

固眞飮子가 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

강대원, 강석봉

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Gojineumja* on Immunosuppression Induced by Methotrexate in Rat

Dae-Won Kang, Seok-Bong Kang

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Hanny University

Objectives : To examine the effects of *Gojineumja* on white rats which deteriorated immunity caused by Methotrexate(MTX), first of all, MTX was fed to the rats once a day for 4 day.

Methods : After the immune response of the rats are deteriorated, dried extracts of *Gojineumja*(GJE) mixed in water was fed to the white rats once a day for 14days. The next conclusion was made by examining the rates of B-cells and T-cells of the peripheral blood and the changes in rates of CD4+ T-cells and CD8+ T-cells of the blood sampled from the spleen and peripheral region. Especially the count of CD3+ CD4+ T-cells of the peripheral blood and the count of CD3+ CD4+ T-cells of the spleen the count of CD4+ / CD8+ T-cell of the peripheral blood and the spleen proved the significant effect of increasing immune responses statistically.

Results :

① The following are the summary of the results.

- ② The percentage of B lymphocyte of peripheral blood was increased significantly in GJE group as compared with control group.
- ③ The percentage of CD3+ CD4+ T-cell of peripheral blood was increased significantly in GJE group as compared with control group.
- ④ The percentage of CD3+ CD8+ T-cell of peripheral blood was not different statistically.
- ⑤ The percentage of CD4+ / CD8+ T-cell of peripheral blood was increased significantly in GJE group as compared with control group.
- ⑥ The percentage of CD3+ CD4+ T-cell of spleen was increased significantly in GJE group as compared with control group.
- ⑦ The percentage of CD3+ CD8+ T-cell was not different statistically.
- ⑧ The percentage of CD4+ / CD8+ T-cell was not different statistically.

Conclusions : *Gojineumja* has an effect of increasing immune responses on white rats with deteriorated immunity caused by MTX.

Key Words: *Gojineumja*, Methotrexate, Immunosuppression

1. 緒 論

면역이란 자연 면역와 획득 면역(특이성면역)으

로 나누어진다. 특이성 면역는 체액성 면역와 세포성 면역으로 구분되며 체액성 면역는 B림파구가 주관하며 항체를 생성하며 항원에 대항한다. 세포성 면역는 T림파구가 주관하며 주로 바이러스 등의 세포내 항원에 대항한다¹.

이러한 면역의 개념은 한의학에서는 邪氣에 대항

· 접수 : 2004. 10. 11 · 채택 : 2004. 10. 22
· 교신저자 : 강석봉, 대구광역시 수성구 상동 165
대구한의대학교 한의과대학 신계내과교실
(Tel. 053-770-2102 Fax. 053-770-2055
E-mail : kangsb@dhu.ac.kr)

하는 正氣로 볼 수 있다².

이러한 正氣는 인체의 정상적 기능 활동과 질병에 대한 저항능력을 말하며 虛라는 개념도 인간의 구성요소의 일부가 부족하여 저항능력이 저하된 상태를 말하는 것으로 正氣虛弱은 질병발생의 근본적 원인이 되는바 이러한 경우 신체의 결핍을 돕고 항병력을 증강시켜주는 補養藥을 사용하여 扶正祛邪³시킨다.

固眞飮子는 李⁴의 <醫學入門>에 처음 收載된 처방으로서 “五味를 갖추고 五臟을 補한다”고 했고 許⁵의 <東醫寶鑑>에서는 “陰陽이 俱虛하고 氣血이 부족할 때 사용한다”고 했으므로 正氣를 補해서 면역기능을 향진시킬 것으로 생각된다.

최근의 면역과 관련된 연구는 十全大補湯⁶, 補中益氣湯⁷ 등의 처방을 사용한 연구가 보고되었다. 그러나 固眞飮子에 대한 연구는 없었다.

