

加味清肝湯의 肝保護 및 免疫調節效果

손창규, 한성수, 조종관

대전대학교 한의과대학 간계내과 교실

A Study on the Immune Modulation and Hepatoprotection of *Gamichunggan-tang* (GCT)

Chang-Kyu Son, Sung-Soo Han, Chong-Kwan Cho

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

Objectives : This study was to examine the efficacy of GCT on the hepatoprotective effect in the liver function and immune activity.

Methods : The experiment to investigate the hepatoprotective effect of GCT on the liver damage was conducted with D-galactosamine. The experiments to verify the effects of GCT on the immune activity were conducted by carbon clearance assay, plaque-forming cell SRBC assay of IgM, lymphoproliferation assay of T and B cells, and adherence and phagocytosis of macrophages.

Results : In the damage of liver induced by D-galactosamine, GCT carried hepatoprotective effect on AST. In carbon clearance assay GCT showed significant effect on phagocytosis of Kuffer cells.

In the plaque-forming cell assay, GCT improved the formation of IgM. In the lymphoproliferation assay, GCT activated the formation of T and B lymphocytes. In macrophages, GCT activated adherence and phagocytosis.

Conclusion : Though further study is needed, our findings suggest that GCT could be recommended as hepatoprotector and immune modulator for liver disease. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(2):28-38)

Key Words: *Gamichunggan-tang*, Hepato-protection, Immune Modulation

서 론

肝은 胎兒期부터 가장 빨리 자라면서 旺盛한 造血作用을 하고 제일 먼저 成熟되는 人體의 가장 큰 實質臟器로서¹⁾, 30%정도의 血液과 대부분의 營養分을

받아들여 各種 必須物質의 生成과 轉換, 貯藏, 分泌 및 再吸收 뿐만 아니라 細菌이나 老廢物의 除去와 免疫物質의 生産등을 主管함으로써 恒常성과 生命維持에 있어서 매우 중요한 役割을 한다²⁾. 또한 肝은 廣範圍의 代謝性, 毒物性, 循環系性, 微生物學的인 解毒을 비롯하여 腫瘍으로부터도 대단히 예민하여 우리 몸에서 가장 損傷을 잘 입는 臟器이기도 하다³⁾.

韓醫學에서의 肝은 心腎과 母子關係를 갖고 있으면서 '體陰'인 '藏血機能'과 '用陽'인 '疏泄機能'을

· 접수 : 2001년 11월 15일 · 채택 : 2002년 3월 14일
· 교신저자 : 손창규, 대전광역시 중구 대흥동 대전대학교 부속 한방병원 간계내과
(Tel. 042)229-6804, 6723,
E-mail: ckson@dragon.taejon.ac.kr)

통해서 臟腑 및 陰陽氣血의 均衡維持를 擔當하고 있으며, “肝和則氣生 發育萬物 爲諸臟之生火”⁴⁾, “肝者主爲臧 使之候外”⁵⁾라 하여 免疫機能을 擔當하고 있음을 說明하였다.

臨床的으로 肝에 생기는 疾患은 크게 肝實質 病變, 肝膽道系 및 血管系 病變으로 나눌 수 있는데⁶⁾, 이러한 각종 肝疾患은 우리나라 40-50代 死亡率을 높이는 主要한 原因이 되고 있으며, 그 중에서도 특히, B型이나 C型的 肝炎 바이러스와 關聯된 疾患이 가장 重要한 危險因子로 認識되고 있는데, 이는 알콜과 더불어 非可逆的인 肝硬化나 肝癌을 일으키는 主犯이기 때문이다. 80年代부터 사용된 B型 肝炎 바이러스 백신의 結果로 예전보다는 感染率이 顯著히 낮아졌음에도 不拘하고 아직도 成人의 약 6-7%가 B型 肝炎 바이러스를 保有하고 있으며, 1996년 통계청 자료에 의하면 1981년에 비해 慢性 肝疾患으로 인한 入院率이 男女 모두 3배정도 增加하였고, 死亡率에 있어서도 全體 死因 중 5위를 차지할 정도로 높은 比重을 차지한다⁷⁾.

그러나 아직까지도 이러한 바이러스성 肝疾患에 대한 正確한 病態의 기전도 明確히 밝혀져 있지 않아 이에 따른 뚜렷한 治療對策 또한 세우지 못하고 있으며, 現在까지의 西洋醫學의인 治療法으로 쓰이는 항바이러스제, 면역조절제, 그리고 肝機能을 도와주는 補助的인 治療 등이 있으나 매우 불만족스런 實情이다^{8,9)}. 韓醫學에서도 內經 以來로 다양한 治療方法들이 發展하면서 臨床에서 活用되어 왔고, 最近에 와서는 現代의인 方法을 應用한 研究가 활발히 이루어지고 있으나 아직 그 結果는 많이 미흡하다고 할 수 있다¹⁰⁾.

이에 著者는 西洋醫學의으로도 그 治療法이 미흡한 바이러스성 肝炎患者 및 其他의 肝臟疾患 患者에게 大田大學校 附屬 韓方病院 肝系內科에서 處方한 加味淸肝湯이 臨床的인 效果를 보여주고 있어 이에 대하여 實驗研究를 통해 그 效果를 現代의인 方法으로 立證하고자 肝細胞 保護와 免疫學的 側面에서의 抗原의 除去, 抗體生成에 一次的인 役割을 하는 macrophage의 機能, 綿羊赤血球를 이용한 IgM 生成

能, 淋巴細胞들에 대한 影響을 觀察한 결과 有意한 效果를 얻었기에 報告하는 바이다.

