

白金丸의 경구 투여가 전기자극 스트레스를 받은 mouse의 비장에 존재하는 면역 세포 분획과 사이토카인 생성에 미치는 영향

심상민 · 주승균 · 김근우 · 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of Baegumhwan administration on immune-function in ICR mice stressed by electric footshock

Sang-Min Shim · Seung-Gyun Joo · Geun-Woo Kim · Byung-Soo Koo

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental medicine, Dong-Guk University, Seoul, Korea.

The present experiments were designed to study the influence of Baegumhwan on immune function of ICR mice under stress condition. Baegumhwan was orally administered to the mice for 15 days. On the 11th day the mice subjected to electric footshock for 5 days (2 session a day, 11 footshocks a 31 min-session). B/T cell populations in splenocytes were studied by FACS analysis and cytokines (IFN- γ and IL-10) production of the mouse splenocytes treated with PHA were studied by sandwich ELISA assay on the 15th day.

The results were as follows.

1. After electric footshock, mice became sluggish and crowded to one side of the cage. Increased B/T cell populations in splenocytes were observed. These results confirm that electric footshock caused stress inducing immunological and behavioral changes in ICR mice.
2. Baegumhwan administration without stress increase B cell populations in splenocytes, but T cell populations and cytokines (IFN- γ and IL-10) production of the mouse splenocytes treated with PHA maintain as similar levels as in the normal group.
3. Baegumhwan administration with stress significantly antagonized the effect of electric footshock on behavior, increased B cell populations in splenocytes, so maintain as similar levels as in the normal group. cytokines (IFN- γ and IL-10) production of the mouse splenocytes treated with PHA maintain as similar levels as in the normal group and T cell populations in splenocytes were increased as stress control.

Key word : stress, Baegumhwan, immune function, B/T cell, cytokines

緒 論

스트레스는 자극에 대한 비특이적인 생체적 반응을 설명하기 위해 Hans Selye에 의해서 처음 제창되었으며, 이는 생체에 가해진 각종 유해인자에 대한 생체의 반응과 그에 따른 방어반응의 총화이다.^{1,2)}

면역기능은 감염, 알레르기, 자가면역질환, 암 등에 대한 생체측의 저항을 담당하고 있고 스트레스는 면역계를 억제하거나 과잉하게하여 이들 질환에 영향을 미친다.³⁾

한의학적으로 스트레스 질환을 氣鬱症으로 보는데 氣는 肝, 脾 등의 臟腑에 영향을 미쳐 血의 生理에도 영향을 준다.^{4,5)} 《靈樞·口問篇》⁶⁾과 《素問·舉痛論》⁷⁾에서는 鬱證의 原因을 六淫과 飲食起居 등의 외적인 요인과 喜怒, 大驚卒恐의 정서적인 반응을 내적인 요인으로 생각하였고, 후대로 가면서 情志所因이 강조되었다. 또한 嚴 등^{8,9)}은 心因이나 七情, 情緒의 不安定 등이 痰을 생기게 하는 原因이 된다고 하였고, 張 등^{10,11)}은 痰이 精神疾患의 중요한 原因임을 말하였다.

白金丸은 危¹²⁾의 《世醫得效方》에 처음 기재된 처방으로 ‘鬱金圓’이라 하며, 驚憂(鬱)로 인하여 痰涎이 心竅에 있어 癲狂이 됨을 치료한다고 하였고, 최근에는 喉風, 乳蛾, 煩躁不安, 神志不清, 癲癇發狂 등에 사용되어 왔다.¹³⁾

면역과 스트레스에 대한 최근의 연구를 보면 金 등^{14,15,16)}은 越鞠丸複合方이 스트레스를 받은 mouse의 면역에 영향을 미친다고 보고한 바 있다. 白金丸에 대한 최근 연구는 姜 등^{17,18)}의 抗痙攣, 鎮痛에 대한 研究와 高脂血症에서 血液의 流變性과 cAMP의 변화에 관한 것은 있었으나 면역과 스트레스에 관한 실험은 없었다.

이에 저자는 白金丸의 스트레스와 면역에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 전기자극으로 스트레스 상황을 유발시킨 mouse와 전기자극 전후에 白金丸을 경구투여 시킨 mouse의 비장에 존재하는 임파구의 분포를 FACS 분석으로 조사하여 비교하였고, 나아가 얻어진 비장세포들을 in vitro 상에서 배양하여 mitogen의 자극에 의하여 생성되는 사이토카인을 ELISA로 분석하여 유의

한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 藥材

이 실험에 사용한 약제는 동국대 강남한방병원에서 구입하여 精選한 것을 사용하였고, 白金丸의 처방구성은 世醫得效方¹²⁾에 준하였으며 그 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition of Baegumhwan prescription

韓藥名	生藥名	重量(g)
鬱金	Rhizoma Curcumae	234.5
白礬	Alumen	112.5
총 용량		347.0

2. 藥材의 투여

위 약제로 白金丸을 제조한 후 실험에 편리하도록 다시 白金丸 50g을 細末하여 마우스용 배합사료 200g과 함께 물로 반죽하여 펠렛을 만들었다. 서늘한 곳에서 건조시킨 후 4℃에 저장하며 배합사료 대신 이 약제가 혼합된 사료를 마우스에 투약하였다.

3. 실험동물

생후 6-7 주 된 ICR 雄性 마우스를 각 실험군마다 5 마리씩 사용하였다. 마우스를 폴리카보네이트 케이지에 5 마리씩 넣어 음료수와 실험동물(마우스)용 배합사료(삼양유지사료 주식회사, 서울 종로구)를 공급하고 특수 무 병원균(specific-pathogen-free) 환경에서 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 조용한 분위기에서 일주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다.

4. 실험군 분류와 약액의 투여

실험군은 마우스 5 마리를 한 군으로 하여 아무런 처치도 하지 않은 군 (Normal), 약제만 투여하고 스트레스 자극을 하지 않은 군 (Drug control), 약제를 투여하지 않고 스트레스 자극만 준 군 (Stress control), 약제를 투여하고 나서 스트레스 자극을 준 군 (Sample)으로 나누어 실험을 시행하였다. 약제를 투여 받은 마우스는 약제가 섞인 배합사료를 일반 배합사료 대신 15일간 경구로 투여 받았다. 모든 마우스들에게 음용수로 정제된 수돗물을 공급하였다.

