

원 저

微細變化 腎症候群에서 溫脾湯과 當歸芍藥散이 免疫調節機能에 미치는 影響

安永敏, 安世永, 杜鎬京

경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Immuno-Regulatory Effects of *Onbi-tang* and *Dangguijakyak-san* in Minimal Change Nephrotic Syndrome

Young-Min Ahn, Se-Young Ahn and Ho-Kyung Doo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

The purpose of this research is to investigate the synergistic effect of herb medicines with hydrocortisone and the regulation effect on the immune system of *Onbitang* and *Dangguijakyaksan* at the supernatant of PHA-P stimulated PBMC in the patients with minimal change nephrotic syndrome(MCNS).

From the measurement of the concentration rate of IL-4, sCD23 and IL-13, the experiment yielded the following results :

The *Onbitang* group showed a greater tendency to suppress IL-4 and IL-13 levels in MCNS group with no statistical significance. It showed very strong suppression in soluble CD23 compared with control group in MCNS group.

The *Dangguijakyaksan* group, though not statistically significant, was inclined to suppress IL-4 level in MCNS group. It shows stronger suppression in sCD23 and IL-13 levels than these of control group in MCNS group.

As for the synergistic effect, the group of hydrocortisone with herb medicines(*Onbitang* or *Danguijakyaksan*) produced more suppressive effect to IL-13 level in MCNS group than that of hydrocortisone-only group. They also tended to suppress sCD23 and IL-4 levels, though no statistical significance can be given. As to the suppressive effect of IL-13 level, the group of *Onbitang* with hydrocortisone showed an increase of 22.6%, while the group of *Danguijakyaksan* with hydrocortisone showed 14.7%. So *Onbitang* is more effective than *Danguijakyaksan*.

From the above results, a combinative treatment(herb medicines with hydrocortisone) can be an alternative method to substitute for steroid therapy. It can be a more effective therapy than steroid-only therapy because it is expected to reduce side effects and it shows more special effect to suppress IL-13 level. Based on the present results, further investigation concerning the serum IgE elevation is needed. (J Korean Oriental Med 2000;21(1):20-28)

Key Words: Minimal change nephrotic syndrome, IL-4, IL-13, soluble CD23, *Onbi-tang*, *Danguijakyak-san*

서론

小兒 腎症候群의 80% 이상을 차지하는 微細變化 腎症候群(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)은 甚한 蛋白尿와 低蛋白血症, 浮腫 및 高脂質血症 등을 特徵으로 하는 疾患으로^{1,2)} 아토피性 皮膚疾患, 氣管支喘息 등과 같은 알러지 疾患과 聯關되어 나타나는 境遇가 많다고 알려져 있다^{3,4)}.

微細變化 腎症候群의 原因 및 病理機轉은 아직까지 明

確히 밝혀져 있지 않지만, 免疫學的 機轉의 可能性이 알려져 있는데, 最近에는 T 細胞 機能異常으로 humoral factor, 특히 림포카인이 絲毯體 基底膜의 陰性 荷電이나 血漿蛋白 荷電에 變化를 일으켜서 蛋白尿가 나타난다는 理論이 提起되고 있다⁵⁾.

西洋醫學의 治療로서 大部分의 微細變化 腎症候群 患者들은 스테로이드(steroid)에 反應을 보이나, 약 5~10%는 初期 스테로이드 治療에 反應하지 않고, 初期 治療에 反應하더라도 약 40%는 자주 再發하여 慢性的인 經過를 取하므로⁶⁾ 스테로이드 長期連用에 의한 成長障礙, 骨多孔症, 糖尿病, 感染 등의 副作用이 問題가 된다⁷⁾. 最近에는 싸이클로스포린(cyclosporin A)이 使用되지만, 이 또한 重

· 접수 : 2000년 3월 27일 · 수정 : 5월 2일 · 채택 : 5월 16일
· 교신저자 : 안영민, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원 한방병원 신계내과 (Tel. 02-958-9155)

Table 1. The Composition of Onbi-tang(溫脾湯)

藥物名	生藥名	學名	重量(g)
大黃	Rhei Radix et Rhizoma	<i>Rheum coreanum</i> NAKAI	10
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY	10
乾薑	Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiber officinale</i> ROSC	6
附子	Aconiti lateralis Preparata Radix	<i>Aconitum carmichaeli</i> DEBX	6
甘草灸	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> GISCH	3
總量			35

Table 2. The Composition of Dangguijakyak-san(當歸芍藥散)

藥物名	生藥名	學名	重量(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	8
川芎	Cnidii Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	8
赤茯苓	Hoelen	<i>Poria cocos</i> (SCHW) WOLF	4
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	<i>Atractyodes macrocephala</i> KOIDZ	4
澤瀉	Alismatis Rhizoma	<i>Alisma plantago-aquatica var. orientale</i> SAMUELS	6
赤芍藥	Paeonia Radix Rubra	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL	12
總量			42

症腎毒性이 問題되고, 投藥 中斷 時 再發하는 境遇가 많으므로⁸⁾ 本 疾患의 發病機轉에 대한 明確한 糾明과 이에 따른 보다 特異的인 治療法의 開發이 要望되고 있는 實情이다.

腎症候群은 東洋醫學의 ‘浮腫’, 즉 ‘水腫’의 範疇에 屬한다⁹⁾. 現在까지 韓醫學界에서 微細變化 腎症候群에 關한 研究로는 本疾患과 가장 類似한 實驗모델로 알려진 PAN(puromycin aminoneucleoside)腎症 白鼠의 血清學的 및 組織學的 變化를 觀察한 많은 報告들^{10,11,12)}이 있고, 最近에 杜 등¹³⁾은 스테로이드 依存性 頻回再發型 腎症候群 患者에게 柴苓湯과 스테로이드를 併用 治療하여 再發率을 크게 減少시켰다는 臨床研究 結果를 報告하였으나, 아직까지 本疾患 患者의 末梢血液 單核球 培養上清液에서 cytokines을 指標로 하여 東醫 方劑의 免疫學的 效果를 觀察한 研究는 없는 實情이다.

