

少陽人 忍冬藤地骨皮湯이 中消合併症에 미치는 影響

서용배* · 송정모*

Effects of Soyangin Indongdeungjickolpitang on the Complication of Diabetes

Seo Yong-bae · Song Jeong-mo

Dept. of Oriental medicine, Graduate School of Woo Suk University

The purpose of this research was to investigate the effects of Indongdeungjickolpitang water extract(IJTE) on the complication of diabetes. IJTE did not affect the level of blood glucose in alloxan- or streptozotocin-induced hyperglycemic mice, but inhibited the motility of gastrointestinal. IJTE inhibited the writhing syndrome induced by acetic acid, the permeability of evans blue into peritoneal cavity induced by acetic acid, the paw edema induced by histamine, and the formation of cotton pellet granuloma. IJTE increased the cell viability of thymocytes and splenocytes. IJTE decreased the release of γ -interferone(γ -IFN) and interleukin-2(IL-2), but did not affect the release of interleukin-4(IL-4) from murine thymocytes. IJTE increased the release of IL-4 and decreased the release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), but did not affect of γ -IFN and IL-2 from murine splenocytes. IJTE decreased the release of TNF- α and IL-1 β from murine peritoneal macrophages. IJTE decreased the production of nitric oxide(NO) from murine peritoneal macrophages and increased the phagocytic activity of murine peritoneal macrophages. These results suggest that IJTE has an anti-inflammatory action via the inhibition of TNF- α , IL-1 β and NO production from immune cells.

초 록

少陽人 忍冬藤地骨皮湯이 中消 合併症에 미치는 影響을 살펴보고자 하였고 結果는 다음과 같다.

1. 腸管運動을 抑制하였다.
2. Acetic acid에 의한 writhing syndrome을 抑制하였다.
3. Evans blue에 의한 毛細血管透過性을 抑制하였다.
4. Histamine에 의한 急性足浮腫을 抑制하였다.

* 우석대학교 한의과대학 사상체질의학교실
교신저자 : 서용배 주소) 전북 전주시 완산구 다가동 1가 76-3 연수당한의원 Tel) 063-283-6636

5. Cotton pellet에 의한 肉芽腫 形成을 抑制하였다.
6. 胸線細胞 및 脾臟細胞의 細胞生存率을 增加시켰다.
7. 胸線細胞로부터 γ -IFN 및 IL-2의 分泌를 抑制하였다.
8. 脾臟細胞로부터 IL-4의 分泌는 增加시켰으나, TNF- α 및 IL-1 β 의 分泌는 抑制하였다.
9. 腹腔 大食細胞로부터 TNF- α , IL-1 β 및 nitric oxide의 分泌를 抑制하였다.
10. 腹腔 大食細胞의 lucigenin chemiluminescence 및 FITC-conjugated E. coli engulfment를 促進하였다.

이상의 實驗 結果 IJTE는 腸管運動을 抑制하였으며, 鎮痛 및 抗炎作用을 나타냈고, 이들 작용은 免疫細胞로부터 TNF- α , IL-1 β 및 nitric oxide의 生成을 抑制하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 이러한 機轉에 의하여 忍冬藤地骨皮湯은 中消 合併症의 하나인 炎症을 抑制하는 데 有效한 것으로 思料된다.

I. 緒論

忍冬藤地骨皮湯은 李濟馬¹⁾의 『東醫壽世保元』 중 「少陽人 胃受熱裏熱病論」에 수록된 新定 處方으로, 少陽人의 消渴 중에서 中消에 사용하는 것으로 되어 있다.

消渴은 糖尿病을 포괄하는 넓은 의미의 病證으로, 역대의 醫家들에 의하여 三消로 區分되었다^{2,13)}. 李¹⁾는 少陽人 消渴은 마음이 寬遠闊達하지 못하고 陋固膠小하기 때문에 온다고 하여 그 원인을 性情의 偏急 현상에서 찾고 있으며, 上消에는 涼膈散火湯, 中消에는 忍冬藤地骨皮湯, 下消에는 熟地黃苦蔘湯을 治方으로 제시하였다.

中消는 '消穀善飢, 飲食倍常' 혹은 '善食而瘦' 등을 主症으로 하는 당뇨병의 한 유형이라 할 수 있는데^{2,11)}, 李¹⁾는 합병증으로 癰疽, 腦疽疔瘡, 中滿鼓脹이나 失明등의 眼病이 발생한다고 하고, 여기에 危亦林¹¹⁾의 '忍冬藤을 多用한다'는 내용을 예로 들어 말함으로써 忍冬藤地骨皮湯의 처방목적이 단순히 消渴을 치료하는데만 있는 것이 아니고 消渴로 인한 합병증을 다스리고자 하는 데에도 목적이 있음을 시사하고 있다.

忍冬藤地骨皮湯에 대한 실험적 연구로, 崔¹²⁾는 alloxan 투여 高血糖 白鼠에 대하여 少陽人 消渴에 사용하는 涼膈散火湯, 忍冬藤地骨皮湯, 熟地黃苦蔘湯이 高血糖의 개선에 유효한 작용을 하고 있으며, 특히 忍冬藤地骨皮湯은 糖尿에 수반되는 高脂血症을 개선시키는데 유효하다고 하였다. 또한 高¹³⁾는 streptozotocin을 투여한 高血糖 白鼠를 대상으로 한

實驗에서 忍冬藤地骨皮湯의 血糖降下機能을 입증할 수 있었다고 하였다.

著者は 이와는 다른 관점에서 忍冬藤地骨皮湯이 消渴의 합병증으로 나타나는 癰疽등의 병증에 어떠한 작용을 미칠 것인지 살펴볼 필요가 있을 것으로 생각하여 鎮痛效果와 消炎作用, 그리고 免疫作用 등을 중심으로 忍冬藤地骨皮湯이 中消의 合併症에 미치는 影響을 살펴보고자 하였다.

진통작용을 알아보기 위해 acetic acid에 의한 writhing syndrome 回數 측정을, 소염작용을 관찰하기 위해 毛細血管透過性, 急性足浮腫 및 肉芽腫形成에 관한 실험을 실시하였고, 면역작용을 관찰하기 위해 胸線細胞, 脾臟細胞 및 腹腔 大食細胞의 증식, cytokine의 분비 및 貪食能에 대한 실험을 실시하였다. 그리고 血糖에 미치는 영향을 알아보기 위하여 streptozotocin 및 alloxan에 의한 高血糖 유발 후 血糖降下作用을 측정하였고, 活性炭의 腸內 이동거리를 측정하여 腸管運動의 억제효과를 살펴 보았다.

著者は 이와 같은 실험을 통하여 少陽人 忍冬藤地骨皮湯의 中消 合併症에 미치는 影響을 살펴 본바 有意한 결과가 있어 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용한 생쥐는 면역세포 실험시에는 6~8 주령 BALB/c계 수컷을, 기타 실험에서는 20± 2g ICR계 수컷을 사용하였으며, 흰쥐는 150~180g

SD계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 22 ±2℃, 습도 55±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였다.

