

## Methotrexate로 유발된 생쥐의 免疫反應에 대한 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方の 效果

김경선, 김덕곤

경희대학교 한의과대학 소아과학교실

### Effects of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the immune response induced by Methotrexate in mice

Kim Gyoung Sun, Kim Deog Gon

Department of Pediatrics, college of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objectives** : In order to study the effect of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the immune response induced by methotrexate in mice.

**Method** : Delayed type of hypersensitivity, hemagglutinin titer, hemolysin titer, rosette forming cells, phagocytic activity for immune response, lymphocyte transformation, and productivity of Interleukin-2 were measured.

**Results** : Body weight decreasing was significantly inhibited as compared with control group in both the *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* groups. Delayed type of hypersensitivity was significantly increased as compared with control group in both groups. Hemagglutinin titer was significantly increased as compared with control group in both groups. Hemolysin titer was significantly increased as compared with control group in the *Okbyoungpoongsangamibang* group. Rosette forming cells were significantly increased as compared with control group in both groups. Phagocytic activity for immune response was slightly decreased in the *Dangkwiyughwangtang* group and slightly increased in the *Okbyoungpoongsangamibang* group insignificantly as compared with the control group. Lymphocyte transformation was significantly increased as compared with the control group in both the *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* groups. Productivity of Interleukin-2 was significantly increased as compared with the control group in both the *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* groups.

Conclusion : Both the *Dangkwiuyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* groups enhance immunity in mice.

Key words : *Dangkwiuyughwangtang*, *Okbyoungpoongsangamibang*, immune response, Methotrexate

접 수 : 2007년 3월 23일, 채택일자 : 2007년 4월 21일  
교신저자 : 김경선, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 한방소아과  
(Tel : 02-958-9172, E-mail : aokop@hanmail.net)

## I. 緒 論

韓醫學에서 疾病의 發生이론은 人體에 內在된 근본적인 에너지인 正氣와 病因인 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 과정으로 본다. 正氣는 人體의 生理機能으로 주로 抗病能力과 恢復能力을 의미하고 防禦機能에서의 組織의 恢復, 免疫機能 등을 말하며 邪氣에 대항하는 防禦개념으로써의 衛氣는 生體內의 수많은 질병에 저항하는 물질을 지칭하므로 正氣와 衛氣의 기능적인 면은 免疫과 불가분의 관계에 있다<sup>1)</sup>. 衛氣는 肌肉사이를 순행하며 汗線을 조절하여 체내의 恒常性を 유지하므로 韓醫學에서 發汗정도를 중요시하는데 그 이유는 正氣와 衛氣의 기능을 측정할 수 있는 지표가 되기 때문이다<sup>2)</sup>.

免疫은 宿主를 병원균으로부터 보호하는 역할을 하는데 宿主를 보호하는 免疫은 身體의 生理構造, 食細胞들에 의해 抗原에 노출되기 이전부터 가지고 있는 自然免疫과 특정병원균에 노출된 후 특정병원균에 대하여 免疫을 가지게 되는 特異免疫으로 나눈다<sup>3,4)</sup>. 또한 외부로부터 침입하는 微生物, 同種의 組織이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 抗體를 만들며 이것을 排除하여 그 개체의 恒常性を 유지하는 현상을 말한다<sup>5)</sup>.

多汗症은 人體의 正氣가 소모된 상태에서 精血, 津液을 간직하지 못하거나 내부의 虛熱이 津液과 相搏하여 津液을 激動시키기 때문에 일어나는 병증이다. 多汗症은 虛症의 대표적인 증상의 하나로 크게 盜汗症과 自汗症으로 분류하여 辨證施治한다. 盜汗은 寐中而通身女浴覺來方止하며, 自汗은 無時而汗出動則爲甚하는 증상으로<sup>6-8)</sup> 특히 소아는 피부가 緻密하지 못하고 衛氣가 단단하지 않고, 氣血이 아직 완전하지 못하는 등의 生理的 특성을 갖고 있어 氣虛, 血虛, 表虛로 인한 多汗症은 小兒虛弱症에서 많은 비율을 차지하고 있다<sup>9-11)</sup>.

