

## 加味補兒湯의 免疫調節作用에 對한 實驗的 研究

鄭連熙\* · 柳同烈\*\*

\*大田大學校 大學院 韓醫學科 小兒科 專攻

\*\*大田大學校 韓醫科大學

### Experimental Study on the Immunoregulative Action of Kamiboatang

Jeong Yeon-Hee, O. M. D. and Yoo Dong Yeol, O. M. D., Ph. D.

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

The purpose of this study was to investigate the effects of Kami boatang(KBT) on the immune cells in Balb/c mice. KBT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. KBT enhanced the proliferation of thymocytes and splenocytes. KBT enhanced the subpopulation of helper T(Th) cells, but did not affect the subpopulation of Thy1/B220 cells and Th/Tc cells in splenocytes. KBT enhanced the production of  $\gamma$ -interferon and interleukin-2 in thymocytes, but decreased the production of interleukin-4. KBT enhanced the production of  $\gamma$ -interferon, interleukin-2 and interleukin-4 in splenocytes and serum. KBT suppressed the production of nitric oxide, and enhanced the phagocytic activity in peritoneal macrophages.

These results suggest that KBT has a potent activity on the immune response via the increase of the production of cytokines and phagocytic activity *in vivo*.

### I. 緒 論

加味補兒湯<sup>1)</sup>은 水土丹<sup>2-6)</sup>에서 黃砂仁, 白荳蔻, 陳皮, 元肉을 加하고 胡黃蓮, 使君子肉, 蘆薈를 去한

方劑로 水는 六味地黃湯을, 土는 肥兒丸을 指稱하며<sup>3,7)</sup> 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 抵抗力을 키워주는<sup>3-6)</sup> 小兒의 虛弱證을 治療할 目的으로 作方되었다<sup>1)</sup>.

小兒은 生理的으로 “陽有餘 陰不足”이라하여 迅速한 成長發育에 必要한 腎精이 相對的으로 不足하며<sup>8,9)</sup>, 病理的으로 “脾常不足, 肺常不足, 腎常虛”하여 外感과 內傷으로 因한 各種 虛弱性 疾患이 자주 出現하게 되는데<sup>9)</sup>, 小兒의 이런 生理病理의 特性을 考慮하여 臨床에서 腎精을 補하며 免疫力增強을 위해 加味補兒湯을 多用하고 있다.

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機構로써 外部로부터 侵入하는 各種 微生物, 同種의 組織, 體內에 생긴 不必要한 產物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<sup>10,11)</sup>으로, 韓醫學에서는 《內經》〈四氣調神大論〉<sup>12)</sup>에서 “不治已病 治未病”, 〈刺法論〉<sup>12)</sup>에서 “正氣存內 邪不可干”, 〈評熱病論〉<sup>12)</sup>에서 “邪之所湊 其氣必虛”라고 하여 疾病의 成立過程中에서 生體의 抵抗性을 重要하게 여겼음을 알 수 있고 그 關與因자를 正氣라고 하였으며<sup>13)</sup>, 免疫疾患의 治療에서도 疾病除去와 豫防의인 側面을 考慮하여 扶正祛邪法을 자주 活用하고 있다<sup>14)</sup>.

免疫에 대한 實驗研究로 金 등<sup>14,17)</sup>은 數種의 處方에 대한 免疫反應에 미치는 實驗의 研究를, 元 등<sup>18)</sup>은 補兒湯의 細胞性 및 體液性 免疫에 對하여 研究를, 金<sup>19)</sup>은 加減補兒湯의 造血 및 免疫增進에 關한 研究를 報告하였으나 加味補兒湯이 免疫調節作用에 미치는 影響에 對한 報告는 未洽한 實情이다. 또한 最近 小兒에 있어 疾病의 變遷을 살펴보면, 感染病과 營養失調 등은 經濟狀態의 改善과 各種治療劑의 出現으로 急激히 減少하였으나, 體質의 機能的으로 誘發되는 小兒虛症의 諸般症狀은 顯著하게 늘고 있는 實情이다.

이에 著者는 本 實驗에서 補血滋陰, 滋養腎水, 健脾清熱, 滲濕行氣하는 效能이 있는 加味補兒湯이 免疫調節作用에 어떠한 影響을 미치는지 알아보기 위하여 正常 Balb/c mouse의 thymocytes, splenocytes

의 活性變化와 cytokines 分泌量을 測定하였고 아울러 macrophages로부터 nitric oxide 生成과 食食能에 미치는 影響을 調査하였던 바 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 材料 및 動物

#### 1) 藥材

本 實驗에 使用한 加味補兒湯은 大田大學校 附屬 韓方病院 處方集<sup>1)</sup>에 準하였으며 使用한 藥劑는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였고, 處方 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of *Kamiboatang*

韓藥名	生 藥 名	分量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	12
山 藥	Dioscoreae Radix	6
山茱萸	Corni Fructus	6
白茯苓	Hoelen	4
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	4
山查肉	Crataegi Fructus	6
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	4
神 曲	Massa Medix Fermenteta	4
麥 芽	Hordei Fructus Germinatus	4
貢砂仁	Amomi Fructus	4
人 蔘	Ginseng Radix	2
毛黃連	Picrorrhiae Rhizoma	2
甘 草	Glycyrrhizae	2
白 朮	Atractylis Rhizoma	2
木 香	Aucklandiae Radix	2
白豆蔻	Amomi Rotundus Fructus	2
陳 皮	Citri Pericarpium	4
元 肉	Longanae Arillus	6
總 量		76

## 2) 動物

本 實驗에 使用한 생쥐는 8 週令 Balb/c 系 수컷을 大韓實驗動物에서 購入하여, 溫度  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 濕度  $50 \pm 5\%$ , dark/light 12時間의 條件下에서 1주일 이상 實驗室에 適應시킨 후 使用하였으며, 固形飼料과 물을 자유스럽게 攝取하도록 하였다.

## 3) 試藥 및 器具

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN), lucigenin, MTT, zymosan, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine  $\cdot$  2HCl은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse  $\gamma$ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated E. coli particle은 Molecular Probes Co. 등을 사용하였으며, 기타 試藥은 細胞培養用 試藥과 1級 試藥을 使用하였다. 使用機具는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 使用하였다.

## 2. 實驗 方法

### 1) 檢液의 調劑

加味補兒湯 4貼 分量을 蒸溜水 2,000ml에 넣고 熱湯抽出器에서 4時間 동안 加熱 抽出한 다음 濾過하여 rotary evaporator로 濃縮하고 freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末 88g(수득율 28.9%)을 얻었으며, 檢液은 2.5mg/ml이 되도록 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였다.

### 2) Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 分離

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 分離는 Wysocki<sup>20)</sup> 및 Mizel<sup>21)</sup> 등의 方法을 利用하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 加味補兒湯 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與한 다음 8일째 생쥐를 頸椎脫骨하여 屠殺하였다. 摘出した 胸線 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 滅菌된 stainless mesh로 濾過하여 細胞浮游液을 얻은 후, DPBS-A로 2回 洗滌한 다음(1,500rpm에서 10分間 遠心分離), thymocytes 및 splenocytes 浮游液으로 하였다.

Macrophage의 分離는 加味補兒湯 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與 하였다. 藥物 投與 4일째 mouse 腹腔에 3% thioglycollate 2ml를 注入하고, 8일째 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 다음, 腹腔에 cold PBS 10ml를 넣어 腹腔細胞를 收集하였다. 收集한 細胞를 4°C에서 1,300rpm으로 10分間 遠心分離하고 RPMI 培地로 2회 洗滌後, 直徑 120mm petri dish에 分株하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養시키고 2時間 後에 附着되지 않은 細胞를 除去한 다음, 附着한 macrophage를 cell scraper로 分離하여 使用하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 培地를 使用하였으며, 培地에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100units/ml, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 添加하여 使用하였다.

### 3) Thymocytes 및 splenocytes의 增殖能 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 加味補兒湯의 影響은 MTT法으로 測定하였다. 本 實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann<sup>22)</sup>이 開發하여 Kotnik<sup>23)</sup>이 變形시킨 方法으로, 96-well plate의 各 well에 分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 各 RPMI 1640 培地로 稀釋하고 96-well plate에  $1.2 \times 10^6$  cells/ml 濃度로 分注하여 thymocytes concanavalin A(Con A) 5 $\mu$ g/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide(LPS) 10  $\mu$ g/ml를 添加한 후, 37 $^{\circ}$ C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48時間 培養한 다음 培養 終了 4時間 前에 MTT 試藥을 加하였다. 培養 終了 時 0.1N HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 $\mu$ l를 各 well에 添加하고 遮光狀態에서 18時間 더 培養한 後 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader로 570nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗 群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다.

### 4) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 各 RPMI 1640 培地로 3회 洗滌하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 二重 染色하여 4 $^{\circ}$ C에서 30時間 反應시킨 후 flow cytometer (excitation: 488nm, emission: 525nm(FITC), 575 nm(PE))로 subpopulation을 測定하였다<sup>24)</sup>.

### 5) Cytokines 測定

생쥐 5 마리를 1군으로 하여 對照群에는 生理食鹽 水만을, 實驗群에는 加味補兒湯 500mg/kg을 1일 1

회씩 7일간 經口投與한 다음 8일째 同一한 方法으로 thymocytes 및 splenocytes를 分離하여  $2 \times 10^7$  cells/ml로 調劑하여 96 well plate에 200 $\mu$ l/well씩 分注한 후, 72時間 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다. 培養液을 遠心分離 (2,500rpm, 2분, 4 $^{\circ}$ C) 한 다음, 上澄液 50 $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 測定하였다.