2) 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), lipopolysaccharide(LPS), lucigenin, 3-[4-5-dimethyl-thiazol-2yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), γ -interferon(γ -IFN), zymosan, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl은 Sigma Co.에서, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin 은 Gibco Co.에서, mouse γ -interferon(γ -IFN) immunoassay kit, mouse interleukin-2(IL-2) immunoassay kit, mouse interleukin-4(IL-4) immunoassay kit, mouse tumor necrosis factor- α (TNF- α) immunoassay kit, interleukin-1 β (IL-1 β) immunoassay kit는 R&D Co.에서, FITC-conjugated E. coli K-12 bio-particles는 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask(Nunc), multi-well plate(96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO2 incubator (Vision scientific Co.), micrometer(Mitutoyo Co.), blood glucose test meter(super glucocardTM II, Arkray Co.), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), luminometer(Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

본 실험에 사용한 忍冬藤地骨皮湯의 처방 구성은 『東醫壽世保元』¹¹⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 又石大學校附屬 韓方病院에서 정선된 재료를 구입하여 사용하였다.

처방 3첩 분량을 증류수 1,500ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 45g을 얻어(수득율 18.1%, 以下 IJTE라 함) 동물실험시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

Prescription of Indongdeungjokolpitang

韓藥名	生藥名	重量(g)
忍冬藤	<i>Lonicerae Folium</i>	15
山茱萸	<i>Cassiae Cortex</i>	7.5
地骨皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	7.5
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3.75
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	3.75
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	3.75
苦參	<i>Sophorae Radix</i>	3.75
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Crudus</i>	3.75
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	3.75
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	3.75
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	3.75
覆盆子	<i>Rubi Fructus</i>	3.75
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	3.75
防風	<i>Saposhnikovia Radix</i>	3.75
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	3.75
Total amount		75

2) 혈당 실험

(1) Streptozotocin에 의한 혈당 강하 실험

생쥐를 24시간 절식시킨 후 streptozotocin(STZ) 45 mg/kg을 citrate buffer solution(pH 4.5)에 용해시켜 꼬리정맥에 주사하였으며, 사료는 STZ 투여 후부터 공급하였다. 24시간 후에 혈당을 측정하여 수치가 300mg/dl 이상인 생쥐 10마리를 1군으로 하여 실험에 사용하였다^{14,17)}. 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500mg/kg을 1일 1회씩 정해진 시간에 경구투여 하였고, 약물 투여 다음날부터 7일간 매일 약물을 투여하기 전에 혈당을 혈당측정기로 측정하였다.

(2) Alloxan에 의한 혈당 강하 실험

생쥐를 24시간 절식시킨 후 alloxan 75mg/kg을 꼬리정맥에 주사한 다음, 48시간 후에 꼬리에서 채혈하였다. 혈당을 측정하여 수치가 300mg/ml 이상인 생쥐 10마리를 1군으로 하여 실험에 사용하였다.¹⁸⁾ 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500 mg/kg을 1일 1회씩 정해진 시간에 경구투여 하였고,

약물 투여 다음날부터 7일간 매일 약물을 투여하기 전에 혈당을 혈당측정기로 측정하였다.

(3) 당부하 실험

생쥐 1군을 10마리로 하여 24시간 절식시킨 후 IJTE 500mg/kg을 1회 경구투여하고 1시간 후에 dextrose 2g/kg을 경구 투여한 다음, 30, 60, 120 및 180 분에 혈당을 측정하였으며, 대조군에는 생리식염수만을 투여하여 혈당을 혈당측정기로 측정하였다.

(4) 장관운동 실험

생쥐 1군을 10마리로 하여 24시간 절식시킨 후 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500 mg/kg을, 실험대조군에는 atropine sulfate 10mg/kg을 1회 경구투여하고 10분 후에 활성탄을 0.5% methyl cellulose에 현탁시켜 10% 현탁액을 만들어 경구투여한 후 10분 후 경추탈골 하여 치사시킨 다음, 장 전체의 길이에 대한 활성탄의 이동 거리를 측정하여 억제효과를 평가하였다.¹⁹⁾

3) 진통작용 실험

생쥐 8마리를 1군으로 하여 acetic acid에 의한 writhing syndrome을 Whittle²⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500mg/kg을, 실험대조군에는 aminopyrine 100mg/kg을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 0.7% acetic acid 10ml/kg을 복강내에 주사한 다음 10분 후부터 10분간의 writhing syndrome의 횡수를 측정하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{대조군의 writhing syndrome 횡수} - \text{실험군의 writhing syndrome 횡수}}{\text{대조군의 writhing syndrome 횡수}} \times 100$$

4) 소염작용 실험

(1) 모세혈관투과성 실험

생쥐 8마리를 1군으로 하여 evans blue에 의한 모세혈관투과성을 Shimomura²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500mg/kg을, 실험대조군에는 sodium salicylate 300 mg/kg을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 1% evans

blue 5ml/kg을 꼬리정맥에 주사하였다. 주사 후 즉시 0.6% acetic acid 10ml/kg을 복강내에 주사하고, 1시간 후에 복강액을 생리식염수 5ml로 세척하여 회수한 다음, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 620nm에서 흡광도를 측정한 다음 미리 작성한 검량선에 의해 유출된 evans blue의 양을 비색정량하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{대조군의 evans blue 유출량} - \text{실험군의 evans blue 유출량}}{\text{대조군의 evans blue 유출량}} \times 100$$

(2) 급성 足浮腫 실험

생쥐 8마리를 1군으로 하여 histamine에 의한 급성 足浮腫을 허 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500 mg/kg을 경구투여하고, 1시간 후에 좌측 足에 기염물질로 histamine-0.9% saline(30 μg/20 μl)을 足蹠 피하에 20 μl/hind paw를 주사하였다. 주사 직전, 직후 15분, 30분, 60분, 120분, 180분에 足 두께를 micro-meter로 측정하였다.

(3) 육아종형성 실험

흰쥐 5마리를 1군으로 하여 육아종형성을 Hara²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. Pentobarbital 30mg/kg을 복강주사하여 흰쥐를 마취시킨, 등부위 정중선을 따라 털을 제거하고 피부를 절개하여, 양측 견갑부 피하에 미리 중량을 측정(약 35-40mg)한 멸균 cotton pellet 2개를 삽입하고 봉합한 다음, 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 IJTE 500mg/kg을, 실험대조군에는 phenylbutazone 40mg/kg을 1일 1회씩 5일간 각각 경구투여하였다. 6일째 흰쥐를 마취하여 cotton pellet 주위에 증식한 육아조직을 조심스럽게 분리한 후 60℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 중량을 측정하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{대조군의 육아종 중량} - \text{실험군의 육아종 중량}}{\text{대조군의 육아종 중량}} \times 100$$

5) 면역 실험

(1) 세포 분리 및 배양 실험

생쥐의 흉선세포 및 비장세포 분리는 Wysocki²⁵⁾ 및 Mizel 등²⁶⁾의 방법을 이용하였다. 생쥐 5마리를 1군으로 하여 IJTE 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 8일째 생쥐를 경추탈골하여 치사시켰다. 적출한 흉선 및 비장을 Dulbecco's phosphate buffered saline A(DPBS-A)를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500rpm에서 10분간 원심분리), 흉선세포 및 비장세포 부유액으로 하였다.