當歸六黃湯은 이러한 多汗症 특히 盜汗症에 사용되는 聖藥으로 李<sup>12)</sup>의 蘭室秘藏에 처음 기재된 이후 많은 醫家들에 의해 頻用되어 온 방제이다. 主治症은 淸火補陰하고 方劑의 구성약물은 黃芪, 生地黃, 熟地黃, 當歸, 黃芩, 黃柏, 黃連이다<sup>13)</sup>. 또한 玉屏風散加味方은 朱<sup>14)</sup>의 丹溪心法에 수록된 이후 많은 醫家들이 表虛自汗症에 이용한 대표적인 방제로 白朮, 防風, 黃芪로 구성된 玉屏風散을 合方하였다.

지금까지 면역반응에 관한 한의학 방제를 이용한 효능실험은 免疫에 관한 실험연구로는 高<sup>15)</sup>의 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 면역반응 및 NK 세포활성에 미치는 영향을, 金<sup>16)</sup>의 歸茸湯이 면역반응에 미치는 영향을, 金<sup>17)</sup>의 人蔘 및 熟地黃이 methotrexate로 유발된 면

역기능저하를 회복시키는 효과를 보고하였으며, 羅<sup>18)</sup>는 白朮과 枸杞子가 생쥐의 세포성 및 체액성 면역반응에 미치는 영향을, 李<sup>19)</sup>는 蓼芩湯 및 歸補腎湯을, 吳<sup>20)</sup>는 黃芪 및 當歸의 면역증강 효과를 보고하였으며, 李<sup>21)</sup>는 防風通聖散을, 金<sup>22)</sup>은 肌散을, 金<sup>23)</sup>은 消風散을, 盧<sup>24)</sup>는 當歸飲子를, 金<sup>25)</sup>은 八珍湯의 면역증강효과를 보고한 바 있으나, 臨床에서 小兒汗症에 응용되고 있는 當歸六黃湯에 관한 免疫學的 實驗研究는 아직 報告되지 않았다.

이에 著者는 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方の 免疫반응에 관한 效能을 규명하기 위하여 면역반응에 관한 실험으로는 생쥐를 사용하여 體重의 변화, 遲延型 過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, rosette 形成細胞數, carbon clearance에 의한 貪食能, 淋巴球增殖能, interleukin-2 생산능을 實驗하였다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

체중 20~25g의 Balb/c 및 ICR계 생쥐(해은 무역, 한국)를 사용하였으며, 고휘사료(삼양유지, 마우스 랫트용, 한국)와 물을 충분히 공급하였으며, 실험실 환경에 2주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실 온도는 20±2℃, 습도는 60±5%, 조도는 60±20Lux(a.m. 9:00 - p.m.5:00)에서 사육하였다.

#### 2) 藥材

약재는 시중 건재약국에서 원산지가 확실한 것을 구입 정선한 후 사용하였으며 當歸六黃湯과 玉屏風散은 東醫寶鑑<sup>15)</sup>에 준하였으며, 處方내용과 1첩 분량은 다음과 같다.

### ① 當歸六黃湯

藥材名	生藥名(學名)	重量 (g)
黃 芪	Astragali Radix ( <i>Astragalus membranaceus Bunge.</i> )	7.50
生地黃	Rehmanniae Radix ( <i>Rehmannia glutinosa(Gaertn.) Libosch</i> )	3.75
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat ( <i>Rehmannia glutinosa Libosch</i> )	3.75
當 歸	Angelicae Gigantis Radix ( <i>Angelica gigas N akai.</i> )	3.75
黃 芩	Scutellariae Radix ( <i>Scutellaria baicalensis Georgi.</i> )	2.62
黃 柏	Phellodendri Cortex ( <i>Phellodendron chinens Schneid.</i> )	2.62
黃 連	Coptidis Rhizoma ( <i>Coptis chinensis Franch.</i> )	2.62
總 量		26.61

② 玉屏風散加味方

藥材名	生藥名(學名)	重量 (g)
黃芪	Astragali Radix ( <i>Astragalus membranaceus</i> Bunge.)	12.75
防風	Ledebouriellae Radix ( <i>Ledebouriella divaricata</i> (Turcz.) Hiroe)	5.00
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma ( <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz)	10.00
生地黃	Rehmanniae Radix ( <i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch)	3.75
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat ( <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch)	3.75
當歸	Angelicae Gigantis Radix ( <i>Angelica gigas</i> Nakai)	3.75
黃芩	Scutellariae Radix ( <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.)	2.62
黃柏	Phellodendri Cortex ( <i>Phellodendron chinens</i> Schneid.)	2.62
黃連	Coptidis Rhizoma ( <i>Coptis chinensis</i> Franch.)	2.62
總量		46.86

