식세포의 증식능 검색

태음인 처방들이 대식세포주의 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 murine macrophage cell line인 RAW 264.7세포를 96-well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 약제 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 약제의 세포증식 효과에 대한 비교물질로 lipopolysaccharide 100 ng/mL (LPS, Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 tetrazolium salt인 CCK-8 kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 ELISA reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였고, 여러 well의 평균값을 사용하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/well로 48-well plate에 분주하여 CO2 incubator내에서 12시간 배양하여 안정화 시킨 후 약물독성이 없는 범위 내에서 농도별

Table 1. Combinations of Crude Drugs in Herbal Formulas

Crude Drug	Componented Crude Drugs (g)		
	Yuldahanso-tang	Chungsimyonja-tang	Taeumjowi-tang
갈근 Puerariae Radix	15.0		
황금 Scutellariae Radix	7.5	3.75	
고분 Angelicae Tenuissimae Radix	7.5		
나복자 Raphani Semen	3.75	3.75	7.5
길경 Platycodonis Radix	3.75		3.75
승마 Cimicifugae Rhizoma	3.75		
백지 Angelicae Dahuricae Radix	3.75		
연자육 Nelumbinis Semen		7.5	
산약 Dioscoreae Radix		7.5	
천문동 Asparagi Radix		3.75	
맥문동 Liriopsis Tuber		3.75	3.75
원지 Polygalae Radix		3.75	
석창포 Acori Graminei Rhizoma		3.75	3.75
산조인 Zizyphi Spinosi Semen		3.75	
용안육 Longanae Arillus		3.75	
백자인 Thujae Semen		3.75	
감국화 Chrysanthemi Flos		3.75	
의이인 Cocicis Semen			11.25
견을 Castaneae Semen			11.25
오미자 Schizandrae Fructus			3.75
마황 Ephedrae Herba			3.75
Total (g)	45	52.5	48.75
Yield (%)	29.0	20.5	19.9

(2-200 µg/mL)로 처리하였다. 양성 대조군으로 LPS를 농도별 (0.001-1.00 µg/mL)로 처리하였으며 18 시간 배양 후 상층액을 수집하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 Griess reagent (Promega, WI, U.S.A)를 이용하여 nitrite 양을 측정하여 계산하였다.

2) 생쥐 비장세포 분리 및 증식능 검색

(1) 비장 세포의 분리 및 배양

6주령의 수컷 ICR 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL, NY, U.S.A)로 세척하고 주사기를 이용하여 비장세포를 분리한 후 원심 분리하여 RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co, MO, U.S.A)를 처리하여 적혈구를 제거하였다. 10% FBS와 penicillin-streptomycin을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, NY, U.S.A)에 비장세포를 부유시켜 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

(2) 비장세포의 증식능 검색

태음인 처방이 비장세포 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 분리 배양한 비장 세포를 96-well plate에 5×10⁵ cells/well로 분주하고 약제 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 처방의 세포증식 효과에 대한 비교물질로 T cell lymphocyte에 대한 mitogen인 Con A (0.5 및 1 µg/mL)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit solution 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였고, 여러 well의 평균값을 사용하였다.

3) OVA 감작 생쥐에서 면역 활성화 검색

(1) 실험동물 및 항원물질 투여

7주령 (17~21 g)의 수컷 C57BL/6 생쥐(오리엔트바이오, 성남)를 대조군, Ovalbumine/Aluminium/Saline (OVA/Alum 군) 투여군, OVA/Alum 및 각 태음인 처방

추출물 투여군 (처방 투여군)으로 분리하여 1주일간 순화시킨 다음 실험에 사용하였다. 항원으로 OVA/Alum은 생쥐 당 100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 용량을 1일, 8일, 15일에 복강투여하여 항체생성을 유도하였으며 대조군은 동일량의 주사용 생리식염수를 복강 투여하였다. 대조군과 OVA/Alum 군은 증류수를, 처방 투여군은 각 태음인처방 추출물을 1 g/kg/day 용량으로 OVA 감작과 동시에 21일간 투여하였다. 22일에 pentobarbital (150 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)을 복강 투여한 후 마취하에 복강절개하여 후대정맥에서 채혈한 후 비장을 적출하고 방혈치사하였다. 채혈된 혈액은 전혈구수 측정 후 원심분리하여 혈장을 분리하고 다음 실험시까지 -80°C 에 보관하였다. 동물실험은 열다한소탕, 청심연자탕과 태음조위탕으로 나누어 진행하였다.