대식세포의 분리는 IJTE 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 치사시킨 다음, 복강에 cold PBS 10ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4℃에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 1640 배지로 2회 세척 후, 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 대식세포를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 흉선세포, 비장세포 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

(2) 세포증식능 측정 실험

동일한 방법으로 분리한 흉선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 IJTE의 영향은 MTT법^{27, 28)}으로 측정하였다. 96-well plate의 각 well에 분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하여, 1.2x10⁶ cells/ml 농도로 분주하고 흉선세포에는 concanavalin A(Con A) 5 µg/ml를 첨가하고, 비장세포에는 lipopolysaccharide(LPS) 10 µg/ml를 첨가한 후, 37℃의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하되, 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후, 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570nm에서 측정하여, 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도

를 백분율로 환산하여 세포생존율을 측정하였다.

(3) 세포활성물질 측정 실험

동일한 방법으로 분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 2x10⁷ cells/ml로, 복강 대식세포는 1x10⁷ cells/ml로 조제하여, 96 well plate에 200 µl씩 분주한 후, 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500 rpm, 5분, 4℃)한 다음, 상등액 50 µl를 취하여 흉선세포에서 분비되는 γ -IFN, IL-2 및 IL-4의 양을, 비장세포에서 분비되는 γ -IFN, IL-2, IL-4, TNF- α 및 IL-1 β 양을, 대식세포로부터 분비되는 TNF- α 및 IL-1 β 양을 각각의 mouse immunoassay kit를 이용하여 측정하였다. 즉 상등액 50 µl에 assay diluent 50 µl를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugate concentrate 100 µl를 가하여 실온에서 2시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 µl를 혼합하여 30분 동안 실온에서 incubation한다. Stop solution 100 µl를 가하여 450nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

(4) Nitric oxide 측정 실험

동일한 방법으로 분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2x10⁶ cells을 분주한 후, 대식세포로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess법²⁹⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24시간 배양한 후, 배양액 100 µl와 Griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37℃에서 10분간 방치한 후 570nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂⁻의 농도를 환산하였다.

(5) Lucigenin chemiluminescence 측정 실험

동일한 방법으로 분리한 대식세포를 2x10⁶ cells/ml가 되도록 DME(without phenol red, 0.34g/L NaHCO₃, 2.6g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10ml의 DPBS-A에 용해

한 후, 여과 멸균하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37℃에서 측정하였다.^{30, 31)} 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 대식세포 세포부유액 50μl와 lucigenin 용액 50μl를 넣고 37℃에서 15분간 전처리한 후, 5분 간격으로 60분 동안 chemiluminescence를 측정하였다.

(6) E. coli engulfment 측정 실험

복강 대식세포의 식작용을 확인하기 위하여 FITC-conjugated E. coli particles를 Hanks' balanced salts solution(HBSS)에 현탁시켜 sonification 한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250 μg/ml 농도로 용해하여 사용하였다.³²⁾ 분리한 대식세포를 RPMI 1640 배지로 5x10⁵ cells/ml되도록 조정한 후, 100 μl를 96well에 분주하고 1시간 동안 CO2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, sample 10 μg/ml 및 E. coli 현탁액 25 μl 가하여 1시간 동안 배양한 다음, 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μl를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.³³⁾

6) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 student t-test를 실시하여 P<0.05를 기준으로 하여 유의성 여부를 판정하였다.

III. 실험 결과

1. Streptozotocin에 의한 혈당 강하 효과

정상군의 혈당치는 98.5±3.7mg/dl 이었으며, STZ를 투여한 대조군의 혈당치는 STZ 투여 24시간후에 416.3±11.9mg/dl로 증가하였고, 7일까지 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, IJTE 투여군은 대조군과 별 차이가 없거나 오히려 증가하는 현상을 나타내었다(Table I).

Table I. Effect of Indongdeungjokolpitang water extract(IJTE) on blood glucose in streptozotocin-induced diabetes mice

Group	Blood sugar level(mg/dl)						
	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Normal	98.5 ±3.7	90.3 ±4.2	91.7 ±5.8	97.2 ±3.5	98.1 ±2.9	96.5 ±4.1	95.5 ±3.3
Control	416.3 ±11.9	381 ±19.1	377.5 ±19.3	354.8 ±17.3	343.8 ±21.9	346.2 ±31.7	358.8 ±38.6
IJTE	420.6 ±18.5	402.3 ±19.2	388.2 ±16.8	413.6 ±24.7	408.3 ±34.9	411.6 ±18.5	407.6 ±23.7

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days and streptozotocin(45 mg/kg) was injected i.v. at the 1st day. The data represents the mean±SE of 10 mice.

2. Alloxan에 의한 혈당 강하 효과

정상군의 혈당치는 105.5±4.7mg/dl 이었으며, alloxan를 투여한 대조군의 혈당치는 alloxan 투여 48시간 후에 316.3±13.2mg/dl로 증가하였고, 7일까지 약간 감소하는 경향을 나타내었으며, IJTE 투여군은 대조군과 별 차이가 없거나 오히려 증가하는 현상을 나타내었다(Table II).

Table II. Effect of IJTE on blood glucose in alloxan-induced diabetes mice

Group	Blood sugar level(mg/dl)					
	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day
Normal	105.5 ±4.7	100.3 ±4.2	99.7 ±4.8	112.2 ±3.5	115.1 ±4.9	108.5 ±3.1
Control	316.3 ±13.2	321.2 ±15.1	327.5 ±18.2	312.4 ±15.8	305.8 ±11.3	290.2 ±18.7
IJTE	320.3 ±15.3	342.3 ±16.7	368.1 ±15.9	358.9 ±21.4	333.3 ±14.5	331.6 ±16.4

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days and alloxan(75 mg/kg) was injected i.v. at the 1st day. The data represents the mean±SE of 10 mice.

3. 당부아 억제 효과

24 시간 절식시킨 정상군의 혈당치는 52.2±2.5 mg/dl이었으며, dextrose를 투여한 대조군의 혈당치는 dextrose 투여 30분 후에 161.2±18.2mg/dl로 증가하였고, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 3시간 후

에는 거의 정상치로 회복되었다. IJTE 투여군은 대조군과 별 차이가 없었다(Table III).

Table III. Effect of IJTE on blood glucose in dextrose-administered mice

Group	Blood sugar level(mg/dl)				
	0	30	60	120	180 min.
Control	52.2 ±2.5	161.2 ±18.2	115.4 ±7.2	69.2 ±3.2	56.0 ±3.3
IJTE	320.3 ±15.3	150.8 ±11.0	110.6 ±7.8	68.8 ±6.0	60.2 ±5.1

Dextrose(2 g/mouse) was administered p.o. 1 hour after IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. The data represents the mean±SE of 10 mice.

4. 장관 운동 억제 효과

대조군의 장관 운동 거리를 100%로 하였을 때, IJTE 투여군은 72.7±2.3% 이었으며, 실험대조군인 atropine sulfate 투여군은 59.7±4.6%로 대조군에 비해 감소하였다(Table IV).