血清 중 cytokines를 測定할 때는 생쥐 5 마리를 1 군으로 하여 對照群에는 生理食鹽水만을, 實驗群에는 加味補兒湯 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與한 다음 8일째 생쥐의 心臟으로부터 血液을 採取하여 遠心分離한 후 血清을 分離하여, 血清 50 $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 測定하였다. 즉 sample 50 $\mu$ l에 assay diluent 50  $\mu$ l를 混合하여 室溫에서 2時間 동안 incubation한 후 4회 洗滌하였다. 洗滌 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100  $\mu$ l를 加하여 室溫에서 2時間 incubation한 후, 5회 洗滌하고 substrate solution 100 $\mu$ l를 混合하여 30분 동안 室溫에서 培養하였다. Stop solution 100 $\mu$ l를 加하여 450nm에서 microplate reader로 吸光度를 測定한 후, 미리 作成한 檢量線에 의해 cytokines의 양을 換算하였다.

### 6) 腹腔 macrophage로 부터 nitric oxide 生成量 測定

分離한 macrophage를 24 well plate에 well당  $2 \times 10^6$  cells을 分注한 후 macrophage로부터 生成되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess法<sup>25)</sup>으로 測定하였다. 各 well에 LPS 1 $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 添加하여 24 時間 培養한 후, 培養液 100 $\mu$ l와 Griess 試藥 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylenediamine 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 混合하여 96 well module에 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 10

分間 放置한 後 570nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成한  $\text{NaNO}_2$ 의 檢量線에 의 해  $\text{NO}_2^-$ 의 濃度を 換算하였다.

### 7) 腹腔 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophage를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DMEM (without phenol red, 0.34g/L  $\text{NaHCO}_3$ , 2.6g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 製造는 10ml의 DPBS-A에 溶解한 後, 濾過 滅菌하여  $-20^\circ\text{C}$ 에서 保管하면서 使用하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 使用하기 직전에 DMEM 培地에 1/10로 稀釋하여 使用하였다. Chemiluminescence 測定은 luminometer를 利用하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 測定하였다<sup>26,27)</sup>. 測定用 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 浮遊液  $50\mu\text{l}$ 와 lucigenin 溶液  $50\mu\text{l}$  및 zymosan 溶液  $30\mu\text{l}$ 를 添加하여 最終 volume이  $200\mu\text{l}$ 가 되도록 한 後 37 $^\circ\text{C}$ 에서 15분간 前處理한 後 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 測定하였다.

### 8) 腹腔 macrophage의 貪食能 測定

FITC-conjugated E. coli particle을 HBSS에 1mg/ml 농도로 懸탁시켜 sonification한 後 使用하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에  $250\mu\text{g/ml}$  濃도로 溶解하여 使用하였다. 分離한 macrophage를 RPMI 1640 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 調整한 後,  $100\mu\text{l}$ 를 96 well에 분주하고 E. coli 懸탁액  $25\mu\text{l}$ 를 가하여 1時間 동안 培養한 다음 培養液을 除去하고 extracellular fluorescence를 抑制하기 위해 trypan blue  $100\mu\text{l}$ 를 添加하여 inverted fluoromicroscope로 觀察하였다<sup>28)</sup>.

### 9) 統計處理

모든 實驗 結果들은 Mean  $\pm$  S.E.로 나타내었고 統計處理는 student's t-test를 實施하여  $p < 0.05$ 를 基準으로 有意性 與否를 判定하였다.

## III. 實驗 成績

### 1. 加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 效果

加味補兒湯이 thymocytes의 增殖에 미치는 影響을 알아보기 위하여 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 處理하였다. 對照群에서 Con A를 處理하였을 時의 thymocytes 細胞增殖率을 100%로 하였을 경우, Con A를 處理하지 않았을 때에는  $50.2 \pm 1.5\%$ 로 減少하였다. 加味補兒湯을 投與하고 thymocytes를 分離한 實驗群에서는 Con A를 處理하였을 時 thymocytes의 細胞增殖率은  $114.6 \pm 2.4\%$ 를 나타내었으며, Con A를 處理하지 않았을 때에는  $65.1 \pm 1.8\%$ 로 同一條件의 對照群에 비해 有意하게 增加하였다(Fig. 1).

또한 加味補兒湯의 splenocytes의 增殖에 미치는 影響을 알아보기 위하여 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 處理하였으며 對照群에서 LPS를 處理하였을 時의 splenocytes 細胞增殖率을 100%로 하였을 경우, LPS를 處理하지 않았을 때에는  $77.3 \pm 1.0\%$ 로 減少하였다. 加味補兒湯을 投與하고 splenocytes를 分離한 實驗群에서는 LPS를 處理하였을 時 splenocytes의 細胞增殖率은  $124.8 \pm 2.5\%$ 를 나타내었으며, LPS를 處理하지 않았을 때에는  $96.4 \pm 1.1\%$ 로 同一條件의 對照群에 비해 有意하게 增加하였다(Fig. 2).

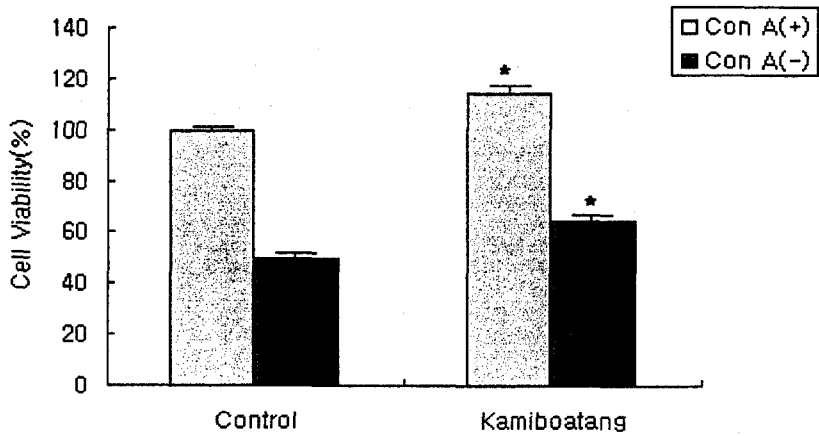


Fig. 1. Effect of *Kamiboatang* water extract on the proliferation of murine thymocytes.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes ( $1.2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 48 hours in RPMI 1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A(Con A). The data represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*: Significantly different from same condition of control group ( $p < 0.001$ ).

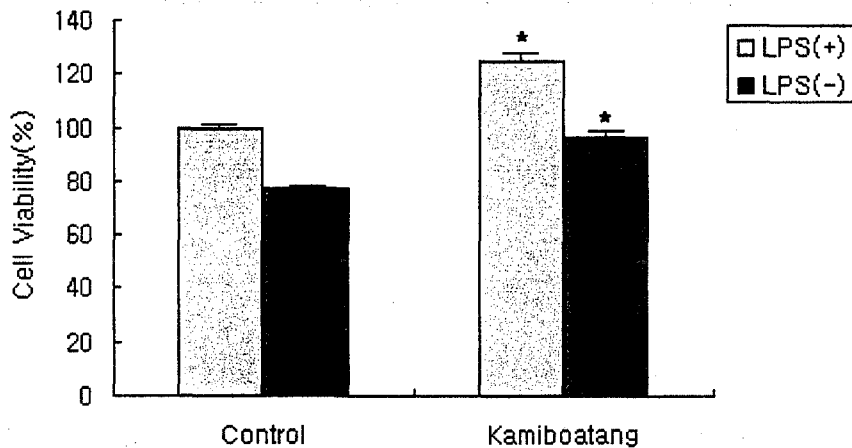


Fig. 2. Effect of *Kamiboatang* on the proliferation of murine splenocytes.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes ( $1.2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 48 hours in RPMI 1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide. The data represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*: Significantly different from same condition of control group ( $p < 0.001$ ).

## 2. 加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation에 미치는 效果

加味補兒湯이 thymocytes의 subpopulation에 미치는 效果를 알아보기 위하여 分離 染色한 thymocytes에서 CD4 single positive 細胞(CD4<sup>+</sup>)와 CD8 single positive 細胞(CD8<sup>+</sup>)의 양을 測定하였다. 對照群에서 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 11.5±0.3% 이었으며, CD8<sup>+</sup> 細胞는 2.7±0.3%이었다. 加味補兒

湯을 投與한 實驗群에서는 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 13.8±0.5%로 對照群에 比해 增加하였으나, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.3±0.5%로 對照群에 比해 別 差異가 없었다(Fig. 3.4).

