

加味歸茸湯이 새끼 생쥐의 免疫反應 및 成長에 미치는 影響

李京任, 金允姬, 柳同烈*

大田大學校 韓醫科大學 小兒科學教室, * 大田大學校 韓醫科大學 婦人科學教室

Effect of *Kamikwiryongtang* on Immune Response and Growth in a Young Mouse

Lee Kyeong Im, Kim Yun Hee, Yoo Dong Youl*

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, DaeJeon University

* Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, DaeJeon University

Objective: The purpose of this study was to investigate the effects of *Kamikwiryongtang* (KKT) on the immune response and growth in a young mouse (3 weeks mice).

Methods The viability of thymocytes and splenocytes *in vivo* and *in vitro* system, the population of helper T (Th) cells and cytotoxic T (Tc) cells in thymocytes and increased the population of T-lymphocytes and the population of Th cells in splenocytes, the production of γ -interferon, interleukin-2 and interleukin-4 in splenocytes was investigated. KKT (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days.

Results: KKT increased the viability of thymocytes and splenocytes *in vivo*, but did not affect the viability of thymocytes and enhanced the viability of splenocytes *in vitro* system. In addition, KKT did not affect the population of helper T (Th) cells and cytotoxic T (Tc) cells in thymocytes and increased the population of T-lymphocytes and the population of Th cells in splenocytes. Also, KKT increased the production of γ -interferon, interleukin-2 and interleukin-4 in splenocytes. Furthermore, KKT increased the production of nitric oxide *in vivo*, but did not affect the production of nitric oxide *in vitro* system. KKT enhanced the phagocytic activity of peritoneal macrophages *in vivo*, but decreased the phagocytic activity *in vitro* system. KKT increased the body weight of a young mouse.

Conclusions: KKT stimulates the specific immune response via increase of the viability of thymocytes and splenocytes and the non-specific immune response via increase of phagocytic activity of peritoneal macrophages and stimulates the growth of a young mouse.

Key word: Kamikwiryongtang, immune response, growth

접 수 : 2004년 6월 30일, 채택일자: 2004년 8월 17일
교신저자 : 이경임, 서울시 성북구 정릉 2동 107-33 형제한의원
(Tel. 02-913-8398, E-mail: sdh1ki@yahoo.co.kr)

I. 緒 論

小兒은 출생 후 成人이 되기까지 부단한 生長과 發育의 과정을 겪게 되면서 특유한 生理와 病理的 特徵을 가지게 되는데, 生理的으로는 “純陽”이라 하여 未成熟한 時期에 있어서 생기 왕성한 발육이 신속하며 陽氣가 偏成하여 “陽常有餘 陰常不足”하므로 相對的으로 腎精이 不足하게 되고 病理的으로는 “稚陽體 邪易干”이라 하여 疾病에 대한 抵抗力이 낮아 疾病의 罹患과 轉變이 쉬워 外感과 內傷으로 인한 각종 虛弱性 疾病이 자주 발생하게 된다^{1, 2)}.

《素問》 [四氣調神大論]³⁾에서 “不治已病治未病”, [評熱病論]³⁾에서는 “邪之所湊其氣必虛”라 하여 韓醫學에서는 疾病의 成立過程中에서 그 關鍵은 致病 素因인 邪氣라기 보다는 오히려 防禦 因子인 正氣에 달려 있어서 正氣의 虛損을 더욱 重視하고, 陳⁴⁾은 “小兒之病 虛者十之九 實者十之一 故藥宜補爲善”이라 하여 小兒病證의 대부분이 虛證이라 하였으니, 小兒疾病의 治療에 있어 扶正, 補虛의 개념이 매우 중요함을 알 수 있다⁵⁻⁷⁾.

歸茸湯은 李⁸⁾가 鹿茸을 酒蒸하고 當歸를

酒浸한 후 各等分 細末하여 烏梅肉으로 和丸하고 精血枯渴 面色黧黑 耳聾 目暗 口乾 多渴 腰痛 脚弱 小便白濁 上燥下寒 等 諸虛證에 使用할 目的으로 立方한 것으로, 《東醫寶鑑》⁹⁾에서 歸茸元이라 命名하여 虛勞에 活用한 이후로 現在까지도 널리 活用되고 있는 處方으로, 虛弱兒의 補虛劑로 常用되고 있다. 加味歸茸湯은 歸茸湯⁸⁾에 補氣和中, 養血安神, 補益肝腎의 效능을 지닌 黃芪, 人蔘, 白朮, 龍眼肉, 貢砂仁, 山查肉, 枸杞子, 五加皮, 紅花를 加味한 方劑로, 陰陽을 雙補하여 先天不足을 補하고 肝腎을 滋養하여 小兒의 成長 發育을 促進시키며 脾胃機能을 圓滑히 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 小兒의 諸虛弱證을 治療할 目的으로 作方된 處方으로 小兒 免疫力 增進과 成長 促進에 效과가 있을 것으로 본다.

小兒免疫에 관한 實驗的 研究로, 金¹⁰⁻¹²⁾ 등이 補兒湯 및 補兒湯加減方이 免疫反應에 대한 연구를, 沈¹³⁾은 錢氏白朮散이 생쥐의 體液性免疫反應과 細胞性免疫反應에 미치는 影響을, 朴¹⁴⁾은 補中益氣湯加味가 새끼 생쥐의 免疫能에 미치는 影響을, 李¹⁵⁾는 蔘朮健脾湯이 흰쥐의 免疫反應에 미치는 影響을 報告하였으며, 歸茸湯에 대한 實驗的 研究로는 金¹⁶⁻¹⁷⁾ 등이 報告한 바가 있으

나, 加味歸茸湯의 免疫反應과 成長에 미치는 영향을 함께 연구한 보고는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者は 加味歸茸湯이 새끼 생쥐의 면역반응에 미치는 영향을 살펴보고자, 生體에서 免疫系를 調節하는 중요한 細胞인 thymocytes, splenocytes 및 macrophages에 대한 作用과 새끼생쥐의 成長에 미치는 영향을 觀察하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 報告하고자 한다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

본 實驗에 사용한 생쥐는 免疫實驗을 할 때는 3週(새끼 생쥐) 또는 8 週令 C57 BL/6 系 수컷을, 成長實驗을 할 때는 3週令 ICR 系 수컷을 大韓實驗動物에서 購入하여, 溫度 20±2 °C, 濕度 50±5%, dark/light 12 時間의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 試藥 및 器具

實驗에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS), γ -interferon (γ -IFN), N-naphthylethylenediamine · 2HCl, sulfanilamide, lucigenin, MTT, zy-

mosan은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse γ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated *E. coli* particle은 Molecular Probes Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR 5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP)을 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

본 實驗에 사용한 加味歸茸湯의 構成은 《東醫寶鑑》⁹⁾을 參考하여 作方하였으며, 사용한 藥材들은 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한후 精選하여 사용하였고 그 內容과 分量은 다음과 같다.

處方 3貼 分量을 蒸溜水 2,000 ml로 2회가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 56.1 g (수득율 22.3%)을 얻어(以下 KKT라 稱함), 動物實驗 때에는 생리식염수에 溶解시켜 사용하였다.

加味歸茸湯(Kami-Kwiryong-Tang:KTT)의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量 (g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	16
白朮	Atractylodis Macrocephalae hizoma	16
人蔘	Ginseng Radix	6
貢砂仁	Amomi Fructus	6
龍眼肉	Longanae Arillus	6
黃芪	Astragali Radix	6
枸杞子	Lycii Fructus	4
山查肉	Crataegi Fructus	4
鹿茸	Cervi Parvum Cornu	4
五加皮	Acanthopanax Cortex	16
紅花	Carthami Flos	4
Total		84

2) Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 分離

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 分離는 Wysocki¹⁸⁾ 및 Mizel¹⁹⁾ 등의 方法을 이용하였다. 3週 또는 8週令 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 KKT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口 投與한 다음 8일째 생쥐를 頸椎脫骨하여 屠殺하였다. 摘出した 胸線 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 細胞浮游液을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500 rpm에서 10 分間 遠心分離), thymocytes 및 splenocytes 浮游液으로 하였다.