Table IV. Effect of IJTE on gastrointestinal motility

Group	Dose (mg/kg)	Movement of active carbon(%)
Control	-	100.0±3.5
IJTE	500	72.7±2.3*
Atropine sulfate	10	59.7±4.6*

Active carbon was administered p.o. 30 min. after IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. The data represents the mean±SE of 10 mice. *; Significantly different from control group(p<0.01).

5. 진통 효과

10분간의 writhing syndrome 횟수는 대조군 24.5±1.8회이었으며, IJTE 투여군은 8.8±1.5회로, 실험대조군인 aminopyrine 투여군은 12.0±2.1회로 대조군에 비해 모두 유의성 있는 억제효과가 있었다. 진통 작용은 IJTE 64.1%로 aminopyrine 51.0%에 비해 강력하였다(Table V).

Table V. Effect of IJTE and aminopyrine on writhing syndrome induced by acetic acid in mice

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of writhing syndrome	Inhibition(%)
Control	-	24.5±1.8	-
IJTE	500	8.8±1.5*	64.1
Aminopyrine	100	12.0±2.1*	51.0

IJTE was administered p.o. and the number of writhingsyndrome induced by 0.7% acetic acid was determined for 10 min. The data represents the mean±SE of 8 mice. *; Significantly different from control group(p<0.001).

6. 모세혈관투과성 억제 효과

대조군의 evans blue 유출량은 12.5±0.5 µg/ml 이었으며, IJTE 투여군은 5.6±0.6 µg/ml로 실험대조군인 sodium salicylate 투여군은 4.4±0.5 µg/ml로 모두 대조군에 비해 유의성 있는 억제효과가 있었다. 모세혈관투과성 억제율은 sodium salicylate가 64.8%로 IJTE 55.2%에 비해 강력하였다(Table VI).

Table VI. Effect of IJTE and sodium salicylate on the permeability of evans blue into peritoneal cavity induced by acetic acid in mice

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	Leakage of evans blue(µg/ml)	Inhibition(%)
Control	-	12.5±0.5	-
IJTE	500	5.6±0.6*	55.2
Sod. salicylate	300	4.4±0.5*	64.8

IJTE was administered p.o. and the permeability of evans blue induced by 0.6% acetic acid was determined. The data represents the mean±SE of 8 mice. *; Significantly different from control group(p<0.001).

7. 급성 足浮腫 억제 효과

대조군의 족 부종율은 histamine 투여 30분 후에 39.0%로 가장 강력하였으며, IJTE 투여군은 대조군에 비해 15분 및 30분에 대조군에 비해 감소되었다(Table VII).

Table VII. Anti-inflammatory activity of IJTE on histamine-induced edema in mice paw

Group	Time(minutes)					
	0	15	30	60	120	180
Control	1.59 ±0.02	2.15 ±0.03 (35.2)	2.21 ±0.03 (39.0)	2.05 ±0.02 (28.9)	1.89 ±0.04 (18.9)	1.73 ±0.03 (8.8)
IJTE	1.59 ±0.02	2.03 ±0.02* (27.7)	2.05 ±0.03** (28.9)	1.99 ±0.03 (25.2)	1.83 ±0.03 (15.1)	1.69 ±0.02 (6.3)

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. and the thickness of hind paw edema induced by histamine(30 μg/μl) was determined with micrometer. The data represents the mean ±SE of 8 mice. *, Significantly different from control group(*; p<0.05, **; p<0.01).

8. 육아종형성 효과

육아종의 증량은 대조군 36.4±1.5mg 이었으며, IJTE 투여군은 28.7±1.8mg으로, 실험대조군인 phenylbutazone 투여군은 23.8±1.1mg으로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 육아종형성 억제율은 phenylbutazone이 34.6%로 IJTE 21.2%에 비해 강력하였다(Table VIII).

Table VIII. Effect of IJTE and phenylbutazone on the formation of cotton pellet granuloma in rats

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	Granuloma weight(mg)	Inhibition(%)
Control	-	36.4±1.5	-
IJTE	500	28.7±1.8*	21.2
Phenylbutazone	40	23.8±1.1**	34.6

IJTE was administered p.o. once a day for 5 days and the formation of cotton pellet granuloma was determined. The data represents the mean ±SE of 5 rats. *, Significantly different from control group(*; p<0.05, **; p<0.01).

9. 흉선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 효과

흉선세포에 concanavalin A(Con A)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, IJTE 투여군은 118.4±1.4%로 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, Con A를 처리하지 않았을 때 대조군의 세포생존율은 53.6±1.3%이었으며, IJTE 투여군은 68.7±0.5%로 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다. 대조군의 비장세포에 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때,

IJTE 투여군은 121.9±1.2%로 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, LPS를 처리하지 않았을 때 대조군의 세포생존율은 59.4±0.9%이었으며, IJTE 투여군은 74.5±1.3%로 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였다(Table IX).

Table IX. Effect of IJTE on the cell viability of murine thymocytes and splenocytes

Group	Thymocytes(%)		Splenocytes(%)	
	Con A(+)	Con A(-)	LPS(+)	LPS(-)
Control	100.0±1.1	53.6±1.3	100.0±1.2	59.4±0.9
IJTE	118.4±1.4*	68.7±0.5*	121.9±1.2*	74.5±1.3*

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and thymus or spleen was separated. Thymocytes or splenocytes(1.2x10⁶ cells/ml) were cultured for 48 hours in CO₂-incubator. The cell viability was determined by MTT method. The data represents the mean ±SE of 5 mice. *, Significantly different from control group (p<0.001). Con A(+); Concanavalin A treated group, Con A(-); Concanavalin A non-treated group, LPS(+); Lipopolysaccharide treated group, LPS(-); Lipopoly- saccharide non-treated group.

10. 흉선세포, 비장세포 및 복강 대식세포로부터 세포활성물질 분비에 미치는 효과

흉선세포에서 분비되는 γ-IFN의 양을 측정한 결과, 대조군은 121.5±1.3pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 37.9±1.5pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다. IL-2의 양을 측정한 결과, 대조군은 173.0±8.7pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 61.1±4.9pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다. IL-4의 양을 측정한 결과, 대조군은 45.2±1.6pg/ml이었으며, MMC 투여군은 45.5±2.1pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다(Table X).

비장세포에서 분비되는 γ-IFN의 양을 측정한 결과, 대조군은 258.2±5.1pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 265.8±4.7pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. IL-2의 양을 측정한 결과, 대조군은 253.4±5.4pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 252.2±5.1pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. IL-4의 양을 측정한 결과, 대조군은 106.7±3.4pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 219.3±4.8pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. TNF-α의 양을 측정한 결과, 대조군은 439.5±10.5pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 202.3±6.5pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다. IL-1β의 양을 측정한 결과, 대조군은 164.3±6.1pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 77.5±3.8pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다(Table XI).

복강 대식세포에서 분비되는 TNF- α 의 양을 측정 한 결과, 대조군은 247.0 \pm 1.5pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 154.3 \pm 8.2pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다.

IL-1 β 의 양을 측정한 결과, 대조군은 329.7 \pm 3.3 pg/ml이었으며, IJTE 투여군은 166.0 \pm 6.3pg/ml로 대조군에 비해 감소하였다(Table XII).