2. 方法

1) 檢液의 製造

當歸六黃湯과 玉屏風散加味方 10貼分量인 266.1g, 468.6g을 각각 5,000 round flask에 넣고 3,000의 증류수를 加하여 冷却器를 부착하고, 3時間동안 220℃에서 煎湯器 (Misung Scientific Co. Korea)로 加熱煎湯하였다. 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator (Rikakikal Co. Japan)로 減壓濃縮한 後 凍結乾燥機(Freeze Dryer, Christa, Germany)로 完全乾燥시켜 當歸六黃湯 추출물 135.8g, 玉屏風散加味方 추출물 208.7g을 얻어 檢液으로 使用하였다.

2) 檢液의 投與

생쥐 15마리를 1群으로 하여 對照群, 當歸六黃湯投與群, 玉屏風散加味方投與群으로 나누었으며, 當歸六黃湯 投與群에는 當歸六黃湯 추출물 54.3mg/0.2ml/20g, 玉屏風散加味方 投與群에는 玉屏風散加味方 추출물 83.4mg/

0.2ml/20g, 對照群에는 檢液을 용해할 때 使用한 同量의 생리식염수(0.85% NaCl)를 1日 1回 각각 經口投與하였다.

3) 抗原

抗原으로 使用된 SRBC(Korea Media Co.)는 緬羊의 頸動脈에서 heparin처리된 注射器로 採血한 後, 同量의 Alserver氏液(dextrose 20.5g/l, sodium citrate 8.0g/l, citric acid 0.55g/l, sodium chloride 4.2g/l)을 加하여 4℃에서 保存한 後, 1週日以內의 것만 使用하였다.

4) 免疫

檢液 및 生理食鹽水を 14日間 經口投與한 後 實驗群과 對照群의 尾靜脈에  $5 \times 10^8$  cells/ml의 濃度로 調整된 緬羊赤血球浮游液을 0.2ml 注射하여 免疫시켰다.

5) 免疫機能의 低下

檢液을 14日間 經口投與한 後 實驗群 및 對照群에 methotrexate(Sigma, U.S.A.) 1mg/

1kg을 1회/1日, 4日間 經口投與하여 免疫機能을 低下시킨 後, 體重, 遲延形過敏反應, 赤血球凝集所價, 赤血球溶血素價를 測定하였다.

#### 6) 體重의 測定

體重의 測定은 檢液投與 第1日과 第19日째 (免疫機能低下 4日後)에 測定하였다.

#### 7) 遲延形過敏反應(Delayed Type Hypersensitivity)의 測定

遲延形 過敏反應의 測定은 Mitsuoka 등의 方法<sup>26)</sup>에 따라 免疫시킨 4日 後에  $2 \times 10^9$  cells/ml로 調整된 緬羊赤血球 浮游液 0.05 ml를 右側後肢 足蹠皮內에 注射하고 24時間이 經過한 다음 足蹠腫脹反應檢査를 施行하였다.

足蹠腫脹程度는 생쥐를 ether로 가볍게 痲醉시키고 dial thickness gage(No. 2052-08, Mitutoyo, MFG. Co. Tokyo, Japan)를 使用하여 左右側後肢足蹠 두께를 0.01mm까지 測定하여 左右足蹠 두께의 差異를 計算하였다.

#### 8) 採血 및 血清分離

足蹠腫脹反應檢査가 끝난 생쥐를 ether로 痲醉하여 解剖板에 固定하고 1회用 注射器로 心臟에서 約 1ml採血한 後 5ml用 plastic tube(Falcon, No. 2058, Oxford, CA., U. S. A.)에 옮겨 1時間 동안 室溫에서 放置하고 작은 유리봉으로 凝固된 血液을 數回 저은 후, 遠心分離器(IEC Centra-8R, U. S. A)로 2000rpm, 4℃에서 30分間 遠心分離시켜 上層의 血清을 다른 tube에 取하였다. 이 血清을 56℃에서 30分間 非動化시킨 後, 各各 赤血球溶血素價 및 赤血球凝集所價 測定에 使用하였다.

赤血球溶血素價 測定에 補體(complement)로 使用된 家兔의 血清도 上記와 같은 方法

으로 分離하되 非動化하지 않은 狀態로 使用하였다.