또한 加味補兒湯의 splenocytes의 subpopulation에 미치는 效果를 알아보기 위하여 分離 染色한 splenocytes에서 B220 positive 細胞(B220<sup>+</sup>)와 Thy1 positive 細胞(Thy1<sup>+</sup>)의 양을 測定하였으며, splenic T-lymphocytes에서는 CD4<sup>+</sup> 細胞와 CD8<sup>+</sup>

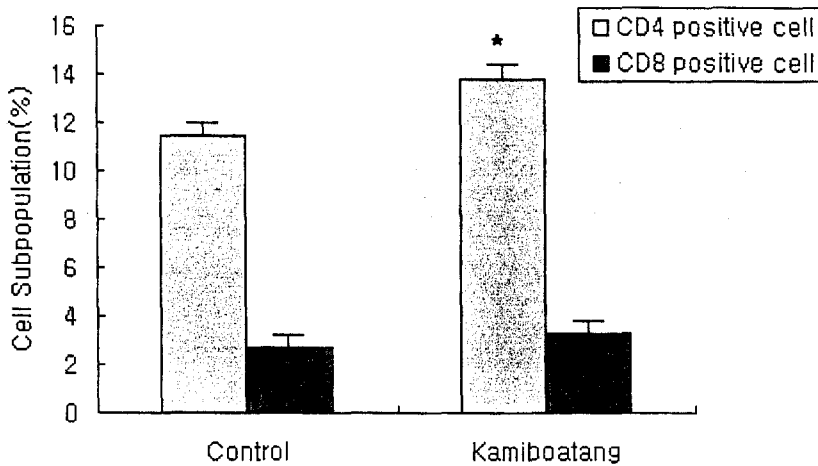


Fig. 3. Effect of *Kamiboatang* on the subpopulation of murine thymocytes

*Kamiboatang* (500mg/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 40C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±S.E. of 5 experiments.

\*; Significantly different from same condition of control group (p<0.05).

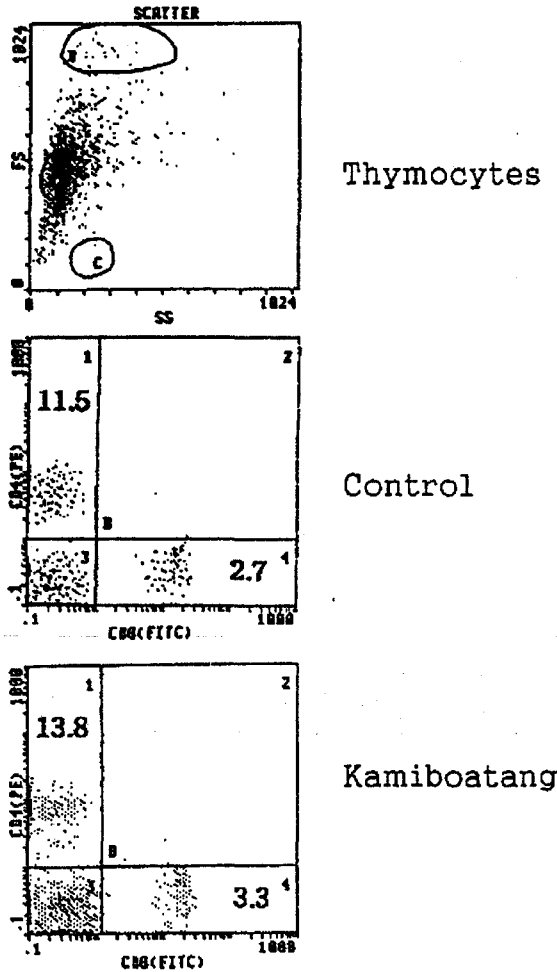


Fig. 4. Cytofluorometric pattern of thymocytes subpopulation change in vivo.

細胞의 양을 測定하였다. Splenocytes 중 B220<sup>+</sup>와 Thy1<sup>+</sup>의 양은 對照群의 경우 각각 39.7±1.6%, 23.2±1.4% 이었으나, 加味補兒湯을 投與한 實驗群에서는 38.7±0.9%, 23.7±0.5%로 對照群과 別 差異가 없었다. Splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 細胞

와 CD8<sup>+</sup> 細胞의 양은 對照群의 경우 각각 13.8±1.3%, 3.7±0.2%이었으나, 加味補兒湯을 投與한 實驗群에서는 15.6±0.4%, 4.1±0.3%로 對照群에 比 別 差異가 없었다(Fig. 5,6).



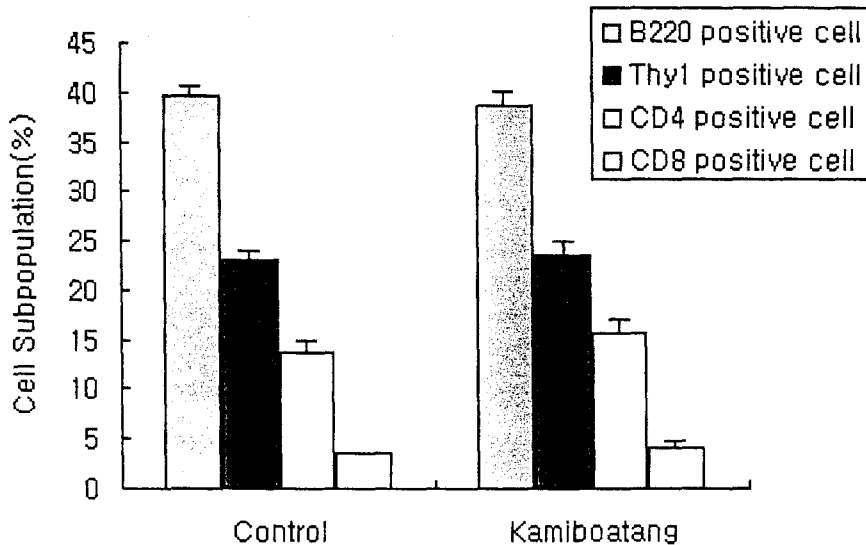


Fig. 5. Effect of *Kamiboatang* on the subpopulation of murine splenocytes.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 40C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

### 3. 加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 cytokines 分泌에 미치는 效果

加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 cytokines 分泌에 미치는 效果를 알아보기 위하여 分離 培養한 각각의 細胞에서  $\gamma$ -interferon과 interleukin-2 그리고 interleukin-4의 양을 測定하였

다. Thymocytes 중  $\gamma$ -interferon 과 interleukin-2의 양은 對照群의 경우 각각  $60.6 \pm 9.3$ ,  $313.4 \pm 8.1$ pg/ml 이었으나, 加味補兒湯을 投與한 實驗群은 각각  $89.0 \pm 7.1$  과  $424.8 \pm 9.5$ pg/ml로 對照群에 비해 有意하게 增加하였다. 그러나 interleukin-4의 양은 對照群에서  $297.4 \pm 9.4$ pg/ml 이었으며, 加味補兒湯을 投與한 實驗群에서는  $223.7 \pm 9.4$ pg/ml로 減少하였다(Fig. 7).

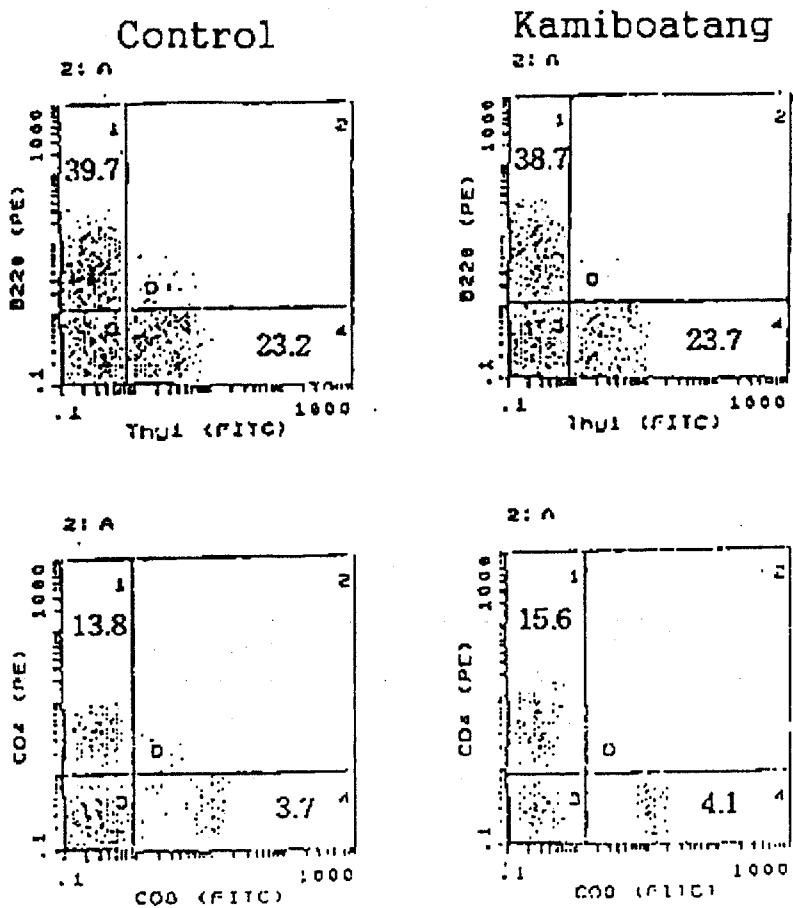


Fig. 6. Cytofluorometric pattern of splenocytes subpopulation change in vivo.

또한 splenocytes에 있어서  $\gamma$ -interferon, interleukin-2, interleukin-4의 양은 對照群의 경우 각각  $442.9 \pm 8.9$ ,  $379.3 \pm 11.4$ ,  $148.0 \pm 7.6$  pg/ml 이었으나, 加味補兒湯을 投與한 實驗群에서는 각각  $501.5 \pm 6.7$ ,  $501.7 \pm 14.1$ ,  $245.8 \pm 12.3$  pg/ml로 對照群에 比하여 모두 有意한 增加를 나타내었다(Fig. 8).