Table X. Effect of IJTE on the production of cytokines in murine thymocytes

Group	γ -INF (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
Control	121.5 \pm 1.3	173.0 \pm 8.7	45.2 \pm 1.6
IJTE	37.9 \pm 1.5*	61.1 \pm 4.9*	45.5 \pm 2.1

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and thymus was separated. Thymocytes(2x10⁷ cells/ml) were cultured for 72 hours in CO₂-incubator. The cytokine were determined at 450 nm with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group(p<0.001).

Table XI. Effect of IJTE on the production of cytokines in murine splenocytes

Group	γ -INF (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
Control	258.2 \pm 5.1	253.4 \pm 5.4	106.7 \pm 3.4	439.5 \pm 10.5	164.3 \pm 6.1
IJTE	265.8 \pm 4.7	252.2 \pm 5.1	219.3 \pm 4.8*	202.3 \pm 6.5*	77.5 \pm 3.8*

IJTE(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and spleen was separated. Splenocytes(2x10⁷ cells/ml) were cultured for 72 hours in CO₂-incubator. The cytokine were determined at 450 nm with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group(p<0.001).

Table XII. Effect of IJTE on the production of cytokines in murine peritoneal macrophages

Group	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
Control	247.0 \pm 1.5	329.7 \pm 3.3
IJTE	154.3 \pm 8.2*	166.0 \pm 6.3*

IJTE(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 2hours adherence period were cultured for 24hours in CO₂-incubator. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (p<0.001).

11. 복강 대식세포로부터 nitric oxide 분비에 미치는 효과

복강 대식세포로부터 분비되는 nitric oxide(NO)의

양을 측정 결과, 대조군은 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때는 1.9 \pm 0.2 μ M 이었으나, LPS와 γ -IFN를 처리하였을 때는 12.9 \pm 0.8 μ M로 증가하였으며, IJTE 투여군은 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 1.1 \pm 0.1 μ M로, LPS와 γ -IFN를 처리하였을 때 9.5 \pm 0.4 μ M로 대조군에 비해 감소하였다(Table XIII).

Table XIII. Effect of IJTE on the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophage

Samples	NO(μ M)	
	Non-treated γ -IFN and LPS	Treated γ -IFN and LPS
Control	1.9 \pm 0.2	12.9 \pm 0.8
PMT	1.1 \pm 0.1*	9.5 \pm 0.4*

IJTE(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 2 hours adherence period were cultured for 24 hours in CO₂-incubator. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (p<0.05).

12. Lucigenin chemiluminescence에 미치는 효과

IJTE를 투여하고 분리한 복강 대식세포에서 대조군에 비해 lucigenin chemiluminescence가 현저히 증가하였다(Fig.1). 이는 IJTE가 복강 대식세포의 탐식능을 증가시킴을 의미한다.

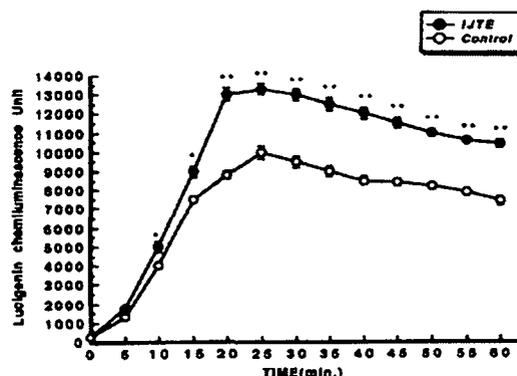


Fig.1. Effect of IJTE on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophage. IJTE(500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2hours adherence period were cultured in RPMI 1640 media mixed with opsonized zymosan. The lucigenin chemiluminescence was measured for 60min. with luminometer. Other procedures were described as detailed materials and method section. Each bar represents the mean \pm SE of 5mice. *; Significantly different from control group(*; p<0.01, **; p<0.001).

13. E. coli engulfment에 미치는 효과

복강 대식세포의 탐식능을 확인하기 위하여 FITC-conjugated E. coli particles를 이용하여 현미경으로 복강 대식세포에 uptake되는 형광 particles를 관찰한 결과, IJTE를 투여한 생쥐의 복강 대식세포에서 형광이 현저히 증가됨을 확인하였다(Fig.2).

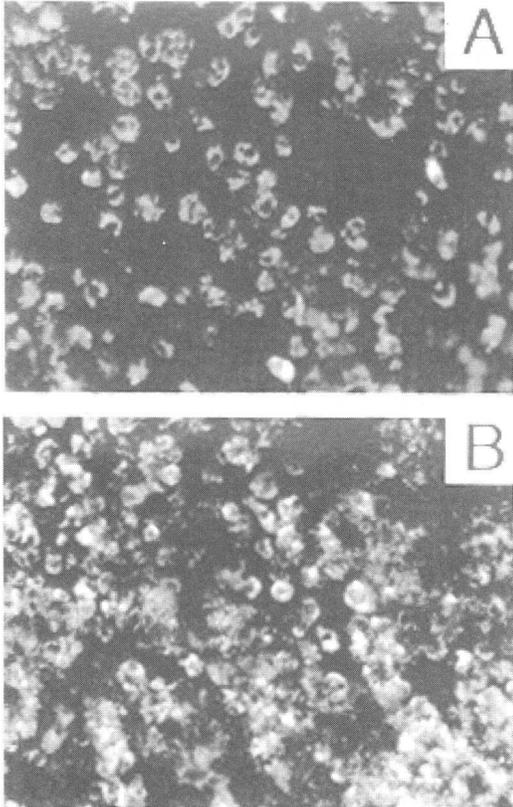


Fig.2. Photomicrographs of the engulfment of fluorescein- conjugated E. coli particles in murine peritoneal macrophages administered with IJTE. Photographs(taken at 200X magnification) showing the uptake of fluorescein-conjugated E. coli particles in control (A) and the macrophages administered with IJTE (500mg/kg) (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

IV. 考 察

忍冬藤地骨皮湯은 既存處方에 根據하지 않은 李濟馬의 獨創의인 處方으로 『東醫壽世保元』¹⁾의 「新定 少陽人病 應用要藥 十七方」 중의 하나이며 少陽人 消渴 중 中消에 적용되는 처방이다. 忍冬藤과 地骨皮라는 두가지 藥 이름으로 處方名을 삼은 것은

이 두 가지 藥의 특성이 이 處方의 성질을 대변하는 것으로 볼 수 있다.

『東醫壽世保元』¹⁾ 「少陽人 胃受熱裏熱病論」에 危亦林¹¹⁾이 말한 “消渴은 반드시 癰疽가 생기는 것을 방지하여야 하는데, 忍冬藤을 量에 구애받지 않고 根莖花葉을 많이 써서 좋다”고 한 내용을 인용한 것으로 보아 主藥으로 선택한 忍冬藤은 李濟馬가 中消의 合併症인 癰疽등을 治療 豫防하는데 사용할 목적으로 선택하였을 것으로 짐작된다. 地骨皮는 『東武遺稿』³⁴⁾에 ‘開腎之胃氣而消食進食’하는 것으로 언급되었고, 瀉腎火하며 清虛熱하는 효과³⁵⁾를 가지는 藥材이다.