이에 著者는 臨床에서 腎症候群 治療에 多用되는 溫脾湯¹⁴⁾과 當歸芍藥散¹⁵⁾의 免疫學的 效能을 糾明하고, 아울러 스테로이드와의 併用投與에 의한 相乘效果를 알아보기 위하여 微細變化 腎症候群 患兒의 末梢血液 單核球(peripheral mononuclear cell, PBMC) 培養 上清液에서 分泌되는 cytokines 중 本疾患의 發病機轉과 關聯이 있는 것으로 알려진 Interleukin-4(IL-4), soluble CD23(sCD23), Interleukin-13(IL-13)을 指標로 하여 東醫 方劑 投與 및 스테로이드와의 併用投與 後, 그 變化를 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 實驗對象 및 材料

1) 對象

慶熙醫療院 東西腎臟病센터에서 頻回再發型 微細變化 腎症候群으로 診斷되어 通院 治療 중인 緩解期 患者 10名으로 性別은 男女 各各 5名이었고 發病年齡은 7.9±4.53歲, 發病期間은 4.04±3.77年이었다.

2) 材料

本 實驗에 使用한 藥材는 모두 慶熙醫療院 附屬韓方病院 藥劑部에서 購入하여 精選한 後 使用하였으며, 各處方의 內容과 分量은 Table 1, Table 2와 같다.

2. 方法

1) 檢體의 製造

總量 200g으로 換算한 上記 處方을 各各 1,500ml의 蒸溜水에 넣어 4時間 동안 加熱 抽出하여 濾過한 濾液을 rotary evaporator(Model NE-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 減壓 濃縮한 다음, 凍結乾燥器(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 乾燥시켰다.

凍結 乾燥된 各 藥劑 1次 抽出物 1g을 10ml의 蒸溜水로 溶解시킨 後 95℃ 水槽에서 2時間 동안 再次 加熱 抽出하였고, 이들 抽出物을 遠心分離用 試驗管에 담아 14,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 上清液을 收去하였다. 이 上清液은 直徑 0.2µm의 濾過紙를 通過시켜 濾過滅菌하였으며, 使用할 때까지 -70℃에 保管하였다.

2) 各 藥劑의 細胞毒性 檢査

各 藥劑의 試驗管 內 投與濃度를 決定하기 爲하여 細胞 毒性 檢査를 施行하였다.

우선 正常對照群의 末梢血液으로부터 單核細胞를 Ficoll-Hypaque 밀도구배 方法으로 分離하였다. 分離된 單核細胞를 phosphate buffered saline, pH 7.4 溶液으로 2~3回 洗滌하고, 最終으로 10% fetal bovine serum을 添加한 RPMI 1640 培養液을 ml當 1×10^6 細胞濃도가 되도록 調整하였다. 이들 細胞를 96well microplate, flat-bottom의 各 well當 100 μ 씩 分注하고, 여기에 여러 濃度로 稀釋시킨(最終濃度 15.6 μ g~2,000 μ g/ml) 各 藥劑 50 μ 와 Con-A(最終濃度 20 μ g/ml) 50 μ 를 各 well에 加한 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 條件下 培養基에서 72時間 동안 培養하였다. 72時間 經過 後, MTS-PMS 試藥(Promega, Cat# G5430, 2800 woods Hollow Rond Madison, WI 53711-5399, USA)을 各 well當 20 μ 씩 分注하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 條件下 培養基에서 4時間 동안 反應시킨 다음, spectrophotometer(Behring, Germany)를 利用하여 波長 492 nm에서 그 吸光度를 測定하였다. 各 藥劑의 濃度에 따른 細胞의 活性도가 顯著하게 低下되는 時點을 細胞毒性 誘發 時點으로 보아 藥劑 投與濃度를 각기 그 時點 直前에서 決定하였다.

3) 各 藥劑의 試驗管 內 投與濃度 決定

各 藥劑의 試驗管 內 投與濃度の 決定은 MTS-PMS 分析에서 吸光度가 對照群에 比해서 急激하게 낮아지기 直前의 濃度를 使用濃度로 決定하였는데, 그 濃度는 溫脾湯 30 μ g/ml, 當歸芍藥散 60 μ g/ml, Hydrocortisone 0.4 μ g/ml 이었다.

4) Cytokines의 生産

MCNS 患者의 靜脈으로부터 heparin 處理된 50cc syringe로 全血 15ml씩을 採血하여, 이들 血液을 Ficoll-Hypaque, S.G=1.077 (Pharmacia Biotech, Bj rkgatan 30, 751, 84 uppsala, Sweden) 溶液 15ml 위에 각각 重疊시켜 400 \times g에서 30分間 遠心沈澱시켜 試驗管 中間에 形成된 單核球 層을 收穫하였다. 分離된 單核球는 phosphate buffered saline(pH 7.4) 溶液으로 2回 洗滌한 다음 10% fetal bovine serum(Gibco, Grand Island NY, USA), 100 U/ml penicillin- 100 μ g/ml streptomycin이 添加된 RPMI 1640 培地에 2-mercaptoethanol을 50 μ M의 濃度로 添加한 培養液으로 細胞濃도가 4×10^6 /ml이 되도록 調整하였고, 이 細胞 浮游液을 48well microplate(Costa, Cambridge MA, USA)에 各 well當 0.5ml씩 分注하였다. 여기에 2)項 및 3)項의 細胞毒性 檢査에서 決定된 藥劑 稀釋液 및 Phytohaemagglutinin-P(PHA-P)를 各各 250 μ 씩 加하였는데, Sample A群에는 30 μ g/ml 溫脾湯 稀釋液을, Sample

B群에는 60 μ g/ml 當歸芍藥散 稀釋液을, HC群에는 0.4 μ g/ml Hydrocortisone을, Sample AH群에는 30 μ g/ml 溫脾湯 稀釋液과 0.4 μ g/ml Hydrocortisone 混合溶液을, Sample BH群에는 60 μ g/ml 當歸芍藥散 稀釋液과 0.4 μ g/ml Hydrocortisone 混合溶液을 加하였고, 對照群으로는 PHA-P 溶液과 完全 培養液을 各各 250 μ 씩 加하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培養基에서 5日間 培養한 다음, 그 培養 上清液을 收去하여 分析할 때까지 -70 $^{\circ}$ C 冷凍庫에 保管 하였다.