Macrophage의 分離는 3週 또는 8週令 생쥐에 KKT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 mouse 腹腔에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 다음, 腹腔에 cold PBS 10 ml를 넣어 腹腔細胞를 수집하

였다. 수집한 細胞를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10分間 遠心分離하고 RPMI 培地로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 分株하여 CO₂ incubator에서 培養시키고 2시간 후에 附着되지 않은 細胞를 제거한 다음, 附着한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 培地를 사용하였으며, 培地에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

3) Thymocytes 및 splenocytes의 增殖能 測定

분리한 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 KKT의 영향은 MTT法으로 측정하였다. 본 實驗에 사용한 MTT法은 Mosmann²⁰⁾이 개발하여 Kotnik 등²¹⁾이 변형시킨 方法으로, 96-well plate의 각 well에 分離한 thymocytes 및 splenocytes를 각각

RPMI 1640 培地로 1×10^7 cells/ml 濃度로 희석하여 96-well plate에 100 μ l씩 분주한 다음 thymocytes는 concanavalin A (Con A) 5 μ g/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 추가하였다. 배양 종료 시 0.1N-HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하고 遮光狀態에서 18시간 더 배양한 후 發色된 각 well의 吸光度를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 對照群의 吸光度에 대한 실험군의 吸光度를 百分率로 환산하여 계산하였다. *In vitro* 實驗에서는 분리한 thymocytes 및 splenocytes 1×10^7 cells/ml에 KKT 1, 10 및 100 μ g/ml를 각각 추가하고 48시간 배양한 후 동일한 방법으로 細胞生存率을 측정하였다.

4) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 測定

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각 RPMI 1640 培地로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후, flow cytometer [excitation: 488 nm, emission: 525 nm (FITC), 575 nm (PE)]로 subpopulation을 측정하였다.²²⁾

5) Cytokines 測定

3週 또는 8週齡 생쥐 5마리를 1群으로 하

여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 KKT 500 mg/kg을 1日 1회씩 7日間 경구 투여한 다음 8日째 동일한 방법으로 splenocytes를 분리하여 2×10^7 cells/ml로 調劑하여 96-well plate에 200 μ l씩 분주한 후, 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500rpm, 2分, 4°C)한 다음, 上等液 50 μ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 즉 sample 50 μ l에 assay diluent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 μ l를 가하여 실온에서 2시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μ l를 가하여 450 nm에서 Microplate-Reader로 吸光度를 측정 후, 미리 작성한 檢量線에 의해 cytokines의 量을 환산하였다.

6) 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide 生成量 測定

분리한 macrophage를 2×10^6 cells/ml로 調劑하여 24-well plate에 1 ml씩 분주한 후 macrophage로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 量을 Griess法²³⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 및 48시간 배양한 후, 배양액 100 μ l와 Griess 시약(1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5 % H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96-well module에 넣고, 37 °C에서 10분간 방치한 후, 570 nm에서 microplate-reader로 吸光度를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 檢量線에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다. *In vitro* 실험에

서는 분리한 macrophages를 2×10^6 cells/ml로 調劑하여 24-well plate에 1 ml씩 분주한 후 KKT 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 加하고 48시간 배양한 후 동일한 방법으로 실험하였다.

7) 腹腔 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 測定

분리한 macrophage를 5×10^5 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO_3 , 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 浮遊시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 조제는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 使用하기 直前に DME 培地에 1/10로 희석하여 使用하였다. Chemiluminescence 測定은 luminometer를 이용하여 37°C 에서 측정하였다²⁴⁻²⁵). 測定用 96-well plate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 浮遊液 100 μl 와 lucigenin 溶液 50 μl 및 zymosan 溶液 30 μl 를 添加하여 37°C 에서 15 分間 前處理한 後 5分 間隔으로 30分 동안 lucigenin chemiluminescence 量을 測定하였다. *In vitro* 實驗에서는 분리한 macrophages에 KKT 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 加하고 同一한 方法으로 lucigenin chemiluminescence 量을 측정하였다.

8) 腹腔 macrophage의 貪食作用에 의한 engulfment 測定

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 濃度로 현탁시켜 sonification한 후 使用하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 溶解하여 使用하였다. 분리한 macrophage를 RPM

I1640 培地로 1×10^5 cells/ml 되도록 調整한 후, 100 μl 를 96-well plate에 分株하고 *E. coli* 현탁액 25 μl 를 加하여 1시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μl 를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다²⁶).

9) 成長率 測定

3週齡 생쥐 10 마리를 1群으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 KKT 1g 및 2g을 증류수 100 ml에 각각 용해시켜 물병에 넣어 자유 섭취하도록 하였으며, 생쥐의 체중은 2일 간격으로 16일간 측정하였다.

10) 統計處理

모든 실험 결과들은 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 로 나타내었고 통계처리는 student's *t*-test를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

III. 實驗 結果

1. 加味歸茸湯 (KKT)이 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 效果

3週齡 생쥐(새끼생쥐)의 대조군 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때의 細胞生存率は $122.4 \pm 1.3\%$ 로 증가하였으며, KKT를 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의

細胞生存率은 $107.0 \pm 1.0\%$ 로, Con A를 처리하였을 때 細胞生存率은 $134.4 \pm 1.7\%$ 로 對照群에 비해 증가하였다. 8週齡 생쥐의 대조군의 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때의 細胞生存率은 $115.9 \pm 1.1\%$ 로 증가하였으며, KKT를 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率은 $98.5 \pm 0.6\%$ 로, Con A를 처리하였을 때 細胞生存率은 $114.0 \pm 1.0\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table I).

3週齡 생쥐의 대조군 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 細胞生存率은 $135.3 \pm 1.8\%$ 로 증가하였으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率은 $113.9 \pm 1.8\%$ 로, LPS를 처리하였을 때 細胞生存率은 $147.2 \pm 1.7\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다. 8週齡 생쥐의 대조군 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 細胞生存率은 $133.9 \pm 2.0\%$ 로 증가하였으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率은 $109.4 \pm 0.8\%$ 로, LPS를 처리하였을 때 細胞生存率은 $145.2 \pm 1.3\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다 (Table II).

In vitro 실험에서 3週齡 대조군의 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $101.4 \pm 0.6\%$, $100.5 \pm 0.9\%$ 및 $101.4 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다.

Con A를 처리하였을 때 대조군의 細胞生存率은 $117.1 \pm 1.4\%$ 로 증가하였으며, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $115.3 \pm 1.4\%$, $115.2 \pm 1.2\%$ 및 $118.0 \pm 1.8\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Table III). 8週齡 대조군의 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $97.3 \pm 1.2\%$, $98.5 \pm 0.9\%$ 및 $99.4 \pm 0.6\%$ 로 對照群에 비해 별 차이가 없었다. Con A를 처리하였을 때 대조군의 細胞生存率은 $113.5 \pm 0.5\%$ 로 증가하였으며, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $112.1 \pm 0.8\%$, $112.9 \pm 0.6\%$ 및 $111.2 \pm 1.8\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Table IV).

3週齡 대조군의 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $103.2 \pm 1.1\%$, $112.3 \pm 0.9\%$ 및 $133.8 \pm 1.1\%$ 로 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 細胞生存率이 증가하였다. LPS를 처리하였을 때 대조군의 細胞生存率은 $155.0 \pm 2.1\%$ 로 증가하였으며, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $156.5 \pm 1.5\%$, $165.3 \pm 1.8\%$ 및 $171.2 \pm 1.6\%$ 로 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 細胞生存率이 증가하였다 (Table V). 8週齡 대조군의 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100% 로 하였을 때, KKT 1, 10 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $106.6 \pm 0.9\%$, $110.9 \pm 0.9\%$ 및 $121.3 \pm 1.0\%$ 로 $1 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 細胞生存率이 증가하였다. LPS를 처리하였을 때

대조군의 細胞生存率은 $152.8 \pm 1.8\%$ 로 증가하였으며, KKT 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 $159.9 \pm 1.7\%$, $165.5 \pm 2.1\%$ 및 $169.9 \pm 1.9\%$ 로 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 細胞生存率이 증가하였다 (Table VI).

2. KKT가 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

3 週齡 대조군의 thymocytes 中 CD4 single positive(CD4^+) 세포는 $7.6 \pm 0.4\%$ 이었으며, CD8 single positive(CD8^+) 세포는 $2.0 \pm 0.2\%$ 이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4^+ 세포는 $8.3 \pm 0.4\%$ 로, CD8^+ 세포는 $1.7 \pm 0.3\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다. 8 週齡 대조군의 thymocytes 中 CD4 single positive(CD4^+) 세포는 $11.6 \pm 0.3\%$ 이었으며, CD8 single positive(CD8^+) 세포는 $3.2 \pm 0.2\%$ 이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4^+ 세포는 $13.2 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으나, CD8^+ 세포는 $2.1 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 감소하였다 (Table VII).