5. 전기 자극 스트레스의 유발

약제 혼합된 사료 투여 11일 채부터 5일간 전기자극을 가하였는데 마우스의 발이 닿으면 전기충격장치로부터 전기자극을 받도록 구리선을 5 mm 간격으로 평행되게 붙인 식쇠 (grid) 플라스틱 판 (230 x 170 x 5 mm)을 케이지 밑바닥에 꼭 맞도록 놓고 사용하였다.¹⁹⁾ 전기자극은 1회 (약 31분 50초 소요)에 11번 빈도, 3분 간격, 10초의 기간으로 가하며, 하루에 오전 9시와 오후 5 시경 두 차례씩 5일간 가하였다. 전기자극의 강도는 첫 3일간은 1.0 mA로, 마지막 2일간은 2.0mA 씩 증가시켜 스트레스를 계속 유지하도록 하였다.²⁰⁾ 스트레스를 받지 않은 마우스들도 전기자극을 전혀 받지 않는 조건에서 전기자극 장치가 설치된 케이지에 스트레스를 받은 군과 동일한 시간과 횟수 동안 두었다가 원래의 케이지로 옮겼다.

6. 시약

본 실험에 사용한 RPMI 1640, Fetal bovine serum (FBS)과 antibiotics는 Gibco사 (Gibco BRL, Life Technol. Inc., NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Phycoerythrin(PE)이 표지된 anti-mouse B220/CD45R 단일클론 항체와 phycoerythrin(PE)이 표지된 anti-mouse CD8 단일클론 항체, fluorescein isothiocyanate(FITC)가 표지된 anti-mouse CD4 단일클론 항체는 PharMingen사 (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 비장 세포 수확에 사용된 sandblasted single frosted slide glass는 Chase Scientific

Glass사 (Rockwood, TN, USA)에서 구입하여 사용하였다. Sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)에 사용된 모든 항체와 사이토카인 표준액은 PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Extravidine, alkaline phosphatase conjugate와 phosphatase의 substrate 및 본 실험에 사용한 phytohemagglutinin (PHA)는 Sigma 사 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 그 외에 사용한 일반 시약들은 특급 내지 일급 제품을 사용하였다.

7. 마우스 비장 세포의 준비²¹⁾

마우스를 질식시키고 해부대에 고정시킨 다음 70% alcohol로 전신을 소독하였다. 멸균 가위를 사용하여 비장을 무균적으로 적출한 다음, 차가운 RPMI 1640 배지가 들어 있는 샤아레로 옮기고 frost 된 슬라이드 글라스 사이에 끼워 비버가며 비장 속에 들어 있는 대부분의 세포를 회수하였다. 이때 세포 중에 포함된 적혈구는 멸균 증류수를 가해 저장액을 만든 후 10 초간 둔 후 다시 등장액이 되도록 하여 제거하였다. 얻어진 세포를 PBS로 3회 원심세척하고 0.2% trypan blue로 염색하여 세포의 생존률이 95% 이상임을 확인하였다.

8. 면역형광 항체법에 의한 항원 검색 및 분석²²⁾

비장세포 중 B 세포의 확인을 위해서는 PE가 표지된 항 마우스 B220/CD45R 항체를 사용하였고 CD4⁺와 CD8⁺ T 임파구가 차지하는 비율을 확인하기 위해서 PE가 표지된 항 마우스 CD8 항체와 FITC가 표지된 항 마우스 CD4 단일 클론 항체를 사용하였다. 각 마우스에서 채취된 비장세포를 각각 10⁶ 개 씩 3% FBS와 0.1% sodium azide가 첨가된 FACS media에 1 회 세척하고 재현탁하여 B220/CD45R 항체나 항 CD8 항체 및 항 CD4 항체를 각각 0.5 µg 씩 넣은 후 ice bath에 꽂아 어두운 곳에서 30 분간 항체와 반응시켰다. 반응이 끝난 후 FACS media로 2회 세척하고 0.5ml FACS media에 재현탁시켜 FACStar (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)로 면역형광 유량 세포분석을 시행하였다.

9. 마우스 비장세포 단핵구에 의한 사이토카인의 분비 조사^{23,24)}

적혈구를 제거한 마우스 비장 세포를 2 mM의 glutamine과 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 들어있는 5 % FBS-RPMI 1640 배지에 4 x 10⁵ cells/ml 되게 현탁하였다. 현탁된 비장 세포를 flat bottom 96-well plate의 각 well에 250 µl 씩 넣어 4 µg/ml PHA를 처리하고 37°C CO₂ incubator에서 48 시간 배양 후 ELISA에 사용하기 위해 세포 배양 상등액을 따로 취하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 배양 상등액에 분비된 Th 1 type 사이토카인인 IFN-γ와 Th 2 type 사이토카인인 IL-10의 농도를 각각의 사이토카인에 특이한 항체를 이용하여 quantitative sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 방법으로 측정하였다. 요약하면, 마우스 사이토카인 각각에 대하여 특이한 다클론 항체로 코팅된 96 well microplate의 각 well에 배양 상등액 50 µl를 가한 후 잘 혼합하여 adhesive strip으로 plate를 덮고 실온에서 2 시간 반응시켰다. 그 후 세척 완충액으로 4 회 세척하고 각각의 항-사이토카인 biotinylated detection antibody 100 µl를 가하고 adhesive strip으로 덮어서 다시 실온에서 1 시간 반응시킨 다음 4회 세척하였다. 마지막으로 ExtraAvidin-Alkaline phosphatase conjugate를 각 well에 넣고 상온에서 30분간 반응시키고 5회 세척하고 phosphatase substrate를 넣어 상온에서 약 30분간 반응을 진행시킨 다음 0.2 M NaOH를 가하여 microtiter plate reader로 405 nm에서 흡광도를 읽었다. 따로 마우스 IFN-γ 및 IL-10의 표준액을 계열 희석하여 ELISA를 실시하고 그 결과로부터 각 사이토카인의 농도와 흡광도 간의 상관 관계식을 구하고 그를 바탕으로 각 배양 상등액에 든 사이토카인의 양을 계산하였다.

10. 자료의 통계처리

각 실험군 마다 5 마리의 마우스를 사용해 실험하고 얻은 수치의 평균값과 표준편차 (SD)를 구하고, 유의성 검정은 Students's t-test를 실시하여, p 값이 0.05 이하이면 유의하다고 판정하였다.