5) Interleukin-4 濃度の 測定

培養 上清液 內 IL-4 濃度の 測定은 R&D社(R&D system Inc, Minneapolis, MN 55413, USA)의 quantitative sandwich enzyme immunoassay(Cat# HS400) kit를 利用하였다. 要約하면 사람 IL-4에 대한 特異 단클론 抗體가 coating된 well에 IL-4 標準檢體와 檢體 200 μ 씩을 各 well에 加하고 室溫에서 3時間 反應시켰다. 3時間 經過 後 各 well을 洗滌 緩衝液으로 4回 洗滌한 다음 alkaline phosphatase가 附着된 IL-4 二次抗體를 各 well에 200 μ 씩 加하여 室溫에서 2時間 反應시켰다. 그 後, 各 well을 洗滌 緩衝液으로 4回 洗滌한 다음 tetramethylbenzidine 基質液 200 μ 씩을 各 well에 分注하여 室溫에서 2時間 反應시켰다. 여기에 2N H₂SO₄ 反應停止液 50 μ 씩을 各 well에 分注하여 反應을 中止시킨 後, 이 microplate를 spectrophotometer 波長 450nm에서 그 吸光度를 測定하였다. 測定된 吸光度 값을 log-log paper에 옮겨 標準檢體로 作成된 標準曲線(standard curve graph)에 의해 各 檢體 內의 IL-4 濃度를 算出하였다.

6) Soluble CD23(Low affinity IgE receptor, Fc ϵ R II) 濃度の 測定

培養 上清液 內 sCD23의 測定은 Biosource社의 quantitative solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay(EASIA) kit(Cat# KAS 0252)를 利用하였다. 要約하면 sCD23의 여러 抗原決定群을 認識하는 단클론 抗體들(oligoclonal)이 coating된 well에 標準檢體와 檢體를 100 μ 씩 各 well에 加한 後 horseradish peroxidase가 附着된 二次抗體를 50 μ 씩 各 well에 分注하여 horizontal shaker(700rpm) 上에서 2時間 反應시켰다. 2時間 經過 後, 洗滌 緩衝液으로 各 well을 3回 洗滌한 다음 tetramethylbenzidine 基質液 200 μ 를 各 well에 加하여 horizontal shaker(700rpm) 上에서 30分間 反應시켰다. 여기에 1.8N H₂SO₄ 反應停止液을 各 well에 50 μ 씩 加하여 反應을 中止시킨 後, 이 microplate를 spectrophotometer 波長 450nm에서 그 吸光度를 測定하였다. 測定된 吸光度 값을 log-log paper에 옮겨 標準檢體로 作成된 標準曲線에 의해 各 檢體 內의 sCD23 濃度를 算出

하였다.

7) Interleukin-13 濃度の 測定

培養 上清液 內 IL-13 濃度の 測定은 R&D社(R&D system Inc, Minneapolis, MN 55413, USA)의 quantitative sandwich enzyme immunoassay kit(Cat# D 1300)를 利用하였다. 要約하면, IL-13에 대한 特異 단클론 抗體가 coating된 well에 IL-13 標準檢體와 檢體 100 μ 씩을 各 well에 加하고 室溫에서 2時間 反應시켰다. 2時間 經過後, 各 well을 洗滌 緩衝液으로 3回 洗滌한 다음 horseradish peroxidase가 附着된 IL-13 二次抗體를 各 well에 200 μ 씩 加하여 室溫에서 2時間 反應시켰다. 그後, 各 well을 洗滌 緩衝液으로 3回 洗滌한 다음 NADPH 基質液 50 μ 씩을 各 well에 分注하여 室溫에서 1時間 동안 反應시켰다. 여기에 2N H₂SO₄ 反應停止液 50 μ 씩을 各 well에 分注하여 反應을 中止시킨 後, 이 microplate를 spectrophotometer 波長 492nm에서 그 吸光度를 測定하였다. 測定된 吸光度 값을 log-log paper에 옮겨 標準檢體로 作成된 標準曲線에 의해 各 檢體 內의 IL-13 濃度を 算出하였다.

3. 統計處理

모든 實驗結果의 統計處理는 SAS 統計 program(SAS 7.0, 1995)을 利用하였다. 모든 項目은 Paired Sample t-test法으로 各 Group間의 差異를 檢定하였고, p<0.05에서 統計學的 有意性を 觀察하였다. 또한, 韓方 方劑와 Hydrocortisone 併用投與群의 IL-13 抑制類型은 線形回歸分析(simple linear regression analysis)으로 分析하였다.

실험성적

1. PHA-P로 刺戟한 末梢血液 單核求에서의 IL-4에 대한 調節 效果

HC群은 對照群에 비해 3.617pg/ml(抑制率 12.0%), Sample A群과 Sample B群은 各各 3.460, 1.967pg/ml(抑制率 40.1, 21.2%)로 抑制하였고, Sample AH群과 Sample BH群은 各各 7.35, 6.83 pg/ml(抑制率 80.0%, 63.3%)로 抑制하였으나 統計學的 有意性은 없었다(Table 3, Fig 1).

2. PHA-P로 刺戟한 末梢血液 單核求에서의 sCD23에 대한 調節 效果

HC群은 對照群에 비해 4.338U/ml(抑制率 75.0%), Sample A群과 Sample B群은 各各 1.062, 1.312U/ml(抑制率 25.2%, 30.5%)로 매우 有意한 抑制를 하였다. Sample AH群과 Sample BH群은 對照群에 비해 各各 5.10, 5.15U/ml(抑制率 78.4%, 86.5%), HC群에 비해 各各 0.25, 0.30U/ml(抑制率 15.69%, 18.45%)로 抑制하였으나 統計學的 有意性은 없었다(Table 4, Fig 2).