실 험

1. 材 料

1) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 구입한 후 精選하여 使用하였고, 處方 1貼의 構成內容과 分量은 다음과 같다.(Table 1)

2) 動物

實驗動物은 韓國 化學 研究所에서 4週齡의 雌性 BALB/c mouse를 구입하여, 15日 동안 실험실 환경에 適應시킨 후 體重이 18~20g 범위내의 마우스를 實驗에 使用하였다.

3) 試藥 및 器機

(1) 試藥

實驗에 使用된 試藥中 RPMI 1640, William's medium, Hanks' balanced salts solution, 2% gellatin solution, fetal bovine serum (FBS), D-galactosamine, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS),

Table 1. Prescription of Gamichunggan-tang(GCT)

韓藥名	學名	用量(g)
蟹甲	<i>Trionycis Carapax</i>	8.0
牛角朮	<i>Rhinocari Cornu</i>	8.0
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	8.0
澤瀉	<i>Alismatic Rhizoma</i>	4.0
白朮炒	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4.0
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	4.0
麥芽炒	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	4.0
白茯苓	<i>Poria</i>	4.0
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	4.0
藿香	<i>Pogostemonis Herba</i>	4.0
猪苓	<i>Polyporus</i>	4.0
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	4.0
貢砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	3.0
青皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	3.0
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	3.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.0
Total amount		84.0

phosphate buffered saline(PBS), lipopolysaccharide(LPS), concanavalin A(ConA), carrageenan(type II) 등은 Sigma社(U.S.A) 製品을 使用하였으며, ink는 Pelican(D-4001, Hannover, Germany), [³H]-thymidine은 Amersham에서, cyclophosphamide는 중외제약, sheep-RBC(SRBC)는 忠北大學校 獸醫學 研究所에서 구입하였으며, 其他 一般 試藥은 特級 試藥을 使用하였다.

(2) 器機

使用된 器機는 血清分析機(Olympus reply AU060, Japan), centrifuge(한일 과학, Korea), UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan), CO₂ incubator(Napco, U.S.A), clean bench(VS-1400LS, Vision scientific Co. Korea), rotary vacuum evaporator(B-480, B chi labotechnik AG, Switzerland), autoclave(TOMY KOGYO Co., LTD., Japan), Freezing dryer(centrifugal vacuum concentrator, Ecospin 3180C, Hanil R&D, Korea), peristaltic pump(SMP-21, TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD., Japan) 그리고 blood cell counter(HEMA VET. CDC Technologies, Inc., U.S.A)등을 使用하였다.

2. 方法

1) 加味清肝湯의 檢液製造

加味清肝湯 420g(5貼 分量)에 증류수 3,000ml을 가하여 熱湯 抽出器에서 2時間 抽出하여 얻은 液을 吸入 濾過하여 이를 Rotary evaporator로 濃縮하여, 이를 다시 Freezing dryer를 利用하여 完全 乾燥한 加味清肝湯 抽出物(110g)을 冷藏 保管하면서 적당한 濃度로 稀釋하여 使用하였다. In vitro 실험에는 다양한 濃度로 우태아혈청결핍 RPMI1640(with 10% FBS, 10⁻⁶M dexametason, 10⁻⁷M insulin, 100IU/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin)培養液에 稀釋하여 使用하였고, 動物實驗用으로는 200mg/kg과 1,000 mg/kg의 濃度로 증류수에 稀釋하여 經口投與 하였다.

2) 實驗群의 分類 및 藥物投與

實驗 前에 몸무게를 基準으로 모든 그룹의 平均이

均一하게 하여 다음과 같이 4그룹으로 각각 8마리와 4마리씩 分類하였다.

正常群(Normal): BALB/c mouse에 carrageenan(8마리)과 dexametason(4마리)으로 각각 細網內皮系 抑制와 免疫 抑制를 誘發시키지 않고 加味清肝湯을 投與하지 않은 群

對照群(Control): BALB/c mouse에 carrageenan(8마리)과 dexametason(4마리)으로 각각 細網內皮系 抑制와 免疫 抑制를 誘發시키고 加味清肝湯을 投與하지 않은 群 實驗群 A(GCT100mg): BALB/c mouse에 carrageenan(8마리)과 dexametason(4마리)으로 각각 細網內皮系 抑制와 免疫 抑制를 誘發시키고 加味清肝湯(100mg/kg)을 投與한 群

實驗群B(GCT1,000mg): BALB/c mouse에 carrageenan(8마리)과 dexametason(4마리)으로 각각 細網內皮系 抑制와 免疫 抑制를 誘發시키고 加味清肝湯(1,000mg/kg)을 投與한 群 加味清肝湯의 投與는 mouse用 劑량을 利用하여 一定한 時間에 投與하였으며, carrageenan과 dexametason으로 각각 細網內皮系 抑制와 免疫 抑制를 誘發시키기 3日前부터 실험 종료일까지 投與하였다.

3) 加味清肝湯의 肝細胞保護作用

(1) mouse의 1次 肝細胞 分離

Berry등¹¹⁾의 方法을 應用하여 實施하였는데 略述하면 다음과 같다. BALB/c mouse의 腹腔에 0.1ml의 uretan(1.5g/ml)을 注射하여 深麻酔시킨 후 알콜을 충분히 적시어 고정대에 실펜으로 고정하였다. 滅菌된 가위와 핀셋을 利用하여 腹部를 切開한 후 미리 준비된 24G의 gelco needle로 간문맥에 조심하여 삽입한 후 peristaltic pump에 장치된 45℃로 데운 HBSS를 통과시키면서 腹大動脈을 잘랐다. 肝의 血液이 모두 除去된 후에 collagenase(0.05%)과 약간의 trypsin inhibitor가 섞인 William's medium을 통과시키는데 핀셋으로 腹大靜脈을 20초간 눌렀다 떼었다를 반복하여 肝細胞가 분리됐을 때 얼음에 꽂아둔 HBSS에

간을 떼어 넣었다.