(2) OVA 감작된 생쥐 비장세포의 증식능 검색 (mitogen effect)

적출한 비장에서 앞에서와 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 96-well plate에 분주한 다음 대조군, 항원으로 사용한 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), T cell lymphocyte에 대한 mitogen으로 Con A (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 B cell lymphocyte에 대한 mitogen으로 LPS (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 각각 첨가하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit를 사용하여 세포 증식능을 검색하는 방법으로 처방 투여에 대한 mitogen effect를 검색하였다.

(3) 혈중 항체 생성량 측정

생체내 항체 생성량을 측정하기 위하여 감작항원으로 사용한 OVA에 대한 특이적 (OVA-specific) 또는 비특이적 (total) 면역 글로불린의 양을 측정하였다. 혈중 생쥐 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, total IgM level은 enzyme linked immunosorbent assay kit (Bethyl Laboratory, Inc., Texas, USA)를 사용하여 측정하였다. OVA-specific IgG 및 IgG1을 검색하기 위하여 microtiter plate에 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in carbonate buffer, pH 9.6) 용액을 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C 에서 24시간 반응시켜 OVA를 부착시켰다. Total IgM을 측정하기 위하여 IgM capture antibody (Ab)를 carbonate buffer (pH 9.6)에 1:100으로 희석하여 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C 에서 24시간 반응시켜 Ab를 부착시켰다. 각각 Wash buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 3번 세척한 후 blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl,

1% BSA, pH 8.0)를 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 비특이적인 결합부위를 차단하였다. Wash buffer로 세척한 후 혈장을 1:1000 (OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1) 또는 1:10,000 (total IgM)으로 희석한 후 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG, IgG1 또는 IgM을 1:100,000으로 희석하여 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치한 후 세척하여 TMB용액을 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 로 가하고 빛을 차단하고 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 2 M H₂SO₄를 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 로 가한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 통계처리

모든 측정 결과는 mean \pm SEM으로 나타냈으며 실험군 간의 차이는 Student's t-test (Excel 2007 program)법으로 유의성을 검증하였다.

III. 結果

1. 대식세포 활성화에 미치는 영향

대식세포는 1차적인 면역 반응과 관련되므로 태음인 처방이 대식세포주인 RAW 264.7의 증식에 미치는 영향을 검색한 결과 열다한소탕은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서, 청심연자탕과 태음조위탕은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 20% 이상의 세포독성을 나타냈으므로 (data not shown) 이후의 RAW 264.7 세포를 이용한 효능 검색에서 열다한소탕은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 청심연자탕과 태음조위탕은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도를 사용하였다. 열다한소탕은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $29.4\pm 1.6\%$ ($p<.01$), 청심연자탕 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $44.5\pm 1.5\%$ ($p<.01$), 태음조위탕 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $30.7\pm 2.0\%$ ($p<.05$)로 대식세포의 증식 효과를 나타냈다. (Fig. 1)

대식세포의 활성화 지표인 NO 생성량을 측정된 결과, 무처리군의 배지 내 NO의 농도는 $0.65\pm 0.12 \mu\text{M}$ 로 나타났고, 양성 대조군으로 사용한 LPS (0.001-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $23.78\pm 1.34 \mu\text{M}$ 로 대조군의 36배 이상으로 NO 생성을 유발하는 것으로 나타났다 ($p<.001$). 열다한소탕 (2-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 처리는 농도의

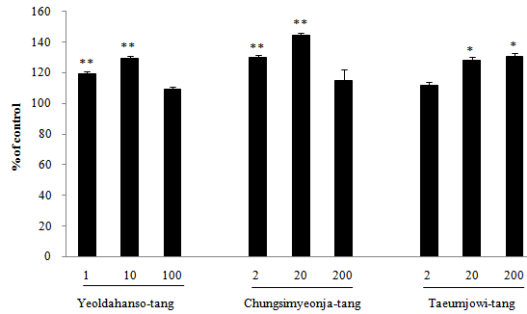


Figure 1. The proliferation of RAW 264.7 cells treated with herbal formulas for Taeumimin.

Cells (3×10^3 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with Taeumimin formulas for 48 hr. The unit of concentrations of herbal formulas for Taeumimin is $\mu\text{g/mL}$. The values are presented as means \pm SEM. Differences between control and herbal formula-treated groups were evaluated in each group. *, $p < .05$ and **, $p < .01$.