3. PHA-P로 刺戟한 末梢血液 單核求에서의 IL-13에 대한 調節 效果

對照群에 비해 HC群은 8795.50pg/ml(抑制率 87.9%)로 매우 有意하게 抑制하였고, Sample B群은 1000.0pg/ml(抑制率 9.9%)로 有意한 抑制를 하였다. Sample A群은 590.0pg/ml(抑制率 7.2%)로 抑制하는 傾向을 보였으나 統計學的 有意性은 認定되지 않았다. Sample AH群과 Sample BH群은 對照群에 비해 各各 9098.7, 8987.9pg/

Table 3. The Effect of Herb Medicines and Herb Medicines with Hydrocortisone on the IL-4 Level at the Supernatants of PHA-P Stimulated PBMC in MCNS Group

Group	IL-4(pg/ml)	Inhibition(%)
Control	6.25 \pm 1.90(3.15,13.5)	-
HC	3.88 \pm 1.14(1.85,5.8)	12.0 \pm 49.3
Sample A	3.57 \pm 1.02(0.86,5.5)	40.1 \pm 19.5
Sample B	5.47 \pm 2.02(3.2,9.5)	21.2 \pm 10.7
Sample AH	0.98 \pm 0.08(0.9,1.05)	80.0 \pm 13.3
Sample BH	1.52 \pm 0.35(0.9,2.1)	63.3 \pm 30.0

Each value represents the Mean Differences \pm S.E.(Minimum, Maximum)
 Control: complete media(RPMI 1640) stimulated by PHA-P without treated
 HC: with Hydrocortisone treated
 Sample A: with Extracts of *Onbitang* treated
 Sample B: with Extracts of *Dangguijakyaksan* treated
 Sample AH: with Extracts of *Onbitang* and *Hydrocortisone* treated
 Sample BH: with Extracts of *Dangguijakyaksan* and *Hydrocortisone* treated

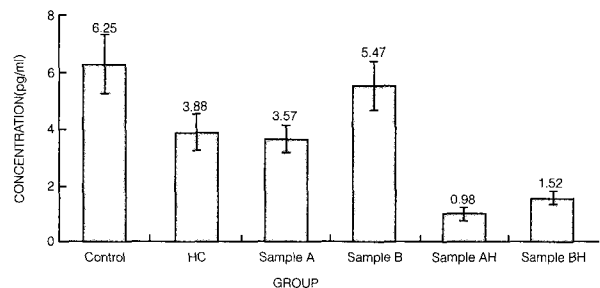


Fig. 1. It shows the effect of herb medicines(sample A, sample B) and herb medicines with hydrocortisone(sample AH, sample BH) on IL-4 level at the supernatants of PHA-P stimulated PBMC in MCNS group. The IL-4 level is more decreased in sample A, sample B group and sample AH, sample BH group than complete media control group, however, it is not statistically significant.

Table 4. The Effects of Herb Medicines and Herb Medicines with Hydrocortisone on the sCD23 Level at the Supernatants of PHA-P Stimulated PBMC in MCNS Group

Group	sCD23(U/ml)	Inhibition(%)
Control	4.19±0.54(2.25,8.15)	-
HC	1.35±0.11(1.15,1.65)*	75.0±3.9
Sample A	3.50±0.58(1.7,6.65)*	25.2±4.4
Sample B	3.25±0.54(1.6,6.4)*	30.5±3.4
Sample AH	1.28±0.03(1.25,1.3)	78.4±5.6
Sample BH	1.23±0.13(1.1,1.35)	86.5±7.1

Legends are the same in Table 1.

*: p<0.05, compared with "Control group"

Table 5. The Effect of Herb Medicines and Herb Medicines with Hydrocortisone on the IL-13 Level at the Supernatants of PHA-P Stimulated PBMC in MCNS Group

Group	IL-13(pg/ml)	Inhibition(%)
Control	9990.0±2416.6(1650,27000)	-
HC	1194.5±319.05(155,2700)*	87.9±2.1
Sample A	9400±2393.16(1850,26000)	7.2±3.6
Sample B	8990±2282.56(1650,25000)*	9.9±4.2
Sample AH	891.30±269.23(83,891.3)*†	91.1±2.0
Sample BH	1002.1±287.76(98,2450)*†	90.0±2.1

Legends are the same in Table 1

*: p<0.05, compared with "Control group", †: p<0.05, compared with "HC group"

ml(抑制率 91.1%, 90.0%), HC群에 比해서는 各各 303.20, 192.40pg/ml(抑制率 30.32%, 18.54%)로 매우 意味있는 抑制를 하였다(Table 5, Fig 3).

韓方 方劑와 Hydrocortisone의 併用投與 時와 Hydrocortisone 單獨 使用時의 抑制樣相 關係를 線形回歸分析으로 알아본 結果, Hydrocortisone과 韓方 方劑를 併用하는 境遇 Hydrocortisone 單獨 使用 때보다 IL-13의 抑制가 統計적으로 매우 有意하게 增加하였으며 抑制能의 增加程度는 Sample AH가 약 22.6%, Sample BH가 약 14.7%의 增加된 抑制效果를 觀察할 수 있었으며, 併用效果는 溫脾湯이 當歸芍藥散보다 큰 것으로 나타났다(Fig 4).

고찰

微細變化 腎症候群의 原因 및 病態機轉은 免疫學的 機轉과 密接하게 關聯되는 것으로 알려져 있는데, Shalhoub⁶⁾가 처음으로 T細胞의 異常으로 인하여 本疾患이 招來된다고 發表한 以後, 最近에는 T細胞 機能異常으로 體液性 因子(humoral factor), 특히 림포카인

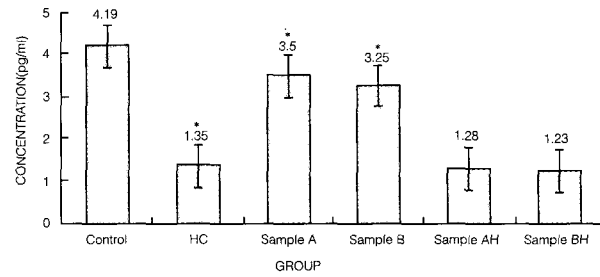


Fig. 2. It shows the effect of herb medicines(sample A, sample B) and herb medicines with hydrocortisone(sample AH, sample BH) on the sCD23 level at the supernatants of PHA-P stimulated PBMC in MCNS group. The sCD23 level is more decreased significantly in HC group, sample A and sample B group than the complete media control group. It is decreased in sample AH and sample BH group, however, it is not statistically significant.