實驗結果

1. 전기자극 스트레스에 대한 마우스의 반응

전기자극 스트레스만 받은 스트레스 대조군은 전기자극이 끝난 후에도 케이지 한 귀퉁이에 서로 모여 잘 움직이지 않는 모습을 볼 수 있었다. 이는 白金丸을 경구 투여 받거나 받지 않고 전기자극을 전혀 받지 않는 조건에서 전기자극 장치가 설치된 케이지에 스트레스를 받은 군과 동일한 시간과 횟수 동안 두었다가 원래의 케이지로 옮기는 처리를 받은 약제 대조군 및 정상군의 마우스가 지속적으로 활발히 움직이는 것과는 매우 다른 모습이었다. 흥미롭게도, 白金丸을 경구 투여 받고 전기자극을 받은 실험군의 마우스들은 스트레스 대조군과는 달리 정상군이나 약제 대조군과 유사한 행동 양상을 보여 白金丸의 투여가 스트레스 억제 효과가 있음을 짐작할 수 있었다.

2. 면역형광 항체법에 의한 항원 검색 및 분석 결과

우선 전기자극 스트레스가 비장세포에서의 B 세포가 차지하는 백분율과 白金丸 경구 투여에 대한 영향을 조사하기 위하여 각 실험 동물에서 채취한 비장세포로부터 적혈구를 제거하고 FACS 분석을 실시하였다. 각 그룹에서 얻어진 대표적인 실험 결과 한 예씩을 Fig. 1에 예시하고 각 그룹마다 얻어진 평균값과 표준편차를 Table II에 정리하였다.

비장세포에 존재하는 B220/CD45R positive B 세포의 백분율은 전기자극 스트레스에 의하여 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였고 (33.3±4.8% vs. 23.2±3.3%, p<0.05), 白金丸을 경구 투여 받은 마우스에서도 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (31.4±4.7% vs. 23.2±3.3%, p<0.05). 한편 전기자극 스트레스 전후에 白金丸을 경구 투여 받은 마우스들에서의 B220/CD45R positive B 세포의 백분율 (26.4±4.1%)이 정상군, 약제 대조군, 스트레스 대조군 어느 군과도 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

다음으로 비장세포에서 CD4와 CD8 positive T 세포가 차지하는 백분율을 조사하여 각 그룹

에서 얻어진 대표적인 실험 결과 한 예씩을 Fig. 2에 예시하고 각 그룹의 평균값과 표준편차를 Table III에 정리하였다. 비장세포에 존재하는 CD4와 CD8 positive T 세포의 백분율은 전기자극 스트레스에 의하여 모두 유의성 있는 증가를 보였다 (CD4: $19.3 \pm 3.0\%$ vs. $14.5 \pm 3.2\%$, $p < 0.05$; CD8: $8.8 \pm 2.5\%$ vs. $4.1 \pm 2.0\%$, $p < 0.05$). 白金丸을 경구 투여 받은 마우스에서는 CD4와 CD8 positive T 세포가 차지하는 분획이 정상군에 비하여 둘 다 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다 (CD4: $13.4 \pm 4.1\%$ vs. $14.5 \pm 3.2\%$; CD8: $6.4 \pm 4.1\%$ vs. $4.1 \pm 2.0\%$). 전기자극 스트레스 전 후에 白金丸을 경구 투여 받은 마우스들에서의 CD4와 CD8 positive T 세포의 백분율 (CD4: $17.9 \pm 2.0\%$; CD8: $6.6 \pm 1.7\%$)이 스트레스 대조군에서와 유사한 경향을 나타내었으며 정상군이나 약제 대조군에서 보다 유의성 있게 높은 값을 나타내었다.

3. 마우스 비장세포 단핵구에 의한 사이토카인 분비에 미치는 영향

마우스 IFN- γ 및 IL-10의 표준액을 계열 희석하여 ELISA를 실시하고 그 결과로부터 각 사이토카인의 농도와 흡광도 간의 상관 관계식을 구하여 이를 바탕으로 각 배양된 비장세포 상등액에 든 사이토카인의 양을 계산하였다. 계열 희석된 마우스 IL-10의 경우 Fig. 3에서 보듯이 농도와 405 nm에서의 흡광도 사이에 좋은 직선성을 나타내었고 ($r=0.9884$) 얻어진 직선식은 $y=0.3236 + 0.00022435x$ 이었다. 각 실험군에 속하는 마우스에서 채취한 비장세포 배양 상등액 중에 존재하는 IL-10의 농도를 측정한 결과 정상군의 경우 137.3 ± 15.1 pg/ml로 나타났고 전기자극 스트레스를 받은 마우스들에서는 126.8 ± 18.9 pg/ml, 白金丸을 경구투여 받은 마우스에서는 132.8 ± 8.3 pg/ml, 전기자극 스트레스 전 후에 白金丸을 경구 투여 받은 마우스들에서는 146.5 ± 23.3 pg/ml로 각 실험군 마다 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다 (Table IV).

마우스 IFN- γ 의 standard curve도 Fig. 4에 나타낸 것처럼 농도와 405 nm에서의 흡광도 사

이에 좋은 직선성을 나타내었고 ($r=0.9994$) 얻어진 직선식은 $y=0.1843 + 0.0008121x$ 이었다. 각 실험군에 속하는 마우스에서 채취한 비장세포 배양 상등액 중에 존재하는 IFN- γ 의 농도를 측정한 결과 정상군의 경우 80.5 ± 8.0 pg/ml로 나타났고 전기자극 스트레스를 받은 마우스들에서는 85.3 ± 8.5 pg/ml, 白金丸을 경구투여 받은 마우스에서는 78.4 ± 4.9 pg/ml, 전기자극 스트레스 전 후에 白金丸을 경구 투여 받은 마우스들에서는 84.3 ± 10.4 pg/ml로 각 실험군 마다 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다 (Table V).