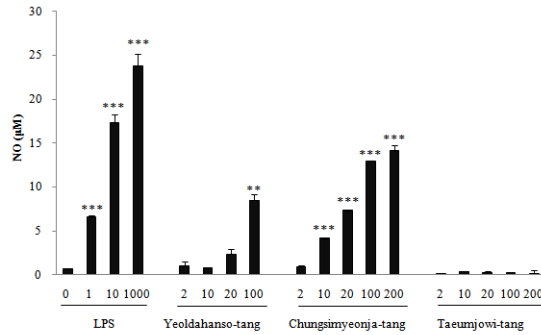


Figure 2. The stimulation of NO production in RAW 264.7 cells treated with herbal formulas for Taeumimin.

Cells (2.5×10^5 cells/well) were seeded into 48-well plates and treated with herbal formulas for 18 hr. LPS was used as positive control. The units of concentrations of LPS and herbal formulas are ng/mL and $\mu\text{g/mL}$, respectively. The values are presented as means \pm SEM. Differences between LPS 0 (control) and herbal formula-treated groups were evaluated in each group. **, $p < .01$, *** $p < .001$.

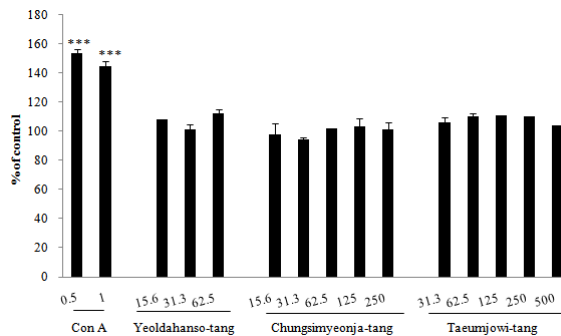


Figure 3. The proliferation of mouse splenocytes treated with herbal formulas for Taeumimin.

Isolated mouse splenocytes (5×10^5 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with herbal formulas for Taeumimin for 48 hr. The unit of concentrations of Con A and herbal formulas for Taeumimin is $\mu\text{g/mL}$. *** $p < .001$ compared with control.

존적으로 NO 생성을 증가시켜 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $8.47 \pm 0.71 \mu\text{M}$ ($p < .01$), 청심연자탕 (2-200 $\mu\text{g/mL}$)도 농도 의존적으로 NO 생성을 증가시켜 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $14.13 \pm 0.64 \mu\text{M}$ ($p < .001$)로 LPS 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군과 유사한 NO 생성 유발 효과를 나타냈다. 반면 태음조위탕 (2-200 $\mu\text{g/mL}$)은 NO 생성을 유발하지 않는 것으로 나타났다. (Fig. 2)

2. 생쥐 비장세포 증식능에 미치는 영향

분리한 생쥐 비장세포에 태음인 처방을 처리하여 비장세포의 증식능을 검색한 결과, 양성대조군으로 사용한 Con A는 0.5 또는 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 각각 53.22 ± 1.92 , $44.7 \pm 3.07\%$ 로 40% 이상의 비장세포 증식 효과를 나타냈다 ($p < .001$). 열다한소탕 (15.6-62.5 $\mu\text{g/mL}$), 청심연자탕 (15.6-250 $\mu\text{g/mL}$), 태음조위탕 (13.3-500 $\mu\text{g/mL}$)은 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. (Fig. 3)

3. OVA-감작된 생쥐에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

태음인 처방이 생체내에서 비장세포 증식능에 미치는 영향을 검색하기 위하여 태음인 처방을 투여한 생쥐의 비장세포를 분리하여 항원으로 사용한 OVA, B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대한

mitogen effect를 검색하였다. 각 투여군에서 mitogen을 처리하지 않은 무처리군을 대조군으로 하여 이에 대한 세포 증식효과를 Fig. 4에 나타냈다. 대조군에서 항원인 OVA에 대한 반응은 나타나지 않았고 Con A와 LPS 처리 시 각각 $38.32 \pm 10.38\%$, $49.96 \pm 7.43\%$ 로 비장 세포의 증식을 유발하였다. OVA/Alum 군에서는 OVA 처리시 $15.95 \pm 4.85\%$, LPS 처리시 $50.58 \pm 4.98\%$ ($p < .01$), Con A 처리시 $53.61 \pm 2.00\%$ ($p < .01$)로 세포 증식이 유발되었다. 열다한소탕 투여군은 OVA, LPS, Con A 처리시 각각 $37.39 \pm 5.76\%$ ($p < .05$), $166.67 \pm 7.11\%$ ($p < .001$), $264.83 \pm 8.64\%$ ($p < .001$)로 비장 세포의 증식을 유발하였다 (Fig. 4A). 청심연자탕 투여군은 OVA, LPS, Con A에 대해서 $20.22 \pm 1.78\%$, $87.30 \pm 2.96\%$ ($p < .001$), $84.18 \pm 3.07\%$ ($p < .001$), 태음조위탕 투여군은 각각 $19.17 \pm 6.41\%$, $152.51 \pm 6.32\%$ ($p < .001$), $224.40 \pm 9.01\%$ ($p < .001$) 증가되었다. (Fig. 4-B)