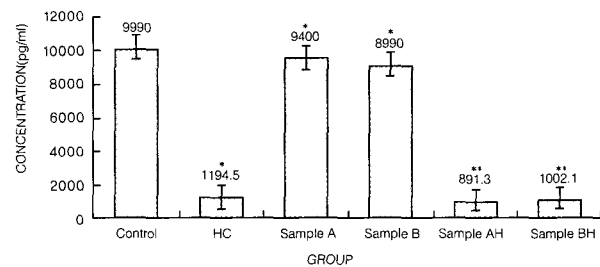


Fig. 3. It shows the effects of herb medicines(sample A, sample B) and herb medicines with hydrocortisone(sample AH, sample BH) on the IL-13 level at the supernatants of PHA-P stimulated PBMC in MCNS group. The IL-13 level is more decreased significantly in HC group, sample A, sample B group and sample AH, sample BH group than complete media control group. Especially, it is more manifest at the sample AH, sample BH group than the HC group.

(lymphokines)이 絲球體 基底膜의 陰性荷電이나 血漿蛋白 荷電에 變化를 일으켜서 蛋白質에 대한 透過性이 增加되어 蛋白尿가 나타난다는 假說이 提起되었다³⁾. 이를 뒷받침하는 事實로 細胞媒介性 免疫을 變形시키는 紅疫을 앓거나 紅疫 豫防注射를 맞은 뒤 自然的인 緩解가 오는 點, 림프구의 transformation이 損傷된 Hodgkin氏病을 앓는 患者에서 腎症이 자주 誘發되는 點, 스테로이드나 기타 免疫抑制劑에 의하여 緩解를 誘導할 수 있는 點 등^{6,10)}을 들 수 있으나, 아직까지 T細胞 異常을 일으키는 原因 自體는 明確히 糾明되지 않고 있다³⁾.

東洋醫學에서 腎症候群은 '浮腫', 즉 '水腫'의 範疇에 屬한다¹⁹⁾. 水腫의 病因 病機를 考察해 보면, 風寒濕의 邪

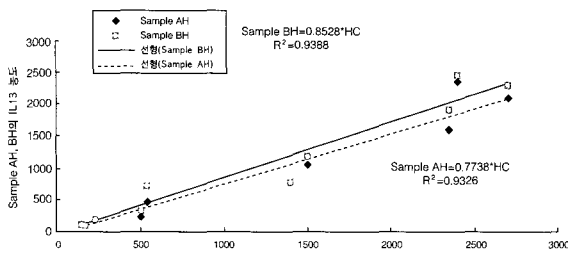


Fig. 4. The combination treatment of herb medicines with hydrocortisone and hydrocortisone alone were given to MCNS groups and the simple linear regression analysis was done to evaluate the inhibition pattern differences among the results. The combination treatment group of herb medicines and hydrocortisone shows statistically significant inhibition effect on IL-13 expression than that of the hydrocortisone-only group ($p < 0.001$). Inhibition effect was increased 22.6% (1-0.7738) in sample AH and 14.7% (1-0.8528) in sample BH. Thus Onbitang is thought to have better effect than Dangguijakyaksan, though both are regarded to have synergistic effects.

氣가 人體에 侵入하거나 飲食起居失常, 勞倦內傷 等으로 因하여 人體의 津液代謝를 擔當하는 脾氣의 運化轉輸作用, 肺氣의 通調肅降作用, 腎氣의 開闔調節作用과 三焦의 氣化作用이 失調되므로 水液이 停滯되어 肌膚에 泛濫하여 發生하는데¹⁾, 이를 張¹⁷⁾은 “凡水腫等證 乃肺脾腎三臟 相干之病 蓋水爲至陰 故其本在腎 水化於氣 故其標在肺 水惟畏土 故其制在脾 今肺虛則氣不化精而化水 脾虛則土不制水而反克 腎虛則水無所主而妄行 水不歸經則逆而上泛”이라 하였다. 또한, 人體 各 組織의 水液은 반드시 腎, 즉 命門原氣에 의하여 散布되어진 後, 쓸모 없는 水液이 體外로 排出되고 脾陽의 根本도 腎陽에 있으므로 脾·肺와 相助하여 水液代謝를 遂行하는 腎의 作用이 매우 重要하며, 이 때문에 “腎者 水臟”¹⁸⁾이라고 한다¹⁾.

또한, 血과 腎의 關係를 살펴보면, 張¹⁷⁾은 “血者 水穀之精也 源源而來而實 生化於脾 總統於心 臧受於肝 宣布於肺 施泄於腎”이라 하여 營養物質인 血이 水穀에서 비롯되어 그 最終代謝가 腎의 排泄로 進行됨을 말하였고, 腎은 全身의 陰陽을 調節하고 主宰하여 陰陽이 平衡하고, 體溫과 血液의 運行이 正常을 維持하도록 한다^{1,19)}. 瘀血이란 非生理的인 血로서 單純히 엉겨 있는 피만이 아니라 血의 運行이 遲緩되어 流暢하지 못하거나 血性이 變亂, 轉變된 것까지를 包括하는데, 특히 腎臟의 瘀血은 水腫發生의 重要한 原因의 하나가 된다¹⁾. 實驗的으로도 李 등²⁰⁾은 絲絨體腎炎 患者의 血流力學的 變化指標(血液凝固指標 包含)가 正常人에 비해 意味있게 增加되고, 病情이 惡

化될수록 더욱 顯著하다는 報告를 하면서 瘀血證이 腎炎 病變 惡化의 重要 原因이 된다고 하였는데, 以上の 理論 들은 浮腫의 活血化瘀 治法에 대한 理論의 根據가 된다.

本 實驗에 使用된 處方을 살펴보면 溫脾湯은 孫思邈의 <千金翼方>¹⁴⁾에 收錄된 處方으로 浮腫과 關聯하여 脾腎 陽虛, 濁陰上逆의 境遇에 使用하고²¹⁾, 最近 日本의 服部 智久 등²²⁾은 絲絨體腎炎 誘發 白鼠에 投與하여 血清 크레 아티닌值를 減少시키고 BUN 上升을 抑制하므로 急速히 進行하는 絲絨體 腎炎에 效果가 있을 것이라는 報告를 하였으며, Hattori 등²³⁾은 腎不全 誘發 白鼠에서 溫脾湯의 投與가 絲絨體에서 TGF-β 陽性部位를 抑制하고, 成熟TGF-β(mature TGF-β)의 上升 抑制를 報告하는 등 腎臟疾患과 關聯된 많은 研究가 進行되고 있다. 한편, 當歸芍藥散은 張仲景의 <金匱要略>¹⁵⁾에 收錄된 處方으로 陰水證 瘀血 水腫에 活血化瘀의 目的으로 使用되고²¹⁾ 腎臟疾患 治療와 關聯되어서는 瘀血이 主가 되고 血虛와 水滯를 同伴한 裏寒證 病態의 慢性 腎炎이나²⁴⁾ 陰證 虛證 傾向이 있는 絲絨體腎炎이나 腎症候群에 使用된다²⁵⁾.