3 週齡 대조군의 splenocytes 中 B220 positive 세포(B220^+)는 $32.3 \pm 0.3\%$ 이었으며, Thy1 positive (Thy1⁺) 세포는 $11.7 \pm 0.2\%$ 이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 中 B220^+ 세포는 $30.9 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1⁺ 세포는 $19.7 \pm 0.3\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 中 대조군의 CD4^+ 세포는 $12.5 \pm 0.3\%$, CD8^+ 세포는 $7.3 \pm 0.5\%$ 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 생쥐 splenic T-lymphocytes 中 CD4^+ 세포는 $16.3 \pm 0.5\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으나,

CD8^+ 세포는 $8.2 \pm 0.4\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 8 週齡 대조군의 splenocytes 中 B220 positive 세포(B220^+)는 $33.7 \pm 1.4\%$ 이었으며, Thy1 positive (Thy1⁺) 세포는 $22.9 \pm 1.1\%$ 이었다. KKT를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 中 B220^+ 세포는 $29.2 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으나, Thy1⁺ 세포는 $21.7 \pm 1.8\%$ 로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. Splenic T-lymphocytes 中 대조군의 CD4^+ 세포는 $15.1 \pm 0.2\%$, CD8^+ 세포는 $8.0 \pm 0.6\%$ 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 생쥐 splenic T-lymphocytes 中 CD4^+ 세포는 $13.5 \pm 0.4\%$ 로 대조군에 비해 감소하였으나, CD8^+ 세포는 $7.2 \pm 0.3\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table VIII).

3. KKT가 splenocytes의 cytokines 分泌에 미치는 효과

3 週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 中 ν -interferon의 양은 432.6 ± 19.5 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 ν -interferon의 양은 653.7 ± 23.7 pg/ml으로 대조군에 비해 증가하였으며, 8 週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 中 ν -interferon의 양은 523.5 ± 24.8 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 ν -interferon의 양은 639.8 ± 21.0 pg/ml으로 대조군에 비해 증가하였다 (Table IX).

3 週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 中 interleukin-2의 양은 210.5 ± 13.6 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 interleukin-2의 양은 354.4 ± 19.5 pg/ml으로 대조군에 비해 증가하였으며, 8 週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 中 inter-

leukin-2의 양은 276.8 ± 17.3 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 interleukin-2의 양은 362.8 ± 21.7 pg/ml으로 대조군에 비해 증가하였다 (Table X).

3週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 중 interleukin-4의 양은 125.8 ± 10.2 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 interleukin-4의 양은 228.3 ± 14.5 pg/ml으로 대조군에 비해 증가하였으며, 8週齡 생쥐의 대조군 splenocytes 중 interleukin-4의 양은 176.9 ± 18.4 pg/ml 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 splenocytes에서 분비되는 interleukin-4의 양은 200.1 ± 22.5 pg/ml으로 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Table XI).

4. KKT가 腹腔 macrophage로 부터 nitric oxide의 生成에 미치는 效果

3週齡 생쥐의 대조군 macrophages에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide(NO) 生成量은 24 및 48시간 후에 2.1 ± 0.2 및 2.2 ± 0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 生成量은 9.3 ± 0.3 및 17.3 ± 0.5 μ M로 증가하였다. KKT를 투여하고 分離한 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 生成量은 24 및 48시간 후에 3.4 ± 0.1 및 4.3 ± 0.1 μ M로 대조군에 비해 증가하였으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 生成量은 45.8 ± 0.8 및 64.0 ± 1.6 μ M로 대조군에 비해 증가하였다. 8週齡 생쥐의 대조군 macrophages에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 生成量은 24 및 48시간 후에 1.6 ± 0.1 및 1.4 ± 0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 生成量은 $17.3 \pm$

0.9 및 21.8 ± 0.7 μ M로 증가하였다. KKT를 투여하고 분리한 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 生成量은 24 및 48시간 후에 2.4 ± 0.1 및 2.7 ± 0.1 μ M로 대조군에 비해 증가하였으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 生成量은 33.7 ± 0.5 및 43.1 ± 0.9 μ M로 대조군에 비해 증가하였다 (Fig. 1).

In vitro 실험에서 3週齡 생쥐의 대조군 macrophages에 LPS와 γ -IFN을 處理하지 않았을 때 NO 生成量은 48시간 후에 2.6 ± 0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 生成量은 20.6 ± 1.8 μ M로 증가하였다. 분리한 macrophages에 KKT 1, 10 및 100 μ g/ml를 처리하고 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 生成量은 19.8 ± 0.2 , 19.7 ± 0.9 및 19.5 ± 0.9 μ M로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 8週齡 생쥐의 대조군 macrophages에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 生成量은 48시간 후에 1.8 ± 0.1 μ M 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 生成量은 42.5 ± 1.9 μ M로 증가하였다. KKT 1, 10 및 100 μ g/ml를 처리하고 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 生成量은 42.1 ± 1.5 , 41.9 ± 1.7 및 39.6 ± 1.7 μ M로 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Fig. 2).

5. KKT가 腹腔 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 效果

Chemiluminescence (CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 生成되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 3週齡 생쥐의 대조군 macrophages로부터 生成되는 CL量은 2.1×10^6 RLU 이었으며, KKT를 투여하고 분리한

macrophages에서 생성되는 CL량은 7.7×10^6 RLU로 증가하였다. 8週齡 생쥐의 대조군 macrophages로부터 생성되는 CL량은 1.1×10^6 RLU 이었으며, KKT를 투여하고 분리한 macrophages에서 생성되는 CL량은 2.8×10^6 RLU로 증가하였다 (Table XII). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particle의 貪食도 대조군에 비해 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 3).

In vitro 실험에서 3週齡 생쥐의 대조군 macrophages로부터 생성되는 CL량은 2.5×10^6 RLU 이었으며 KKT를 1, 10 및 100 μ g/ml를 각각 처리하였을 때 macrophages에서 생성되는 CL량은 2.2×10^6 , 2.0×10^6 및 1.6×10^6 RLU로 농도가 증가함에 따라 감소하였다 (Table XIII). 8週齡 생쥐의 대조군 macrophages로부터 생성되는 CL량은 1.5×10^6 RLU 이었으며 KKT를 1, 10 및 100 μ g/ml를 각각 처리하였을 때 macrophages에서 생성되는 CL량은 1.3×10^6 , 1.0×10^6 및 0.7×10^6 RLU로 농도가 증가함에 따라 감소

하였다 (Table XIV).

6. KKT가 새끼생쥐의 成長에 미치는 效果

생쥐의 체중을 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16일째 측정하였을 때 생리식염수만을 투여한 대조군의 체중은 11.5 ± 0.4 , 13.7 ± 0.5 , 16.8 ± 0.6 , 19.7 ± 0.6 , 22.5 ± 0.5 , 24.9 ± 0.5 , 26.5 ± 0.7 , 27.9 ± 0.8 및 28.3 ± 0.9 g이었으며, KKT 1g/ml를 투여한 군의 체중은 11.6 ± 0.4 , 14.3 ± 0.5 , 17.5 ± 0.7 , 20.9 ± 0.7 , 23.5 ± 0.9 , 26.1 ± 0.5 , 27.5 ± 0.6 , 28.6 ± 0.7 및 29.2 ± 0.7 g으로 체중이 대조군에 비해 약간 상승하였으나 유의성은 없었으며, KKT 2g/ml를 투여한 군의 체중은 11.9 ± 0.5 , 14.9 ± 0.7 , 18.5 ± 0.6 , 22.3 ± 0.6 , 25.7 ± 0.9 , 28.0 ± 0.5 , 29.7 ± 0.7 , 30.5 ± 0.6 및 31.3 ± 0.9 g으로 8日 이후에 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 4).

Table I. Effect of the administration of KKT on the cell viability of Con A treated-thymocytes in C57BL/6 mice

Samples	Mice Age (Weeks)	Cell Viability (%)	
		Non-treated of Con A	Treated of Con A
Control	3	100.0 \pm 1.1	122.4 \pm 1.3
KKT	3	107.0 \pm 1.0*	134.4 \pm 1.7**
Control	8	100.0 \pm 0.9	115.9 \pm 1.1
KKT	8	98.5 \pm 0.6	114.0 \pm 1.0

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of ConA. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

Table II. Effect of the administration of KKT on the cell viability of LPS in C57BL/6 mice

Samples	Mice Age (Weeks)	Cell Viability (%)	
		Non-treated of LPS	Treated of LPS
Control	3	100.0±1.2	135.3±1.8
KKT	3	113.9±1.8*	147.2±1.7*
Control	8	100.0±0.9	133.9±2.0
KKT	8	109.4±0.8*	145.2±1.3*

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of LPS. The data represents the mean±SE of 5 mice. *; Significantly different from control group (**p*<0.001).

Table III. Effect of KKT on the cell viability of Con A treated-thymocytes of 3 weeks mice *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose (µg/ml)	Cell viability (%)	
			Non-treated of Con A	Treated of Con A
Control	3	-	100.0±0.8	117.1±1.4
KKT	3	1	101.4±0.6	115.3±1.4
KKT	3	10	100.5±0.9	115.2±1.2
KKT	3	100	101.4±0.6	118.0±1.8

The separated thymocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KKT (1, 10 and 100 µg/ml). The data represents the mean±SE of 3 experiments.