이상의 결과를 종합하면 OVA/Alum 군에서 OVA에 대한 비장 세포 증식이 약 16% 증가되었고 열다한소탕, 청심연자탕, 태음조위탕 투여시 각각 37%, 20%, 19% 증가되어 열다한소탕 ($p < .01$)을 제외한 2종의 처방은 OVA/Alum 군과 비교해서 통계적인 의미는 없는 것으로 나타났다. B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대해서 mitogen effect를 검색한 결과, 열다한소탕, 청심연자탕, 태음조위탕 투여군 모두 OVA/

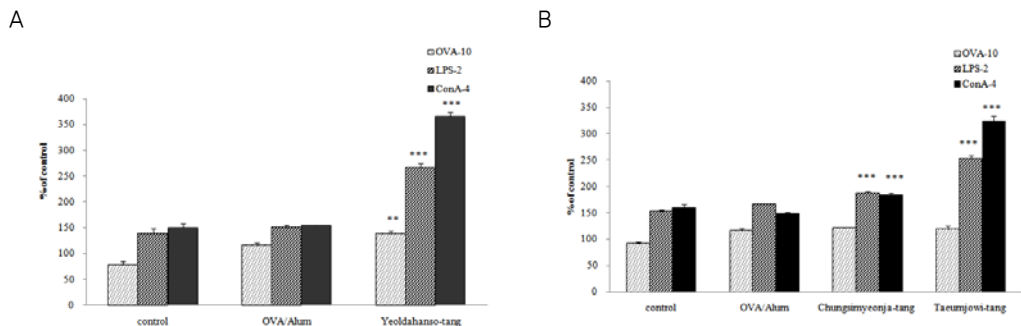


Figure 4. Effects of herbal formulas for Taeemin on OVA- or mitogen-stimulated splenocyte proliferation (A; Yeoldahanso-tang, B; Chungsimyeonja-tang and Taeumjow-i-tang).

Splenocytes were prepared from control, OVA/Alum or herbal formula-administrated mice on Day 22 and cultured with OVA, Con A or LPS for 48 h. Cellular proliferation was shown as a percentage of the proliferation of cells cultured without a mitogen (% of control). The values are presented as means \pm SEM. Differences between OVA/Alum and herbal formula-administrated groups were evaluated in each group. *** $p < .001$