(2) 肝細胞의 培養 및 藥物處理

HBSS로 3분간 400 r.p.m.으로 2번 씻어주고 William's media로 5×10^5 으로 맞춘 다음, 미리 전날에 2% gellatin solution으로 coating해 두었던 12well plate에 1ml씩 6 well을 한 그룹으로 하여 각각 분株하였다. 4시간 후에 바닥에 붙지 않은 肝細胞는 다시 吸入하여 버리고 새로운 培地로 갈아준 다음 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 培養하였다. Sylinger filter로 滅菌하여 貯藏해 놓았던 加味淸肝湯(GCT)을 새로운 William's media에 最終濃度가 5µg/ml, 50µg/ml, 500µg/ml로 맞추어서 갈아준 다음, 1시간 후에 D-galactosamine이 最終濃度 50mM이 되도록 가해주고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 培養하였다.

(3) AST의 測定

4시간 동안 培養한 뒤 2000 r.p.m.으로 5분간 遠心分離하여 細胞가 따라오지 않게 조심하여 1.5ml ependorf tube에 培地를 모아서 血清分析機를 이용하여 AST(37°C IFCC, without pyridoxal phosphate method)를 測定하였다.

4) Kuffer cell의 食食能 觀察을 위한 carbon clearance 測定

Colloidal carbon의 clearance의 測定은 Biozzi등¹³⁾의 方法을 應用하여 施行하였다.

(1) Carrageenan에 의한 細網內皮系의 抑制誘發

細網內皮系의 機能遮斷劑로 알려진 carrageenan type II를 8마리씩 그룹 지은 正常群을 除外한 BALB/c mouse의 control 그룹과 加味淸肝湯을 3일간 미리 投與하기 시작한 低濃度, 高濃度 그룹 등 3그룹에 100mg/kg의 濃度로 腹腔內 投與한 후 加味淸肝湯을 5일간 더 투여하였다.

(2) Carbon의 注入과 clearance測定

ink를 1% gelatin이 함유되어 있는 生理食鹽水로 40%稀釋하여 40°C로 설정한 shaking incubator에 굳지 않게 보관하면서 생쥐의 尾靜脈에 0.2ml씩 交代로 注入하였다. 注入한 후 5분과 15분에 각각 heparin 처리된 capillary tube(I.D. 1.1mm, Chase Scientific

Glass Inc., U.S.A)로 左右의 後眼窩靜脈叢에서 교대로 採血하여 2ml의 0.1% sodium carbonate액에 넣어 溶血시키고 V-Vis spectrophotometer로 600nm에서 吸光度를 測定하여 血中 carbon의 濃度를 測定하였고 carbon clearance(t1/2, 반감기, min)를 산출하였다.

Carbon clearance(t1/2,min)=

$$\frac{(t_2 - t_1)1/2 \times OD_{t_2}}{OD_{t_1} - OD_{t_2}}$$

t1: 5 mim ODt1: t1에서의 吸光度

t2: 15 mim ODt2: t2에서의 吸光度

(3) 肝臟의 組織觀察

mouse의 肝을 實驗 終了後 防血하고 나서 10% 중성 포르말린 용액에 1차 고정하여 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 Hematoxylin & Eosin염색 후 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

5) Antibody(IgM)生成能 觀察을 위한 plaque-forming cell assay

(1) Dexametason에 의한 免疫抑制 誘發과 抗原 感作

4마리씩 그룹 지은 BALB/c mouse를 그룹별로 Normal과 Control 에는 증류수를, 韓藥物 投與群에는 濃度別 加味淸肝湯을 미리 3일간 투여한 다음 正常群을 除外한 3그룹에 dexametason을 1mg/kg의 濃度로 腹腔內 투여한 5시간 후에 마리당 5×10^8 cell의 SRBC를 腹腔에 注射한 후 加味淸肝湯을 5일간 더 투여하였다. 5일째 되는 날 에테르 痲醉下에 防血하여 脾臟을 떼었다.

(2) 脾臟細胞 分離

그룹별 각각의 BALB/c mouse를 에테르 痲醉한 後 防血시키고 알콜을 충분히 적시어 消毒을 실시하고 腹腔을 滅菌시킨 가위로 열어서 脾臟을 각각 떼어내 차가운 PBS가 담겨진 35φ petridish에 그룹별로 넣었다. 5ml syringe의 plunger로 가볍게 눌러서 細胞들이 흘러지게 한 후 15ml conical tube에 옮겨 5분간 방치한 다음, 상층액을 따로 취해서 1,200 r.p.m.의 속도로 5분간 遠心分離하고 상층액을 버린 후 PBS로 한 번 더 씻었다. 바닥에 붙은 pellet에 0.83% NH4Cl을 1ml씩 넣고 3분간 방치하여 赤血球를 溶血

시킨 후 5ml의 PBS를 다시 가해 1,200 r.p.m.의 속도로 5분간 遠心分離하고 상층액을 버린 후 PBS로 한 번 더 씻고 pellet을 RPMI-1640(with 10% FBS, 100unit penicillin, 100 μ g streptomycin)으로 1×10^7 cell/ml이 되도록 조정하였다.

(3) Plaque의 誘發과 count

Michael 등¹³⁾의 方法을 應用하여 실시하였는데 약술하면 다음과 같다. Alsever solution에 貯藏되어 있던 感作시켰던 것과 동일한 SRBC를 HBSS로 씻은 후 5×10^8 cell/ml의 농도로 맞춘 0.3ml의 SRBC를 1×10^7 cell/ml로 맞춘 spleen cell 0.1ml과 guinea pig complement 0.1ml을 0.5ml의 RPMI-1640(with 10% FBS, 100unit penicillin, 100 μ g streptomycin)과 섞어서 미리 알콜로 닦아서 만들어 놓은 Cunningham chamber에 공기가 들어가지 않게 잘 넣고 바셀린으로 완전히 밀봉한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 培養하였다. 2시간 후 형성된 plaque의 숫자를 magnifier로 세어서 각 그룹별 비교를 하였다.