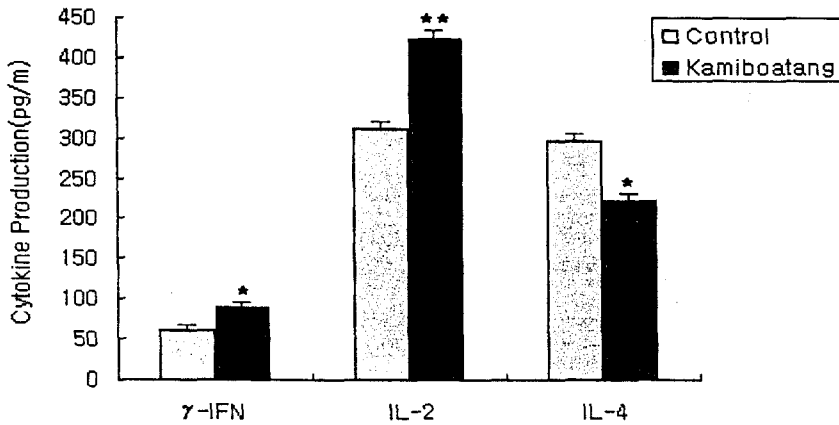


Fig. 7. Effect of *Kamiboatang* on the production of cytokines in murine thymocytes.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 72 hours in RPMI 1640 media. The secretion of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*Significantly different from same condition of control group (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ).

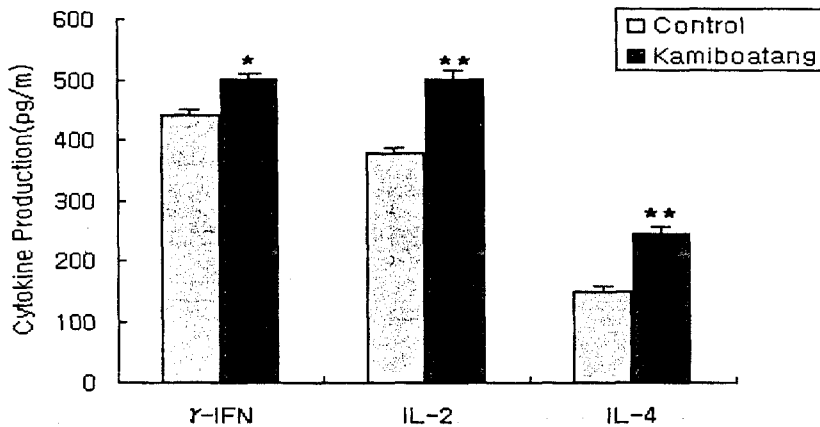


Fig. 8. Effect of *Kamiboatang* on the production of cytokines in murine splenocytes.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 72 hours in RPMI 1640 media. The secretion of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*Significantly different from same condition of control group (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ).

#### 4. 加味補兒湯이 血清 中 Cytokines의 分泌에 미치는 效果

血清 中 cytokines 分泌에 미치는 加味補兒湯의 效果를 알아본 結果 血清 中  $\gamma$ -interferon, interleukin-2, interleukin-4의 양은 對照群의 경우 각각  $32.7 \pm 3.9$ ,  $45.6 \pm 3.5$  및  $45.2 \pm 1.0$  pg/ml 이었으나, 加味補兒湯을 投與한 實驗群은  $182.5 \pm 15.3$ ,  $82.5 \pm 5.7$  및  $80.5 \pm 8.1$  pg/ml로 對照群에 比하여 有意한 增加를 나타내었다(Fig. 9).

#### 5. 加味補兒湯이 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide의 生成에 미치는 效果

Nitric oxide(NO)는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 形成을 抑制하여 phagocytic activity를 調節하는 것으로 알려져 있는 바<sup>29)</sup>, 加味補兒湯이 腹腔 macrophage로부터 NO 生成에 어떠한 效果를 나타내는지를 調査하였다. 腹腔에서 分離된 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하지 않고 24 시간 培養한 후 NO 生成量은  $1.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理한 對照群의 경우 NO 生成量

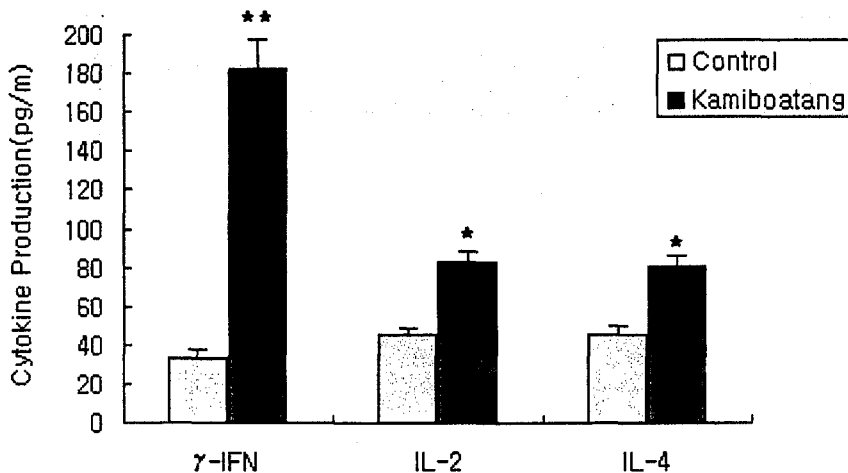


Fig. 9. Effect of *Kamiboatang* on the production of cytokines in mice serum.

*Kamiboatang* (500mg/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  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*Significantly different from same condition of control group (\*;  $p < 0.01$ , \*\*;  $p < 0.001$ ).

은  $12.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 로 增加하였다. 또한 加味補兒湯을 投與한 實驗群에서 分離된 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하였을 경우, NO 生成量은  $9.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 로 對照群에 比해 有意한 抑制效果를 나타내었다 (Fig. 10).

### 6. 加味補兒湯이 腹腔 macrophage의 食 食能에 미치는 效果

加味補兒湯이 腹腔 macrophages의 食食能에 미치는 效果를 알아보기 위하여 macrophages의 食食能

을 lucigenin chemiluminescence로 測定하였다. Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 進行되는 동안 生成되는 oxygen radical에 의해 發生되며, lucigenin에 의해 增加되는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>. 對照群의 macrophages로부터 生成되는 CL의 양은 10분 후에 가장 많이 增加하였으며 그 후 漸次的으로 減少하는 경향을 나타내었다. 加味補兒湯을 投與하고 分離한 實驗群의 macrophages에서는 CL 양의 시간에 따른 變化가 對照群과 비슷한 양상으로 出現하였으나, 時間別로 對照群의 CL 양과 比較할 경우 有意한 增加 現狀을 나타내었다(Fig. 11).

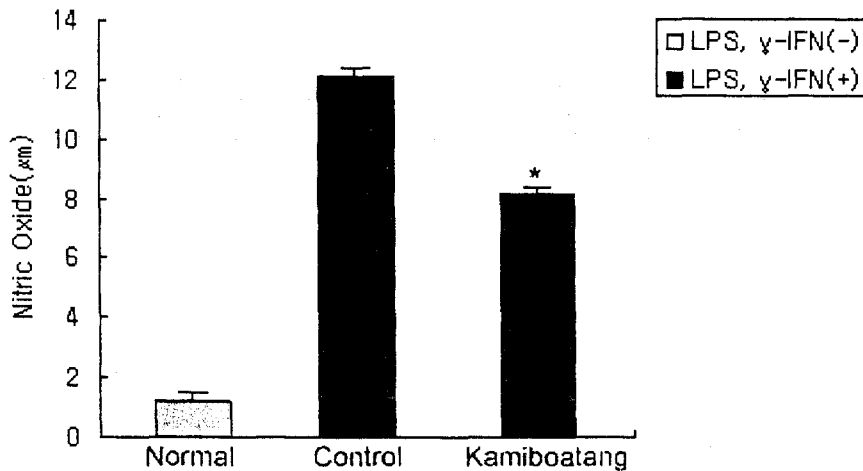


Fig. 10. The production of nitric oxide from peritoneal macrophages in *Kamiboatang*-administered mice.

*Kamiboatang* (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 24 hours. adherence period were cultured in RPMI 1640 media in the presence LPS and  $\gamma$ -interferon.

\*; Significantly different from same condition of control group( $p < 0.001$ ).

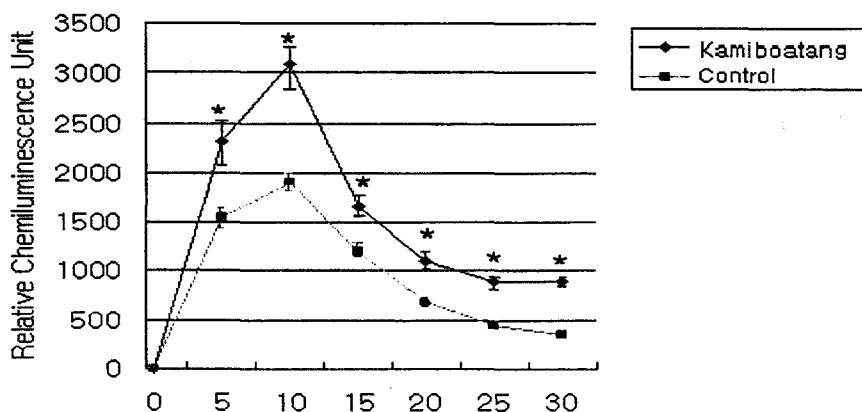


Fig. 11. Effect of *Kamiboatang* on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages

*Kamiboatang* (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 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) obtained after 2 hours adherence period were cultured in DEM media (without phenol red) containing opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. interval for 30 min. Other procedures were described as detailed in the materials and methods section. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 5 experiments.