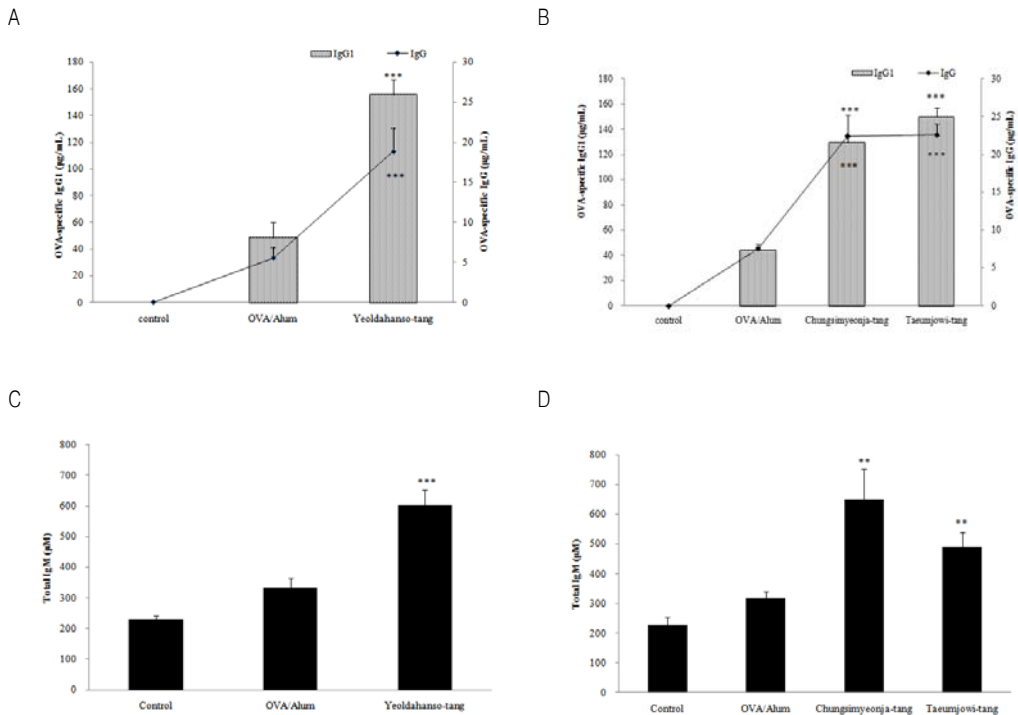


Figure 5. The plasma levels of OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, (A; Yeoldahanso-tang, B; Chungsimyeonja-tang and Taeumjowi-tang) and total IgM (C; Yeoldahanso-tang, D; Chungsimyeonja-tang and Taeumjowi-tang) on OVA-immunized mice.

Data represent the means±SEM (n=5~6) **p<.01 and ***p<.001 compared with OVA/Alum

Alum 군보다 LPS 및 Con A에 대한 mitogen effect를 증가시키는 것으로 나타났으나 (각 p<.001) 청심연자탕의 경우 다른 2종의 처방보다는 낮은 mitogen effect를 나타냈다.

4. 생체내에서 항체생성능에 미치는 영향

혈장에서 OVA-specific IgG, IgG1을 정량한 결과 대조군에 비해 OVA/Alum 군에서 각각 5.53±1.30 µg/mL, 48.33±11.64 µg/mL로 OVA에 감작되었음을 나타냈다. OVA 감작 생쥐에 처방을 투여한 결과 열다한소탕군은 OVA-specific IgG, IgG1 level이 18.87±1.42 µg/mL (p<.001), 155.67±8.82 µg/mL (p<.001)으로 OVA/Alum 군과 비교하여 각각 3.4배, 3.2배 증가시켰다 (Fig. 5-A). 청심연자탕과 태음조위탕에 대한 실험 결과 OVA/Alum군에서 OVA-specific IgG, IgG1을 정량한 결과 각각 7.56±0.56 µg/mL, 44.18±2.68 µg/mL로 나타났으며

처방 투여 결과 청심연자탕군은 각각 22.41±2.83 µg/mL (p<.001), 129.30±4.48 µg/mL (p<.001)로 OVA/Alum 군과 비교하여 3.0배 및 2.9배 증가되었으며, 태음조위탕군은 각각 22.56±1.49 µg/mL, 149.82±7.15 µg/mL로 3.0배 및 3.4배 증가된 것으로 나타났다. (Fig. 5-B)

초기 면역반응에서 증가하는 혈중 total IgM을 정량한 결과 대조군과 OVA/Alum군에서 각각 231.80±9.63 µg/mL와 333.79±29.35 µg/mL로 대조군과 비교하여 OVA 감작 시 1.4배 증가된 것으로 나타났으며 열다한소탕군에서 603.18±50.22 µg/mL (p<.001)으로 OVA/Alum 군과 비교하여 1.8배 증가되었다 (Fig. 5-C). 청심연자탕과 태음조위탕의 실험 결과, total IgM 양이 대조군과 OVA/Alum군에서 각각 228.02±24.33 µg/mL와 317.62±22.72 µg/mL로 1.4배 증가되었고 청심연자탕군에서 649.88±113.77 µg/mL (p<.01)로 OVA/Alum

군과 비교하여 2.0배 상승하였으며 태음조위탕군에서 $490.40 \pm 49.09 \mu\text{g/mL}$ ($p < .01$)로 1.5배 증가된 것으로 나타났다 (Fig. 5-D). 본 연구에 사용한 3종의 태음인 처방은 모두 OVA-specific IgG, IgG1 및 total IgM level을 상승시켰다.

IV. 考 察

太陰人 사상체질의학 처방들 중에 대표적인 처방을 선정하기 위하여, 한의학논문 검색 시스템인 오아시스(<http://oasis.kiom.re.kr>)에서 가장 많이 연구된 처방을 검색한 결과, 태음조위탕 25편, 청심연자탕 24편, 열다한소탕 19편의 연구결과가 발표되었다. 또한 사상체질의학 전문의에게 의료 현장에서 다빈도로 사용되는 태음인 처방 순위를 문의하였고 이 두 방법을 통해 熱多寒少湯과 太陰調胃湯, 清心蓮子湯을 최종 선정하였다.