#### 9) 赤血球凝集素價의 측정

緬羊赤血球에 대한 凝集素價(hemagglutinin titer)를 測定하기 爲하여 免疫을 誘發시킨 생쥐의 心臟에서 採血한 血液을 分離하여 얻은 血清을 56℃에서 30分間 非動化시킨 다음, microtitration plate(Limbro chemical Co., Conn., U.S.A)의 各 well에 磷酸鹽緩衝食鹽液(Phosphate buffered saline ; PBS pH7. 2, 德山科學, Korea)으로 2倍系列 釋한 血清 25 $\mu$ l에 0.5% 緬羊赤血球浮游液을 50 $\mu$ l씩 加하여 잘 混合한 다음 37℃, 5%, CO<sub>2</sub> 培養機 (GLS-2014, G.L.S Co., Korea)內에서 18時間 放置한 후, 赤血球凝集反應을 觀察하였으며, 赤血球凝集을 일으키는 血清의 最高釋倍數를 凝集素價로 測定하였다.

#### 10) 赤血球溶血素價의 測定

緬羊赤血球에 대한 溶血素價(hemolysin titer)를 測定하기 위해서 위와 같은 방법으로 各 well에 補體로서 5倍釋한 家兔의 血清을 25 $\mu$ l씩 加하여 37℃, 5%, CO<sub>2</sub>培養機(GLS-2014, G. L. S Co., Korea)內에서 1時間 放置한 後, 緬羊赤血球가 完全히 溶血을 일으키는 最高釋倍數를 溶血素價로 測定하였다.

#### 11) 脾臟細胞浮游液 準備

採血이 끝난 생쥐를 頸椎脫骨로 致死시킨 후, 腹部를 alcohol로 完全히 塗布하여 脾臟을 無菌的으로 摘出した 後, 脾臟周圍의 組織들을 조심스럽게 除去하고 나서 RPMI(Gibco, Grand Island, NY)로 洗滌하였다. RPMI는 magnetic stirrer를 利用하여 均一한 濃度로 調整한 後, 細菌檢査를 通하여 Gram(-)의 結

결과 나왔을 境遇 使用하였다. 다시 homogenizer에 넣고 適定量의 RPMI를 加한후 펌프질을 하였다. 細胞浮游液을 50ml conical tube에 넣고 遠心分離機(IEC Centra-8R, U. S. A)로 4°C, 1,000rpm에서 10分間 遠心分離하여 上層液은 버리고, red blood lysing buffer(Sigma, USA)를 9ml를 加한 後 잘 섞이도록 pipetting을 하여 赤血球를 破壞하였다. 約 15分間 室溫에 放置한 後 4°C, 1,000rpm에서 5分間 遠心分離한 後 上層液은 버렸다. 脾臟細胞만 남은 tube에 RPMI를 加하여 다시 2번 洗滌하고 脾臟細胞를 再浮游시켰다. 脾臟細胞分離와 遠心分離過程을 除外한 모든 過程을 無菌作業臺에서 無菌의으로 施行하였고, 모든 초자기구는 autoclave(Johnsa m, Co., Korea)로 1時間, 130°C, 3kg/cm<sup>2</sup>로 完全滅菌하여 使用하였다.

#### 12) Rosette 形成細胞數의 測定

Rosette 形成細胞(rosette forming cells : RFC)의 測定은 Bach 등의 方法<sup>27)</sup>에 準하여 測定하였으며, 遠心洗滌한 脾臟細胞浮游液을 1×10<sup>7</sup>cells/ml의 濃度로 調整한 것과 3×10<sup>8</sup> cells/ml 의 濃度로 調整한 緬羊赤血球浮游液을 12×71mm plastic tube(Falcon No. 2058, Oxford, CA., U.S.A)에 各各 0.5ml씩 넣고 混合하여 遠心分離機로 980rpm에서 5分間 遠心分離시킨後, 4°C 冷水槽에서 30分間 放置 後 Hank's balanced salt solution(HBSS : Gibco, No. 310-4020) 1ml를 加하면서 細胞를 再浮游시킨 다음 細胞浮游液을 血球計算板(hemocytometer, Germany)위에 한 방울 떨어뜨리고 450倍率로 檢鏡觀察하였다.

脾臟細胞에 緬羊赤血球가 4個以上 附着된 경우를 rosette 形成 細胞로 定하여 10<sup>6</sup> 脾臟細胞당 10<sup>3</sup> rosette 形成細胞數를 算定하였다.