忍冬藤地骨皮湯은 이러한 두 藥材를 중심으로 黃連·黃栢·玄蔘·苦蔘·生地黄·知母·梔子·金銀花·山茱萸·枸杞子·覆盆子 등의 清熱, 補陰, 補精의 효과가 있는 藥과 發散藥으로서 降表陰하며 大清胸隔¹⁾하는 荊芥, 防風 등으로 構成되어 있다.

消渴은 糖尿病을 포괄하는 넓은 의미의 病證으로 이해되고 있는데²⁻¹³⁾, 역대의 醫家들에 의하여 대개 三消로 區分되었다²⁻¹¹⁾. 李¹⁾는 消渴에 대하여 少陽人에 있어서는 ‘胃受熱裏熱病論’에 原因, 病證, 治法, 治方 등을 자세히 기술하였으나 太陰人과 少陰人에 있어서는 太陰人 燥熱證, 少陰人 食消證이라하여 간략하게 기술했을 뿐이다. 한편 少陽人 消渴은 마음이 寬遠闊達하지 못하고 陋固膠小하기 때문에 온다고 하여 그 원인을 性情의 偏急 현상에서 찾고 있으며, 上消에는 涼膈散火湯을, 中消에는 忍冬藤地骨皮湯을, 下消에는 熟地黄苦蔘湯을 治方으로 제시하였다.

糖尿病은 장기간 지속될 때 多飲, 多尿, 多食과 瘦瘠 등과 같은 임상적인 증상 뿐만 아니라 急性感染, 網膜症, 糖尿病性 腎症, 粥狀動脈硬化症, 壞疽 등을 비롯한 다양한 合併症이 나타나기 때문에 당뇨병 자체의 治療도 중요하지만 합병증이 나타나지 않도록 豫防하는 것도 매우 중요하다^{4-8,36)}. 이에 대하여 李¹⁾ 또한 糖尿의 合併症을 매우 중요하게 생각했음을 알 수 있는데, 危亦林과 李杲, 『東醫醫方類聚』등의 文句를 인용하여 消渴에 併發하는 癰疽(腦疽, 背瘡)와 眼病(雙目失明) 등은 다 少陽人 中消의 變證이라 하였던 것이다.

따라서 少陽人 中消證에 사용하는 忍冬藤地骨皮

湯이 만들어지게 된 배경에는 忍冬藤을 비롯하여 淸熱解毒, 즉 消炎作用이 강한 黃連, 黃柏, 玄蔘, 苦蔘, 金銀花 등의 약들을 많이 첨가함으로써 合併症으로 발생하는 여러 증상을 治療하고 豫防하고자 하는 목적이 있었음을 짐작할 수 있는 것이다.

忍冬藤地骨皮湯의 효능과 관련하여 崔¹²⁾는 alloxan 투여 高血糖 白鼠에 대하여 少陽人 消渴에 사용하는 涼膈散火湯, 忍冬藤地骨皮湯, 熟地黃苦蔘湯이 高血糖의 개선에 유효한 작용을 하고 있으며, 특히 忍冬藤地骨皮湯은 糖尿에 수반되는 高脂血症을 개선시키는데 유효하다고 하였다. 高¹³⁾는 streptozotocin을 투여한 高血糖 白鼠를 대상으로 한 實驗에서 忍冬藤地骨皮湯의 血糖降下機能을 입증할 수 있었다고 하였다.

著者は 이와는 다른 관점에서 消滲(中消)의 합병증으로 나타나는 癰疽 등의 병증에 忍冬藤地骨皮湯이 어떠한 작용을 할 것인지 알아보기 위해 鎮痛, 消炎作用과 免疫作用을 중심으로 살펴보고, 血糖에 미치는 영향과 腸管運動에 미치는 영향도 관찰하였다.

실험적으로 糖尿病을 유발시키는 약물로는 streptozotocin과 alloxan이 있는데 alloxan은 肝과 腎臟機能에 미치는 영향이 적으나 streptozotocin은 간과 신장기능에 미치는 영향이 크다고 알려져 있다.^{37,39)}

본 실험에서는 糖尿病을 유발시키기 위해 streptozotocin 및 alloxan을 모두 사용하였다. 생쥐에 streptozotocin을 투여하고 24시간 후에 血糖値가 가장 높았으며, 시간이 경과됨에 따라 약간 減少하는 경향을 나타냈으나, 忍冬藤地骨皮湯(IJTE) 투여군은 streptozotocin 투여군에 비해 별 차이가 없거나 오히려 增加하는 경향을 나타내었다. Alloxan 투여시에도 비슷한 결과를 나타내었으며, 糖負荷 실험에서도 IJTE는 血糖을 강하시키지 못하였다. 이러한 결과는 崔¹²⁾나 高¹³⁾의 실험과는 다른 결과로, 本 實驗에서는 이들의 실험보다 약물 투여기간이 짧았던 점에 비추어 볼 때 투여기간에 따른 작용상의 차이가 있다고 생각할 수 있으며, 尙後 이에 대한 研究도 필요할 것으로 생각된다.

血糖 低下는 insulin 분비에 의해 촉진되기도 하지만, 腸運動의 抑制에 의해 吸收가 나빠져서도 일어날 수 있다¹⁹⁾. IJTE를 투여하고 장운동을 측정할 결

과 실험대조군인 atropine sulfate 보다는 약하였지만 장운동이 抑制되었다는 것은 IJTE가 장운동을 억제하여 血糖을 低下시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 그러나 streptozotocin 및 alloxan 투여시 IJTE가 血糖 강하작용이 없었다는 앞의 실험 결과와 비교할 때 서로 相反되는 결과이지만, 血糖강하작용 실험이 7일간 지속적으로 飼料를 공급하면서 측정한 결과이기 때문에 이들 결과를 相對적으로 비교하는 것은 문제점이 있다고 사료된다. 다만 腸運動이 抑制되었다는 사실은 中消의 특징인 '消穀善飢'를 解消하는 忍冬藤地骨皮湯의 효능을 간접적으로 보여주는 것으로 생각할 수도 있을 것이다.

高血糖시 나타날 수 있는 합병증에 대한 作用을 검토하기 위해, acetic acid에 의한 writhing syndrome 횡수를 측정하는 鎮痛作用 실험에서 IJTE 투여군은 진통효과가 64.1%로 약물대조군인 aminopyrine 51%보다 강력하게 나타났다. 이는 IJTE가 鎮痛作用을 가지고 있음을 의미한다.

炎症의 경과를 3기로 나눌 수 있는데, 제1기는 血管透過性 亢進期로 국소 자극이 가해진 부위에서 histamine과 같은 화학적 媒介物이 유리되어, 血管 內皮細胞에 변화가 일어나 血管이 擴張되고 血管투과성이 항진되며, 제2기는 白血球遊走期로 주로 好中球의 혈관벽에 침착하여 유주가 일어나고, 제3기는 增殖期로 大食細胞와 같은 세포에 의한 貪食作用, 纖維芽細胞의 증식, 새로운 세포간물질의 합성 촉진, 교원섬유의 신생, 육아형성, 痂皮形成 등이 일어나 傷處가 치유되는 시기이다⁴⁰⁾.