6) Lymphoproliferation assay

(1) 脾臟細胞의 分離 및 培養

BALB/c mouse 1마리를 에테르 痲醉한 후 防血시키고 알콜을 충분히 적시어 消毒을 실시하고 腹腔을 滅菌시킨 가위로 열어서 脾臟을 떼어내 차가운 PBS가 담겨진 35 ϕ petridish에 넣었다. 5ml의 plunger로 가볍게 눌러서 세포들이 흩어지게 한 후 15ml conical tube에 옮겨 5분간 방치한 다음, 상층액을 따라 취해서 1,200 r.p.m.의 속도로 5분간 遠心分離하고 상층액을 버린 후 PBS로 한 번 더 씻었다. 바닥에 붙은 pellet에 0.83% NH₄Cl을 1ml씩 넣고 3분간 방치하여 赤血球를 溶血시킨 후 5ml의 PBS를 다시 가해 1,200 r.p.m.의 속도로 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후 PBS로 한 번 더 씻고 pellet을 RPMI-1640(with 10% FBS, 100unit penicillin, 100 μ g streptomycin)으로 1×10^7 cell/ml이 되도록 조정하였다. 96 well plate에 100 μ l의 비장세포를 넣고 syringe filter로 멸균한 加味淸肝湯을 각각 6 well을 最終濃도가 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml이 되도록 50 μ l씩 첨가하

고 control에는 같은 양의 培地를 넣었으며, 또한 LPS는 最終濃도가 1 μ g/ml과 10 μ g/ml이 되도록 50 μ l씩 가했고, ConA의 最終濃도는 1 μ g/ml과 5 μ g/ml이 되도록 50 μ l씩 가하여 48시간 동안 37, 5% CO₂ incubator에서 培養하였다. 각 藥物의 조성마다 6 well을 한 그룹으로 하였다.

(2) Thymidine 處理와 放射能 測定

48시간 培養 후 培地에 1 μ Ci/50 μ l의 濃度로 稀釋한 [³H]-thymidine을 각각의 well에 50 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양한 후 cell harvester를 이용하여 glass fiber filter에 부착시키고 3차 증류수로 洗滌한 다음 완전히 건조시켰다. 여과지를 scintillating 바이알에 넣은 후 카테일 용액을 2ml씩 가하여 β -counter로 그 放射能을 측정하였으며 각각의 disintegrations per minutes(DPM) 값의 平均을 구하였다.

7) 腹腔 macrophage의 附着能과 食食能

(1) 腹腔 macrophage의 回收 및 培養

BALB/c mouse 3마리를 에테르 痲醉한 후 防血시키고 알콜을 충분히 적시어 消毒을 실시하고 腹皮를 조심스럽게 벗긴 후 차가운 D-PBS 5ml을 넣어 1분간 잘 마사지한 후 出血되지 않게 조심하여 腹腔細胞를 回收하였다. 1,200 r.p.m.의 速度로 10분간 遠心分離하고 상층액을 버린 후 바닥의 pellet에 0.83% NH₄Cl을 1ml씩 넣고 3분간 방치하여 赤血球를 溶血시킨 후 5ml의 D-PBS로 한 번 더 씻었다. 상층액을 버리고 RPMI-1640(with 10% FBS, 100unit penicillin, 100 μ g streptomycin)으로 분산시킨 후 얼음에 꽂혀있던 4개의 15ml conical tube에 4.5ml씩 나누어 넣고 最終濃도가 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml이 되도록 滅菌된 加味淸肝湯을 0.5ml을 가하였고 control은 培地를 가하여 30분간 얼음에 꽂아 놓았다. 이후 60 ϕ petridish에 5ml씩 분주한 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 培養한 후 37°C의 PBS로 2회 씻어서 부착되지 않은 腹腔細胞를 버렸다.

(2) 附着能과 rabbit anti-SRBC IgG의 媒介性 食食能 測定

부착된 腹腔細胞를 最終的으로 PBS로 씻은 후 다시 약간의 PBS가 넣어져 있는 각 그룹당 3개씩의 petridish를 inverted microscope(X400)로 정중앙을 지나도록 조정하여 附着된 macrophage를 3번 세워서 그 평균으로 附着能을 구하였다. 이 細胞들을 利用하여 IgG의 媒介性 食食能을 測定 하였는데, 세고난 dish들을 37°C, 5% CO₂ incubator에 보관을 해놓고, SRBC에 rabbit anti-SRBC IgG를 coating시켜서 macrophage의 食食能을 알아보았는데 略述하면 다음과 같다. 즉 Alsever solution에 貯藏되었던 SRBC를 HBSS로 1000 r.p.m.의 속도로 3분간 遠心分離하고 씻은후, 다시 HBSS로 1×10⁶cell/ml의 농도로 조정 한 후 rabbit anti-SRBC IgG를 1/100부피 비율로 가한 다음 37°C, shaking incubator에서 30분간 반응시켰다. 다시 20ml의 HBSS를 가하고 1000 r.p.m.의 속도로 3분간 遠心分離하여 붙지 않은 IgG를 씻어버린 다음 HBSS를 가하여 적당히 稀釋된 SRBC를 incubator에 보관되어 있던 각 그룹별 macrophage에 4ml씩 넣고 25분간 반응시키고 다시 37°C의 PBS로 2회 씻어서 부착되지 않은 赤血球들을 除去하였다. 附着能의 경우와 같은 방법으로 부착되어 있는 300개의 macrophage중에서 赤血球를 5개 이상 食食하거나 食食중인 세포를 세어서 그 백분율을 구하였다.