이에 논자는 固眞飮子의 면역기능저하에 미치는 영향을 살펴보고자 MTX로 흰쥐의 면역기능저하를 유발시키고 固眞飮子추출물을 투여하여 말초혈액의 B細胞率과 T細胞率을 측정하고 脾臟과 말초혈액내 CD4+ T細胞率과 CD8+ T細胞率의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 實驗材料

(1) 動物

동물은 체중 200±20g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였으며, 사료는 고행사료(구성성분: 조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6% 인 0.6%)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

(2) 藥材

본 실험에서 사용된 약재는 대구한의과대학 부속 대구한방병원에서 공급하는 약재를 엄선해서 사용하였으며 처방내용은 동의보감에 수록된 固眞飮子로 내용과 한 貼의 용량은 다음과 같다.

2. 實驗方法

(1) 검액의 준비

上記한 固眞飮子 5첩 분량 240g을 5,000cc의 등근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2µm filter로 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농

The Compositions of Gojineumja(GJE)

韓藥名	生藥名	用量
熟地黄	Rehmanniae Radix	6.0
人蔘	Ginseng Radix	4.0
山藥	Dioscoreae Radix	4.0
當歸	Angelicae gigantis Radix	4.0
黃芪	Astragali Radix	4.0
黃柏	Phellodendri Cortex	4.0
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	3.2
白茯苓	Hoelen	3.2
杜冲	Eucommiae Cortex	2.8
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.8
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	2.0
澤瀉	Alismatis Rhizoma	2.0
山茱萸	Corni Fructus	2.0
破古紙	Psoraliae Semen	2.0
五味子	Masimowicziae Fructus	2.0
總量		6.0g

축하였다. 이 농축액을 -80°C deep freezer (SANYO, Japan)에서 한시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 52.0g의 분말을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml conical tube(Falcon, USA)에 넣어 $2-4^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel 상태를 완전히 녹여 사용하였다.

(2) 實驗動物群 分離

正常群(normal group), 對照群(control group), 實驗群(GJE group)으로 구분하여, 한 군에 10마리씩 배정하였다. 正常群은 고휘사료와 물만을 충분히 공급하였고, 對照群은 正常群과 同一한 환경에서 MTX를 투여하였고, 實驗群에 투여하는 검액과 같은 양의 생리식염수를 경구투여 하였다. 實驗群은 對照群과 동일한 방법으로 MTX를 투여하고 固眞飲子를 경구투여 하였다.

(3) MTX를 이용한 免疫 低下

Methotrxate(MTX; C20H11N8O5 Sigma, U.S.A) 분말을 2mg/kg으로 조정하여 생리식염수에 녹여 1ml씩 1일, 1회, 4日間 경구투여하여 면역력을 저하시켰다.

(4) 검액 투여

MTX투여로 면역저하를 유발한 다음 이틀째 되는 날부터 固眞飲子 건조액기스를 마리 당 192.0mg/200g씩 증류수로 희석하여 실험군의 흰쥐에 1일 1회 14일간 일정한 시각에 경구 투여하였다. 대조군은 동량의 식염수를 경구 투여하였다.

(5) 採血

클로로포름으로 마취하고 心臟穿刺하여 혈액을 EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt)가 들어 있는 병에 넣어 잘 섞어서 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

(6) 脾臟細胞의 준비

心臟採血 후 腹部를 70% 알콜로 완전히 도포한 후 무균적으로 脾臟을 적출한 다음, 脾臟 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4°C RPMI-1640 (GibcoBRL, NY, USA)배지로 2회 세

척한 뒤, RPMI-1640이 들어있는 petri dish에서 작은 해부가위로 脾臟을 잘게 자르고 멸균된 유리막대로 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 부유시켰다. 이 부유액을 스테인레스 철망(mesh No. 100: 청계상공사, 한국)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포덩어리를 제거하고 RPMI-1640으로 1회, HBSS(Hanks Balanced Salt Solution, Cat. No. 21250-089, GibcoBRL, USA)로 2회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, $10\times$ HBSS로 2회 세척하고 RPMI-1640배지로 한번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 脾臟細胞를 재 부유하였다.

(7) 末梢血液과 脾臟내의 B細胞率과 T細胞率 측정
혈청은 15일째에 心臟穿刺를 통해 얻었다. 심장 채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 x 75 시험관에 $100\mu\text{l}$ 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 $0.1\mu\text{l}$ 가하고 다시 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody (Caltag Laboratories)를 $0.5\mu\text{g}$ 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다.

Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심 분리 한다. 상층액을 버리고 $500\mu\text{l}$ 의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

(8) 脾臟과 末梢 血液내 CD4+ T細胞率의 변화
심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 x 75 시험관에 $100\mu\text{l}$ 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 $0.1\mu\text{l}$ 가하고 다시 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 $0.5\mu\text{g}$ 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton

dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에 서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer (Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

(9) 脾臟과 末梢 血液내 CD8+ T細胞率의 變化
 심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 x 75 시 험관에 100 μ l 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 μ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 0.5 μ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에 서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer (Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

3. 統計分析

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 11.0)를 이 용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 \pm 표준오차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with

multiple comparisons(Duncan's method)으로 분석하 였다. 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 實驗成績

1. 末梢血液내의 B lymphocyte 率에 미치는 影響
 末梢血液의 B lymphocyte 比를 살펴본 결과 正常 群(normal group)은 40.14 \pm 1.86%, 對照群(control group)은 36.35 \pm 0.89%, 實驗群(GJE group)은 34.14 \pm 1.49%으로, 집단 간 B lymphocyte의 率은 통 계적으로 유의한 차이가 없었다(F=4.250, p=0.034, ANOVA test)(Table 1).
2. 末梢血液내의 T lymphocyte 率에 미치는 影響
 末梢血液의 T lymphocyte比를 살펴본 결과 正常 群(normal group)은 51.47 \pm 1.94%, 對照群(nontrol group)은 43.02 \pm 1.77%, 實驗群(GJE group)은 50.35 \pm 2.47%으로, 집단 간 T lymphocyte率은 통계 적으로 有意한 차이가 있었으며(F=4.841, p=0.024, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하 여 각 집단간 차이의 유의성을 검증한 결과 對照群 의 T lymphocyte率은 正常群에 비하여 유의한 감소 를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 유의한 증 가를 보였다(Table 2).
3. 末梢血液내의 CD3+CD4+T-cell率에 미치는 影響
 말초혈액의 CD3+CD4+T-cell率을 살펴본 결과 正常群(normal group)은 34.76 \pm 2.05%, 對照群 (control group)은 25.66 \pm 1.50%, 實驗群(GJE group)

Table 1. Effect of Gojineumja on the percentage of B lymphocyte of peripheral blood in rat

	B lymphocyte in peripheral blood (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	40.14 \pm 1.86	0.34 (F=4.250)
Control(n=6)	36.35 \pm 0.89	
GJE(n=6)	34.14 \pm 1.49	

Value are expressed as mean \pm SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX. GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

은 35.33±1.51%으로, 집단 간 CD3+CD4+T-cell率は 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=10.082 p=0.002, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+T-cell率は 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table 3).

4. 末梢血液内の CD3+CD8+ T-cell率에 미치는 影響
末梢血液의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴본 결과

正常群(normal group)은 14.69±1.08%, 對照群(control group)은 18.66±1.20%, 實驗群(GJE group)은 18.68±1.03%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell率は 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=4.268, p=0.034, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 T lymphocyte率は 正常群에 비하여 유의한 증가를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 유의성있는 변화가 없었다(Table 4).

Table 2. Effect of Gojineumja on the percentage of T lymphocytes of peripheral blood in rat

	T lymphocytes in peripheral blood (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	51.47±1.94 A	0.024 (F=4.841)
Control(n=6)	43.02±1.77 B	
GJE(n=6)	50.35±2.47 A	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

Table 3. Effect of Gojineumja on the percentage of CD3+CD4+ T-cell of peripheral blood in rat

	CD3+CD4+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	34.76±2.05 A	0.002 (F=10.082)
Control(n=6)	25.66±1.50 B	
GJE(n=6)	35.33±1.51 A	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX. GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

Table 4. Effect of Gojineumja on the percentage of CD3+CD8+ T-cell of peripheral blood in rat

	CD3+CD8+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	14.69±1.08 A	0.034 (F=4.268)
Control(n=6)	18.66±1.20 B	
GJE(n=6)	18.68±1.03 AB	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX. GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

5. 末梢血液내의 CD4+/CD8+ T-cell比率에 미치는 影響

末梢血液의 CD4+/CD8+ T-cell比率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 2.44±0.26, 對照群(Control group)은 1.40±0.12, 實驗群(GJE group)은 1.90±0.10으로, 집단 간 CD4+/CD8+ T-cell比率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=8.893, p=0.003, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+ T-cell比率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table 5).