Table IV. Effect of KKT on the cell viability of concanavalin A treated-thymocytes of 8 weeks mice *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose (µg/ml)	Cell viability (%)	
			Non-treated of ConA	Treated of Con A
Control	8	-	100.0±1.0	113.5±0.5
KKT	8	1	97.3±1.2	112.1±0.8
KKT	8	10	98.5±0.9	112.9±0.6
KKT	8	100	99.4±0.6	111.2±1.8

The separated thymocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KKT (1, 10 and 100 µg/ml). The data represents the mean±SE of 3 experiments.

Table V. Effect of KKT on the cell viability of LPS of 3 weeks mice *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)	
			Non-treated of LPS	Treated of LPS
Control	3	-	100.0 \pm 0.7	155.0 \pm 2.1
KKT	3	1	103.2 \pm 1.1	156.5 \pm 1.5
KKT	3	10	112.3 \pm 0.9**	165.3 \pm 1.8*
KKT	3	100	133.8 \pm 1.1**	171.2 \pm 1.6**

The separated splenocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KKT (1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$). The data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

Table VI. Effect of KKT on the cell viability of lipopolysaccharide treated- splenocytes of 8 weeks mice *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)	
			Non-treated of lipopolysaccharide	Treated of lipopolysaccharide
Control	8	-	100.0 \pm 0.7	152.8 \pm 1.8
KKT	8	1	106.6 \pm 0.9*	159.9 \pm 1.7*
KKT	8	10	110.9 \pm 0.9**	165.5 \pm 2.1**
KKT	8	100	121.3 \pm 1.0**	169.9 \pm 1.9**

The separated splenocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KKT (1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$). The data represents the mean \pm SE of 3 experiments. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.001$).

Table VII. Effect of KKT on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Mice Age (Weeks)	Cell Subpopulation (%)	
		CD4 ⁺	CD8 ⁺
Control	3	7.6 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2
KKT	3	8.3 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3
Control	8	11.6 \pm 0.3	3.2 \pm 0.2
KKT	8	13.2 \pm 0.3*	2.1 \pm 0.3*

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group ($p < 0.05$).

Table VIII. Effect of KKT on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Mice Age (Weeks)	Cell Subpopulation (%)			
		B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Control	3	32.3±0.3	11.7±0.2	12.5±0.3	7.3±0.5
KKT	3	30.9±0.6	19.7±0.3 ^{***}	16.3±0.5 ^{**}	8.2±0.4
Control	8	33.7±1.4	22.9±1.1	15.1±0.2	8.0±0.6
KKT	8	29.2±0.6 ^{**}	21.7±1.8	13.5±0.4 [*]	7.2±0.3

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. ^{*}; Significantly different from control group (^{*}; p<0.05, ^{**}; p<0.01, ^{***}; p<0.001).

Table IX. Effect of KKT on the production of γ -interferon from murine splenocytes

Samples	Mice Age (Weeks)	γ -interferon (pg/ml)
Control	3	432.6±19.5
KKT	3	653.7±23.7 [*]
Control	8	523.5±24.8
KKT	8	639.8±21.0 [#]

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days. The production of γ -interferon was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. ^{*}; Significantly different from normal group (p<0.001). [#]; Significantly different from control group (p<0.05).

Table X. Effect of KKT on the production of interleukin-2 from murine splenocytes

Samples	Mice Age (Weeks)	Interleukin-2 (pg/ml)
Control	3	210.5±13.6
KKT	3	354.4±19.5 [*]
Control	8	276.8±17.3
KKT	8	362.8±21.7 [#]

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days. The production of interleukin-2 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. ^{*}; Significantly different from normal group (p<0.001). [#]; Significantly different from control group (p<0.05).

Table XI. Effect of KKT on the production of interleukin-4 from murine splenocytes

Samples	Mice Age (Weeks)	Interleukin-4 (pg/ml)
Control	3	125.8±10.2
KKT	3	228.3±14.5*
Control	8	176.9±18.4
KKT	8	200.1±22.5

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days. The production of interleukin-2 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. *; Significantly different from normal group ($p<0.01$).

Table XII. The relative luminescence unit (RLU) of peritoneal macrophages separated from KKT-administered mice.

Samples	Mice Age (Weeks)	RLU
Control	3	2.1×10^6
KKT	3	7.7×10^6
Control	8	1.1×10^6
KKT	8	2.8×10^6

KKT (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 (5×10^5 cells/ml) obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in DME (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer.

Table XIII. The relative luminescence unit (RLU) of 3 weeks mice peritoneal macrophages treated with KKT *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose (μ g/ml)	RLU
Control	3	-	2.5×10^6
KKT	3	1	2.2×10^6
KKT	3	10	2.0×10^6
KKT	3	100	1.6×10^6

The separated peritoneal macrophages (5×10^5 cells/ml) obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in DME (without phenol red) mixed with KKT. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer.

Table XIV. The relative luminescence unit (RLU) of 8 weeks mice peritoneal macrophages treated with KKT *in vitro*

Samples	Mice Age (Weeks)	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	RLU
Control	8	-	1.5×10^6
KKT	8	1	1.3×10^6
KKT	8	10	1.0×10^6
KKT	8	100	0.7×10^6

The separated peritoneal macrophages (5×10^9 cells/ml) obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in DME (without phenol red) mixed with KKT. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer.

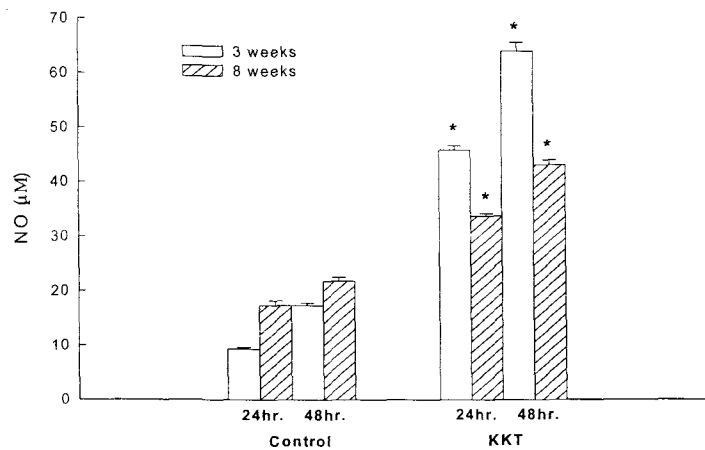


Fig. 1. The production of nitric oxide from peritoneal macrophages in KKT-administered mice.

KKT (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 hrs. adherence period were cultured in RPMI 1640 media in the presence LPS and γ -interferon. *Significantly different from control group ($p < 0.001$).

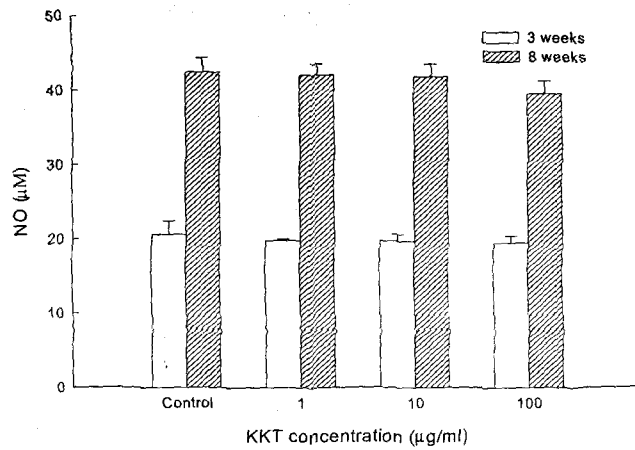


Fig. 2. Effect of KKT on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages *in vitro*

The separated macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KKT (1, 10 and 100 µg/ml) and IFN- γ and LPS. The data represents the mean \pm SE of 3 experiments.

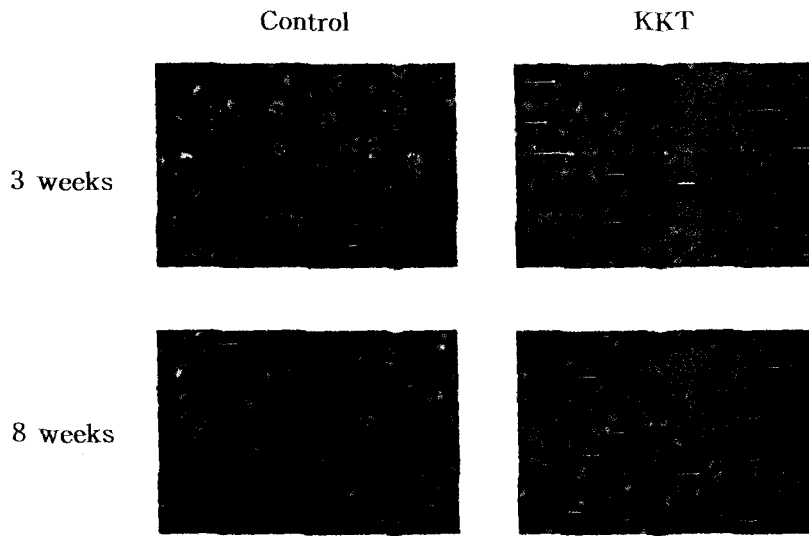


Fig. 3. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from KKT-administered mice.