3. 統計處理

多様な 實驗으로부터 얻은 結果는 Mean S.D.로 記錄하였다. 有意性 檢證은 Student's T-test 分析 方法을 利用하여 決定하였다.

성적과 고찰

肝은 제일 먼저 成熟되는 가장 큰 實質 臟器로 旺盛한 造血作用과 各種 體內代謝와 解毒機能을 擔當하고, 또한 代謝性, 毒物性, 循環系性, 微生物性, 腫瘍性 등의 廣範圍한 原因으로 자주 損傷을 받기도 한

다³⁾. 우리나라의 경우 肝炎 바이러스, 특히 B型 肝炎 바이러스에 의한 慢性 肝疾患의 罹患率이 世界的으로 높은 편인데, 死亡率에 있어서도 全體 死因中 5位를 차지할 정도로 높게 나타나 개인은 물론 국가적으로도 시급히 해결해야 하는 중요한 문제로 인식되고 있다⁴⁾.

이러한 肝炎을 포함한 肝疾患의 治療로 현재까지 알려진 西洋醫學的인 治療法에는 항바이러스제, 면역조절제, 그리고 肝機能을 도와주는 보조적인 치료 등이 있으나 肝炎 자체의 진행을 막는 만족스런 치료방법은 제시되지 못하고 있는 실정이고, 또한 바이러스性 肝疾患에 대한 正確한 病態기전도 밝혀지지 않고 있는 실정이다⁵⁾.

韓醫學에서는 《素問·評熱病論》⁶⁾의 “邪氣所湊 其氣必虛”와 《素問·刺法論》⁷⁾에서 “正氣存內 邪不可干”이라 하여 疾病의 發生原因 및 治療를 個體의 內的 防禦因子에 중점을 두었는데, 이는 바이러스性 肝疾患을 포함한 慢性 肝疾患의 肝細胞 損傷에 대해 人體 免疫應答의 結果로 보며 治療에 있어서도 免疫調節劑가 주가 되는 최근의 西洋醫學的인 觀點과 매우 유사하다고 여겨진다. 즉 肝炎 바이러스는 그 자체로서의 病變誘發能은 전혀 없으나 다만 人體의 免疫監視能(immune surveillance)과의 상관관계에서 肝疾患이 誘發되는 것이니, 대부분의 感染者는 健康한 免疫시스템에 의해 본인도 모르는 사이에 바이러스가 제거되거나 혹은 6개월 이내에 완벽한 치유 및 영원한 防禦機能이 형성되는 반면, 주로 新生兒 感染이나 과도한 알콜섭취 및 過勞나 스트레스 혹은 다른 질환에 罹患중인 경우처럼 免疫能이 완벽하지 못한 일부에게는 慢性化되어 持續的인 肝細胞의 파괴 및 纖維化와 再生結節 形成, 혹은 反復된 遺傳子 變異의 結果로 肝硬變이나 癌의 發生이 促進되는 것이다. 逆說的으로 장기이식후의 강력한 免疫抑制劑를 투여중인 환자는 肝炎바이러스에 감염 되어도 肝細胞의 破壞가 유도되지 않는 사실은 이를 더욱 뒷받침하는 例라 하겠다⁸⁾.

現在 大田大學校 附屬 韓方病院 肝系內科 教室에

서 바이러스性 肝炎患者를 중심으로 기타의 肝疾患患者의 治療를 위해 현재 處方되어 臨床의 效果를 보여주고 있는 加味淸肝湯은 2000年 前부터 黃疸 治療에 代表的으로 使用되어져 왔던 茵陳五苓散과 金¹⁾이 創方한 生肝健脾湯의 加減方으로, 위에서 言及한 여러 가지 原因들에 의해 免疫能이 완벽하지 못하여 慢性的으로 肝細胞 破壞 및 纖維化가 이루어지는 과정에서 濕熱症狀과 함께 肝陰不足 및 血熱症狀를 동반하기 때문에 生肝健脾湯 중 活血化瘀作用이 있는 三稜, 蓬朮을 除하고 淸熱涼血作用이 있는 牛角, 鱉甲을 加하여 淸熱利濕, 退黃疸시키는 茵陳과 함께 君藥으로 하고, 利水滲濕作用이 있는 澤瀉, 猪苓과 健脾化濕作用이 있는 山查肉, 白朮, 白茯苓, 厚朴, 藿香, 木香, 砂仁, 甘草, 枳實, 青皮, 生薑 등¹⁵⁾으로 구성하였다.

이에 著者는 加味淸肝湯을 免疫學的 측면에서 實驗의 研究를 통해 그 效果를 觀察하고자 肝細胞 保護作用을 비롯한 抗原의 除去와 抗體生成에 일차적인 역할을 하는 macrophage의 기능, 綿羊赤血球를 이용한 IgM生成能, 淋巴細胞들에 대한 영향을 觀察하여 考察한 바 다음과 같다.