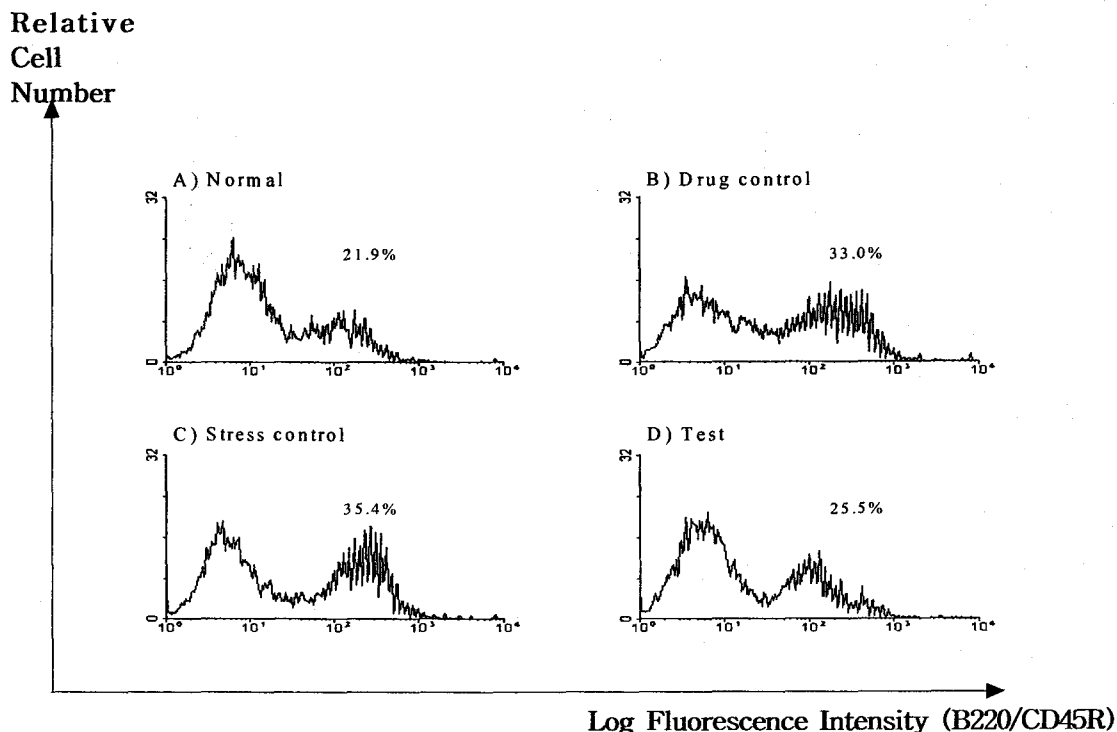


Fig. 1. Effects of electric footshock and drug Baekgumhwan oral administration on B220/CD 45R expression in mouse splenocytes.

- A) Normal : Mice were not treated with drug and not shocked with electricity.
- B) Drug control : Mice were treated with drug but not shocked with electricity.
- C) Stress control : Mice were not treated with drug but shocked with electricity.
- D) Sample : Mice were treated with drug and shocked with electricity.

After 15 day treatment, spleen was removed from each mouse and the total splenocytes were stained with PE anti-mouse B220/CD45R monoclonal antibody before they were subjected to analysis. The experiments were performed for all 5 mice for each group and representative examples of each group are shown.

Table II. Effects of electric footshock and drug Baekgumhwan oral administration on B220/CD45R positive cell populations in splenocytes

Group	B220/CD45R positive cells (%)
Normal	23.2±3.3
Drug control	31.4±4.7 *
Stress control	33.3±4.8 *
Sample	26.4±4.1

Splenocytes were prepared, stained with antibodies, and analyzed for expression of B220/CD45R with FACStar (Becton Dickinson, CA). Results were obtained from 5 mice for each group and expressed as the mean percentages of total splenocytes ± SD (standard deviation), * = p<0.05 vs. Normal.

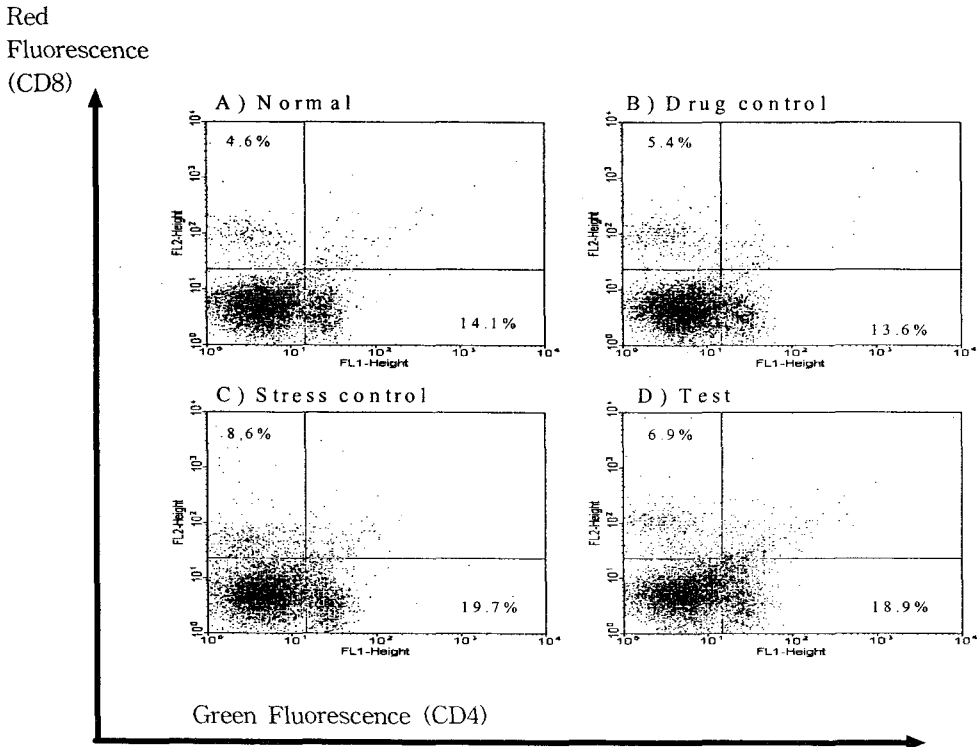


Fig. 2. Flow cytometric analysis of CD4 and CD8 expression of splenocytes from mice.

- A) Normal : Mice were not treated with drug and not shocked with electricity.
 B) Drug control : Mice were treated with drug but not shocked with electricity.
 C) Stress control : Mice were not treated with drug but shocked with electricity.
 D) Sample : Mice were treated with drug and shocked with electricity.

After 15 day treatment, spleen was removed from each mouse and the splenocytes were stained with mixture of monoclonal antibodies before they were subjected to analysis. The experiments were performed for all 5 mice for each group and representative examples of each group are shown.

Table III. Effects of electric footshock and drug Baekgumhwan oral administration on CD4 and CD8 positive cell populations in splenocytes

Group	CD4 positive cells (%)	CD8 positive cells (%)
Normal	14.5±3.2	4.1±2.0
Drug control	13.4±4.1	6.4±4.1
Stress control	19.3±3.0 *	8.8±2.5 *
Sample	17.9±2.0 *	6.6±1.7 *

Total spleen cells were prepared and stained with antibodies and analyzed for expression of CD4 and CD8 with FACStar (Becton Dickinson, CA). Results were obtained from 5 mice for each group and expressed as the mean percentages of total splenocytes ± SD (standard deviation), * = p<0.05 vs. Normal.