#### 13) Carbon clearance에 依한 飮食能의 測定

細胞內皮系 飮食能의 測定은 Biozzi 등의 方法<sup>28)</sup>에 依하여 생쥐의 尾靜脈에 carbon 16mg을 注射한 後 1分, 5分에 retro-orbital venous plexus에서 25씩 血液을 micropipette으로 採取하고 各 血液을 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml에 溶血시켜 spectrophotometer(HACH, DREL/2000, Japan)를 使用하여 波長 675nm에서 末梢血管內 炭粉濃度를 測定하였으며, 飮食指數 K는 아래에 公式에 依하여 算出하였다.

#### Phagocystic index K

$$= \frac{\log C1 - \log C2}{T2 - T1}$$

C1: 時間 T1에서의 sample 血液中の carbon 濃度

C2: 時間 T2에서의 sample 血液中の carbon 濃度

T1: 처음 採血時間

T2: 마지막 採血時間

#### 14) 淋巴球增殖能 測定

##### ① 檢液 製造

當歸六黃湯과 玉屏風散加味方 5貼 分量을 各各 5,000ml 플라스크에 넣고, 1,000의 蒸溜水를 넣고 冷却機를 附着하였다. 3時間, 220°C에서 煎湯機(Misung Scientific Co. Korea)로 加熱煎湯한 後, 濾過한 濾液을 rotary vacuume vaporator(Rikakikai Co. Japan)로 減壓濃縮한 後 凍結乾燥機(freeze dryer, Christa, Germany)로 完全乾燥시켜 當歸六黃湯추출물과 玉屏風散加味方추출물을 各各 37.2g, 51.8g 얻었다. 適定濃度로 蒸溜水에 추출물을 釋하여 遠心分離하여 上層液을 使用하였다. 추출물

製造과정에서 蒸溜水, 플라스크 등은 모두 autoclave(Johnsam, Co. Korea)로 130°C, 2kg/cm<sup>2</sup>에서 1시간을 完全滅菌하여 使用하였다. 각 플라스크의 入口는 알루미늄 호일로 싸서 接觸에 의한 感染을 防止하였다.

#### ② 脾臟細胞 浮游液 準備

Balb/c系 생쥐의 脾臟을 無菌의으로 摘出한 後 homogenizer에 넣고 適定量의 RPMI (Gibco, Grand Island, NY)를 加한 後 펌프질을 하였다. 細胞浮游液을 50ml conical tube에 넣고 4°C, 1,000rpm으로 10分間 遠心分離한 後 上層液은 버린 後 red blood lysing buffer (Sigma, U.S.A)를 9ml를 加한 後 잘 섞이도록 pipetting을 하였다. 約 15分間室溫에 放置한 後 4°C, 1,000rpm에서 5分間 遠心分離한 後 上層液은 버렸다. 脾臟細胞만 남은 tube에 RPMI를 加하여 2번 洗滌을 하였다.

#### ③ 培地準備

Complete media에 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY)과 10% Fetal calf serum (FCS) (Gibco, Grand Island, NY), 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, Grand Island, NY)을 添加하여 培地를 만들었다.

#### ④ 淋巴球增殖能測定

淋巴球增殖能은 John 등의 方法<sup>29)</sup>에 따라 測定하였다. 培地에 위의 方法으로 浮游된 脾臟細胞를 1×10<sup>6</sup>cells/ml으로 調整하여 加한 後 T-cell 有絲分裂 유도물질 mitogen의 一種인 concanavalin-A(Sigma, U.S.A)를 10μg/ml를 添加하여 하였다. 5個群으로 나누어 對照群에는 細胞만을 넣었고, sample A群에는 當歸六黃湯 抽出物 0.45μg/ml만을 넣고, sample B群에는 玉屏風散加味方 추출물 0.52μg/ml을 넣