最近 免疫學 및 分子生物學의 發展으로 腎症候群의 特徵인 蛋白尿가 여러 가지 cytokine에 의해 仲介된다는 것이 밝혀졌다²⁶⁾. 흔히 腎症候群의 再發은 바이러스 感染에 의해 觸發되며, 그 結果 여러 種類의 cytokines 放出이 免疫調節 不均衡의 原因이 된다. 이에 대한 證據로는 臨床的으로 cytokine 生産에 影響을 주는 스테로이드, 싸이클 로스포린과 같은 免疫調節 藥劑에 대한 腎症期 反應을 들 수 있다²⁷⁾.

現在까지 밝혀진 10餘種의 cytokines 중 IL-4는 活性化 된 T 림프구, 肥滿細胞, 好鹽基球에서 生成되는 多向性 (pleiotropic) cytokine으로 여러 가지 細胞에 作用하여 多樣한 免疫反應 調節機能을 갖는다. 그 主 機能은 anti-IgM 抗體와 함께 作用하여 B 림프구의 成長, 增殖 및 分化의 促進을 誘導하는데²⁸⁾ 특히, 細胞 內 Ig 遺傳子 再配列 (Ig gene rearrangement)에 關與하여 IgE 遺傳子 發顯과 IgE의 生産 및 分泌를 促進시키는 主調節 cytokine으로 알려져 있다²⁹⁾. IL-4는 IgE 轉換을 促進시키고³⁰⁾ B 細胞 分化 特異抗原이며 B 細胞의 低親和性 IgE 受容體인 CD23의 發顯을 誘導하며^{28,30)}, B 細胞에서 MHC Class II 抗原의 發顯을 增加시켜 抗原 認知能力을 向上시킴으로써 IgE 合成을 誘導하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. Cho 등³²⁾이 微細變化 腎症候群 患兒에서 IL-4의 活性和 IL-4 mRNA의 發顯이 增加되어 있고, 이것이 低親和性 IgE 受容體의 發顯과 血清 IgE 上升에 關與된다는 것을 報告한 以後, Neuhouse 등³³⁾은 스테로이드反應性 腎症候群 患者에서 血清 IL-4 濃度가 增加되어 있음을 밝히는 등 IL-4와 微細變化 腎症候群의 關聯性에 대한 많은 研究가 進行되고

있다.

또한, macrophage 및 B 세포에서 發顯되는 II 型인 低親和性 IgE 受容體 發顯 誘導에 IL-4가 關與됨이 여러 研究에서 證明되었다^{28,30}. CD23은 IL-4에 의해 顯著하게 上升 調節(up-regulation)되는데 이때 IL-4는 mCD23 (membrane CD23)뿐 만 아니라 B 림프구 培養液 內에서 檢出되는 sCD23(soluble CD23)도 함께 增加시킨다²⁸. 이러한, CD23은 IgE와 結合하여 IgE를 통한 抗原의 endocytosis 過程에 媒介體로 作用하고 IgE에 結合한 抗原의 T 세포 刺戟 效果를 높여 IgE 反應은 물론 IgE와 關係된 免疫反應을 直接 및 間接적으로 充進시킨다고 알려져 있다³⁴. Ogawa 등³⁵은 微細變化 腎症候群의 血清 IgE 上升에 IgE 受容體의 發顯이 主된 機轉으로 作用함을 報告하였고, 微細變化 腎症候群에서 血清 IgE의 增加와 함께 血清 IL-4, CD23도 有意하게 增加되어 있고³⁴ 緩解를 보인 患者에서는 急性期 때보다 CD23值가 顯著히 減少됨을 밝힌 研究 結果³들은 이들 cytokine이 腎症候群의 發病에 密接하게 作用한다는 것을 示唆한다³⁴.

한편, IL-13은 單核球과 B 세포에 免疫調節 機能과 抗炎症 作用을 갖는 것으로 알려진 重要한 T cell cytokine 으로 사람 單核球의 表現型(phenotype)을 變化시키고 B 세포에서 MHC class II와 低親和性 IgE 受容體의 發顯을 誘導하며 B 세포에 作用하여 IgG4와 IgE 生産에 關與하는 등 그 生化學的 活性이 IL-4와 類似한 것으로 알려져 있다^{36,37}. 單核球에 대한 IL-13의 多様な 生化學的 活性은 炎症, 알러지 및 免疫調節 過程에서 重要한 役割을 차지하게 되는데³⁷, 이러한 免疫調節作用으로 Th1 cytokine인 IL-2와 IFN- γ 을 誘導하는 IL-12의 生産을 抑制하고³⁶ Th2 cytokine인 IL-10 mRNA 發顯을 抑制하는 것으로 報告³⁷ 된다. 一般的으로 IL-10은 單核球의 炎症 cytokines, MHC ClassII와 T 세포, NK 세포의 反應을 下向 調節(down-regulating)하는 免疫 抑制 作用을 하므로 IL-13의 IL-10 生産 抑制 作用은 慢性 疾患 狀態에서 重要한 役割을 하게 된다³⁷. Kimata 등³⁸은 腎症候群과 아토피性 皮膚炎을 앓고 있는 患者를 對象으로 한 實驗에서 再發期 腎症候群 患者의 血清 IgE 上升에 IL-13이 關與하고, 아토피性 皮膚炎 患者에서는 IL-4가 關與한다는 것을 報告하였고, 最近에는 再發期 腎症候群 患者에서 IL-13 mRNA 發顯의 增加와 함께 蛋白尿의 病理機轉과 關聯되어 IL-13이 單核球의 血管透過性因子(vascular permeability factor) 生産에 作用할 것이라는 報告²⁷ 등 이에 대한 많은 研究이 이루어지고 있다.