Inverted fluoromicroscope photomicrographs (100 \times) showing uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in control (left), and peritoneal macrophages obtained from KKT-administered mice (right).

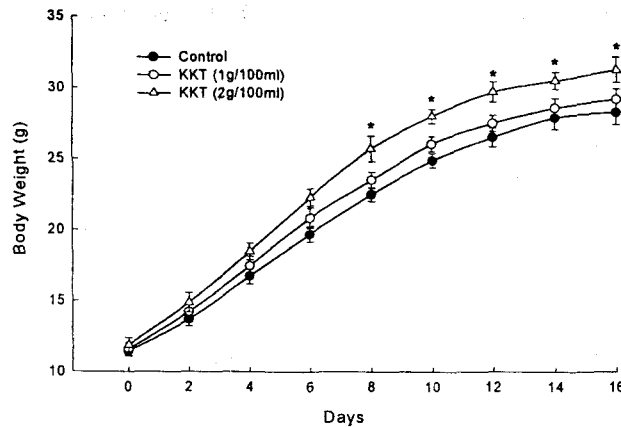


Fig. 4. Effect of KKT on body weight in 3 weeks mice.

KKT (1g/100ml and 2g/100ml) was administered for 16 days and the body weight was measured at 2 days intervals. Each bar represents the mean±SE of 10 mice. *; Significantly different from control group ($p < 0.05$).

IV. 考 察

小兒는 항상 成長과 發達의 과정을 겪고 있어 成人과는 다른 小兒만의 독특한 生理와 病理의 特徵을 가지고 있다^{1,28)}.

《靈樞》 [逆順肥瘦篇]³⁾에서 “嬰兒者 肌肉脆血少氣弱”이라 하고, 錢은 “五臟六腑 成而未全 … 全而未壯”, 陳은 “小兒一周內 皮毛 肌肉 筋骨 腦髓 五臟六腑 榮衛 氣血 皆未堅固”, 吳는 “小兒稚陽未充 稚陰未長者也” 라고 하여 小兒의 臟腑嬌嫩, 形氣未充한 生理的 特徵을 설명하고 있는데²⁸⁾, 이는 臟腑嬌嫩하고 氣血不足함을 말한 것으로 脾胃薄弱, 腎氣未充, 肌膚柔嫩, 腠理疏松, 神氣怯弱, 筋骨未堅으로 歸納할 수 있다²⁸⁾. 臟腑嬌嫩은 五臟六腑가 모두 포함되지만 그중에서도 脾, 肺, 腎이 중요한데, 肺는 一身之

氣를 主하고 腎은 先天之本이며 脾는 後天之本이므로 三臟은 밀접한 관련이 있다. 萬²⁹⁾은 “五臟之中肝有餘 脾常不足腎常虛 心熱爲火同肝論 嬌肺遭傷不易愈”, “脾常不足 肺常不足 腎常虛”라고 하여 小兒의 病理의 特徵을 錢乙의 五臟辨證을 기초로 歸納하여 설명하고 있다. 또한 陳⁴⁾은 “小兒之病 虛者十之九 實者十之一 故 藥宜補爲善”이라 하여 小兒의 病은 90%가 虛證이라 하였고, 李⁸⁾는 “太半胎毒 少半內傷乳食 十分之一外感 傷寒大率屬肝與脾 多因脾胃嬌嫩 乳食傷精 則生濕 濕生痰 痰生火 濕熱結滯而然 具眞水未旺 心火獨炎 故肺金受制肝常有餘 脾腎不足”이라 하였다. 이처럼 小兒는 臟腑機能과 衛外機能의 취약한 生理的 特徵으로 인해 疾病의 罹患과 轉變이 쉽고, 外因으로 六淫의 侵襲과 內因으로 飲食에 傷하는 것이 쉬우므로 특히 脾肺의 病證이 가장 많고,

그 대부분이 虛證에 속하는 것이다¹⁾.

韓醫學에서 免疫이라는 용어는 19세기 《免疫類方》에 처음으로 기재되어 있지만³⁰⁻³¹⁾, 免疫에 대한 개념은 內經에서부터 비롯되었다고 할 수 있는데, 《靈樞》[百病始生篇]³⁾에서 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”라고 하고, 《素問》[評熱病論]³⁾에서 “邪之所湊 其氣必虛”라고 하여 疾病의 發生과 進展을 人體의 正氣와 發病因子인 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 過程으로 發病의 成立 過程 中에서 그 關鍵은 致病 素인 邪氣라기 보다는 오히려 防禦 因子인 正氣에 달려 있어서 正氣의 虛損을 더욱 重視하였다³²⁻³³⁾. 正氣란 眞氣와 衛氣를 포함하는 것으로 臟腑, 經絡, 營衛, 氣血의 正常生理機能을 包括한 人體內의 모든 抗病能力을 뜻하며 正常免疫機能의 概念과 有關하다^{5, 7, 34)}. 正氣는 腎中의 精氣, 脾胃의 運化에 의한 水穀의 氣와 肺에서 吸入한 天氣가 結合되어 組成된 것으로 正氣의 生成과 分布는 脾, 肺, 腎 三臟과 有關하므로 脾, 肺, 腎은 免疫과 關聯된다고 볼 수 있는데³⁵⁾, 先天之氣는 元氣에 屬하며 元氣는 腎에 藏하여 生命活動의 原動力이 되므로 그 中에서 根本이 되는 것은 腎이라고 볼 수 있으며 脾는 水穀精微를 運化하여 氣血營衛의 바탕으로 後天의 根本이 되고, 肺는 皮毛를 主管하는데 皮毛란 皮膚 粘膜 肌肉 汗腺 毛髮 等を 包括하여 外邪의 侵入經路가 되므로 防禦機關이 된다. 그러므로 이 三臟의 虛實如何에 따라 免疫機能이 左右될 수 있다³⁶⁾.

小兒의 成長과 發育은 成人과 다른 근본적인 特長으로서 외부적으로는 적절한 영양공급과 내부적으로는 호르몬의 복합작용에 의하여 이루어지며 이중 한 가지라도 이상이 생기면 정상적인 성장은 기대하기 어렵다³⁷⁻³⁸⁾. 韓醫

學에서 小兒의 生長發育은 先後天的인 要因과 밀접한 관계가 있는 것으로 파악하고 있는데³⁹⁾, “腎爲先天之本”으로 腎藏精, 腎主骨生髓, 齒者 骨之餘, 髮者 腎之榮이라 하여 腎精과 腎陽이 소아의 성장에 주도적인 작용을 하게 되고, “脾爲後天之本”으로 脾主肌肉, 主四肢하고 氣血生化之原이 되어 先天의 腎 또한 後天水穀精氣의 끊임없는 濡養을 받아야 정상적인 성장발육을 이룰 수 있다^{28, 40)}. 小兒의 成長障礙에 대한 韓醫學의 用語로는 五軟, 五遲, 疳症 등이 있는데, 五軟은 先天衰弱과 發育不振의 證候로 肝腎虧損과 脾胃虛弱이 原因이 되고, 五遲에 대해서는 “五遲者, … 皆胎弱也. 父母精血不足 腎氣虛弱 不能榮養而然”이라 하였으며, 疳症은 小兒의 脾胃損傷으로 轉化失調되어 臟腑가 營養을 받지 못하고 形體가 虛弱하고 羸瘦해지는 慢性病症을 말하는 것이니 小兒의 成長障礙는 先天의인 腎氣能의 不足과 後天的인 脾氣能의 失調가 原因이라고 要約할 수 있다. 따라서 腎氣가 充實하고 脾氣가 健運하면 生長發育이 양호한 반면, 先天不足과 後天失調가 생기면 生長發育에 障礙를 초래하여 體重, 身長, 齒牙發生, 動作, 知能 등 여러 方面에 영향을 미치게 된다²⁸⁾. 또한 先天의인 요인으로 “所以肥瘦長短 大小妍媸 皆肖父母也”²⁹⁾라고 하여 父母에게서 물려받은 유전적 소인이 小兒의 成長에 중요함을 지적하였다^{1, 2, 28, 40-41)}. 따라서 脾常不足 肺常不足 腎常虛한 小兒의 病理的 特徵과 聯關지어 보면 小兒에게서 免疫力 低下에 따른 虛證의 증상이 많이 나타날 수 있고 그에 따른 成長不振도 일으킬 수 있다.