고, sample C群에는 當歸六黃湯추출물 0.45μg/ml와 T cell 유사분열 유도물질 mitogen의 一種인 concanavalin-A(Sigma, U.S.A)를 10μg/ml를 添加하였고, sample D群에는 玉屏風散加味方 추출물 0.52μg/ml에 concanavalin-A를 10μg/ml를 添加하였다. sample E群에는 concanavalin-A만 10μg/ml 넣었다. 培地에 들어 있는 混合液이 잘 섞이도록 흔들어주었다. 各群을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器(GLS-2014, G.L.S Co, Korea)에 넣어 48時間 培養한 後, 96 well microplate에 well당 100씩 分株하였다. 다시 여기에 1μCi의 [<sup>3</sup>H]-thymidine(Sigma, U.S.A)을 添加하고 18時間 培養한 後 自動細胞收集機 (Skatron, Skatron instrument, Norway)로 glass fiber filter상에 收去하였다. Filter를 60°C에서 1時間 乾燥시킨 後 scintillation vial에 cocktail인 scintillation fluid를 5ml를 加하여 同位元素測定器인 β-scintillation counter(Beckman, LS 3801, U.S.A)에서 DNA合成時 陷入된 [<sup>3</sup>H]-thymidine量을 counter per minute (cpm)로 放射能活性을 測定하였다. 培地에 分株한 各 추출물의 量은 cell이 자라는데 가장 適定한 濃度를 實驗을 통해 調節한 것이다.

#### 15) Interleukin-2 生産能 測定

IL-2 生産能은 John 등의 方法<sup>29)</sup>에 따라 測定하였다. 培地에 위의 方法으로 浮游된 脾臟細胞를 5×10<sup>6</sup>cell/ml로 調整하여 加한 後 T-cell 유사분열 유도물질 mitogen의 一種인 concanavalin-A(Sigma, U.S.A)를 10μg/ml를 添加하여 하였다. 5個群으로 나누어 對照群에는 細胞만을 넣었고, sample A群에는 當歸六黃湯 추출물 0.45μg/ml만을 넣고, sample B群에는 玉屏風散加味方 추출물 0.52μg/ml만을 넣고, sample C群에는 當歸六黃湯추출물 0.45μg/ml와 T cell 유사분열 유도물질 mitogen의

一種인 concanavalin-A(Sigma, U.S.A)를 10 $\mu$ g/ml를 添加하였고, sample D群에는 玉屏風散加味方 추출물 0.52 $\mu$ g/ml에 concanavalin-A를 10 $\mu$ g/ml를 添加하였다. sample E群에는 concanavalin-A만 10 $\mu$ g/ml 넣었다. 培地에 들어 있는 混合液이 잘 섞이도록 흔들어 주었다. 各群을 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>培養器(GLS-2014, G.L.S Co. Korea)에 넣어 24時間 培養한 後 遠心分離한 다음 上層液만을 取하여 IL-2 活性度を 測定하였다. IL-2測定은 Elisa用 mouse IL-2 Kit(ENDOGEN, U.S.A)을 使用하였다. 96 well microplate에 plate reagent를 加한 다음, 細胞培養後 取한 上層液을 50 $\mu$ l씩 分株한 後 4時間 培養하였다. 培養한 다음 RPMI로 3번 洗滌하고 conjugate reagent를 添加한 다음 다시 4時間培養하였다. 培養後 다시 3번 RPMI로 洗滌한 다음 TMB substrate solution을 添加한 後室溫에서 1時間 정도 放置한 다음 stop solution을 添加한 後 Elisa(Emax precision microplate reader, molecular devices, U.S.A)로 450波長에서 吸光度를 測定하였다.

16) 統計處理

實驗結果는 student unpaired T-test에 依하여 統計的 處理를 하였으며 그 結果 p<0.05수

준인 경우 有意性이 있는 것으로 看做하였다.

### Ⅲ. 成 績

#### 1. 免疫反應에 대한 成績

1) 體重變化에 대한 效果

檢液投與 제1일과 제19일에 體重을 측정하였는데 對照群의 1일과 19일째 體重은 각각 20.71 $\pm$ 0.33g, 17.76 $\pm$ 0.31g이었고 當歸六黃湯投與群은 20.59 $\pm$ 0.56g, 18.97 $\pm$ 0.44g, 玉屏風散加味方 投與群은 20.26 $\pm$ 0.30g, 19.09 $\pm$ 0.26g이었다. 實驗群은 對照群에 比하여 모두 有意性(P<0.01)있는 감소 억제 效果가 인정되었다 (Table 1, Fig. 1).