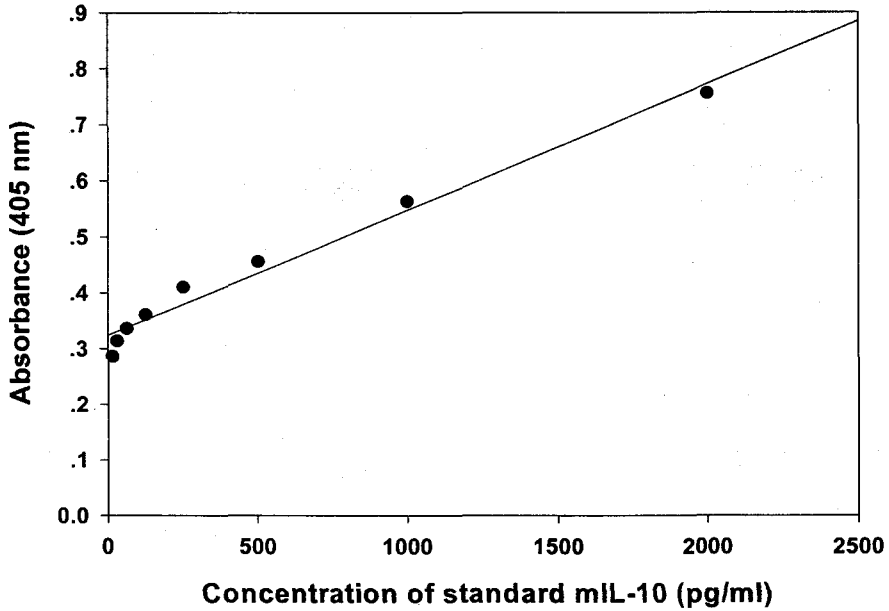


Fig. 3. Standard curve of mIL-10 ELISA. Standard mIL-10 was serially diluted and used for sandwich ELISA assay. The absorbance at 405 nm was read using microtiter plate reader. Each point represents mean value of duplicate samples. Equation was obtained from the relationship between concentration and absorbance at 405 nm.

Table IV. Effects of electric footshock and drug Baekgumhwan oral administration on the mIL-10 production of the mouse splenocytes treated with PHA.

Group	mIL-10 (pg/ml)
Normal	137.3±15.1
Drug control	132.8±8.3
Stress control	126.8±18.9
Sample	146.5±23.3

The splenocytes (4×10^5 cells/ml) were cultured in complete RPMI medium with $4 \mu\text{g/ml}$ PHA and maintained at 37C for 48 hours in 5% CO₂ incubator. The quantitative assay of mIL-10 production in the culture supernatant was performed by sandwich ELISA method. Results were obtained from 5 mice for each group and expressed as the mean \pm SD (standard deviation).

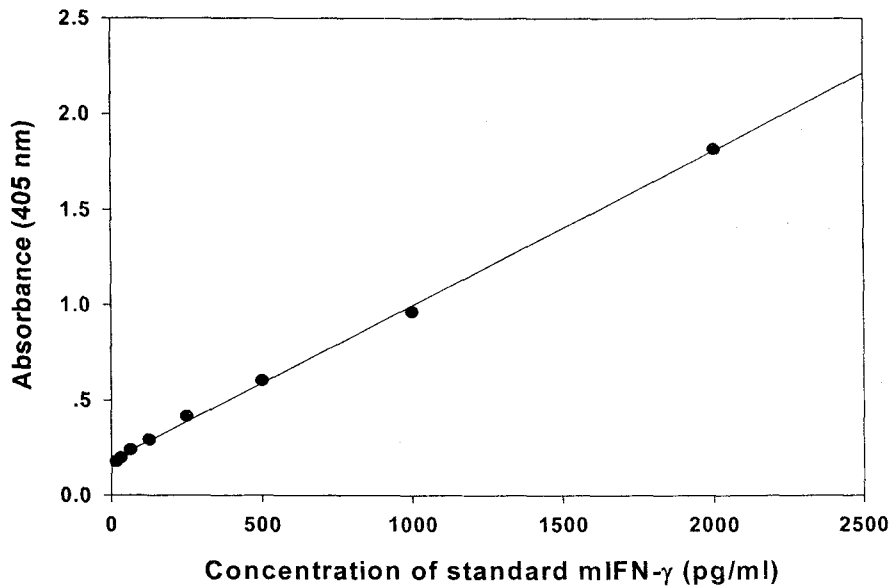


Fig. 4. Standard curve of mIFN- γ ELISA. Standard mIFN- γ was serially diluted and used for sandwich ELISA assay. The absorbance at 405 nm was read using microtiter plate reader. Each point represents mean value of duplicate samples. Equation was obtained from the relationship between concentration and absorbance at 405 nm.

Table V. Effects of electric footshock and drug Baekgumhwan oral administration on the mIFN- γ production of the mouse splenocytes treated with PHA.

Group	IFN- γ (pg/ml)
Normal	80.5 \pm 8.0
Drug control	78.4 \pm 4.9
Stress control	85.3 \pm 8.5
Sample	84.3 \pm 10.4

The splenocytes (4×10^5 cells/ml) were cultured in complete RPMI medium with $4 \mu\text{g/ml}$ PHA and maintained at 37C for 48 hours in 5% CO₂ incubator. The quantitative assay of mIFN- γ production in the culture supernatant was performed by sandwich ELISA method. Results were obtained from 5 mice for each group and expressed as the mean \pm SD (standard deviation).