本 研究에서는 腎症候群에 臨床적으로 使用되는 溫脾湯과 當歸芍藥散의 免疫抑制 效能을 觀察하기 위한 指標로 Th2 cytokine인 IL-4 및 IL-13과 B 세포의 低親和性

水溶性 IgE 受容體인 sCD23을 選定하였다.

末梢血液 單核細胞는 非特異的 分裂原質로 刺戟 培養하면 初期 數時間 內에 많은 化學的 伸介子, 즉 림포카인을 上清液으로 分泌하는데³⁹, 最近 腎症候群과 關聯된 많은 研究에서 分裂原質(mitogen)로 刺戟된 末梢血液 單核細胞의 上清液에서 多様な 水溶性 因子들에 對한 研究이 이루어지고 있다^{26,33,39}.

이에 本 研究에서는 微細變化 腎症候群 患兒의 靜脈血 15ml를 採血한 後, 末梢血液 單核球를 分離 培養한 다음 分裂原質인 PHA-P 250 μ l와 함께 30 μ g/ml 溫脾湯 稀釋液, 60 μ g/ml 當歸芍藥散 稀釋液, cytokine 生産 抑制效能 이 알려진 0.4 μ g/ml Hydrocortisone 및 0.4 μ g/ml Hydrocortisone과 韓方 方劑의 混合 稀釋液을 各各 250 μ l씩 加하여 培養 上清液 內 IL-4, sCD23, IL-13의 濃度を 完全 培養液인 RPMI 1640 250 μ l만을 加한 對照群과 比較 觀察하였는데 그 結果를 綜合해보면, 溫脾湯은 MCNS群에서 對照群에 비해 sCD23을 매우 有意하게 抑制하였고, 當歸芍藥散은 MCNS群에서 sCD23值와 IL-13值를 有意하게 抑制하였다. Hydrocortisone과 併用投與로 인한 相乘效果를 觀察해 본 結果, Hydrocortisone 單獨 投與時보다 溫脾湯, 當歸芍藥散과 Hydrocortisone을 併用投與한 境遇가 Hydrocortisone을 單獨으로 投與한 境遇에 비해 IL-13의 抑制가 統計적으로 매우 有意하게 增加하는 것을 볼 수 있었고, 抑制能의 增加 程度는 溫脾湯-Hydrocortisone의 境遇 약 22.6%, 當歸芍藥散-Hydrocortisone의 境遇 약 14.7% 增加된 抑制效果가 觀察되었으며, 溫脾湯이 當歸芍藥散보다 併用效果가 큰 것으로 나타났다.

本 實驗에서 溫脾湯, 當歸芍藥散과 Hydrocortisone의 併用投與가 腎症候群의 發病機轉과 關聯된 IL-13의 濃度を 顯著히 抑制시킨 點을 注視할 때, 現在의 스테로이드 療法을 改善하는 試圖로서 併用治療를 考慮해 볼 만하다. 이는 成長障礙, 骨多孔症, 感染, 糖尿病 등과 같은 深刻한 副作用을 가진 스테로이드의 副作用을 減少시키면서 IL-13의 濃度を 보다 選擇적으로 抑制시키므로 스테로이드 單獨治療보다 優秀한 治療效果를 期待할 수 있을 것으로 思慮된다. 또한, 本 實驗의 結果를 바탕으로 血清 IgE 上升과 關聯된 比較 研究 등이 必要할 것으로 생각되고, 向後 微細變化 腎症候群의 腎症期 患者를 對象으로 하는 研究과 어떤 成分이 IL-13 濃度抑制에 主調節 作用을 하는 지에 대한 追加 研究이 遂行되어야 할 것으로 思慮된다.