대표적인 태음인 처방으로 선정한 3종에 대한 최근까지의 연구 결과를 정리해 보면, 태음인에 대하여 열다한소탕은 뇌경막증 환자의 치료에 대한 효과¹⁰와 뇌 상장세포로부터 분비되는 세포활성물질의 조절을 통해서 급성기 증풍환자 치료에 효과가 있다고 보고되었다¹¹. 또한 hydrogen peroxide, xanthine oxidase/hypoxanthine 계에서 산소자유기에 의한 산화적 손상에 대한 방어효과가 보고되었다^{12,13}. 태음조위탕은 노화에 따른 신체기능 저하를 억제하는 작용 및 간 기능과 위 기능의 개선 효과가 있는 것으로 알려졌으며¹⁴, 식욕을 감소시킴으로써 체중증가를 억제하는 비만예방 및 치료효과가 있을 뿐만 아니라, 중성지방의 합성을 억제함으로써 고지혈증 개선효과¹⁵ 및 항산화효과¹⁶가 있는 것으로 보고되었다. 청심연자탕은 노화 생쥐의 비장세포에서 IL-4, IL-6은 감소시키고 IFN- γ 은 증가시켜 면역기능을 향상시켜 항노화 효과를 나타냈다고 발표되었으며¹⁷. 생쥐 비장 B 세포와 복부 mast cell의 IL-4 발현을 억제하고, IFN- γ 의 발현을 증가시켜 B 세포의 IgE 합성 억제와 mast cell에서의 histamine 생산을 저해함으로써 염증 매개물질의 분비를 저해하여 항 allergy 효과를 나타내는 것으로 보고되었다¹⁸. 또한 epinephrine과 norepinephrine의 분비량 감소와 체중 감소 회복 및 위궤양 치유 효과가 있어 항스트레스

효과가 있다고 보고되었다¹⁹. 본 연구에서는 인체 방어에 가장 기본적인 면역 활성화 검증을 위하여 대식세포 및 비장세포의 증식 효과, 면역글로불린의 생성량 변화를 실험하고, 이들 대표 3종 태음인 체질 처방의 면역 반응에 대한 차이를 확인하고자 하였다.

면역 초기단계에서 중요한 역할을 하는 대식세포는 세포성 면역 반응 연구와 면역 활성화 물질의 검색에 주로 사용된다²⁰. 대식세포는 모든 면역 반응의 단계와 관련되어 있고 T세포 매개성 면역 반응이 진행되기 전에 빠른 방어기전으로 작용한다. 그 후 항원을 탐지하고 이에 대한 반응 물질을 발현함으로써 T세포 활성화 반응 개시에 관여한다. 대식세포가 생산하는 NO는 interleukin-1 β , interferon- γ , tumor necrosis factor- α 등과 같은 cytokine류 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 유도되는 inducible NO synthase에 의해 형성되므로 대식세포가 생산하는 NO의 양은 대식세포의 활성화의 기준으로 흔히 언급되고 있다²¹. 대식세포가 활성화되면 NO가 생성되어 세포 내 감염을 일으키는 미생물에 대한 방어능 및 암세포 등에 대해 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있으며²², 활성화된 대식세포는 T 림프구를 활성화시켜 세포성 면역반응을 유도하게 된다. 본 연구에서 선정된 태음인 대표 처방 3종에 대해 NO 생성능을 검색한 결과 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 열다한소탕과 청심연자탕이 농도 의존적으로 NO 생성능을 증가시키는 것으로 나타났으므로 이들 처방이 대식세포를 활성화하여 NO 생성을 증가시키고 대식세포의 기능을 증진시킴으로써 1차적인 면역기능을 증진시킨다고 해석될 수 있다.

五臟에 속하는 脾臟은 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반응을 나타내는 조직으로 T 및 B 세포의 성숙과 분화가 이루어지며, T 및 B 세포 증식은 면역 시스템에서 중요한 의미를 갖는다²³. 또한 인체의 전체 림프구 중 비장에 분포되어 있는 림프구는 T 세포 60%, B 세포 30% 정도로 T 세포의 비율이 높다^{24,25}. 이에 3종의 태음인 처방에 대한 비장 세포 증식효과를 검색하였고 상대적으로 T 세포 또는 B 세포의 활성화를 비교하고자 T 세포 mitogen인 Con A와 B 세포 mitogen을 LPS를 양성 대조군으로 사용하여 활성을 비교하였다. 3종의 태음인 처방 모두 의미 있는 비장 세포 증식효과를 나타내지 않았다.