\*; Significantly different from same condition of control group ( $p < 0.001$ ).

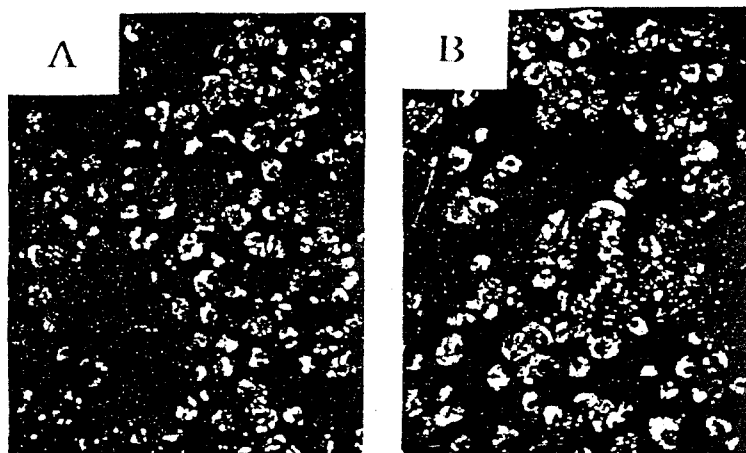


Fig. 12. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages.

*Kamiboatang* (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Photographs (taken at  $400\times$  magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and the macrophages administered with *Kamiboatang*.

The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

또한 FITC-conjugated E. coli particles의 食能을 알아본 結果 加味補兒湯을 投與한 實驗群의 macrophages가 對照群에 比하여 현저히 增加됨을 確認하였다(Fig. 12).

#### IV. 考 察

加味補兒湯<sup>1)</sup>은 水土丹<sup>2-6)</sup>에서 貢砂仁, 白豆蔻, 陳皮, 元肉을 加하고 胡黃連, 使君子肉, 蘆薈를 去한 方劑로 腎水를 滋養하여 小兒의 成長 發育을 促進시키고 脾胃機能을 원활히 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 抵抗力을 키워주는<sup>3-6)</sup> 小兒의 虛弱證을 治療할 目的으로 作方되었다<sup>1)</sup>.

水土丹에서 水는 六味地黃丸을, 土는 肥兒丸을 各各 指稱하는 것으로<sup>3,7)</sup>, 肥兒丸에 1/2用量的 六味地黃湯을 合方한 것이다<sup>7,8,31)</sup>.

六味地黃丸은 錢<sup>32)</sup>의 《小兒藥證直訣》에 記錄된 以來로 補血滋陰하는 熟地黃을 君藥을 삼아 生精滋陰하고 滋補瀦精秘氣하는 山茱萸와 山藥으로 臣藥을 삼아 精血을 收藏益陰케하고 破瘀血하는 牡丹皮와 滲濕行氣하는 茯苓, 澤瀉로 佐를 삼아 新陳代謝를 도와 生氣를 돕는다<sup>33,34)</sup> 고하여 眞陰을 補하여 先天不足을 補하고 腎氣虛乏으로 發生하는 諸證을 治療하는데 널리 活用되었고 腎水를 滋養하여 陽有餘 陰不足한 純陽之氣의 小兒에게 有益한 方劑이다<sup>35)</sup>.

小兒는 稚陽의 體로 陰氣가 未盛하고 陽氣가 柔弱하므로 香竄한 藥을 過用하면 비단 陰을 耗損할 뿐만 아니라 陽도 傷하기 쉽다. 그런데 宋代의 醫家들이 往往 香燥한 藥物을 잘 썼으므로 錢<sup>32)</sup>은 이러한 風조에 느낀바 있어 濡潤한 藥物에 대한 研究를 많이 하였고 張<sup>36)</sup>의 金匱要略의 處方中 八味腎氣丸에서 肉桂, 附子를 除하고<sup>32,37)</sup> 先天稟賦不足을 다스리는데 使用하였으며 그의 著書 小兒藥證直訣<sup>32)</sup>에도

地黃元으로 最初로 收錄되어 腎肝不足으로 因한 小兒疾患 즉 “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” 등<sup>38)</sup>에 應用하였다. 薛<sup>36,37)</sup>은 六味地黃湯을 腎陰不足으로 일어나는 一切의 病을 治療하는 良藥이라고 推崇하였으며 趙<sup>13)</sup>는 命門眞水를 補養하는 專劑로 보았고 王<sup>33)</sup>, 陳<sup>38)</sup>, 許<sup>46)</sup> 등은 治腎水虧損 小便淋瀝 頭目眩暈 腰腿酸軟 陰虛發熱 自汗 盜汗 憔悴瘦弱 精神疲倦 등의 症狀을 壯水之主 以制陽光하여 治療하는 效能이 있다고 하였다.

肥兒丸은 陳<sup>41)</sup>의 《太平惠民和劑局方》에 記錄된 以來로 消疳과 補虛의 意味<sup>42)</sup>로 胡黃連과 毛黃連은 清熱消積하며 四君子는 殺蟲消積하고 神麩, 麥芽, 山楂는 消滯하고 人蔘, 白朮, 茯苓, 甘草는 中焦를 補하고 生氣하며 清濁하니 健脾清熱, 消積驅蟲하여 脾胃虛弱으로 인한 蟲積腹痛, 消化不良, 面黃體弱 등의 慢性 虛弱性疾患에 活用되었다<sup>31)</sup>.

加味補兒湯은 水土丹의 이러한 處方目的을 基礎로 하여 小兒가 生理적으로 “陽有餘 陰不足”이라하여 迅速한 成長發育에 必要한 腎精이 相對적으로 不足하며<sup>8,9)</sup>, 病理적으로 “脾常不足, 肺常不足, 腎常虛”하여 疾病에 대한 抵抗力과 免疫力이 低下된 狀態<sup>9)</sup>로 나타나는 各種 虛弱性 疾患에 熟地黃, 元肉, 山藥, 山茱萸, 人蔘으로 補血滋陰益精助陽시키고, 陳皮, 貢砂仁, 白朮, 木香, 白豆蔻, 山查肉, 神麩, 麥芽로 行氣和胃消食하도록 하였으며, 牧丹皮, 澤瀉, 白茯苓, 毛黃連으로 清熱滲濕行氣시켜<sup>43-47)</sup> 免疫과 관련되는 脾, 肺, 腎을 高루 補하는 藥劑로 構成함으로써 小兒 虛症의 症候에 應用될 수 있도록 하였다.

小兒에서 虛弱이라 함은 先天적으로 稟賦不足으로 인하여 氣血이 充實하지 못하고 精氣가 虛弱하여 筋骨肌肉이 營養을 잘 받지 못해 虛弱한 경우와 後天적으로 健康하게 태어났더라도 攝生의 잘못으로 인한 營養狀態의 不良, 疾病, 病後調理의 잘못 또는 가

정이나 학교 등 外的 環境要因으로 인한 精神的 障  
 碍로 因한 것이다<sup>48)</sup>.

小兒虛症의 治療原則을 세움에 있어 《內經》 〈四  
 氣調神大論〉<sup>12)</sup>에서 “不治已病 治未病”이라 하였듯  
 發病前에 그 虛弱한 部分을 補充하고 均衡을 잡아주  
 어 同一疾患에 反復感染되지 않도록 하는 것이 매우  
 重要한데<sup>35)</sup> 陳<sup>49)</sup>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은 90%가 虛症  
 이라고 하였고, 李<sup>50)</sup> 醫學入門에서는 小兒病機는 “太  
 半胎毒 少半內傷乳食 十分之一外感 傷寒大率屬肝與  
 脾 多因脾胃嬌嫩 乳食傷精則生濕 濕生痰 痰生火 濕  
 熱結滯而然 且眞水未旺 心火獨炎 故肺金受制 肝常有  
 餘 脾腎不足”이라고 하였으며, 丁<sup>8)</sup>은 小兒科의 證治  
 에 있어서 陽有餘 陰不足이란 陰陽의 意義를 誤解하  
 여 小兒의 體質을 純陽性이라고 寒涼劑를 過用하여  
 서 軟弱한 腸胃 機能을 損傷하는 例가 적지 아니한  
 데, 陽有餘라고 말한 것은 發育機能의 旺盛함을 이  
 른 것이고, 陰不足이란 後天性的 滋潤培養力이 아직  
 未洽하다는 뜻으로 알아야 한다고 하였으며, 金<sup>15)</sup>은  
 幼年 成長期의 虛弱體質에는 거의 六味, 四物같은  
 補陰劑를 즐겨 썼으며 늘 成長期의 虛弱은 陽力보다  
 는 陰質의 不足에서 일어나는 경우가 많다고 하였  
 다.