D-galactosamin의 투여는 肝內에 UDP, UDP-glucose, UDP-galactose와 UDP-glucuronate의 감소와 함께 UDP-hexosamines과 UDP-N-acetyl-hexosamines의 합성으로 hepatic uracil nucleotides의 缺損을 초래한다. 이러한 hepatic uracil nucleotides의 缺損은 肝內에 RNA와 protein syntheses를 減少시키고, small organs들에 損傷을 주게된다. 이러한 損傷機轉은 마치 바이러스성 肝炎에 의한 肝細胞 損傷機轉과 유사하여 肝細胞 損傷에 대한 좋은 실험적 모델이 된다¹⁶⁾. D-galactosamine만 50mM/ml 투여한 control 그룹에서는 AST가 41.5±3.94 IU/L인데 비해 加味淸肝湯을 5 μ g, 50 μ g, 500 μ g 동시에 처리한 群에서 각각 35.3±2.16 IU/L, 30.5±3.12 IU/L, 21.8±1.94 IU/L로 濃度 依存的으로 有意性있게 나타나 加味淸肝湯은 肝細胞 保護作用이 있는 것으로 思料된다.(Table 2)

Macrophage는 結合組織 뿐만이 아니라 肝臟, 淋巴關係, 骨髓 등의 血管內에서 특수한 內皮細胞로서 존

재하는데 이들은 體內에서 食食作用을 하는 다른 細胞들과 더불어 macrophage system 또는 細網內皮系(reticulo-endothelial system)를 形成한다. 이 細網內皮系는 食食作用과 아울러 抗體生產과 여러 免疫 活性物質을 生產함으로써 人體免疫의 恒常性과 防禦機轉에 중요한 역할을 하는데 이러한 macrophage 및 細網內皮系의 活性를 遮斷시키는 물질로는 silica, carrageenan, carbon particle 등이 있으며, 이들은 免疫反應에 있어서 macrophage의 역할을 糾明하는데 널리 사용되고 있다¹⁷⁾.

加味淸肝湯을 3일 간 投與하고 난 뒤 carrageenan(100mg/kg)을 腹腔內 投與後 carbon의 濃度를 측정한 결과 control 그룹의 carbon clearance(반감기)가 42.3±9.40min인데 반해서 加味淸肝湯을 투여한 그룹은 30.6±7.95min와 29.9±10.80min으로 carbon clearance를 有意性 있게(P<0.05) 증가시켰다.(Table 3)

肝臟의 組織觀察에서도 control 그룹은 壞死된 肝細胞들이 非正常的으로 核이 결여된 채로 보였고 간간이 炎症細胞의 浸潤을 볼 수 있었는데 반해, 加味淸肝湯 投與群은 대부분이 炎症反應과 核이 소실된 壞死 肝細胞는 보이지 않았으며 旺盛한 細胞分裂을 볼 수 있었다.(Fig. 1.)

Macrophage의 또다른 중요한 역할은 많은 immunogen들을 presentation시킴으로써 immunoglobulins의 生成을 誘導하는 것이다¹⁷⁾. 一般的으로 SRBC, KLH, tetanus toxoid와 같은 外部抗原을 注入하면 B Lymphocytes의 plasma cells로의 分化로부터 많은 IgM이 生成된다¹³⁾. 그러므로 抗體形成을 抑制하는 dexametason(1mg/kg)을 먼저 投與 後 SRBC를 注入한 뒤 control 그룹과 加味淸肝湯 투여한 그룹과의 plaque-forming cell assay를 分析하면 control 그룹이 10.7±2.2개인 반면 高濃度로 加味淸肝湯을 투여한 그룹에서는 13.8±0.8개로 有意性(P<0.05)있는 抗體形成能의 增加를 보였다.(Table 4, Fig. 2) 이러한 결과는 Kuffer cell의 SRBC antigen을 presentation시키는 機能과 有關하다고 볼 수 있다. 이로써 加味淸肝湯은 간에 존재하고 있는 macrophage인 Kuffer cell의 機能을 活性化시키는 것으로 思料된다.

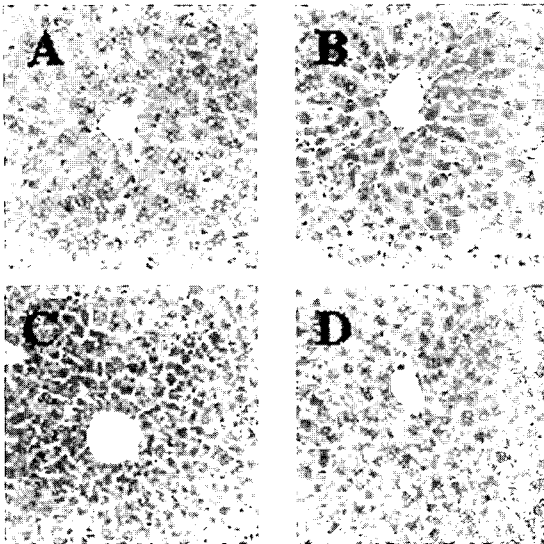


Fig. 1 Histopathology of liver.
Wright-Giemsa stain of liver on the 5th day after carrageenan injection(i.p)x 400
A(normal): Non-treated group with carrageenan or CGT
B(control): Treated group with only carrageenan(100mg/kg)
C(CGT100mg): Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(100 μ g/ml)
D(CGT1000mg): Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(1,000 μ g/ml)

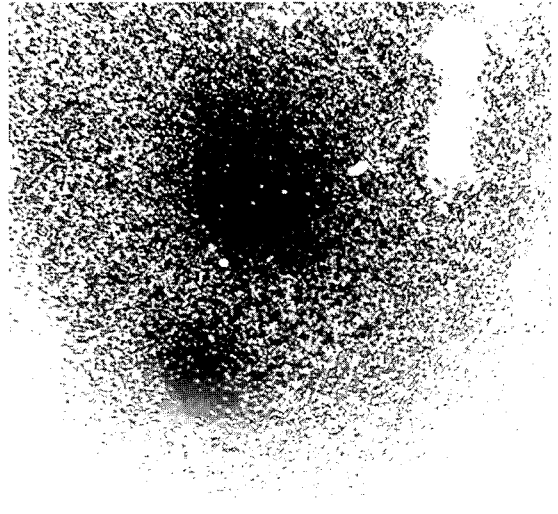


Fig. 2 Formed plaque with spleen cell, SRBC and complement.