炎症에 대한 작용을 관찰하기 위해 毛細血管透過性, 急性足浮腫 및 肉芽腫形成에 관한 실험을 실시하였다.

Evans blue에 의한 모세혈관투과성 실험에서 모세혈관투과성 억제효과가 IJTE 투여군은 55.2%로 약물 대조군인 sodium salicylate 64.8%보다는 약하였지만 약 50% 이상 毛細血管透過性を 抑制하는 작용을 나타내었다.

Histamine에 의한 急性足浮腫 실험에서 histamine 투여 후 1시간 이내에 억제효과가 나타나면 항-histamine작용이 있는 것이며, 1시간 이후에 억제효과가 나타나면 steroid작용이 있는 것으로 알려져 있다.²⁶⁾ IJTE 투여군에서 30분 이내에 억제효과를 나

타내었다는 것은 IJTE에 항histamine작용이 있음을 시사하는 것이다.

Cotton pellet에 의한 肉芽腫形成 실험에서 육아종 형성 억제 효과가 IJTE 투여군은 21.2%로 약물 대조군인 sodium salicylate 34.6%보다는 약하였지만 육아종형성을 억제하는 작용을 나타내었다. 이러한 실험 결과는 IJTE에 抗炎作用이 있으며, IJTE를 당뇨병 환자에 복용시킬 때 합병증으로 나타날 수 있는 炎症을 억제할 수 있는 작용이 있음을 시사하는 것이다.

당뇨병에 의한 합병증을 예방하는데 생체의 免疫系가 중요하게 작용할 수 있다. 생체의 면역계에 미치는 IJTE의 효과를 관찰하기 위해 면역을 담당하는 중요한 세포인 胸線細胞, 脾臟細胞 및 腹腔 大食細胞의 증식, 세포활성물질의 분비 및 食食能에 대한 실험을 실시하였다.

IJTE는 concanavalin A로 활성화된 흉선세포 및 lipopolysaccharide로 활성화된 비장세포의 세포생존율을 증가시켰다. 이는 IJTE가 T 임파구 및 B 임파구의 增殖를 促進하는 작용이 있어, 이들 세포에 의한 면역능을 증가시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

T 임파구 중 TH 임파구는 TH1과 TH2의 2개의 아군으로 구분되며, TH1 임파구는 γ -IFN 및 IL-2를 분비하고, TH2 임파구는 IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 및 IL-13 등을 분비한다. IL-2는 T 세포성장인자(TCGF)로 알려져 있으며, 주로 CD4+ 세포에서 분비되고 γ -IFN은 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 분비된다. 또한 분비된 IL-2는 NK 세포를 활성화하며, γ -IFN은 대식세포의 食食能을 촉진하고, IL-4는 IgE 抗體의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 한편 생체에 感染이 발생되면 CD4+ T 세포가 감염된 질병의 종류에 따라 TH1 또는 TH2 세포 중 어느 한쪽으로 분화하게 되어, TH1/TH2의 비율이 변화함으로써 분비되는 각종 세포활성물질의 종류에 차이가 생기게 된다.⁴¹⁾

胸線細胞에서 분비되는 γ -IFN, IL-2 및 IL-4의 양을 측정된 결과, γ -IFN 및 IL-2의 양은 대조군에 비해 減少되었으며, IL-4의 양은 별 차이가 없었다. 이는 IJTE 투여시 흉선세포의 TH 세포 중 TH1 임파구를 抑制함을 의미한다.

脾臟細胞에서 생성되는 γ -IFN, IL-2, IL-4, TNF-

α 및 IL-1 β 의 양을 측정된 결과, 대조군에 비해 IL-4의 양은 增加하였고, γ -IFN 및 IL-2의 양은 별 차이가 없었으며, TNF- α 및 IL-1 β 의 양은 減少하였다. IL-1, IL-6, IL-8 및 TNF- α 는 炎症反應과 직접적인 관련이 있으며, 특히 自家免疫疾患 환자에게서는 이들의 양이 增加하는 것으로 알려져 있다.^{42,43)}

IJTE 투여시 脾臟細胞에서 IL-4의 양이 增加하였다는 것은 TH 중 TH2 임파구를 활성화함을 의미하는 것이다.

복강 대식세포에서 생성되는 TNF- α 및 IL-1 β 의 양을 측정된 결과, IJTE 투여시 대조군에 비해 減少되었다. 비장세포 및 복강 대식세포에서 TNF- α 및 IL-1 β 의 양이 감소하였다는 것은 IJTE가 이들 세포 활성물질을 조절하여 炎症反應을 抑制할 수 있음을 시사하는 것이다.

포유류의 호중구와 대식세포는 위축형성을 하는 동안 식작용 분자의 cytoskeleton이 cytosolic G-actin monomers로부터 F-actin polymerization으로 변화한다.^{44,45)} Nitric oxide(NO)는 인간 호중구의 F-actin 양을 감소시키며, phagosome에서 산소대사산물의 생성을 억제하여,⁴⁶⁾ 성숙 대식세포의 위축형성과 탐식능을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁴⁷⁾ 또한 炎症時에는 NO의 양이 增加된다고 알려져 있다.^{48,49)} 복강 대식세포로부터 분비되는 NO의 양을 측정된 결과, IJTE 투여군에서 NO의 분비가 대조군에 비해 減少하였다는 것은 IJTE가 NO의 分泌를 抑制하여 염증에 작용할 수 있음을 시사하는 것이다.

탐식능은 opsonic activity의 반응을 증가시키는 lucigenin을 이용하여 식세포 chemiluminescence(CL)를 측정하였다.⁵⁰⁾ CL은 luminol 또는 lucigenin 등에 의해 증가되는데, luminol-dependent CL은 myeloperoxidase-H₂O₂ system과 관련되어 있으며, lucigenin-dependent CL은 식세포에 의해 생성되는 superoxide와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.⁵¹⁾

IJTE를 투여한 복강 대식세포에서 대조군에 비해 lucigenin CL이 增加하였으며, FITC-conjugated E. coli particles을 이용하여 현미경으로 복강 대식세포에 uptake되는 particles를 관찰한 결과, IJTE 투여군에서 E. coli particles의 螢光이 增加됨을 확인하였다. 이는 IJTE가 복강 대식세포의 食食能을 증가시킴을 의미하는 것이다. 이러한 결과가 복강 대식세포로부터

nitric oxide의 生成이 抑制된 결과라 추정되나 자세한 것은 추후 研究되어야 할 것이다.

V. 結論

少陽人 忍冬藤地骨皮湯이 中消 合併症에 미치는 影響을 살펴 본 結果는 다음과 같다.