加味補兒湯을 構成하는 個別藥物의 效能을 살펴 보  
 면<sup>43-47)</sup> 熟地黃은 微溫, 甘하여 滋陰補血, 益精填髓,  
 山茱萸는 微溫, 酸澁하여 補益肝腎 補腎滋精固脫, 山  
 藥은 溫, 微甘하여 健脾補肺 固腎滋精, 牡丹皮는 微  
 寒, 辛苦하여 活血散瘀 清熱行血, 白茯苓은 平, 甘淡  
 하여 利水滲濕, 澤瀉는 寒, 甘하여 利水滲濕, 元肉은  
 溫, 甘하여 養血安神 補益營血, 神麩은 溫, 甘辛하여  
 健脾和中 消食和胃, 麥芽는 溫, 甘하여 消食和中, 貢  
 砂仁은 溫, 辛하여 化濕行氣溫中, 陳皮는 溫, 辛苦하  
 여 理氣調中 燥濕化痰, 人蔘은 微溫, 微甘微苦하여  
 大補元氣 固脫生津, 毛黃連은 寒, 苦하여 清熱燥濕

消痞止痛, 白朮은 溫, 苦甘하여 補脾和中 固表止汗,  
 木香은 溫, 辛苦하여 行氣止痛 溫中和胃, 白豆蔻는  
 溫, 辛하여 化濕消痞 行氣溫中 開胃消食한다.

加味補兒湯의 構成藥物中 白朮의 免疫學的 報告로  
 羅<sup>51)</sup>는 細胞性 및 體液性 免疫反應을 增強시킨다고  
 하였으며, 中醫免疫學<sup>52)</sup>에서는 食食細胞의 食食機能  
 을 增強시킨다고 하였으며, 邱<sup>53)</sup>는 癌細胞에 對하여  
 免疫機能을 強化시킨다고 報告하였다. 甘草의 免疫  
 學的 報告로 韓<sup>54)</sup>은 免疫調節作用에 對하여 報告하  
 였고, 中醫免疫學<sup>52)</sup>에서는 食食細胞의 機能을 促進  
 시키고 抗癌效果가 있다고 하였다. 山藥의 免疫學的  
 報告로 中醫免疫學<sup>52)</sup>에서는 白細胞의 食食機能을 促  
 進시킨다고 하였다.

以上에서 살펴 본 바와 같이 加味補兒湯은 全體의  
 으로 補血滋陰, 滋養腎水, 健脾清熱, 滲濕行氣하는  
 效能으로 腎水를 滋養하여 小兒의 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  
 를 도와 免疫能力을 키워주는 方劑라고 思料된다.

東洋醫學에서 免疫이라는 用語는 19世紀 《免疫類  
 方》에 처음으로 記載<sup>55,56)</sup> 되어 있지만 免疫에 대한  
 概念은 《內經》에서부터 비롯되었다고 할 수 있는  
 데 《素問》 〈四氣調神大論〉<sup>12)</sup>에서 “不治已病 治未  
 病”, 〈刺法論〉<sup>12)</sup>에서 “正氣存內 邪不可干”, 〈評熱  
 病論〉<sup>12)</sup>에서 “邪之所湣 其氣必虛”라고 하였고, 《靈  
 樞》 〈百病始生篇〉<sup>12)</sup>에서는 “風雨寒熱 不得虛 邪不  
 能獨傷人”이라하여 疾病의 成立過程中에서 生體의  
 抵抗性を 重要하게 여겼음을 알 수 있고 그 關與因  
 子を 正氣라고 하였다<sup>13)</sup>.

正氣란 眞氣 또는 元氣와 同一한데 “人體에서 가장  
 基本의 氣를 元氣라고 指稱하며 元氣는 腎의 精氣,  
 脾胃에 의한 水穀之氣 및 吸入된 空氣에 의해서 만  
 들어진다고 하였으며<sup>57)</sup> 臟腑, 經絡, 營衛, 氣血의 正  
 常生理機能을 包含한 人體內의 모든 抗病能力을 뜻  
 하고 人體生命活動의 原動力이며 生命活動을 維持시



켜주는 가장 基本的인 物質이라 하였고, 邪氣란 病邪를 말하며 人體의 正常的인 生命活動을 沮害하고 人體와 外部環境 사이의 相對的 平行狀態를 破壞하는 各種 有害因子로 六淫外邪나 體內的 病理的 產物인 瘀血, 痰飲 등의 病理產物을 包含한 모든 發病因子를 指稱<sup>58-60)</sup> 한다. 또한 正氣中の 病邪를 防止하고 人體를 保護하는 機能을 갖는 氣는 衛氣라고 하였는데<sup>61)</sup> 衛氣에 對하여는 《靈樞》〈本藏篇〉<sup>62)</sup>에 “衛氣者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 司開闔者也”, 《素問》〈痺論〉<sup>12)</sup>의 “衛者 水穀之悍氣也 其氣慄疾滑利 不能入于脈也 故循皮膚之中 分肉之間 薰于盲膜 上于胸腹”이라 하여 모두 衛氣가 그 性質이 迅速하고 강한 活動力을 가지고 全身에서 邪氣와 鬪爭하며 防禦하는 特性을 나타낸 것이며 〈刺節眞邪篇〉<sup>62)</sup>에서 “虛邪之入于身也深... 有所結 氣歸之... 有所結 深中骨 氣因于骨”이라하여 衛氣가 人體 外뿐 아니라 內에서 病邪가 侵入하는 곳이면 빠속 어디나 가서 防禦作用을 한다는 뜻으로 볼 수 있으며, 〈癰疽篇〉<sup>62)</sup>에서 “寒邪客於經絡中則血泣 血泣不行則 衛氣從之而不通 壅遏而不得行 故熱 大熱不止 熱勝則肉腐 肉腐則爲膿”이라하였는데 이는 免疫學에서의 炎症反應과 食食作用과 類似하다고 볼 수 있다<sup>59)</sup>.

東洋醫學에서는 疾病을 人體生理的 動態平衡이 失調되고 破壞된 結果, 즉 人體가 氣候의 異常變化, 發病因子의 侵害, 人體의 調節機能의 不適應 및 抗病能力의 低下 등과 같은 조건 아래 體 내에서 일어나는 어떤 機能이나 形態構造의 損傷과 障礙로 말미암아 人體의 正常的인 活動을 妨害하는 異常表現<sup>59)</sup>이라고 하여 疾病의 發生이 正氣나 衛氣와 邪氣間的 正邪鬪爭으로 表現하고 있다.

免疫學에서도 感染與否가 곧 微生物의 細菌이나 侵入菌量과 宿主의 抵抗性과의 相對的 關係에 의해 決定된다고 보고 있으며 특히 宿主의 抵抗性으로 微生物에 대해 抗體와 淋巴球가 特異的으로 作用하는 獲

得免疫과 모든 微生物에 대해 非特異的으로 作用하는 先天免疫을 列舉하고 있는 바 大體로 正氣는 炎症反應과 인티페론 및 食食作用을 包含한 非特異的인 自然免疫과 類似하다고 볼 수 있다<sup>63)</sup>고 하였다. 이에 대하여 趙<sup>13)</sup>는 免疫學的 側面에서 본 正氣를 非特異的 防禦反應 및 그에 關與하는 諸防禦物質을 總稱한다고 하였고, 匡<sup>55)</sup>은 生體의 正氣가 充實하게 되면 內外邪를 莫論하고 疾病을 豫防할 수 있게 되지만 正氣가 虛衰하게 되면 外邪가 쉽게 틈을 타서 侵入하고 한편으로는 內部로 인한 各種 疾病이 일어나게 되는 것이라고하여 正氣虛의 內的 要因을 疾病發生原因으로 重要視하고 있으니 正氣의 虛는 邪가 侵入하는 條件으로, 여기서 正氣는 免疫機能 등을 包含하는 概念으로 볼 수 있다고 하였다.

免疫과 臟腑와의 關係에 대하여 梅<sup>64)</sup>는 腎, 脾, 胃 및 肺 등을 氣生成의 主要臟腑로 記述하였는데 “先天의 精은 父母로부터 받아 腎에 貯藏되고 水穀의 精氣는 飲食에서 由來하고 清氣는 自然界에서 비롯된다”고 하였으며 傅<sup>56)</sup>은 虛症治療는 대개 肺虛, 脾虛, 腎虛로 나눌 수 있는데 이 三虛의 區別은 免疫機能 低下程度의 差異에 따라 나눌 수 있다고 하여 免疫과 脾, 肺, 腎과의 關係性에 對하여 말하였으며 腎은 腎陽, 腎陰으로 하여금 全身의 陰陽을 調節하며 平衡機能을 圖謀하는 것이 곧 免疫機能의 調節이 되게 하고 있으며 脾는 水穀精微의 運化를 主管하여 氣血營衛의 바탕이며 後天의 根本이 되고 肺는 皮毛를 主管하는데 皮毛란 皮膚 粘膜 肌肉 汗腺 毛髮 등을 包含하여 外邪의 侵入經路가 되므로 防禦機關이 되므로 脾肺腎의 虛實如何에 따라 免疫機能이 左右될 수 있다<sup>65)</sup>.

西洋醫學에서 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 產物들과 特異하게 反應하여 抗體를 만들고 이것을 排除하여 그

個體의 恒常성을 維持하는 現象<sup>10,11)</sup>이며, 初期에는 어떤 傳染性 疾患의 再感染에 대한 防禦反應 卽 特定한 傳染性 疾患에 대하여 特異的인 抵抗性이 부여된 宿主의 能力을 意味하고 있었으나 지금에 이르러는 免疫概念이 漸次 擴大되어 어떤 種類의 傳染性 疾患에 대하여 先天的으로 가지고 있는 抵抗性도 包含시켜서 이를 先天性 或은 自然免疫이라 하여 매우 重要視하고 있다<sup>13)</sup>.