생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 확인하고자 OVA를 외부 항원으로 사용하여 감각시킨 생쥐에 3종의 태음인 처방 추출물을 투여한 후 비장세포의 mitogen effect를 검색한 결과, 감각 항원으로 사용한 OVA, 각각 T 세포와 B 세포의 mitogen인 Con A와 LPS에 대해서 3종 처방 모두 mitogen effect를 상승시켜 비장내 T 세포와 B 세포를 매개로 하는 면역반응, 즉 세포성 면역과 체액성 면역을 증가시키는 것으로 판단되었다. 그러나 청심연자탕은 다른 2종의 처방과 비교해서 상대적으로 낮은 mitogen effect를 나타냈다. 감각 항원 (OVA)에 대해서는 3종의 처방 중 열다한소탕만 비장세포 증식 효과를 나타냈다

생체내에서 체액성 면역의 조절 효과를 검색하고자 혈장내 항체생성능을 검색한 결과, 3종의 처방 모두 일차적인 항체 반응에 관련된 IgM level을 상승시켰고, 그 후 항원에 대한 2차 항체 반응에서 중요한 부분을 차지하는 OVA-specific IgG 및 OVA-specific IgG1 level 또한 증가시키는 것으로 나타나 이들 대표적인 태음인 처방 3종은 모두 항원 특이적 면역 반응을 활성화 시키는 것으로 판단된다. 이외에 Th1 또는 Th2 type의 분화차이를 측정하고자 혈중 IL-2 및 IL-4 level을 측정하였으나 검출되지 않아 (data not shown) 각 처방의 자세한 작용 경로는 언급할 수 없었다.

처방별로 분류하면, 열다한소탕은 대식세포의 세포 증식뿐만 아니라 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성을 의미있게 증가시켰고, OVA로 감각된 생쥐에 투여하였을 때 비장세포에서 OVA, Con A 및 LPS에 대해 유의성 있는 mitogen effect를 나타냈으며, 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 유의성 있게 증가시켰으므로 항원 비특이적 면역 반응과 항원 특이적 면역반응을 모두 활성화 시키는 것으로 사료된다. 청심연자탕은 대식세포의 세포 증식과 NO 생성을 유발하였고, OVA로 감각된 생쥐에 투여시 비장세포에서 Con A 및 LPS에 대해 다른 처방들보다는 낮은 mitogen effect를 나타냈으며, 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 상승시키는 것으로 나타나 초기 면역 반응인 항원 비특이적 면역반응과 항원 특이적 면역반응을 모두 활성화 시키는 것으로 판단된다. 태음조위탕은 대식세포의 증식은 증가시켰으나 NO 생성의 활성화 효과

와 비장세포에 대한 직접적인 세포 증식 효과는 나타나지 않았으며, OVA로 감각된 생쥐에 투여시 비장세포에서 Con A와 LPS에 대해 mitogen effect를 상승시켰고 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 상승시키는 것으로 나타나 항원 비특이적 면역반응보다는 항원특이적 면역반응을 활성화시키는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에 대한 결과로 3종의 대표적인 태음인 처방인 열다한소탕, 청심연자탕, 태음조위탕은 모두 면역 활성을 증가시키는 효과가 있으나 세부적인 작용 시점은 처방별로 차이가 있는 것으로 판단된다.

V. 結 論

대표적인 태음인 처방으로 열다한소탕, 청심연자탕, 태음조위탕 3종의 면역반응 조절 효과를 연구한 결론은 다음과 같다.

1. 대식세포의 활성화 측면에서 비교해보면 청심연자탕과 열다한소탕은 NO 생성을 촉진하는 대식세포 활성화 효과를 나타냈지만 태음조위탕은 이에 영향을 미치지 않았다.
2. OVA로 감각된 생쥐의 비장세포 증식효과를 검색한 결과, B cell의 mitogen인 LPS와 T cell의 mitogen인 Con A에 대해 열다한소탕 및 태음조위탕 투여군은 OVA/Alum 군과 비교하여 2배 이상 mitogen effect를 증가시키는 것으로 나타났으나 청심연자탕은 다른 2종의 처방에 비해 낮은 mitogen effect를 나타냈다.
3. OVA로 감각된 생쥐의 혈청에서 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 측정한 결과 3종 처방 모두 항체 생성을 증가시키는 것으로 나타났다.
4. Th1 또는 Th2 type의 면역 반응을 비교하기 위한 혈중 IL-2 및 IL-4는 검출되지 않아 3종 처방 모두 Th 세포 관련 면역 반응은 비교할 수 없었다.

이상의 결과로 열다한소탕과 청심연자탕은 항원 비특이적 면역반응과 항원특이적 면역반응을 활성화 시키며, 태음조위탕은 항원특이적 면역반응을 활성화 시키는 방향으로 면역반응을 활성화 시키는 것으로

판단된다.