免疫이란 疫을 면하는 것을 말하는 것으로 특히, 감염성 질병으로부터의 보호라는 의미로 사용되었다. 면역에 관여하는 세포와 분자들이

면역계(immune system)를 구성하는데, 외부 물질 즉, 바이러스, 세균, 진균, 기생충 등의 微生物의 침입에 대한 이들의 집합적이고 협동적인 반응을 면역반응(immune response)이라 부른다^{42, 43)}. 免疫反應에는 epithelial barriers, phagocytes, NK cells 등이 관여하는 초기의 선천면역반응(innate immunity, non-specific immunity)과 T-lymphocyte 및 B-lymphocyte가 관여하는 후기의 적응면역반응(adaptive immunity, specific immunity)이 있다. 또한 적응면역(adaptive immunity)에는 혈액 내 항체(antibody)에 의해 매개되는 체액성 면역(humoral immunity)과 T-lymphocyte에 의해 매개되는 세포매개면역(cell-mediated immunity)이라 불리는 두 가지 유형이 있다⁴²⁾.

면역계를 구성하는 모든 세포들은 조혈 간 세포(hematopoietic stem cell)에서 유래하며 이 세포는 재태 주령 2.5~3주에 처음으로 난황에 나타나며 5주에는 태아 간으로 이동하고 임신 말기에는 골수로 이동한다. 림프양 간 세포(lymphoid stem cell)는 조혈 간 세포에서 유래하며 간 세포(stem cell)가 위치하는 조직이나 장기에 따라 T세포, B세포, NK세포 등으로 분화한다. 흉선이나 골수와 같은 1차 림프기관은 태생초기에 형성되고 곧이어 2차 림프기관인 비장, 림프절, 편도선, peyer's patch 등이 발달되어 평생동안 간 세포가 T세포, B세포, NK세포로 분화되는 장소로 작용한다³⁷⁾. 흉선은 재태 주령 4주경에 제 3인두낭(branchial pouch)에서 유래하여 8~8.5주경에는 일부 세포에서 CD 4와 CD 8이 동시에 발현된다. B 림프구의 분화는 정확한 장기가 알려져 있지 않으나 골수와 말초 림프기관에서 일어난다고 생각되며, B 세포의 발달은 재태 주령 7주 이전에 태아 간에서 시작되며 태아

간내의 간 세포(stem cell)는 8주경에 쇄골의 골수에, 10주경에는 장골의 골수에 운집한다. 재태 기간 중 B 세포가 면역글로불린을 생성, 분비할 수 있는 능력이 있음에도 불구하고 태아의 림프기관에 형질세포가 나타나는 것은 재태 20주 이후이다. 모체의 항체 중 분자량이 작은 IgG는 재태 주령 12주부터 태반을 통하여 태아로 이행되기 시작하고, 그 양도 점차 증가하여 출생 시 태아의 IgG농도는 모체와 비슷하거나 약간 높은 정도가 된다. 산모로부터 물려받은 IgG 항체는 그람 양성균과 바이러스에 대한 저항력을 제공하나, IgG2 항체는 상대적으로 저하되어 있어 polysaccharide 항원에 대한 저항력은 저하되어 있다. 미숙아는 만삭아에 비해 IgG 항체를 적게 가지고 있어 병원체에 대한 저항력이 낮다³⁷⁾. 신생아는 출생 직후 IgM 항체를 생성하기 시작하여 생후 1세경에 성인 항체가에 도달하고, 모체로부터 얻어진 IgG 항체는 생후 6~8개월 동안에 소실된 후, 점차적으로 생성되어 7~8세경이후로 성인치에 도달하게 된다. 따라서 생후 4~5개월에 면역글로불린이 최저치에 도달하게 되므로^{37, 44)} 小兒期에는 세균감염에 대한 저항력과 면역력이 저하된 상태에서 각종 감염증상이 多發하게 되고 1차성 면역결핍증의 80% 이상이 소아연령에서 나타난다고 한다³⁷⁾.

면역질환의 治療에 있어서 면역부족질환은 扶正法을 주로 하여 正充邪自祛하고, 면역과민반응은 祛邪法을 주로 하여 祛邪正自安시키되 扶正과 祛邪의 비율을 적절히 응용하여 扶正하되 留邪시키지 않고 祛邪하되 傷正하지 않도록 하여야 한다⁴⁵⁾. 또한 小兒虛證의 치료원칙을 세움에 있어 《素問》 [四氣調神大論]³⁾에서 “不治已病 治未病”이라 하였듯 發病 前에 그 虛弱한 부분을 補充하고 均衡을 잡아주어 同一疾患에 반복 감염되지 않도록

록 하는 것이 매우 중요하다⁴⁶⁾. 따라서 免疫力低下로 인한 小兒의 虛弱性 疾患에는 正氣를 돕는 藥物 즉, 益氣, 助陽, 養血, 滋陰시키는 補養藥들이 人體의 免疫機能을 增強시킬 수 있으며, 아울러 成長不振에는 溫補腎陽, 滋陰養精, 益氣補脾하는 것이 중요하다^{2,39,41)}.

本 實驗에 사용한 加味歸茸湯은 歸茸湯⁸⁾에 黃芪, 人蔘, 白朮, 龍眼肉, 貢砂仁, 山楂肉, 枸杞子, 五加皮, 紅花를 加味한 處方으로 先天不足을 補하여 成長 發育을 促進시키고 脾胃機能을 圓滑하게 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 小兒의 諸虛弱證을 治療할 目的으로 作方된 處方이다. 加味歸茸湯을 構成하는 個別藥物의 效能을 살펴보면, 먼저 歸茸湯의 鹿茸과 當歸는 대표적인 補陽藥과 補血藥으로 鹿茸은 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨하고, 當歸는 補血和血하는 效能이 있다⁴⁷⁾. 또한 이 두 藥物에 대한 실험적 연구도 많이 이루어져 있는데, 鹿茸의 免疫機能에 미치는 영향⁴⁸⁻⁵⁰⁾, 造血作用에 미치는 영향⁵¹⁾, 소화기능에 미치는 영향⁵²⁾, 成長과 骨形成에 미치는 영향⁵³⁻⁵⁴⁾ 등에 관한 研究와 當歸의 免疫增強效果⁵⁵⁻⁵⁶⁾와 造血作用⁵⁷⁾에 관한 研究結果가 이미 報告된 바 있다. 그 외에 人蔘, 黃芪, 白朮은 모두 대표적인 補氣藥으로 공통적으로 溫, 甘하여 補脾益氣, 益胃, 和中하므로 脾胃를 培補하는 要藥이 되고, 또한 一身의 氣를 주관하는 脾肺를 補하여 大補元氣한다. 砂仁과 山楂는 溫脾化濕開胃, 消食積하면서 助脾健胃하는 效能이 있고, 龍眼肉은 補益心脾하면서 養血安神하며, 枸杞子와 五加皮는 肝腎을 補益하는 要藥으로 活血通經하는 紅花가 同用하면 強筋骨하면서 小兒成長을 促進시키는 作用을 하게 된다⁴⁷⁾.

以上에서 살펴 본 바와 같이 加味歸茸湯은 全體的으로 陰陽을 雙補하여 先天不足을 補하고 肝腎을 滋養하여 小兒의 成長 發育을 促進시키며 脾胃機能을 圓滑히 하여 營養作用과 新陳代謝를 도와 生氣를 만들어 免疫機能을 키워주는 方劑로 小兒 免疫力 增進과 成長促進에 충분한 效果가 있을 것으로 사료된다.

생쥐의 경우 평균 수명은 2-3년이고, 3주 정도의 수유기간을 거쳐 암·수컷 모두 50일 정도가 되어야 성숙이 일어난다. 림프계의 성숙도 성숙시기가 되어야 최대가 되기 때문에 3주령정도 되어야 인간의 幼兒기에 해당한다고 볼 수 있다⁵⁸⁾. 따라서 本 實驗에서는 KKT가 幼兒의 免疫能에 미치는 影響을 觀察하고자, 새끼생쥐 (3 주령) 및 어미생쥐 (8 주령)에 KKT를 投與하여 實驗하였다. KKT를 投與하고 分離한 thymocytes의 細胞生存率은 새끼생쥐에서는 concanavalin A를 處理하지 않았을 때나 處理하였을 때 모두 對照群에 비해 增加되었으나, 어미생쥐에서는 별 差異가 없었다. KKT를 投與하고 分離한 splenocytes의 生存率은 새끼생쥐나 어미생쥐에서 모두 LPS를 處理하지 않았을 때나 處理하였을 때 對照群에 비해 增加되었다. 이는 KKT가 thymocytes에 대해서는 어미생쥐보다는 새끼생쥐일 때 細胞生存率을 더욱 增加시키며, splenocytes에 대해서는 어미생쥐나 새끼생쥐 모두 細胞生存率을 增加시켜 免疫能을 調節할 수 있음을 示唆하는 것이다. KKT에 의한 새끼생쥐의 thymocytes 生存率 增加作用이 KKT 直接 또는 間接作用에 의한 것인가를 確認하기 위해 KKT 1, 10 및 100 µg/ml를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 thymocytes의 生存率은 새끼생쥐나 어미생쥐 모두 對照群에 비해 별 差異가 없었다.