2) 遲延型 過敏反應에 대한 效果

遲延型 過敏反應에 대한 結果는 對照群이 0.186 $\pm$ 0.003mm, 當歸六黃湯 投與群이 0.236 $\pm$ 0.013mm, 玉屏風散加味方 投與群이 0.243 $\pm$ 0.016이었다. 對照群에 比하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두 유의성

Table 1. Effects of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on Body Weight in Methotrexate Treated Mice

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	1day	21day	1day - 21day(g)	p value
Control	15		20.71	17.76	2.95 $\pm$ 0.20 <sup>a)</sup>	
Sample A	15	25.2	20.59	18.97	1.62 $\pm$ 0.21	0.0001**
Sample B	15	42.2	20.26	19.09	1.17 $\pm$ 0.16	0.0000**

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method(\*\*P<0.01). Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiyughwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.



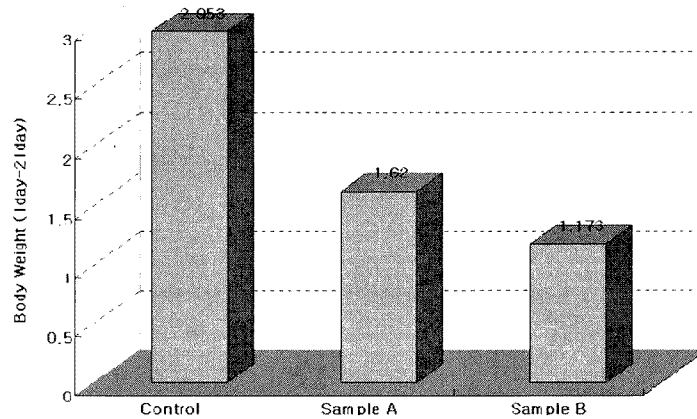


Fig. 1. Effects of *Dangkwiuyuhwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on body weight in methotrexate treated mice. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyuhwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

Table 2. Effects of *Dangkwiuyuhwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on Delayed Type Hypersensitivity in Methotrexate Treated Mice

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	Foot pad swelling (mm)	p value
Control	15		0.186±0.003 <sup>st</sup>	
Sample A	15	25.2	0.236±0.013	0.0013*
Sample B	15	42.2	0.243±0.016	0.0022*

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method (\*P<0.01). Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyuhwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

있는(p<0.01) 증가 효과를 나타내었다(Table 2, Fig. 2).

### 3) 赤血球凝集素價에 대한 효과

凝集素價의 측정은 對照群이 5.33±0.23, 當歸六黃湯 投與群은 6.73±0.54, 玉屏風散加味方 投與群은 6.87±0.46이었다. 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 증가 효과가 인정되었고, 玉屏風散加味方 投與群도 對照群에 비하여 더욱 유의성 있는

(p<0.01) 증가 효과가 나타났다(Table 3, Fig. 3).

### 4) 赤血球溶血素價에 대한 효과

溶血素價를 측정하였는데 對照群이 5.67±0.55, 當歸六黃湯 投與群은 6.93±0.53, 玉屏風散加味方 投與群은 7.07±0.30이었다. 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았으며, 玉屏風散加味方 投與群은 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 증가 효과를 나타내었다

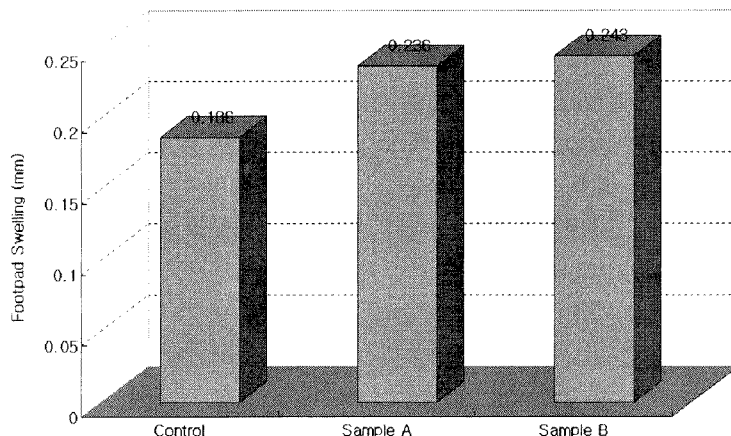


Fig. 2. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on delayed type hypersensitivity in methotrexate treated mice. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid e xtract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

Table 3. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the Hemagglutinin in Mice at 24 Hours after Challenge with SRBC

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	Hemagglutinin (log <sub>2</sub> titer)	p value
Control	15		5.33±0.23 <sup>a)</sup>	
Sample A	15	25.2	6.73±0.54	0.0240*
Sample B	15	42.2	6.87±0.46	0.0057**

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method (\*P<0.05, \*\*P<0.01). Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

(Table 4, Fig. 4).