VI. 感謝의 글

본 연구는 한국한의학회연구원에서 지원하는 ‘표준한방처방 EBM 구축사업 (K10030)’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

VII. 參考文獻

- Kim KY. Consideration about medicine historical view of Je-Ma Lee. J Sasang Constitut Med. 1994;6(1): 11-19. (Korean)
- Cho DW, Cho HS, Cho CS. Genetic analysis study of sasang constitution classification by DNA-fingerprinting methods. J Sasang Constitut Med. 1996;8(2): 151-163. (Korean)
- Hur SM, Kwon CH, Joh JW, Kim SJ. Alteration of molecules and cytokines related to the activation of T lymphocyte in immune tolerance induced mice model. J Korean Surg Soc. 2005;19(2):119-123. (Korean)
- Seo YB, Kil GJ, Lee YC, Kim DH. Experimental studies on thymus cells differentiation by the extracts of Stigma Croci. Kor J Herbology. 2003;18(3):97-111. (Korean)
- Jang SJ, Chun HN, Yun SS, Lee IS, Lee YS. Effects of deer antler extract on serum IGF-I, bone growth and splenocyte proliferation in growing rats. Korean J Nutr. 2006;39(3):225-235. (Korean)
- Friedl R, Moeslinger T, Kopp B, and Spieckermann PG. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of Panax ginseng root in Raw 264.7 cells. Br J pharmacol. 2001;134:1663-1670.
- Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. Annals of the Rheumatic Diseases. 1996;55:7-20.
- Ryu HS, Kim J, Park SC, Kim HS. Enhancing effect of Zingiber Officinale Roscoe extract on mouse spleen and macrophage cells activation. Korean J of Nutrition. 2004;37(9):780-785. (Korean)
- Sun J, Hu S, Song X. Adjuvant effects protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 2007;25:1114-1120.
- Choi YJ, Han JH, Kim KY, Kang SY. Effects of Yuldahansotang water extract on blood pressure, regional cerebral blood flow and pial arterial diameter. J Sasang Constitut Med. 1998;10(1):285-293. (Korean)
- Choi JS, Kim KY, Kim HM, Ju JC. Studies on the cytokine production regulation in human astrocytes by Yuldahansotang. J Sasang Constitut Med. 2001; 13(1):61-69. (Korean)
- Lee JH, Park HS, Kim KY. Effects of Yuldahansotang water extract on cultured primary hippocampal cell culture damaged by hydrogen peroxide. J Sasang Constitut Med. 2002;14(1):79-89. (Korean)
- Hong JH, Kim KW, Yu DG, Park HS, Kim HS. Effects of Yuldahansotang water extract on cultured spinal sensory neurons damaged by xanthine oxidase/hypoxanthine. J Sasang Constitut Med. 2001;13 (1):88-96. (Korean)
- Chou LS, Ahn TW, Lee H. Studies of Chengsimyeonja-tang and Taeumjowitang that get change by Wistar rat's aging. J Sasang Constitut Med. 2005;17(2): 74-84. (Korean)
- Kim KS, Lee DU, Kim YL, Hwang MJ, Kim GW, Koo BS. Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effects of Taeyeumjowee-tang and its modified prescription. J Oriental Neuropsychiatry. 2007;18(2):57-74. (Korean)
- Kim MW, Park SS. Effects of Taeumjowetang on lipid peroxidation by free radicals and oxidative damage of hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. J Sasang Constitut Med. 2001;13(1):51-60. (Korean)
- Lim JP, Ahn TW. The anti-oxidative and immune-regulatory effect of Chungsimyeonja-tang in aged rat. J Sasang Constitut Med. 2007;19(3):227-241. (Korean)
- Park SC. Effects CheongSimYeonJaTang(CSYJT) on control of immune-function in highly purified mouse B cells and Mast cell. J Sasang Constitut Med. 2003; 15(2):166-179. (Korean)
- Hong SC, Ko BH, Song IB. An experimental study on the anti-stress effects by taeumin Chongsimyonjat

- ang. J Sasang Constitut Med. 1995;7(2):227-240. (Korean)
20. Liew FY, Lia Y, Millot S. Tumor necrosis factor synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 1990;145:4306-4310.
 21. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 1990;144(4):1425-1431.
 22. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med,* 2000;28:217-226.
 23. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999;286(5447):2098-2102.
 24. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:201-223.
 25. Kupper TS. T cells, immunosurveillance, and cutaneous immunity. *J Dermatol Sci.* 2000;24:S41-S45.