考 察

Selye는 스트레스에 대응하는 생체의 적응 반응으로, 흉선 및 림프 기관의 위축, 위·십이지장 궤양, 부신비대의 세가지 반응을 보고하였다. 스트레스에 의하여 면역의 증추 장기가 위축된다 함은 면역기능에도 영향을 미치고 있음을 나타낸다고 볼 수 있다. 즉, 생체의 저항력을 저하시켜서 발병을 촉진시키든가 예후를 악화시키는 반면, 경우에 따라 스트레스는 면역 증진을 일으키기도 하고 다른 상황에서는 억제하기도 하는 양면적인 효과를 나타낼 수 있음도 관찰되었다.²⁵⁾ 이는 면역반응의 형태, 스트레스 요인의 신체적, 정신적 특성, 스트레스와 면역 반응이 나타나기까지의 기간 등에 따라 차이를 보인다.²⁶⁾

스트레스 반응과 스트레스 질환을 氣病 특히 氣鬱症으로 볼 때,⁴⁾ 鬱證의 원인에 대하여 朱²⁷⁾는 七情之邪鬱, 寒熱之交侵, 九氣之佛鬱, 雨濕之侵凌, 酒漿之積聚를 들고 있으며, 氣·血·痰 三病이 鬱을 兼하는 경우가 많고, 許²⁸⁾는 氣鬱이 되면 濕滯가 되고 濕滯는 熱을 발생하게 하고 熱이 鬱痰結滯가 되면 血에 障滯가 생긴다고 하였다. 또한 嚴⁸⁾은 “皆由驚動 臟氣不平 鬱而生涎 閉塞諸經”이라 하여 心因으로 臟氣가 편안치 못하여 鬱하면 痰이 생긴다고 하였고, 朱²⁷⁾는 “五志之火 因七情而氣鬱而成痰 故爲癲狂妄之證”이라 하여 七情의 過傷에서 생기는 鬱火가 痰을 생기게 하는 原因이 된다고 하였다. 張¹⁰⁾은 “癲病多因痰氣”라 하여 痰이 精神疾患의 중요한 原因임을 말하였다.

본 실험에서 사용된 白金丸은 危¹²⁾의 《世醫得效方》에 처음 기재된 처방으로 ‘鬱金圓’이라 하며, 驚憂(鬱)로 인하여 痰涎이 心竅에 있어 癲狂이 됨을 치료한다고 하였고, 최근에는 喉風·乳蛾·煩躁不安·神志不清·癲癇發狂 등에 사용되어 왔다.¹³⁾ 癲狂은 韓醫學에서 精神症狀를 통칭하는 병명으로, 狂은 興奮상태로 표현되며, 癲은 抑鬱상태로 표현된다.²³⁾ 朱²⁷⁾는 五志가 過하면 熱이 생기므로 癲狂은 七情의 抑鬱이 心胸間에 鬱結되어 오는 것으로 心神을 鎮靜시키고 痰結된 것은 풀어야 한다고 하였다. 따라서 白金丸이 癲狂을 治療한다는 것은 넓은 의미에서 鬱證을 치료하는

것으로 이해될 수 있고, 本方의 機轉이 抑鬱로 인한 祛痰開鬱·清熱·涼心에 있다고 보아 스트레스에 대한 임상적 효능을 실험적으로 究明하는 것이 의미 있을 것으로 사료되어 본 研究에 着手하였다.

白金丸의 구성 약물인 鬱金과 白礬에 대하여, 李³⁰⁾는 鬱金은 性味가 辛苦寒無毒하고 主治는 血積下氣·破惡血·婦人宿血氣心痛·涼心·失心癲狂蠱毒을 治한다고 했고, 辛³¹⁾은 辛苦涼無毒하고 效能은 涼血清心·行氣解鬱·祛痰止痛·利膽退黃한다고 하였다. 白礬에 대하여 李³⁰⁾는 性味는 酸寒無毒이라 하고 主治는 癲癇疔疾을 治한다 하였고, 辛³¹⁾은 性味는 酸澁寒하며 有小毒으로 止血止瀉·祛痰開閉·解毒燥濕·清熱退黃이라 하였다.

白金丸에 대한 최근의 연구는 姜¹⁷⁾의 抗癲癇, 鎮痛에 대한 研究와 陳 등¹⁸⁾의 高脂血症에서의 血液의 流變性과 cAMP의 변화에 관한 것으로, 白金丸에 대한 면역과 스트레스에 관한 실험은 없었다.

면역과 스트레스에 대한 최근의 연구를 보면 金¹⁴⁾은 越鞠丸合四物湯이 구속 스트레스를 받은 mouse의 免疫에 미치는 영향에 대한 혈중 임파구의 분포와 사이토카인의 농도에 대해 스트레스로 증가한 B임파구가 정상으로 되돌려지는 결과를 보고한 바 있다. 許¹⁵⁾는 越鞠丸合二陳湯을 전기자극 스트레스를 받은 mouse에 투여하여 체내 T 임파구의 조성에 영향을 미치고 비장내 T 임파구 증식능 저하를 막는 등 스트레스에 길항하도록 작용함을 보고하였다. 또한 權¹⁶⁾은 越鞠丸合補中益氣湯가 쥐의 비장세포에서 스트레스에 의해 증가된 B, T 임파구를 억제한다고 하였다. 최근 여러 연구자들에 의하여 스트레스 자극 시에 인간이나 실험동물에서 면역기능에 변화가 생긴다는 보고들이 잇따르고 있다.^{32,33)} 이는 스트레스에 의하여 각종 면역 세포의 성장 및 분화 발달에 변화가 생겨서 나타나는 현상으로 해석될 수도 있다고 하겠다.

白金丸의 스트레스에 대해 억제 작용을 나타낼 가능성을 면역학적 측면에서 비장에 존재하는 B 및 T 임파구 성장 및 분화 발달에 미치는 영향을 규명하여 다음과 같은 유의성을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 전기자극 의하여 마우스의 움직임이 현저히 감소하고 전기자극이 끝난 후에도 케이지 한 귀퉁이에 서로 모여 잘 움직이지 않는 등 행동 양상이 달라지는 것으로부터 전기자극이 ICR 마우스에게 스트레스로 작용함을 추측할 수 있었다.

B 임파구는 임파 조직의 follicular 영역에 주로 분포하고 비장에 다량 존재한다. 이들 B 임파구는 항체를 생성하고 바이러스나 박테리아 등의 병원균으로부터 생체를 방어하는 역할을 담당한다.³⁴⁾

성숙된 T 임파구는 그들 세포 표면에 발현된 marker에 의해 CD4 및 CD8 positive T 임파구로 구분된다. CD4 positive T 임파구는 HMC class II에 의해 present되는 항원을 인식하나 CD8 positive T 임파구는 MHC class I에 의해 present되는 항원을 인식하는 특징을 갖는다.^{35,36)} CD 4 positive T 임파구는 항원 제시 세포에 의해 그들에게 present되는 외부 유래 항원에 대한 면역 반응을 담당하여 IL-2 생성을 촉진하고 그 결과 CD8 positive T 임파구, NK세포, 및 B 임파구가 활성화되어 전체적인 면역 반응이 나타나게 된다.³⁷⁾ CD8 positive T 임파구는 cytotoxic 및 suppressor 세포를 포함하는데 주로 바이러스 감염 등과 같이 내부에서 기인하는 항원에 대해 반응하며 cytotoxic한 기전을 통해 그 작용을 나타낸다.³⁸⁾

ICR 마우스에 전기자극을 주면 비장에 존재하는 B 임파구의 분획이 정상군의 마우스에 비하여 유의성 있게 증가하는 결과가 관찰되었고 白金丸을 경구투여하며 전기자극을 준 마우스에 있어서는 B 임파구의 백분율이 정상 수준으로 회복되었다 (Fig. 1, Table II).