6. 脾臟내의 CD3+CD4+T-cell率에 미치는 影響

脾臟내의 CD3+CD4+T-cell比를 살펴본 결과 正常群(normal group)은 37.42±2.35%, 對照群(control group)은 29.61±1.92%, 實驗群(GJE group)은 34.20±1.51%으로, 집단 간 CD3+CD4+T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=3.993 p=0.041,

ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table 6).

7. 脾臟내의 CD3+CD8+ T-cell率에 미치는 影響

脾臟의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴본 결과 正常群(normal group)은 18.16±0.63%, 對照群(control group)은 20.32±1.09%, 實驗群(GJE group)은 20.50±1.04%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 없었다(F=1.892, p=0.185 ANOVA test)(Table 7).

8. 脾臟내의 CD4+/CD8+ T-cell比率에 미치는 影響

脾臟내의 CD4+/CD8+比率을 살펴본 결과 正常群(normal group)은 2.07±0.15, 對照群(control group)은 1.47±0.12, 實驗群(GJE group)은 1.69±0.11으로, 집단 간 CD4+/CD8+ T-cell比率은 통계적으로 유의

Table 5. Effect of Gojineumja on the CD4+/CD8+ T-cell ratio of peripheral blood in rat

	CD4+/CD8+ T-cell ratio	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	2.44±0.26 A	0.003 (F=8.893)
Control(n=6)	1.40±0.12 B	
GJE(n=6)	1.90±0.10 A	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

Table 6. Effect of Gojineumja on the percentage of CD3+CD4+ T-cell of spleen in rat

	CD3+CD4+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	37.42±2.35 A	0.041 (F=3.993)
Control(n=6)	29.61±1.92 B	
GJE(n=6)	34.20±1.51 A	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

Table 7. Effect of Gojineumja on the percentage of CD3+CD8+ T-cell of spleen in rat

	CD3+CD8+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	18.16±0.63	0.185 (F=1.892)
Control(n=6)	20.32±1.09	
GJE(n=6)	20.50±1.04	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX. GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

Table 8. Effect of Gojineumja on the CD4+/CD8+ T-cell ratio of spleen in rat

	CD4+/CD8+ T-cell ratio	p-value* (F-value)
Normal(n=6)	2.07±0.15 A	0.021 (F=5.040)
Control(n=6)	1.47±0.12 B	
GJE(n=6)	1.69±0.11 AB	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of MTX GJE: treated with Gojineumja for 14 days after administration of MTX

* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

한 차이가 있었으며(F=5.040, p=0.021, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+T-cell比率는 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, GJE group은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다(Table 8).

IV. 考 察

한의학의 관점에서 면역이라는 개념은 正氣는 질병에 대한 인체의 저항력을 말하며 邪氣는 질병을 일으키는 모든 발병원인을 가리킨다. 精·神·津液·氣血 등은 모두 인간이 성장하고 발육하며 健壯하게 하는 물질 및 원동력으로 모두 正氣의 범주에 속한다⁸.

<素問·刺法論>⁹의 “正氣存內 邪不可干 避其得氣”. <素問·評熱病論>⁹의 “邪之所湊 其氣必虛” <靈樞·口門>¹⁰의 “邪之所在 皆爲不足” <靈樞·百病始

生篇>¹¹의 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人” 등은 모두 正氣와 邪氣의 관계로 질병을 설명하고 있다. 따라서 외부에서 들어오는 病因에 대한 正氣의 작용으로 저항력이 형성되는데 이는 면역반응기능과 유사하여 正氣와 病邪간의 抗爭은 면역현상으로 볼 수 있다¹². 이러한 관련성에 근거하여 최근 면역학적인 측면에서 鍼灸, 韓藥 및 藥鍼液의 면역 증강효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

최근의 면역에 대한 연구로는 十全大補湯⁶, 補中益氣湯⁷의 면역효과에 대하여 연구하였고, 固眞飮子에 대한 연구는 없었다. 특히 裴¹³, 朴¹⁴ 등은 黃芪藥鍼이 MTX로 유발된 면역저하를 개선시키는 효과에 대해 연구하였고, 崔¹⁵ 등은 四君子湯과 四物湯이 MTX로 유도된 흰쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향을 보고하였고, 李¹⁶ 등은 蜂毒 藥鍼刺戟이 MTX로 유도된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향을 보고하였다.