生體의 防禦機轉은 非特異的인 先天性 防禦機轉과 特異的인 後天性 防禦機轉의 두가지로 나눌 수 있다. 後天性 防禦機轉이 免疫의 實體로 特異性, 多樣性, 記憶作用, 自家調節 및 異物質에 대한 認知作用의 特性을 갖고 있다. 즉, 免疫反應이란 非自己를 抗原으로 認識하고 特異하게 抗體를 生産하여 이에 對處하고 處理하는 連鎖的인 反應을 말하는데<sup>11)</sup>, T 및 B-lymphocyte가 관련된 特異的 免疫 (specific immunity)과 macrophage가 관련된 非特異的 免疫 (non-specific immunity)으로 分類되며, 그중 特異的 免疫反應은 細菌에 대한 抗體를 生産하는 B細胞의 體液性 免疫反應과 바이러스, 結核菌, 진균에 대해 感作細胞와 사이토카인을 生産하는 T細胞의 細胞性 免疫反應으로 나뉜다<sup>66)</sup>.

즉, 人體免疫界는 淋巴球, 大食細胞, 白血球, 補體, 抗體등으로 構成되어 免疫反應에 作用하며<sup>67)</sup>, 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하나<sup>68)</sup>, 한편으로는 oil adjuvants, mineral salts, double-stranded nucleic acids, bacterial endotoxins 등과 같은 非特異的인 免疫增強劑에 의하여도 實驗的으로 B cell에 의한 抗體의 生産力이 增強<sup>69,70)</sup>되어 宿主의 bacteria나, virus에 의한 感染度를 줄이거나, NK cells, T cells, 및 macrophage 등

의 活性度가 增強되어 抗癌效果<sup>71)</sup>가 나타나고 있음이 報告되고 있다.

그러나 免疫反應은 病原性 細菌에 對한 生體의 防禦機轉에 重要한 수단일 수도 있지만 이러한 免疫反應으로 因하여 때로는 生體에 해로운 疾病을 일으킬 수도 있다. 즉 免疫反應의 結果가 宿主에 대해서 有益한 때를 免疫性이라고 하고 有害한 때를 過敏性 혹은 알레르기라고 한다<sup>11)</sup>.

免疫疾患의 治療에 있어서도 免疫不足疾患은 扶正法을 주로 하여 正充邪自祛하고 免疫過敏反應은 祛邪法을 주로 하며 邪祛正自安시키되 扶正과 祛邪의 比率를 적절히 應用하여 扶正하되 留邪시키지 않고 祛邪하되 傷正하지 않도록 하여야 한다<sup>63)</sup>. 따라서 正氣虛弱으로 因한 慢性疾患일 境遇에는 扶正祛邪시키기 위해 正氣를 도우는 藥物 즉 益氣, 助陽, 養血, 滋陰시키는 補養藥들이 人體의 免疫機能을 增強시킬 수 있다고 思料된다.

특히 免疫不足 疾患中 先天的으로 發生하는 1次 免疫 缺乏症은 80%以上이 小兒年齡에서 나타나므로<sup>72)</sup> 生體內에서 病原素에 대한 防禦作用을 生體의 恒常성을 維持하여 抵抗力을 增強시켜주는 것이 免疫系<sup>18)</sup>라고 할 때 小兒補養藥에 屬하는 加味補兒湯은 免疫機能 增進效果에 關聯이 있다고 思料된다.

加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 效果는 加味補兒湯을 投與한 實驗群의 細胞 增殖率이 對照群에 비해 有意性있게 增加하였으며 (p<0.001) 이는 加味補兒湯이 特異的 免疫反應을 增強시킬 수 있을 것으로 思料된다(Fig. 1,2).

Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 增殖 및 分化過程을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 分化되며, 分化된 Th1 cell은  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 分泌하여 다른 T 세포, B 세포 및

macrophage의 增殖과 分化를 促進하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 活性化시킨다<sup>73)</sup>.

加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation에 미치는 效果에서는 對照群의 thymocytes 중 Th (CD4 single positive cell) 細胞는 11.5%이며 Tc (CD8 single positive cell) 細胞는 2.7%로, 정상 생쥐 胸腺에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells은 약 12%, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 報告된 內容과 비슷한 結果를 나타내었으며<sup>74)</sup>, 加味補兒湯 投與時 thymocytes의 Th 細胞의 population은 有意性있게 增加되었으나(p<0.05), splenocytes의 T- 및 B-lymphocytes의 比率과 splenic T-lymphocytes 중 Th/Tc 細胞의 比率에는 影響을 주지 않았다. 이는 加味補兒湯이 thymocytes의 Th 細胞를 活性化하여 免疫反應을 增強시킬 수 있을 것으로 思料된다(Fig. 3-6).

加味補兒湯이 thymocytes 및 splenocytes의 cytokines 分泌에 미치는 效果에서는 加味補兒湯 投與時 thymocytes 培養液에 Th1 細胞에서 分泌되는  $\gamma$ -IFN 및 IL-2는 對照群에 비해 有意性있게 增加하였으나(p<0.05, p<0.01), Th2 細胞에서 分泌되는 IL-4는 減少하였다. 한편 splenocytes 培養液에서는  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4가 모두 對照群에 비해 有意性 있게 增加하였으며(p<0.05, p<0.01, p<0.01), 血清 중의  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4도 모두 有意性있게 增加하였다(p<0.001, p<0.01, p<0.01). 이는 加味補兒湯이 免疫細胞로부터 cytokines의 分泌를 促進하여 免疫能을 增強시킬 수 있을 것으로 思料된다(Fig. 7-9).

Nitric oxide(NO)는 T-lymphocyte가 生成하는 cytokine을 調節하며, in vivo에서 T-lymphocyte의 生命을 調節하는 因子 중 하나로 알려져 있고<sup>75)</sup>, heper T cell의 增殖을 抑制하며<sup>76)</sup> 自己 免疫系를 抑

制하는 것으로 報告<sup>29)</sup>되었다.

加味補兒湯이 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide의 生成에 미치는 效果에서 加味補兒湯을 投與한 實驗群이 對照群에 比하여 NO 生成이 有意하게 抑制되었다(p<0.001)(Fig. 10).

外部로부터 異物質이 侵入하면 生體는 自己防禦를 위해 macrophages가 活性化되어 phagocytosis가 促進된다. 이러한 phagocytosis는 poly-morphonuclear leukocytes에서도 일어난다. Phagocytosis는 免疫의 인 側面에서 重要하지만, 傷處治癒 過程에서도 매우 重要하다<sup>73)</sup>.

加味補兒湯이 腹腔 macrophage의 食食能에 미치는 效果에서 macrophages의 食食能을 測定하는데 chemiluminescence를 測定하는 方法을 利用하였다. 이 方法의 原理는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 生成하는데, 이때 生成된 oxygen radical과 lucigenin이 反應하여 lucigenin chemiluminescence를 發生하는 것을 測定함으로써 phagocytic activity가 進行되는 것을 確認하는 것이다<sup>77)</sup>. Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence(CL)를 測定한 結果 加味補兒湯 投與時 對照群에 비해 CL 양이 有意性있게 增加하였으며(p<0.001), FITC-conjugated E. coli particle의 食食도 增加하였다.

NO는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 形成을 抑制하는 것으로 알려져 있는데<sup>78)</sup>, 本 實驗에서 加味補兒湯이 NO 生成을 抑制하고 phagocytic activity를 增加시켰다는 結果는 加味補兒湯이 macrophages의 phagocytic activity를 增加시키는데 NO가 一部 關與하고 있음을 시사하며 이는 加味補兒湯이 非特異的 免疫反應도 增強시킬 수 있을 것으로 思料된다(Fig. 11,12).

以上の 實驗結果 加味補兒湯은 生體에 投與되었을 때 thymocytes, splenocytes의 增殖 및 Th1과 Th2

細胞로부터 cytokine을 分泌하는 特異的 免疫反應을, macrophages로부터 nitric oxide 生成을 抑制함으로써 食食能을 增加시키는 非特異 免疫反應을 增強시킬 수 있는 藥物로 思料된다.

따라서 補先天不足, 滋養腎水, 健脾清熱, 滲濕行氣 하는 加味補兒湯의 免疫細胞에 미치는 效果는 주로 先天性 非特異 免疫能 上昇效果와 T 細胞 및 脾臟 細胞의 增殖 促進效果에 起因하고 抗體를 生成하는 B 細胞의 免疫增強效果를 보여 人體의 抵抗力을 키워주어 免疫不足疾患은 扶正法을 주로 하고, 免疫過敏反應은 祛邪法을 주로 하여 扶正하되 留邪시키지 않고 祛邪하되 傷正하지 않도록 하므로 小兒 虛弱證 治療 및 疾病豫防에 活用價値가 있을 것으로 思料된다.

### V. 結 論

小兒의 虛弱證을 治療할 目的으로 應用되어 온 加味補兒湯이 免疫調節作用에 미치는 影響을 알아보기 위하여 正常 Balb/c mouse의 特異 免疫을 나타내는 thymocytes, splenocytes의 活性變化와 先天性 非特異 免疫을 나타내는 macrophages의 活性變化를 調査한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 加味補兒湯은 對照群에 比하여 thymocytes 및 splenocytes의 細胞增殖率을 有意性있게 增加시켰다.
2. 加味補兒湯은 thymocytes 중 Th 細胞의 subpopulation을 對照群에 比하여 有意性있게 增加시켰으나, splenocytes 중 Thy1/B220 細胞 및 Th/Tc 細胞의 比率에는 影響을 주지 않았다.