결론

微細變化 腎症候群 患兒의 PHA-P로 刺戟된 末梢血液 單核球 培養 上清液에서 溫脾湯과 當歸芍藥散의 免疫調

節效果를 糾明하고, 아울러 Hydrocortisone과의 併用投與에 의한 相乘效果를 觀察하기 위해서 實驗的 研究를 施行하였다. 微細變化 腎症候群 患者의 靜脈에서 血液을 採血하여, 이를 培養한 後, PHA-P로 刺戟된 培養 上清液에서 分泌되는 cytokines 중 本 疾患과의 關聯性이 알려진 IL-4, sCD23, IL-13의 濃度를 測定해 본 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 溫脾湯은 MCNS群에서 對照群에 비해 IL-4値와 IL-13値를 抑制하는 傾向을 보였으나 統計學的 有意性은 없었고, sCD23値는 對照群에 비해 매우 有意한 抑制를 하였다.
2. 當歸芍藥散은 MCNS群에서 對照群에 비해 IL-4値를 抑制하는 傾向을 보였으나 統計學的 有意性은 없었고, sCD23値와 IL-13値는 對照群에 비해 매우 有意하게 抑制하였다.
3. Hydrocortisone과 溫脾湯 및 當歸芍藥散의 併用投與로 인한 相乘效果를 觀察해 본 結果, 溫脾湯과 併用投與群, 當歸芍藥散과 併用投與群 모두 Hydrocortisone 單獨 投與時보다 正常對照群과 MCNS群의 IL-13値를 모두 매우 有意하게 抑制하였다. sCD23値와 IL-4値의 境遇, 抑制하는 傾向을 보였으나 統計學的 有意性은 없었다.
4. MCNS群에서 併用投與로 인한 IL-13 抑制效果 樣相를 보면, 抑制能의 增加程度는 Hydrocortisone 單獨 投與時보다 溫脾湯-Hydrocortisone의 境遇 약 22.6%, 當歸芍藥散-Hydrocortisone의 境遇 약 14.7% 增加된 抑制效果가 觀察되었으며, 溫脾湯이 當歸芍藥散보다 併用效果가 큰 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:東洋醫學研究院 出版部. 1993:8-9, 301, 305, 369-371, 377-378, 393-396, 842, 852, 855, 915.
2. A Report of the International Study of Kidney Disease in Children. Nephrotic syndrome in children; Prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at the time of diagnosis. *Kidney Int.* 1978;13:159-165.
3. 조병수. 미세변화신증후군의 예후 표지자에 관한 연구. *소아과학회지.* 1993;36:906-912.
4. Thomson PD, Barratt TM, Stokes CR, Turner MW. HLA antigens and atopic features in steroid-responsive nephrotic syndrome of childhood. *Lancet.* 1976;2:765-768.
5. Fodor P, Saitua MT, Rodriquez E, Gonzalez B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child.* 1982;136:713-717.
6. McEnery PT, Strife CF. Nephrotic syndrome in Childhood. Management and Treatment in Patients with Minimal Change Disease, Mesangial Proliferation, or Focal Glomerulosclerosis. *Pediatr Clin of North Am.* 1982;89(4):875-893.
7. 김정수, 하일수, 정해일, 최용. 소아의 스테로이드 저항성 신증후군의 임상병리학적 고찰. *소아과학회지.* 1996;39(12):1729-1735.
8. Myers BD, Sibley R, Newtom L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, Leutscher Ja, Whitney DJ, Cplon NS, Perlroth MG. The longterm course of cyclosporin-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* 1988;33:590-600.
9. 張大寧. 實用中醫腎病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1990:96, 253, 344, 346.
10. 金鍾大, 安世永, 杜鎬京. 加減胃 湯苓 및 壯元湯이 Puromycin Aminonucleoside로 誘發된 白鼠의 腎症에 미치는 影響. *慶熙韓醫大論文集.* 1998;21(1):269-296.
11. 安永敏, 安世永, 杜鎬京. 六味地黃湯 및 四物湯이 Puromycin Aminonucleoside로 誘發된 白鼠의 腎症에 미치는 組織學的 所見. *慶熙韓醫大論文集.* 1996;19(1):198-211.
12. 洪宗秀. 桂枝茯苓丸合五苓散 및 葶藶分清飲이 Puromycin Aminonucleoside로 誘發된 白鼠의 腎症에 미치는 影響. *慶熙大學校大學院 博士學位論文.* 1999.
13. 두호경, 조병수. 스테로이드의존성 빈회재발형 신증후군의 치료에 있어서 한방제제인 시령당과 서양약물인 스테로이드의 병용효과에 대한 연구. *경희의학.* 1996;12(2):180-185.
14. 孫思邈. 千金翼方. 台北:集文書局. 中華民國十六年四月:238.
15. 張仲景. 仲景全書 金匱要略方論(卷下). 서울:大星文化社. 1984:卷下 403, 428.
16. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: A disorder of T-cell function. *Lancet II.* 1974; 556-560.
17. 張介賓. 景岳全書. 서울:여강출판사. 1987:上卷 39, 下卷 467, 469.
18. 洪元植 編. 精校 黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1981:31, 49, 127.
19. 朴贊國. 臟象學. 서울:成輔社. 1992:67, 81-82.
20. 李國賢, 鄒毅, 李晴, 李冰芳. 164例腎炎患者血液流變學指標及其與血瘀證的關係. *中國中西醫結合雜誌.* 1993; 13:528-530.
21. 安世永. 東醫臨床內科學(II). 서울:法仁文化社. 1999:416, 419, 425, 428, 433.
22. 服部 智久, 進藤省一郎, 藤塚 直樹, 目比野智子, 寺園 芳樹, 佐藤 俊次, 丸野 政雄. ラット抗GBM 腎炎に對する溫脾湯の效果. *和漢醫學雜誌.* 1995;12:71-76.
23. Hattori T, Fujitsuka N, Kurogi A, Shindo S. Effect of Onpi-to on TGF-beta 1 in rats with 5/6 nephrectomized

- chronic renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1996; 38(11):475-483.
24. 曹基湖 辛吉祚 共譯. 서양의학자의 한방진료학. 서울:集文堂. 1998:304-305.
 25. 菊谷 豊彦. 保険適用製劑による 腎炎ネフロゼの漢方治療. *現代東洋醫學*. 1986;7(2):43-45.
 26. Schnaper HW. The immunity in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1989;3:101-11.
 27. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profile in childhood nephrotic syndrome: Evidence for increased IL-13 mRNA Expression in Relapse. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:529-537.
 28. 김수연, 윤석란, 이충은, 정태화, 변광호. B림파구의 CD23발현의 조절에 의한 새로운 Interleukin4 Bioassay. *대한면역학회지*. 1990;12:31-40.
 29. Ishizaka A, Sakiyama Y, Nakanishi M, Tomizawa K, Osrik E, Kojima K, Taguchi Y. The inductive effect of IL-4 on IgG4 and IgE synthesis in human PBL. *Clin Exp Immunol*. 1990;79:392-396.
 30. Rothman P, Lutzker S, Cook W, Coffman R, Alt FW. Mitogen plus interleukin-4 induction of C ϵ transcripts in B lymphocyte cells. *J Exp Med*. 1988;168:2385-2389.
 31. Verceli D, Lutzker S, Cook W, Coffman R, Ali FW. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J Exp Med*. 1989;169:1295-1307.
 32. Cho B-S, Lee C-E, Pyun K-H. Elevation of interleukin-4 activities and mRNA expression in childhood minimal change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 1991;2:590.
 33. Neuhauser TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma(IFN- γ) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1995;100:475-479.
 34. 장미영, 이재호. 신증후군에서 혈청 Cytokines에 관한 연구. *소아과학회지*. 1997;40(12):1701-1706.
 35. Ogawa S, Dohi K, Yamada H, Hirayama T, Morita H, Iwano M, Ishikawa H. Expression of Fc ϵ R2 in minimal change nephrotic syndrome. *Jap J Nephrol*. 1991;33:349-355.
 36. Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P. Interleukin 13 is a B cell stimulating Factor. *J Exp Med*. 1994;179:135-143.
 37. De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, De Vries JE. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocyte. *J Immunol*. 1993;151:6370-6381.
 38. Kimata H, Fugimoto M, Furusho K. Involvement of interleukin(IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. *Eur J Immunol*. 1995;25:1497-1501.
 39. Yoshizawa N, Kusumi Y, Matsumoto K, Oshima S, Takeuchi A, Kawamura O, Kubota T, Kondo S, Niwa H. Studies of glomerular permeability factor in patients with minimal change nephrotic syndrome. *Nephron*. 1989;370-376.