固眞飮子は 주로 補精시키면서 陰과 陽이 동시에 虛한 것을 補해 주는데 자주 사용하였다. 李⁴의 <醫

學入門>에서 固眞飮子를 ”이 處方은 五味를 갖추고 기의 沖和한 것을 숭하며 血을 기르고 脾·胃를 다스리며 五臟을 補하면서 寒熱의 偏併과 過不及의 부작용이 없으며 中年以上の 사람이 常服하면 좋은 藥이다“라고 설명하고 있고, 許⁵의 <東醫寶鑑>의 虛勞門에서 “固眞飮子는 陰陽이 다 虛하고, 氣血이 不足하여 飲食 생각이 적고 五心이 煩熱하며 潮熱하고 自汗하여 精氣가 滑脫하고 行步가 無力하며 或 泄瀉하고 脈度가 沈弱하며 咳嗽 痰多하고 장차 勞瘵가 되려는 症을 다스린다”고 설명되어 있다. 固眞飮子의 處方構成은 熟地黃, 人蔘, 山藥, 當歸, 黃芪, 黃柏, 陳皮, 白茯苓, 杜沖, 甘草, 白朮, 澤瀉, 山茱萸, 破古紙, 五味子¹⁷⁻⁹등으로 대부분이 補肝腎, 補血藥과 補氣藥으로서 이들 각각의 효능을 살펴보면, 熟地黃은 補血·滋陰하며 人蔘은 補肺·益氣하고 山藥은 補脾胃·益肺腎하며 當歸는 補血和血·調經止痛하며 黃芪는 補氣·固表하고 黃柏은 清熱除濕·瀉膀胱相火하고 陳皮는 理氣·調中하고 白茯苓은 利水滲濕·建脾和中하고 杜沖은 補肝腎, 壯筋骨하며 甘草는 補脾胃하고 白朮은 補裨益胃, 燥濕利尿하고 澤瀉는 利水, 滲濕하고 山茱萸는 補益肝腎, 澁精하며 破古紙는 補腎, 益脾하고 五味子는 斂肺滋腎, 生津斂汗 하는 효능이 있다¹⁷⁻⁹. 따라서 본 실험에서는 固眞飮子가 면역기능에 미치는 영향을 알아보고자 MTX를 주사하여 흰쥐의 면역기능을 저하시킨 후 固眞飮子를 대조 투여하여 면역기능의 지표가 되는 말초혈액의 B細胞率과 T細胞率을 측정하고 脾臟과 末梢血液內 CD4+ T細胞率과 CD8+ T細胞率의 변화를 관찰하였다.

생체의 면역반응은 면역억제제인 MTX를 투여하면 저하되는데 이는 MTX가 folic acid와 구조상 유사하여 folic acid의 길항물질로 작용하므로 folic acid에서 folinic acid로의 전환에 관여하는 folic acid reductase를 저해하여 folic acid로 환원되는 것을 억제함으로써 DNA 합성을 방해하기 때문이며, 생체에 있어서 folic acid 결핍을 초래하며 세포독작용으로 골수를 억제하여 백혈구 감소현상이 나타나며, 腎臟毒性이 강하다²⁰⁻¹.

MTX는 동물에 투여시 식욕부진, 출혈성 설사, 점진적 체중감소, 백혈구 감소, 혼수상태에 이르게 하여 사망케한다. 또한 골수의 퇴행성 변성에도 관여하여 투여 24시간 이내에 적혈구 성숙장애, 백혈구 생성저하, 골수 장애, 림프조직내 림프세포 감소, 조혈장애로 말초혈액의 현저한 과립구 감소를 일으킨다. 이러한 MTX는 항암치료제 또는 면역억제제로 사용되며, 주로 T-cell(주로 helper T-cell)의 증식을 차단한다. 주로 絨毛膜癌에 탁월한 효과를 보이거나 골수 억압, 장관상피 탈락에 의한 궤양, 탈모증, 신장장애 등의 부작용을 일으킨다²²⁻³.