1. 腸管運動을 抑制하였다.
2. Acetic acid에 의한 writhing syndrome을 抑制하였다.
3. Evans blue에 의한 毛細血管 透過性を 抑制하였다.
4. Histamine에 의한 急性 足浮腫을 抑制하였다.
5. Cotton pellet에 의한 肉芽腫 形成을 抑制하였다.
6. 胸線細胞 및 脾臟細胞의 細胞生存率을 增加시켰다.
7. 胸線細胞로부터 γ -IFN 및 IL-2의 分泌를 抑制하였다.
8. 脾臟細胞로부터 IL-4의 分泌는 增加시켰으나, TNF- α 및 IL-1 β 의 分泌는 抑制하였다.
9. 腹腔 大食細胞로부터 TNF- α , IL-1 β 및 nitric oxide의 分泌를 抑制하였다.
10. 腹腔 大食細胞의 lucigenin chemiluminescence 및 FITC-conjugated E. coli engulfment를 促進하였다.

이상의 實驗 結果 IJTE는 腸管運動을 抑制하였으며, 鎮痛 및 抗炎作用을 나타냈고, 이들 작용은 免疫細胞로부터 TNF- α , IL-1 β 및 nitric oxide의 生成을 抑制하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 이러한 機轉에 의하여 忍冬藤地骨皮湯은 中消 合併症의 하나인 炎症을 抑制하는 데 有效한 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 李濟馬 : 東醫壽世保元, 서울, 杏林出版, pp.86-91, p.104, 1986
2. 申載鏞 : 糖尿病과 消渴, 서울, 成輔社, pp.13-17, pp.89-91, 1985
3. 朴炳昆 : 韓方臨床四十年, 서울, 杏林書院, pp.338-339, 1973
4. 金永萬 : 糖尿病의 韓方療法, 東洋醫學, 4 : 34,

- 1978
5. 金龍國 : 糖尿病의 心身醫學的 側面에 對한 四象醫學의 考察, 四象醫學會誌, 1(1) : 61, 1989
6. 金應模 : 韓醫學的으로 본 糖尿病의 概說, 大韓韓醫學會誌, 2(1) : 74, 1981
7. 朴鎬湜 등 : 東醫內科學, 부친, 書院堂, pp.463-470, 1985
8. 杜鎬京 : 東醫腎系內科學, 서울, 東洋醫學研究院, pp.518-571, 1986
9. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.506-511, 1972
10. 朱震亨 : 丹溪心法, 中國, 五州出版社, pp.499-504, 1975
11. 危亦林 : 世醫得效方, 中國醫學大系, 商務印書館, 14 : 223-231, 1990
12. 崔炳一 : 少陽人 涼膈散火湯과 忍冬藤地骨皮湯 및 熟地黃苦蔘湯이 Alloxan投與 高血糖 白鼠에 미치는 影響, 四象醫學會誌 10(2), 1999
13. 高基德 : 少陽人에 應用되는 忍冬藤地骨皮湯이 streptozotocin投與 高血糖 白鼠에 미치는 迎香, 四象醫學會誌 2(1), 1990
14. Like, A.A. and Rossini, A.A. : Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis new model of diabetes mellitus. Science, 193 : 415-417, 1976
15. Okabayashi, Y., Otsuki, M., Ohki, A., Tani, S. and Baba, S. : Increased β -cell secretory responsiveness to ceruletide and TPA in streptozotocin-induced mildly diabetic rats. Diabetes, 38 : 1042-1047, 1989
16. Junod, A., Lambert, A.E., Strauffacher, W. and Renold, A.E. : Diabetogenic action of streptozotocin : Relationship of dose to metabolic response. J. Clin. Invest., 48 : 2129, 1969
17. Bonner-weir, G.C. : Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Diabetes, 30 : 64, 1982
18. Weaver, D.C., Mcdaniel, M.L., Naber, S.P., Barry, D. and Lacy, P.E. : Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of langerhans. Diabetes, 27(12) : 1205, 1978
19. Rhinehart, B.L., Robinson, K.M., Liu, P.S., Payne, A.J., Whetley, M.E. and Wagner, S.R. : Inhibition of intestinal disaccharidases and suppression of blood

- glucose by a new α -glucohydrolase inhibitor-MDL 25 : 637, 1987
20. B.A. Whittle : Brit. J. Pharmacol., 22 : 246, 1964
 21. K. Shimomura : J. Pharm., 24 : 837, 1972
 22. E.S. Golub and J.K. Spitznagel : J. Immunol. 95 : 106, 1960
 23. 허인회, 이상준, 김영준 : Daidzen의 항염작용과 그 작용기전에 관한 연구(I), Yakhakhoeji, 31(3) : 154, 1987
 24. Y. Hara and S. Tomizawa : Folia Pharmacol. Japan, 73 : 557, 1977
 25. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : Planning for lymphocytes : A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 2844, 1978
 26. 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
 27. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 65 : 55, 1983
 28. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 129 : 23, 1990
 29. 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
 30. 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
 31. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112 : 163, 1988
 32. Sahlin, S., Hed, J. and Rundquist, I. : Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. J. Immuno. Methods, 60 : 115, 1983
 33. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. : A rapid and simple micro-fluorometric phagocytosis assay. J. Immuno. Methods, 162 : 1, 1993
 34. 洪淳用, 李乙浩 : 四象醫學原論, 서울,杏林出版, p.304, 1992
 35. 全國韓醫科大學 本草學教室, 本草學, 서울,永林社, p.237, 1992
 36. 李文鎬 등 : 內科學, 서울,學林社, pp.2209-2231, 1986
 37. Rerup, C.C. : Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol. Rev. 22 : 485-518, 1970
 38. Evan, A.P., Mong, S.A., Gattone, V.H., Connors, B.A., Aronoff, G.R. and Luft, F.C. : The effect of streptozotocin and streptozotocin induced diabetes on the kidney. Renal. Physiol. 7 : 78-89, 1984
 39. Lazarow, A : Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 61 : 280, 1964
 40. H. Saito : Screening methods for drug evaluation(III), 9 : 45, Hirokawa publishing company, Tokyo, Japan, 1989
 41. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. : Cellular and molecular immunology. 2ed. Saunders, pp.243-257, 1994
 42. Rosenstreich, D.L. and Yost, S.L. : Human urine-derived inhibitors of interleukin-1. Reviews of infectious disease. 9 : S594, 1987
 43. Dayer, J.M. : Chronic inflammatory joint diseases : natural inhibitors of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . J. Rheumatology, 18 : 71, 1991
 44. Sheterline, P. and Rickard, J.E. : The cortical actin filament network of neutrophil leukocytes during phagocytosis and chemotaxis. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.141-165, 1989
 45. Jaconi, M.E.E., Lew, D.P., Carpentier, J.L., Magnusson, K.E., Sjogren, M. and Stendahl, O. : Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosomelysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. J. Cell Biol., 110(5) : 1555, 1990
 46. Forslund, T. and Sundqvist, T. : Nitric oxide-releasing

- particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. and Biophysical Research Communications*, 233 : 492, 1997
47. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Chung, H.T. : Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Korean. J. Immunol.* 18 : 635, 1996
48. Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S. and Dirosa, M. : Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, 211 : 177-182, 1992
49. Ialenti, A., Moncada, S. and Dirosa, M. : Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 110 : 701-706, 1993
50. Holt, M.E., Ryall, M.E.T. and Campbell, A.K. : Albumin inhibits human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence : evidence for oxygen radical scavenging. *Br. J. Exp. Pathol.* 65 : 231, 1984
51. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. : Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45 : 1, 1984