3. 加味補兒湯은 對照群에 比하여 thymocytes의  $\gamma$ -IFN 및 IL-2 分泌를 有意性있게 增加하였으나, IL-4의 分泌는 減少하였다.
4. 加味補兒湯은 對照群에 比하여 splenocytes의  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4의 分泌를 모두 有意性있게 增加시켰다.
5. 加味補兒湯은 血清 중  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4의 分泌量을 對照群보다 有意性있게 增加시켰다.
6. 加味補兒湯은 腹腔 macrophage로부터 生成되는 nitric oxide의 生成을 抑制시켰다.
7. 加味補兒湯은 macrophage의 食食能을 對照群에 比하여 有意性있게 增加시켰다.

以上の 實驗結果 加味補兒湯은 免疫에 直接的인 關聯이 있는 thymocytes와 splenocytes를 增殖시키고 Th1, Th2 細胞로부터 cytokines 分泌를 促進하여 特異的 免疫反應에, 또한 macrophages로부터 nitric oxide 生成을 抑制함으로써 非特異的 免疫反應의 食食能을 增加시킴으로 小兒의 免疫力를 增強시킬 수 있는 目的으로 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

### 參 考 文 獻

1. 大田大學校 韓方病院 : 韓方病院 處方集, 大田, 韓國出版社, p.392, 1992.
2. 黃度淵 : 方藥合編, 서울, 南山堂, p.270-271, 1990.
3. 孟華燮 : 方藥指針講義抄錄, 圓光大學校 韓醫科

- 大學 生理學研究班, pp.689-690, 1985.
4. 朴炳昆 : 韓方臨床四十年, 大光文化社, 서울, pp.595-596, 1996.
  5. 尹吉榮 : 東醫方劑學, 高文社, 서울, pp.180-181, 189, 1980.
  6. 申載鏞 : 方藥合編解說, 成輔社, 서울, p.389, 1986.
  7. 虞搏 : 醫學正傳, 成輔社, 서울, p.389, 1986.
  8. 丁奎萬 : 東醫小兒科學, 서울, 杏林出版社, p.35, 1986.
  9. 蔡化理 : 小兒難病回春新方, 中國, 北京科學技術出版社, pp.1-12, 1993.
  10. 李鐘訓 : 病原微生物學, 서울, 壽文社, pp.133-183, 1973.
  11. 李文鎬 : 內科學, 서울, 금강출판사, pp.167-168, 1989-1999, 1979.
  12. 洪元植編 : 精校黃帝內經, 東洋醫學研究院 出版部, p.37, 55, 57, 61, 69, 78, 82, 122, 137, 169, 213, 249, 256, 292, 326, 336, 340, pp. 118-119, 304-305, 318-319, 347-348, 1981.
  13. 趙鐘寬 : 免疫에 관한 東洋醫學的 考察, 서울, 東洋醫學, p.23, 1985.
  14. 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, 6(2):55-63, 1985.
  15. 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.
  16. 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, 8(1):13-26, 1994.
  17. 李漢哲 : 麥荅白朮散 煎湯液投與가 Mouse의 生體 및 試驗管內 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校大學院 博士學位論文, 1992.
  18. 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 7(5):13, 19, 21, 1986.
  19. 金允姬 : 加減補兒湯의 造血 및 免疫增進에 關한 研究, 大田大學校韓醫科大學院, 博士學位論文, 1999.
  20. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 2844, 1978.
  21. 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.
  22. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods., 65:55-63, 1983.
  23. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods., 129:23, 1990.
  24. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179: 873-879, 1994.
  25. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infec. Immunity., 59(9):3280, 1991.
  26. 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.

27. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods.*, 112:163, 1988.
28. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.: A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. C.*, 162:1, 1993.
29. 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
30. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immunol.*, 45:1, 1984.
31. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, pp.195-196, 1988.
32. 錢 乙 : 小兒藥證直訣, 癸丑文化社, 上卷, pp. 2-3, 7-8, 下卷 p.1, 1974.
33. 汪認庵 : 醫方集解, 臺灣, 文光圖書有限公司, pp.1-2, 1986.
34. 李進容 : 六味地黃丸의 小兒疾患 治療에 대한 文獻的 考察, 서울, 大韓韓方小兒科學會誌 卷4, pp.51-65, 1990.
35. 慎元揆 : 小兒虛證에 관한 文獻的 考察, 大韓韓方小兒科學會誌 4(1):113, 1990.
36. 張仲景 : 金匱要略, 서울, 韓林院, pp.58-59, 1986.
37. 洪元植 : 中國醫學史, 東洋醫學研究院, pp.170-171, p.208, 245, 1984.
38. 陳復正 : 幼幼集成, 上海科學技術出版社, p.51, 53, 108, 136, 179, 181, 195, 1978.
39. 王肯堂 : 證治準繩, 上海鴻寶齋書局印行, pp.828-829, 1975.
40. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.147, 449, 1987.
41. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 施風出版社, p.285, 1985.
42. 陸青節 : 萬病醫藥顧問, 臺北, 大中國圖書公司, 上卷小兒科, pp.67-68, p.158, 178, 1978.
43. 全國韓醫科大學本草學教授共編著: 本草學, 서울, 永林社, p.180, 193, 294, 296, 306, 347, 353, 362, pp.369-371, p.376, 531, pp.536-537, p.560, 585, 626, 1991.
44. 新文豐出版公司 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, pp.30-37, 215-217, 219-221, 239-240, 363-366, p.395, pp.544-550, 566-571, 603-604, 924-927, p.1241, pp.1288-1290, 1562-1563, 1593-1596, 1943-1944, 2445-2447, 2513-2515, 2524-2526, 2609-2611, 1981.
45. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp. 691-695, 699-710, 734-743, 771-780, 852-857, 867-870, 1021-1027, 1349-1352, 1456-1457, 1546-1547, 1773-1775, 1787-1789, 1820-1821, 2094-2095, 2145-2147, 1982.
46. 王好古 : 湯液本草, 서울, 大星文化社, pp. 126-127, 136-137, 145-147, 151-154, 165-167, 172-174, 185-187, 255-256, 277-278, 281-283, 309-310, 336-337, 1996.
47. 陳存仁 : 圖說漢方醫藥大辭典, 東京, 講談社, pp.16-17, 24-25, 32-33, 54-55, 62-63, 66-67, 74-75, 126-127, 130-131, 142-143, 178-179, 198-199, 208-209, 230-231,

- 242-243, 246-247, 258-259, 1982.
48. 丁奎萬 외 2人: 韓方小兒科學 臨床實習 教材, 서울, 宇成文化社, p.51, 1991.
  49. 陳士鐸: 石室秘錄, 서울, 杏林書院, p.164, 1973.
  50. 李挺: 醫學入門, 서울, 南山堂, p.1681, 1985.
  51. 羅瑛杰: 白朮과 枸杞子가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1987
  52. 戴新民: 中醫免疫學, 臺北, 啓業書局有限公司, pp.7-30, 1985.
  53. 邱佳信 외 5人: 健脾中藥防治消化道惡性腫瘤的作用原理研究, 上海中醫藥雜誌, 卷六, pp.45-47, 1987.
  54. 韓宗鉉: 甘草의 免疫調節作用에 關한 研究, 全州又石大學大學院 博士學位論文, 1991.
  55. 匡調元: 中醫病理研究, 中國, 上海科學技術出版社, p.31, 1989.
  56. 傅芳: 中醫免疫思想及成就, 香港, 中醫雜誌, 25(11):55-57, 1984.
  57. 上海中醫學院: 中醫學基礎, 香港, 商務印書館, pp.109-113, p.179, 1981.
  58. 金完熙, 崔達永: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, p.53, 284, 288, 369, 1985.
  59. 文濬典: 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.23-27, 78-80, 337-341, 351-352, 1990.
  60. 方藥中 외: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.12-16, 1988.
  61. 姜孝信: 東洋醫學概論, 서울, 高文社, pp.66-70, 1973.
  62. 河北醫學院 校釋: 靈樞經校釋(下冊), 北京, 人民衛生出版社, p.49, 355, 450, 1980.
  63. 蔡禹錫: 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 關한 文獻的 考察, 서울, 大韓漢醫學會誌 11(2):pp.54-58, 1990.
  64. 梅光慧: 中醫基礎理論, 四川, 四川科學技術出版社, p.70, 1988.
  65. 具本泓: 免疫과 알레르기, 서울, 大韓韓醫學會誌 11(2):9-10, 1990.
  66. 李文憲 編著: 新編實用鍼灸學, 香港藝美圖書公司, p.188, 1970.
  67. 金周德, 金聖光 譯: 免疫學入門, 서울, 醫齒學社, pp. 22-80, 207-235, 273-300, 1983.
  68. Alberda, S.M. and Buck, C.A.: Integrins and other cell l.adhesion FASEB J., 4:28-68, 1990.
  69. Munoz, J: Effect of bacteria and bacterial products on antibody response. Adv. Immunol., 4:397, 1964.
  70. White, R.G.: The adjuvant effect of microbial products on the immune response. Annu. ev. Microbial., 30:579, 1976.
  71. 양용태: 체액 면역 기전에 의한 숙주 방어, 대한 의학협회지, 21(7):74-578, 1978.
  72. 洪彰義: 小兒科學, 大韓教科書株式會社, 서울, pp.209-210, 1994.
  73. 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.
  74. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). U.S.A., pp.177-178, 1994.
  75. 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.

76. Okkuda, Y., Sakada, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T.: Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. *Immunology Letters.*, 52:135, 1996
77. 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
78. 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.