T 淋巴球는 골수에서 생겨 흉선으로 이동한 후 성숙한다. 胸線細胞는 세 단계의 중요한 발달과정을 거치게 되는데, 아주 초기의 흉선세포는 CD4도 CD8도 발현하지 않아 이들을 CD4-CD8- 또는 더블 네가티브(Double Negative)로 부른다. 다음 단계에서 이들은 CD4+CD8+ 혹은 더블 포지티브(Double Positive)되며 마지막 단계에서 흉선세포는 CD4+CD8- 혹은 CD4-CD8+ 인 싱글 포지티브(Single Positive)의 세포로 발달해간다.

T 임파구는 기능적으로 세분되는데, 그 중 보조 T 임파구와 세포용해성(혹은 세포장해성) T 임파구 외에 면역반응을 억제하는 것으로 알려진 억제 T 임파구가 있다. 이 T 임파구의 亞集團을 분석하거나 확인하는데 있어 가장 중요한 진보는 기능적으로 분화된 세포에 의해 각기 다른 세포막 단백질이 발현된다는 것을 밝혀낸 것이다.

이 단백질들이 각기 다른 임파구 집단을 구분 짓게 해주는 표현성 지표(phenotypic marker)로서 이용되는데, 대부분의 보조 T 임파구는 CD4라는 표면 단백질을, 또 대부분의 細胞溶解性 T 淋巴球는 다른 지표인 CD8이라는 표면단백질을 발현한다. 그러므로 그러한 표지에 대한 항체를 이용하여 다양한 임파구 집단을 분리하여 확인할 수 있게 되었다.

CD란 분화군(cluster of differentiation)이란 말의 영문약자로 임파구의 분화단계나 세포의 유래를 알아보기 위해 이용했던 단일 클론 항체(monoclonal antibody)의 군(cluster)에 의해 인식된 분자를 의미

하며 이로써 임파구들간의 구별이 가능해졌다. CD4와 CD8은 T 임파구 표면 당단백질로 특징적인 양상으로 MHC에 제한적인 성숙 T 임파구의 표면에서 상호배타적으로 발현되는 MHC분자의 非多形性 부위와 결합한다. CD4는 Class II MHC 분자와 직접 결합하여 T 임파구에서 발현하는데, 그 TCR은 펩타이드와 Class II MHC의 분자의 복합체를 인식하게 된다. 대부분의 CD4+ Class II MHC 제한 T 임파구는 사이토카인(cytokine)을 생산하는 보조세포의 기능적 표현형을 가지고 있다. CD4는 부착 및 신호전달의 연합기능을 수행함으로써 항원에 대한 T 임파구의 민감성이 크게 향상된다.

이들은 TCR과 밀접하게 연관되어 있고, 항원인식에 표적세포 혹은 APC위의 MHC 분자와 결합하기 때문에 공조수용체라고 부른다. 말초 α -陽性 T 임파구의 약 65%가 CD4를 발현한다. CD4의 기능적 역할은 이 분자들에 대한 특이적 항체가 생체내 및 생체외에서 T 임파구의 MHC 제한 항원자극을 억제하는 능력을 통한다. 특히 CD4에 대한 항체는 Class II MHC 제한 보조 T 임파구의 활성을 억제한다. CD4는 T 임파구 활성화에 있어 아래와 같은 두가지의 중요한 기능을 한다. 첫째, CD4는 MHC 제한 T 임파구가 MHC 분자에 대한 특이적 친화도에 의해 APCs 혹은 표적세포와의 부착을 증가시킨다. 둘째, CD4는 T 임파구가 APC상의 펩타이드-MHC를 인식할 때에 발생하는 초기 신호전달반응에 참여한다.

이처럼 CD4 보조 수용체의 부착 및 신호전달기능의 연합은 성숙 T 임파구의 항원 자극 효율을 크게 향상시킨다. 이러한 역할을 하는 임파구 표면의 표지 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역력을定量한다. 말초 CD4+T-cell 比率은 후천성면역결핍성 질환의 진전을 평가하는데 가장 보편적으로 사용하는 검사방법이며 일반적인 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있다²⁴⁻³³.