이는 白金丸의 경구 투여가 전기자극에 의하여 생긴 B 임파구의 백분율 변화에 길항하는 것으로 이해될 수 있을 것이다. 흥미롭게도 전기자극을 받지 않은 마우스에게 白金丸을 경구 투여하면 스트레스만을 준 경우와 유사하게 B 임파구의 백분율이 증가하는 현상이 나타났다.

이러한 결과는 전기자극 스트레스를 받은 마우스들에게서 관찰되는 이상 행동 양상이 白金丸을

경구투여 받은 마우스들에서는 나타나지 않았으므로 약액의 투여 자체가 마우스에게 스트레스로 작용하여 비장에 존재하는 B 임파구의 백분율이 증가된 것이라기보다는, 白金丸이 스트레스가 없는 일반적인 상황에서는 B 임파구의 성장이나 분화를 촉진하는 고유 성질이 있는 것으로 해석하는 것이 옳을 것이다.

비장 중 CD4와 CD8 positive T 임파구가 차지하는 백분율은 白金丸의 경구 투여에 의해서는 변화를 보이지 않았고 전기자극에 의하여 둘 다 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2, Table III). 그리고 白金丸을 경구 투여하면서 전기자극을 준 경우의 비장 중 CD4와 CD8 positive T 임파구가 차지하는 백분율은 전기자극 스트레스만 준 경우와 흡사하게 정상군에 비하여 유의성 있게 증가한 결과를 나타내어 白金丸의 경구 투여가 전기자극 스트레스에 의한 CD4 및 CD8 positive T 임파구 백분율 변화에는 길항하는 효과를 나타내지 못하는 것으로 생각된다.

한편, 전기자극 스트레스와 白金丸의 경구투여가 마우스의 비장에서 얻은 세포를 PHA로 자극할 때 생성되는 사이토카인의 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ELISA 분석을 실시하였다. PHA는 non-specific mitogen으로 T 임파구의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾ 사이토카인은 주로 면역 관련 세포에 의해 분비되는 용해성 단백질로 분비한 세포 자신이나 주위 다른 세포의 작용에 영향을 미친다. 대부분의 사이토카인은 다양한 작용을 나타낼 수 있고 전신적인 효과보다는 국소에서 그 작용을 나타내게 된다. 일단 생성된 사이토카인은 빠르게 분비되고 작용을 나타낸 후 소실된다는 것이 특징이다.⁴⁰⁾ IFN- γ 는 CD8 positive T 세포에 의해서 분비되는 주 사이토카인으로 바이러스의 증식을 억제하는 작용을 나타내며⁴¹⁾, IL-10은 Th 2 type T 임파구에 의하여 많이 생성되며 B 임파구를 활성화시킨다.⁴²⁾

IL-10과 IFN- γ 의 표준액을 사용한 ELISA 분석 결과 좋은 직선성을 나타내는 standard curve가 얻어졌다. 하지만 PHA로 자극된 비장 세포에 의해 생성된 IL-10과 IFN- γ 의 농도를 분석한

결과 전기자극 스트레스를 받은 마우스, 白金丸을 경구 투여 받은 마우스, 白金丸을 경구투여 받으며 전기자극 스트레스를 받은 마우스 모두에서 정상군과 거의 비슷한 사이토카인 농도가 관찰되었다. (Fig. 3, Fig. 4) 이러한 결과는 전기자극이나 白金丸의 경구 투여가 이 두 사이토카인의 생성에 영향을 미치지 않기 때문으로 해석할 수 있을 것이다. 또는 마우스로부터 비장을 채취한 것이 마지막으로 전기자극을 가하거나 白金丸을 경구 투여하고 나서 18 시간이 경과한 후라서 그 효과가 지속적으로 나타나지 않았다고도 해석할 수 있을 것이다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 白金丸은 스트레스에 의한 마우스 행동 양상의 변화를 막고 비장 내 B 임파구의 조성을 정상으로 유지하게 하지만 스트레스에 의한 비장 내 T 임파구 subset의 조성 변화에는 효과를 나타내지 못하는 것으로 사료되며, 향후 림프조직·임파절·말초혈액 등에서 면역 세포의 분포에 대한 실험을 해 볼 수도 있겠으며, 나아가 실제 임상에서 응용할 수 있도록 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

結 論

白金丸을 15 일간 경구 투여시키며 전기자극으로 스트레스 상황을 유발시킨 ICR 마우스를 대상으로 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白金丸을 경구 투여 받은 마우스에서는 비장 내에 존재하는 CD4 및 CD8 positive T 임파구의 백분율, PHA 자극에 의한 비장세포의 IL-10 및 IFN- γ 의 생성이 정상군 마우스와 비교하여 차이를 나타내지 않았으나, 비장에 존재하는 B 임파구의 백분율이 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

2. 전기자극을 받은 마우스는 움직임이 현저히 감소하는 등 행동 양상이 달라지고 비장 내에 존

재하는 B 임파구의 백분율은 물론 CD4 및 CD8 positive T 임파구의 백분율이 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 그러나 PHA 자극에 의한 비장세포의 IL-10 및 IFN- γ 의 생성이 정상군 마우스와 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

3. 白金丸을 경구 투여 받으며 전기자극 스트레스를 받은 마우스에서는 전기자극 스트레스만 받은 마우스들과는 달리 행동 양상과 비장 내에 존재하는 B 임파구의 백분율 모두 정상군과 유사한 경향을 나타내었고, PHA 자극에 의한 비장세포의 IL-10 및 IFN- γ 의 생성도 정상군 마우스와 비교하여 차이를 나타내지 않았다. 그러나 이들 마우스의 비장에 존재하는 CD4 및 CD8 positive T 임파구의 백분율은 전기자극 스트레스만 받은 마우스들과 유사하게 정상군보다 증가된 경향을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 전기자극은 ICR 마우스에게 스트레스로 작용하여 마우스 행동 양상의 변화는 물론 비장 내에 존재하는 B 임파구의 백분율 증가 등을 일으키나 이들 마우스에 白金丸을 경구 투여하면 전기자극 스트레스 효과에 길항하여 마우스의 행동양상과 B 임파구의 백분율을 정상군과 같은 수준으로 되돌리는 것을 알 수 있다. 그러나, 白金丸의 경구 투여는 전기자극 스트레스에 의해 초래된 마우스의 비장 내 CD4 및 CD8 positive T 임파구의 백분율의 증가는 정상 수준으로 되돌리지 못하였다. 따라서 白金丸은 스트레스에 의한 마우스 행동 양상의 변화를 막고 비장 내 B 임파구의 조성을 정상으로 유지하게 하지만 스트레스에 의한 비장 내 T 임파구 subset의 조성 변화에는 효과를 나타내지 못하는 것으로 추정된다.