이는 KKT가 새끼생쥐의 thymocytes 生存率을 增加시키는 作用이 間接作用임을 意味하는 것이다. KKT에 의한 새끼생쥐 및 어미생쥐의 splenocytes 生存率 增加作用이 KKT 直接 또는 間接作用에 의한 것인가를 確認하기 위해 KKT 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 濃度依存的으로 splenocytes의 生存率은 새끼생쥐나 어미생쥐 모두 對照群에 비해 增加하였다. 이는 KKT가 새끼생쥐 및 어미생쥐의 splenocytes 生存率을 增加시키는 作用이 直接作用임을 강력히 示唆하는 것이다. 이러한 結果는 KKT가 T-lymphocytes는 間接作用에 의해, B-lymphocytes는 直接作用에 의해 活性化함으로써 細胞性免疫反應을 調節하고 있음을 意味하는 것이다.

Thymocyte는 thymus의 皮質 및 髓質에서 增殖 및 分化 過程을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 分化되며, 分化된 Th1 cell은 ν -interferon (ν -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokines을 分泌하여 다른 T 세포, B 세포 및 macrophage의 增殖과 分化를 促進하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 活性化시킨다⁵⁹⁾. 새끼생쥐 對照群의 thymocytes 中 Th (CD4 single positive cell) 細胞는 7.6%, Tc (CD8 single positive cell) 細胞는 2.0%로, 어미생쥐 對照群의 thymocytes 中 Th 細胞는 11.6%, Tc 細胞는 3.2%로 정상 생쥐 胸線에서 CD4⁺CD8⁻ cells은 약 12%, CD4⁺CD8⁺ cells은 약 3%라는 報告⁶⁰⁾와 比較하였을 때 어미생쥐의 population은 낮고 어미생쥐의 population은 비슷한 結果를 나타내었다. KKT를 投與하고 分離한 thy-

mocytes 中 Th 細胞의 population은 새끼생쥐에서는 8.3%로, Tc 細胞의 population은 1.7%로 對照群과 별 差異가 없었으나, 어미생쥐에서는 13.2%로, Tc 細胞의 population은 2.1%로 對照群에 비해 Th 세포의 population은 增加하고 Tc 세포의 population은 감소하였다. 새끼생쥐에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포의 population이 모두 어미생쥐에 비해 현저히 낮은 것은 胸線 發育이 아직 不足하기 때문이 아닌가 推定되나 자세한 것은 追後 研究되어야 할 것이다.

새끼생쥐 splenocytes의 B 및 T 細胞의 population은 KKT를 投與하였을 때 T 細胞의 population은 對照群에 비해 增加하였으며, splenic CD4⁺ 細胞의 population도 對照群에 비해 增加하였으나, 어미생쥐에서는 B 細胞의 population이 對照群에 비해 감소하였다. 새끼생쥐에서 Thy1⁺ 세포의 population이 11.7%로 어미생쥐 22.9%에 비해 현저히 낮았는데, 이는 새끼생쥐의 spleen이 완전히 성숙되지 않았기 때문이 아닌가 사료된다. 이러한 結果는 KKT가 새끼생쥐 spleen의 T-lymphocytes 中 Th 세포의 population을 증가시켜 면역반응을 촉진시킬 수 있음을 示唆하는 것이다. KKT 投與에 의해 splenocytes 中 Th1 細胞에서 分泌되는 ν -IFN 量 및 Th2 細胞에서 分泌되는 IL-4 量을 測定한 結果, 새끼생쥐 및 어미생쥐에서 ν -IFN 및 IL-2의 量은 對照群에 비해 增加하였으나, IL-4의 양은 새끼생쥐에서만 增加하였다. 이는 새끼생쥐에서는 KKT가 splenocytes의 Th1 및 Th2 細胞의 cytokines 分泌에 영향을 주고 있으나, 어미생쥐에서는 KKT가 splenocytes의 Th1 Th2 細胞의 cytokines 에만 영향을 주고 있음을 示唆하는 것이다.

Nitric oxide (NO)는 T-lymphocyte가 생

成하는 cytokines을 調節하며, *in vivo*에서 T-lymphocyte의 生命을 調節하는 因子 中 하나로 알려져 있다⁶¹⁾. 또한 NO는 helper T cell의 增殖을 抑制하며⁶²⁾ 自己 免疫系를 抑制하는 것으로 報告⁶³⁾되었다. 本 實驗에서 KKT를 投與하였을 때 새끼생쥐 및 어미생쥐 모두 對照群에 비해 NO 生成이 增加되었으며, 새끼생쥐에서 어미생쥐보다 NO 生成이 더욱 증가되었다. 이러한 결과가 KKT의 直接作用에 의한 것인지를 確認하고자 KKT 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 새끼생쥐 및 어미생쥐 모두 對照群에 비해 별 차이가 없었다. 이는 KKT가 經口로 投與되었을 때 복강 macrophages에 間接적으로 作用하여 NO 生成을 增加시키고 있음을 示唆하는 것이다. 外部로부터 異物質이 侵入하게 되면 生體는 自己防禦를 위해 macrophages가 活性化되어 phagocytic activity가 促進된다. 이러한 phagocytosis는 macrophage 뿐 아니라 polymorphonuclear leukocyte에서도 일어난다. Phagocytosis는 免疫的인 側面에서 重要하지만, 傷處治癒 過程에서도 매우 重要하다. 本 實驗에서 macrophages의 phagocytic activity를 測定하는데 lucigenin chemiluminescence를 測定하는 方法을 利用하였다. 이 方法의 原理는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 生成하는데, 이때 生成된 oxygen radical과 lucigenin이 反應하여 lucigenin chemiluminescence를 發生하는 것을 測定함으로써 phagocytic activity가 進行되는 것을 確認하는 것이다⁶⁴⁾.

Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence (CL) 量을 測定한 結果 KKT 投與에 의해 새끼생쥐에서는 CL 量이 對照群에 비해 약 3배 增加하였으며, 어미생쥐에서

는 약 2배 增加하였고, FITC- conjugated *E. coli* particle의 食食能 實驗에서도 同一한 結果를 나타내었다. 이러한 작용이 KKT에 의한 直接작용인지 아니면 間接작용인지를 확인하기 위해 *in vitro*에서 KKT를 處理하였을 때 새끼생쥐 및 어미생쥐 모두 CL 量이 減少되었다. 이는 KKT가 macrophage의 食食能을 直接的으로 增加시키기보다는 生體內에서 間接的인 經路를 통하여 食食能을 增加시키고 있음을 示唆하는 것이며, 새끼생쥐가 어미생쥐보다 macrophages의 活性이 더욱 強力하였다. NO는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 形成을 抑制하는 것으로 알려져 있다⁶⁵⁾. 本 實驗에서 KKT를 투여하였을 때 새끼생쥐 및 어미생쥐 모두 NO 生成이 促進되고, phagocytic activity가 增加되었다는 結果는 KKT가 macrophages의 phagocytic activity를 增加시키는데 NO 經路가 아닌 다른 經路를 통하여 作用하고 있음을 意味하는 것이다.

새끼생쥐에 KKT를 KKT 1g을 蒸溜水 100 ml에 溶解시켜 물병에 넣어 自由 攝取하도록 하면서 2일 間隔으로 16日間 體重을 測定한 結果 體重이 對照群에 비해 약간 增加하는 傾向을 나타냈으나 有意性은 없었으며, KKT 2g을 蒸溜水 100 ml에 溶解시켜 攝取시켰을 경우에는 8日 以後부터 對照群에 비해 有意性 있게 增加하였다. 이러한 結果는 KKT를 投與하였을 경우 새끼생쥐의 成長을 促進할 수 있음을 示唆하는 것이다.

以上の 實驗結果, KKT는 비장 T 림프구의 Th1 세포로부터 cytokines의 分비를 促進함과 동시에 대식세포의 食菌作用을 촉진하는 免疫增強作用과 成長을 促進시키는 作用이 있다고 思料된다.

V. 結 論

加味歸茸湯 (KKT)이 3週令 생쥐 (새끼생쥐) 및 8週令 생쥐 (어미생쥐)의 免疫能과 成長에 미치는 영향은 다음과 같다.