말초혈액내의 B 細胞率을 살펴보면 집단 간 B 細胞率은 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($F=4.250$, $p=0.034$, ANOVA test). 末梢血液의 T 細胞

率을 살펴보면 집단 간 T 細胞率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($F=4.841$, $p=0.024$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 T 細胞率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다. 말초혈액의 CD3+CD4+ T-cell率을 살펴보면 집단 간 CD3+CD4+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($F=10.082$ $p=0.002$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다. 말초혈액의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴보면 집단 간 CD3+CD8+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($F=4.268$, $p=0.034$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD3+ CD8+ T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 증가를 보였고, 實驗群은 對照群비하여 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 말초혈액의 CD4+/CD8+ T-cell率을 살펴보면 집단 간 CD4+/CD8+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($F=8.893$, $p=0.003$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+ T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell率을 살펴보면 집단 간 CD3+CD4+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며($F=3.993$ $p=0.041$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다. 脾臟의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴보면 집단간 CD3+CD8+ T-cell率은 통계적으로 有意한 차이가 없었다. 脾臟내의 CD4+/CD8+T-cell率을 살펴보면

집단 간 CD4+/CD8+ T-cell率은 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=5.040, p=0.021, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+ T-cell率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 實驗群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

이상의 실험결과로 固眞飮子는 체액성면역에 관여하므로 B細胞率에는 유의한 변화가 없었고 세포성 면역에 관여하는 T細胞率에는 유의한 증가가 있었다.

말초혈액내에서 CD3+ CD4+ T細胞率과 CD4+/CD8+ T細胞比率의 유의한 증가가 있었고 CD3+ CD8+ T細胞率에서는 감소하는 경향이 있었다. 脾臟細胞에서는 CD3+ CD4+ 細胞率은 유의한 증가가 있었고 CD4+/CD8+ T細胞比率은 증가하는 경향이 있었으나 有意성은 없었으며, CD3+ CD8+ 는 유의한 변화가 있었다. 따라서 固眞飮子는 脾臟細胞보다 말초혈액에서 T細胞의 기능을 활성화시키는 것으로 생각된다.

V. 結 論

固眞飮子の 면역기능저하에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MTX로 면역기능저하가 유발된 흰쥐에게 固眞飮子 건조엑기스를 투여한 후 말초혈액의 B細胞率과 T細胞率을 측정하고 脾臟과 말초혈액내의 CD4+T細胞率과 CD8+細胞率의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 말초혈액내의 B細胞率은 正常群, 對照群, 實驗群의 각 집단간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

둘째, 말초혈액내의 T細胞率에서는 對照군이 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

셋째, 말초혈액내의 CD3+CD4+T-cell率을 살펴본 결과 對照群이 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를

보였다.

넷째, 말초혈액내의 CD3+CD8+T-cell率을 살펴본 결과 對照群이 正常群에 비하여 유의한 증가를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다.

다섯째, 말초혈액내의 CD4+/CD8+T-cell率을 살펴본 결과 對照群이 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

여섯째, 脾臟內의 CD3+CD4+T-cell率을 살펴본 결과 對照群이 正常群에 비하여 有意한 減少를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

일곱째, 脾臟內의 CD3+CD8+T-cell率을 살펴본 결과 집단간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

여덟째, 脾臟內의 CD4+/CD8+T-cell率을 살펴본 결과 對照群이 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고 實驗群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

參考文獻

1. J.H.L. playfair, P.M. Lydyard. Medical Immunology made memorable Second edition. Churchill Livingstone; 2001, pp.1-4.
2. 文濬典 등. 東醫病理學(1). 서울:韓醫科大學病理學教室; 1985, p.127.
3. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫; 1984, p.65.
4. 李槌. 編註醫學入門. 서울:南山堂; 1988, pp.419-20.
5. 許浚. 東醫寶鑑. 重版. 서울:南山堂; 1966, p.447.
6. 黃奎東 外3人. 十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯 加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 關한研究. 大韓韓方腫瘍學會誌. 1996;2(1):1-24.
7. 洪律憲. 補中益氣湯과 香砂六君子湯의 併用投與가 S-180腹水 癌細胞를 接種한 생쥐의 細胞性 免疫에 미치는 影響. 서울:동국대학교대학원; 1994.