參 考 文 獻

1. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, & J. S. Pober. Cells and Tissues of the Immune System In *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Company. 1997;3:16-33.
2. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicology; two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343-346.
3. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.
4. 柳永秀.鬱證에 관한 精神醫學의 考察. 원광한의학회지. 1995;5(1):125-140.
5. 홍석의 외. 정신적인 stress로 인하여 간에 미치는 영향과 이로 인한 소화기장애. 대한한의학회지. 1994;15(2):48-58.
6. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學研究院 出版部. 1985:158, 286.
7. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院 出版部. 1985:123, 145, 282.
8. 嚴用和. 濟生方. 北京: 人民衛生出版社. 1980: 78-80.
9. 李 挺. 醫學入門. 서울: 고려의학. 1989:331, 566-567.
10. 張介賓. 景岳全書. 서울: 杏林書院. 1975:411-417, 842.
11. 陳士澤. 石室秘錄. 서울: 杏林書院. 1973:120-123.
12. 危亦林. 世醫得效方. 서울: 醫聖堂. 1990:289.
13. 中醫大辭典編輯委員會. 中醫大辭典. 北京: 人民衛生出版社. 1983:162.
14. 金吉洙. 越鞠丸合四物湯이 전기자극 스트레스를 받은 mouse의 免疫機能에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 1999.
15. 許 聖. 越鞠丸合二陳湯이 전기자극 스트레스를 받은 mouse의 면역기능에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 1999.
16. 權泰植. 越鞠丸合補中益氣湯이 전기자극 스트레스를 받은 mouse의 면역기능에 미치는 영향. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 1999.
17. 姜炯旭. 白金丸의 效能에 關한 實驗的 研究. 원광대학교 대학원 석사학위논문. 1987.
18. 陳奇 外 9人. 白金降脂丸對實驗性高脂血症大鼠血脂, 血液流變性和環核苷酸化的影響. 中藥通報. 1985;10(12):38.
19. 김정범, 박종욱, 배재훈. 마우스에서 전기자극 스트레스의 면역조절 효과. 생물치료 정신의학. 1996;2:80-91.
20. 박영숙, 김기석. 스트레스 반응에 항정신성 약물이 미치는 효과. 임상심리학회지. 1988;7:1-20.
21. 강형식, 조대호, 이왕재, 김승형, 김용만, 백상기, 변광호, 차인표. B림파구 성장을 유도하는 새로운 Murine Erythroleukemia 세포주의 확립 및 특성 분석. *Korean J. Immunol.* 1998;20:269-275.
22. Kizaki T, Yamashita H, Oh-Ishi S, Day NK, Good RA, Ohno H. Immunomodulation by cells of mononuclear phagocyte lineage in acute cold-stressed or cold-acclimatized mice. *Immunology.* 1995;86(3):456-62.
23. Wojciechowska-Lacka A, Matecka-Nowak M, Adamiak E, Lacki JK, Cerkaska-Gluszak B. Serum levels of interleukin-10 and interleukin-6 in patients with lung cancer. *Neoplasma.* 1996;43(3):155-8.
24. Frydecka I, Mazur G, Kuliczowski K. Decreased production of interferon gamma by anti-CD3 monoclonal antibody and interleukin-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 1995;91(3):671-3.
25. 대한심신스트레스학회 편. 스트레스과학의 이해. 서울: 신광출판사. 1997:29-30.
26. Dantzer R, Kelley KW. Stress and immunity. an intergrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 1989;44(26):1995-2008.

27. 朱震亨. 丹溪心法. 서울: 대성문화사. 1982: 319-320, 327-328.
28. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1990: 235.
29. 柳熙英. 東醫精神科學. 서울: 남산당. 1988:42.
30. 李時珍. 本草綱目.台北: 文光圖書. 1979:390-391, 513.
31. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울: 南山堂. 1986: 455-590.
32. David N. Khansair, Anthony J. Murgó and Robert E. Faith. Effects of stress on the immune system. *Immunology Today*. 1990;11:170-175.
33. Galina Idova, Margarita Cheido and Lidia Devoino. Modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress. *Int. J. Immunopharmac*. 1997;19:535-540.
34. Justewicz DM, Doherty PC, Webster RG. The B-cell response in lymphoid tissue of mice immunized with various antigenic forms of the influenza virus hemagglutinin. *J Virol*. 1995;69(9):5414-21.
35. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:579-99.
36. Miceli MC, Parnes JR. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin Immunol*. 1991;3(3):133-41.
37. Johnson-Leger C, Christenson JR, Holman M, Klaus GG. Evidence for a critical role for IL-2 in CD40-mediated activation of naive B cells by primary CD4 T cells. *J Immunol*. 1998;161(9):4618-26.
38. Depierreux C, Graff I, Lancelot V, Denis M, Vanderplasschen A, Hanon E, Pastoret PP, Swysen C. Optimization of murine CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte responses to pseudorabies virus. *J Immunol Methods*. 1997;203(1):77-88.
39. Di Sabato G, Chen DM, Erickson JW. Production by murine spleen cells of an activity stimulating the PHA-responsiveness of thymus lymphocytes. *Cell Immunol*. 1975;17(2):495-504.
40. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, & J. S. Pober. *Cytokines In Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Company. 1997;3:250-277.
41. Martin R, Vallbracht A, Kreth HW. Interferon-gamma secretion by in vivo activated cytotoxic T lymphocytes from the blood and cerebrospinal fluid during mumps meningitis. *J Neuroimmunol*. 1991;33(3):191-8.
42. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.