加味淸肝湯이 脾臟內 淋巴球 增殖에 直接的으로 미치는 영향을 보고자 대표적인 B-cell mitogen인 LPS(Lipopolysaccharide)와 T-cell mitogen인

Table 2. The Effect of GCT on Hepato-Protection

Group (6 well per group)	Released amount			
	Control	GCT 5 μ g	GCT 50 μ g	GCT 500 μ g
AST(IU/L)	41.5 3.94 ^{a)}	35.3 2.16*	30.5 3.12**	21.8 1.94***

a) Mean \pm S.D.

Control : Treated group with only D-galactosamine(50mM/ml),
CGT 5 μ g: Treated group with D-galactosamin(50mM/ml) and CGT(5 μ g/ml),
CGT 50 μ g: Treated group with D-galactosamin(50mM/ml) and CGT(50 μ g/ml),
CGT 500 μ g: Treated group with D-galactosamin(50mM/ml) and CGT(500 μ g/ml),

* P-value : Statistically significant as compared with control group
(* :P<0.05, * * :P<0.01, * * * :P<0.001)

Table 3. The Effect of GCT on Phagocytosis

Group (8 mice per group)	Carbon clearance(t1/2)			
	Normal	Control	GCT 100mg	GCT1,000mg
min	27.6 7.76 ^{a)}	42.3 9.40	30.6 7.95*	29.9 10.80*

a) Mean \pm S.D.

Normal: Non-treated group with carrageenan or CGT,
Control: Treated group with only carrageenan(100mg/kg),
CGT100mg: Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(100 μ g/ml),
CGT1,000mg: Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(1,000 μ g/ml).

* P-value : Statistically significant as compared with control group(* : P<0.05)

Table 4. The Effect of GCT on IgM Production

Group (4 mice per group)	Flaque-formation			
	Normal	Control	GCT 100mg	GCT1,000mg
Number	19.2 2.0 ^{a)}	10.7 2.2	11.7 1.2	13.8 0.8*

a) Mean±S.D.

Normal: Non-treated group with carrageenan or CGT

Control: Treated group with only carrageenan(100mg/kg)

CGT100mg: Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(100µg/ml)

CGT1,000mg: Treated group with carrageenan(100mg/kg) and CGT(1,000µg/ml)

* P-value : Statistically significant as compared with control group (* :P<0.05)

Table 5. The Effect of GCT on B Lymphoproliferation

Group (3 well per group)	c.p.m			
	Control	GCT 5µg	GCT 50µg	GCT 500µg
LPS 1 µg	40,398 982 ^{a)}	49,552 3590*	57,011 2,706***	46,804 2,657*
LPS 10 µg	54,122 3,027	64,183 2,477*	65,411 3,054*	46,997 2,305

a) Mean±S.D.

Control : Treated group with only LPS(1µg or 10µg)

CGT5µg: Treated group with LPS(1µg or 10µg) and CGT(5µg/ml)

CGT 50µg: Treated group with LPS(1µg or 10µg) and CGT(50µg/ml)

CGT 500µg: Treated group with LPS(1µg or 10µg) and CGT(500µg/ml)

* P-value : Statistically significant as compared with control group

(* :P<0.05, * * :P<0.01, * * * :P<0.001)

ConA(Concanavalin A)를 加味清肝湯과 함께 培養한 후 분열시 끼어들어간 [³H]-thymidine을 측정후 분석하면 濃度依存的으로 結果가 나타났진 않았지만, LPS 1µg에서 control 40,398 ± 982 c.p.m에 비해 加味清肝湯 투여한 군 50µg에서 각각 57,011 ± 2,706 c.p.m이었으며(P<0.001) LPS 10µg에서 control 54,122 ± 3,027 c.p.m에 비해 加味清肝湯 투여한 군 50µg에서 65,411 ± 3,054 c.p.m으로 비교적 有意性 있게 (P<0.05) 나타났다.(Table 5)

또한 T 淋巴球증식에서는 ConA 1µg에서 control 28,338 ± 1581 c.p.m에 비해 加味清肝湯 투여한 그룹 500µg에서 34,286 ± 2,202 c.p.m이었으며 ConA 5µg에서 control 41,095 ± 812 c.p.m에 비해 加味清肝湯 투여한 그룹 50µg에서 57,365 ± 8,762 c.p.m으로 나타나 加味清肝湯은 T 및 B 淋巴球的 增殖을 有意性 있게(P<0.05) 活性化시켰다.(Table 6)

Macrophage의 附着能은 好中球의 支持體 表面에

附着하는 能力을 말하며 貪食의 前段階로서 細胞의 活性과 밀접한 관계가 있다. 이러한 腹腔 macrophage의 附着能과 貪食能에 대해 加味清肝湯이 미치는 效果를 分析하면, 附着能에서는 control 361.3 ± 3.21개에 비해 加味清肝湯 투여한 그룹 5µg, 50µg, 500µg에서 각각 413.3 ± 10.44, 838.3 ± 107.7, 834.3 ± 27.0으로 濃度依存的으로 有意性 있게(P<0.05, P<0.01, P<0.001) 나타났다.(Table 7)

貪食能에서는 control 50.4%에 비해 加味清肝湯 投與群 5µg, 50µg, 500µg에서 각각 71.3%, 78.8%, 85.3%로 역시 濃度依存的으로 有意性 있게(P<0.05, P<0.01, P<0.001) 나타났다.(Table 8) 이로써 加味清肝湯은 macrophage의 附着能과 貪食能을 활성화시키는 것으로 思料된다.