8. 文濬典. 東醫 病理學. 서울:高文社; 1999, pp.188-91.
9. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院 出版部; 1985, p.124, 285.
10. 洪元植. 編著 精校黃帝內經. 서울:東洋醫學研究院 出版部; 1985.
11. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院 出版部; 1985, p.286.
12. 文濬典 등. 東醫病理學 서울:高文社; 1993, p.22.
13. 裴元永, 高炯均, 金昌煥. 黃芪 藥鍼이 MTX를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會. 1994;11(1):49-66.
14. 朴鎮雄 外2人. 濃度差에 따른 黃芪藥鍼이 MTX를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11(1):67-81.
15. 최윤정. 四君子湯 및 四物湯이 MTX로 誘發된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 影響. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 1996.
16. 이홍석 외5인. 봉독 약침자극이 MTX로 유발된 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 경희한의대 논문집. pp.347-59.
17. 李尙仁. 本草學. 改訂 增補版. 서울:修書院; 1981, pp.51-60, 70-1, 85-6, 101-3, 106-7, 114-6, 172-3, 281-2, 285-6, 348-9, 507-9.
18. 辛民敎. 原色 臨床本草學. 改訂4版. 서울:永林社; 1994, pp.166-7, 169-73, 175-7, 198-9, 207-8, 219, 221-2, 241-4, 250-3, 312-3, 380-1.
19. 上海中醫學院 中草藥學 商務印書館 香港 分館 贈인. 1983, pp.200-2, 226-30, 350-2, 511-5, 517-20, 520-2, 525-7, 538-40, 555-7, 561-2, 564-6, 589-92.
20. 한국약학대학 협의회 약전분석회 대한약전 제4개정 제1·2부 해설. 서울:문성사; 1982, pp.181-3.
21. 서울대학교 의과대학편 임상약리학. 서울:서울대 출판부; 1995, p.468.
22. 홍사석. 이우주의 藥理學 講義. 서울:의학문화사; 1993, p.622, pp.646-8.
23. 대한임상 약학회. 臨床藥學 叢書 I 臨床藥學概論. 서울:희성출판사; 1991, pp.180-770.
24. Aries S.P. et al: Fas(CD95) expression on CD4+ T-cells from HIV-infected patients increases with disease progression, J Mol Med. 1995;73(12): 591-3.
25. Chiappelli F. et al: pituitary-Adrenal immune system in normal subjects and in patients with anorexia nervosa : The number of circulating helper Tlymphocytes (CD4+) expressing the homing receptor Leu8 is regulated in part by pituitary-adrenal products. Psychoendocrinology. 1991;16(5):423-32.
26. De jong R. et al : Maturation and differentiation-dependent responsiveness of human CD4+ T-helper subsets. J Immunol, 1992;149(8): 2795-802.
27. Everaus H. : Hormons and Immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia, Leuk Lymphoma. 1992;8(6):483-9.
28. Ferguson A. et al : Spectrum of expression of intestinal cellular immunity: proposal for a change in diagnostic criteria of celiac disease. ann Allergy. 1993;71(1):29-32.
29. Hofmann B. et al : Buspirone, a seortonin receptor agonist, increases CD4+ T-cell counts and modulates the immune system in HIV-seropositive subjects. AIDS, 1996;Oct. 10(12):1339-47.
30. Jarcos A. et al : Nurtritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. european J of clinical Nurtition. 1993;47(11):787-93.
31. Karina M. Butler et al : CD4+ Status and P24 Antigenemia. AJDC. 1992;146:932-6.
32. Klein S.L.et al : Social environment and steroid hormones affect species and sex differences in

固眞飲子가 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

immune function among voles. *Horm Behav*, 1997;32(1):30-9.

33. Lacour M. et al: cAMP up-regulates IL-5 production from activated CD4+ T-cells while decreasing IL-2 release and NF-AT induction. *Int Immunol* 1994;6(9):1333-43.