1. KKT를 투여하였을 때 3週令 생쥐에서는 thymocytes 및 splenocytes의 生存率이 모두 증가되었으나, 8週令 생쥐에서는 splenocytes의 生存率만 증가되었다.
2. KKT를 *in vitro*에서 처리하였을 때 3週令 및 8週令 생쥐의 thymocytes 生存率에는 변화가 없었으나, splenocytes의 生存率은 증가되었다.
3. KKT를 투여하였을 때 3週令 생쥐에서는 thymocytes의 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ 세포의 population이 변화되지 않았으나, 8週令 생쥐에서는 CD4⁺ 세포의 population은 증가하고 CD8⁺ 세포의 population은 감소하였다.
4. KKT를 투여하였을 때 3週令 생쥐에서는 splenocytes의 Thy1⁺ 세포 및 splenic CD4⁺ 세포의 population이 증가되었으며, 8週令 생쥐에서는 B220⁺ 세포 및 splenic CD4⁺ 세포의 population이 감소하였다.
5. KKT를 투여하였을 때 3週令 생쥐의 splenocytes 培養液 中 γ -interferon, interleukin-2 및 interleukin-4의 분비가 증가하였으나, 8週令 생쥐에서는 γ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 증가하였다.
6. KKT를 투여하였을 때 3週令 및 8週令 생쥐에서 모두 腹腔 macrophage의 phagocytic activity가 증가되었으며, 3週令

의 생쥐가 8週令 생쥐보다 더욱 증가하였고, KKT를 *in vitro*에서 처리하였을 때는 3週令 및 8週令 생쥐에서 모두 phagocytic activity가 감소하였다.

7. KKT를 투여하였을 때 3週令 및 8週令 생쥐에서 모두 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide의 분비가 증가되었으며, 3週令의 생쥐가 8週令 생쥐보다 더욱 증가하였고, KKT를 *in vitro*에서 처리하였을 때는 3週令 및 8週令 생쥐에서 모두 nitric oxide의 분비에 영향을 주지 않았다.
8. KKT를 투여하였을 때 3週令 생쥐의 체중은 대조군에 비해 8日 이후에 증가하였다.

以上の 實驗結果 加味歸茸湯은 thymocytes 및 splenocytes의 生存率을 증가시켜 特異的 免疫反應을 活性化하고, macrophages로부터 phagocytic activity를 증가시켜 非特異的 免疫反應을 活性化시켰다. 특히 새끼생쥐에 투여하였을 때 어미생쥐에 비해 면역증강작용이 더욱 강력하였고 체중을 증가시키는 작용이 있어 성장에도 영향을 미칠 수 있는 處方이라고 思料된다.

參考文獻

1. 金德坤 외. 韓方小兒科學. 서울:全國 韓醫科大學 小兒科學教室. 2001:10-11,328-329,381-388.
2. 蔡化理. 小兒雜病回春新方. 北京:北京科學技術出版社. 1993:1-12,66-70,84-89.

3. 洪元植 編. 精校黃帝內經. 서울:東洋醫學研究院 出版部. 1981:37,55,57,61,69,78,82, 87,122,137,169, 213,249,256,292,326,336,340, 118-119,304-305,318-319,347-348.
4. 陳士澤. 石室秘錄. 서울:杏林書院. 1973: 164.
5. 傅芳. 中醫免疫思想及成就. 新中醫. 1994; 25(11):55-57.
6. 金完熙. 韓醫學原論. 서울:傳統醫學研究所. 1993:121.
7. 深承沆. 中醫與免疫. 浙江中醫學院學報. 1990;14(2):6-7.
8. 李 槿. 醫學入門. 서울:翰成社. 1980:195-197,524.
9. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1996:448.
10. 金允姬. 加減補兒湯의 造血 및 免疫增進에 관한 연구. 대한한방소아과학회지. 2000; 14(1):79-115.
11. 鄭連熙. 加味補兒湯의 免疫調節作用에 대한 실험적 연구. 大田大學校 博士學位論文. 2001.
12. 元鐘勳. 補兒湯이 免疫反應에 미치는 실험적 연구. 大韓韓方小兒科學會誌. 1986; 7(5):13,19,21.
13. 沈文敬. 錢氏白朮散이 생쥐의 體液性 免疫反應과 細胞性 免疫反應에 미치는 效果. 大韓韓方小兒科學會誌. 1994;8: 39-58.
14. 朴志修. 補中益氣湯加味가 새끼생쥐의 免疫能에 미치는 影響. 大韓韓方小兒科學會誌. 2001; 15(2):15-30.
15. 李承蓮. 參出健脾湯이 흰쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 大韓韓方小兒科學會誌. 1998;12(1):257-276.
16. 金德鎬. 歸茸湯이 免疫細胞에 미치는 實驗的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1985;6 (2):55-63.
17. 韓在敬. 加味歸茸湯이 생쥐의 免疫細胞에 미치는 影響. 大韓韓方小兒科學會誌. 2000;14(2):47-60.
18. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1978;75:2844.
19. 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. 1979;120:1497.
20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods. 1983;65:55-63.
21. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods. 1990; 129:23.
22. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 1994;179:873-879.
23. 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. 1991;59(9):3280.
24. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminenscence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Im-

- munol. Methods. 1994;174:259.
25. 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. 1988;112:163.
 26. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J. Immunol. Methods. 1993;162:1.
 27. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 1984;45:1.
 28. 王伯岳, 江育仁 主編. 中醫兒科學. 서울:鼎談. 1994;23,34-37,84-85,176-184,582-584.
 29. 萬全. 幼科發揮大全. 北京:人民衛生出版社. 1986:24,7-8.
 30. 戴新民. 中醫免疫學. 臺北:啓業書局有限公司. 1985:7-30.
 31. 匡調元 외. 中醫病理研究. 中國:上海科學技術出版社. 1989:31.
 32. 趙鍾寬. 免疫에 관한 東洋醫學的 考察. 東洋醫學. 1986;12(1):20.
 33. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫. 1984;6:5-6.
 34. 上海中醫學院. 中醫學基礎. 香港:商務印書館. 1981:109-113,179.
 35. 金完熙 외. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:50-55.
 36. 具本泓. 免疫과 알레르기. 大韓韓醫學會誌. 1990;11(2):9-10.
 37. 洪彰義. 소아과학. 서울:대한교과서주식회사. 2001:18,219-248.
 38. 신재훈. 성장학의 새로운 개척분야. 소아과. 1992;35(11):1473-1480.
 39. 鄭宰煥, 丁圭萬. 어린이 成長에 대한 韓醫學的 考察. 大韓韓方小兒科學會誌. 1996;10(1):1-16.
 40. 鄭連熙 외. 成長障礙에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方小兒科學會誌. 1999;13(1):17-62.
 41. 金德坤 외. 동의소아과임상실습. 서울:경희대학교 출판국. 1998:91,96,170.
 42. 강재성 외. 세포분자면역학. 서울:범문사. 2002:3-16.
 43. 新谷太 著. 홍천수 譯. pathophysiology로 이해하는 내과학 7. 서울:鼎談. 2002:3-12.
 44. 尹德鎮. 小兒科學大全. 서울:延世大學校出版部. 1984:447-448.
 45. 蔡禹錫. 면역질환의 한방개념과 치료에 관한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1984;11(2):54-91.
 46. 愼元揆. 小兒 虛證에 관한 文獻的 考察. 大韓韓方小兒科學會誌. 1990;4(1):113-119.
 47. 全國韓醫科大學 本草學教室 共著. 本草學. 서울:永林社. 1995:283,294,369,424,531,534,536,545, 578,585,596.
 48. 고병희, 송일병. 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮의 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1986;7(2):157-173.
 49. 고병희 외. 鹿茸의 면역학적 효능에 관한 실험적 연구. 대한한의학회지. 1991;12(1):187-202.
 50. 오하석, 김장현. 부위별 鹿茸이 흑색종 유발 생쥐의 종양억제와 면역기능에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2000;14(1):

- 39-77.
51. 이민형, 서영배. 鹿茸의 造血作用에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지. 2001;16(1): 92-109.
 52. 이산명 외. 人蔘, 鹿茸 및 木香 水鍼이 흰쥐의 체중 및 소화관 호르몬분비에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1988;5(1):1-13.
 53. 김영태 외. 鹿茸 및 鹿茸 藥鍼이 동물 성장과 지능발달에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(5):122-134.
 54. 한상원 외. 鹿茸藥鍼이 骨形成에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(5):135-146.
 55. 오민철 외. 黃芪 및 當歸의 면역증강효과에 관한 연구. 경희대학교 논문집. 1986;9: 343-353.
 56. 한청광, 안덕균. 당귀류의 Decursin함량 및 빈혈가토의 조절작용에 미치는 영향. 경희대학교 논문집. 1993;6:153-167.
 57. 황현숙 외. 농도별 當歸 藥鍼의 방사선 피폭에 의한 면역기능저하에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1994;11(1):113-129.
 58. 이영순. 실험동물의학. 서울:서울대학교출판부. 2003:158.
 59. Miceli, M.C. and Parnes, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*. 1993;53:59.
 60. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). U.S.A., 1994:177-178.
 61. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer Instit.* 1992;84(11): 828-831.
 62. Okkuda, Y., Sakada, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. *Immunology Letters*. 1996; 52:135.
 63. Albina, J.E., Abate, J.A. and Henry, W.L. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. *J. Immunol.* 1991;147(1):144-148.
 64. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr. R. B. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.* 1987;41:450-455.
 65. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H. Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.* 1996;18:635-644.