以上の 結果를 綜合하면 加味清肝湯은 D-galactosamine 誘因性的 肝細胞 毒性에 대한 肝細胞 保護作用과 抗原의 除去와 抗體生成에 一次的인 役割을

Table 6. The Effect of GCT on T Lymphoproliferation

Group (3 well per group)	c.p.m			
	Control	GCT 5 μ g	GCT 50 μ g	GCT500 μ g
ConA 1 μ g	28,338 1581 ^{a)}	27,671 1,036*	34,233 1,634*	34,286 2,202
ConA 5 μ g	41,095 812	49,805 1,242*	57,365 8,762	37,596 1,370

a) Mean \pm S.D.
 Control : Treated group with only ConA(1 μ g or 5 μ g)
 CGT5 μ g: Treated group with ConA(1 μ g or 5 μ g) and CGT(5 μ g/ml)
 CGT 50 μ g: Treated group with ConA(1 μ g or 5 μ g) and CGT(50 μ g/ml)
 CGT500 μ g: Treated group with ConA(1 μ g or 5 μ g) and CGT(500 μ g/ml)
 *P-value: Statistically significant as compared with control group(* :P<0.05)

Table 7. The Effect of GCT on Macrophage Adherence

Group (3 dish per group)	Cell count			
	Control	GCT 5 μ g	GCT 50 μ g	GCT500 μ g
Adherent macrophage	361.3 3.21 ^{a)}	413.3 10.44**	838.3 107.7*	834.3 27.0***

a) Mean \pm S.D.
 Control : Not-treated group
 CGT5 μ g: Treated group with CGT(5 μ g/ml)
 CGT 50 μ g: Treated group with CGT(50 μ g/ml)CGT500 μ g: Treated group with CGT(500 μ g/ml)
 * P-value: Statistically significant as compared with control group
 (* :P<0.05, * * :P<0.01, * * * :P<0.001)

Table 8. The Effect of GCT on Macrophage Phagocytosis

Group (3 dish per group)	Phagocytosing macrophage in 300 cells			
	Control	GCT 5 μ g	GCT 50 μ g	GCT500 μ g
Cell count	151.3 11.0 ^{a)}	214.0 7.5**	234.7 9.0***	256.0 7.2***
%	40.4	71.3	78.8	85.3

a) Mean \pm S.D
 Control : Not-treated group
 CGT5 μ g: Treated group with CGT(5 μ g/ml)
 CGT 50 μ g: Treated group with CGT(50 μ g/ml)
 CGT500 μ g: Treated group with CGT(500 μ g/ml)
 * P-value: Statistically significant as compared with control group
 (* : P<0.05, * * :P<0.01, * * * :P<0.001)

하는 macrophage의 機能을 活性化시켰으며, dexametasone에 의해 抑制된 抗體 生成能을 增加시키고, LPS와 ConA에 대한 淋巴球들의 增殖과 腹腔 macrophage의 附着能과 貪食能을 有意性 있게 增加시켜 다양한 肝疾患에 대하여 肝細胞 保護作用과 免疫 機能 調節에 뚜렷한 효과가 있으며, 向後에 좀더 具體 的인 免疫學的 機轉의 實驗이 必要하리라 思料된다.

결론

加味淸肝湯의 肝細胞 保護作用 및 免疫調節 作用을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 加味淸肝湯은 D-galactosamine 誘因性的의 肝細胞 毒性을 有意性 있게 防止하였다.
2. 加味淸肝湯은 carbon clearance를 有意性있게 增加시켰다.

3. 加味淸肝湯은 dexametason에 의해 抑制된 抗體生成能을 有意性있게 增加시켰다.

4. 加味淸肝湯은 LPS와 ConA에 대한 淋巴球들의 增殖을 有意性 있게 增加시켰다.

5. 加味淸肝湯은 腹腔內 macrophage의 附着能과 貪食能을 有意性 있게 增加시켰다.

以上으로 加味淸肝湯은 大田大學校 附屬 韓方病院 肝系內科에 內院한 肝疾患者에게서 얻어지는 臨床의 效果들을 實驗의으로 뒷받침한다고 볼 수 있으며, 向後 單一成分의 分離나 좀더 具體的인 免疫學的 機轉의 實驗이 必要하리라 思料된다.

참고문헌

1. 김병운, 우홍정, 김덕호, 강병기, 임재훈, 강윤희, 조종관, 최서형, 장문석. 간계내과학. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1989;24,154, 647.
2. 정일천. 조직학. 서울:대한의학협회. 1988:343-344.
3. 손태중. 병리학. 서울:대한병리학회. 1990:765.
4. 김완희, 최달영. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1996:139.
5. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:165.
6. Isselbacher KJ. HARRISON'S 내과학. 서울:정답출판사. 1997:1544-1546.
7. 통계청. 96년도 사망원인통계결과. 서울: 1996:20-40.
8. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체 간세포의 TGF 1-induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2000;21(1):53-61.
9. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. APPLTON&LANGE. Stanford. 1997: 541-538.
10. 광경규, 김연진, 조종관. 生肝健脾湯을 이용한 慢性肝炎 35例에 대한 臨床分析. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1997;6:313-318.
11. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. The Journal of Cell Biology. 1996;43:520-506.
12. Biozzi G, Benacerraf B, Stiffel C, and Halpern BN. Etude quantitative de l'activite granulopexigie du systeme reticulo-endothelial chez la souris. C. R. Soc. Biol. 1954;148:448-431.
13. Luster MI, Dean JH, and Moore JA. Evaluation of Immune Functions in Toxicology. Methods in Immunotoxicology. 1982:586-561.
14. 汪機. 黃帝內經素問今釋. 서울:成輔社. 1983:164,412.
15. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李映鍾, 金先熙. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1998:47,104,151-156,205,214-233,289-323,382,485,491.
16. Lim HK, Kim HS, Chung MW, Kim YC . Protective effects of bergenin. the major constituent of Mallotus japonicus on D-galactosamine-intoxicated rat hepatocytes. Ethnopharmacology. 2000; 70:72-69.
17. Roitt I, Brostoff J, Male D.. Immunology. London: Mosby International Ltd. 2000:23,9,4,3.