5) Rosette 形成細胞數에 대한 효과

實驗群과 對照群간의 抗原인 綿羊赤血球에 대한 免疫反應細胞數를 비교하기 위하여 脾臟細胞에 綿羊赤血球가 4개 이상 부착된 경우를 rosette 형성세포로 정하여 10<sup>6</sup> 비장세포당 10<sup>3</sup> rosette 형성세포수를 산정한 결과 對照群은 33.47±2.42, 當歸六黃湯 投與群이 47.40±3.22,

玉屏風散加味方 投與群은 48.07±3.36이었다. 實驗群은 對照群에 비하여 모두 유의성 있는 (p<0.01) 증가 효과가 인정되었다(Table 5, Fig. 5).

6) Carbon clearance에 의한 飮食能에 대한 효과

carbon clearance를 측정한 바 對照群의 phagocytic index K 값이 0.00667±0.001, 當歸

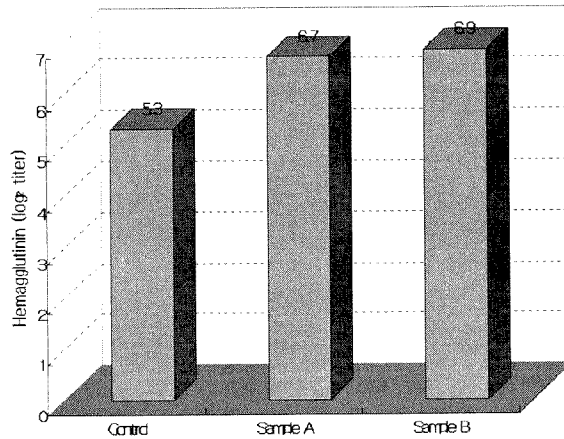


Fig. 3. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the hemagglutinin in mice at 24 hours after challenge with SRBC. Control: Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

Table 4. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the Hemolysin in Methotrexate Treated Mice

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	Hemolysin (log <sub>2</sub> titer)	p value
Control	15		5.67±0.55 <sup>a)</sup>	
Sample A	15	25.2	6.93±0.53	0.1081
Sample B	15	42.2	7.07±0.30	0.0334*

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method (\*P<0.05). Control: Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

六黃湯 投與群이 0.00666±0.001, 玉屏風散加味方 投與群이 0.0087±0.001이었다. 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여 약간 감소하는 효과가 나타났으며 玉屏風散加味方 投與群은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 인정되지는 않았다(Table 6, Fig. 6).

#### 7) 淋巴球 增殖能에 대한 효과

생쥐 脾臟세포를 Concanavalin-A로 刺戟培

養한 후 그 증식을 비교하기 위하여 [<sup>3</sup>H]-thymidine의 흡수 정도를 측정하였던 바 對照群이 108.7±29.9 cpm, 當歸六黃湯 投與群이 1819.2±268.2 cpm, 玉屏風散加味方 投與群이 1953.6±241.9 cpm이었다. 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 증가 효과가 인정되었고, 玉屏風散加味方 投與群은 뚜렷한 유의성 있는(p<0.01) 증가효과가 관찰되었다(Table 7, Fig. 7).

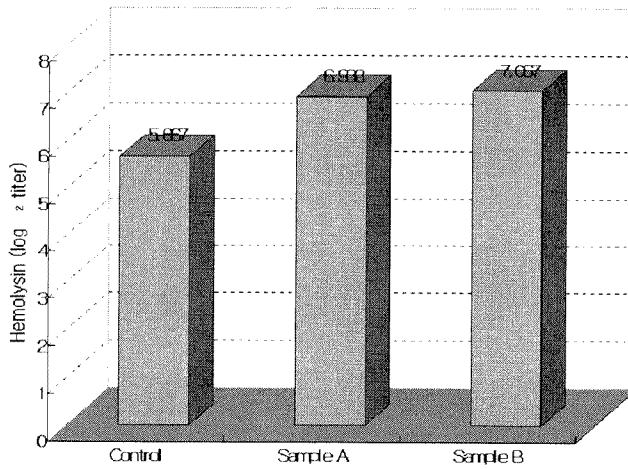


Fig. 4. Effect of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the hemolysin in methotrexate treated mice. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

Table 5. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on Appearance of Rosette Forming Cells in Mice Sensitized with SRBC

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	10 <sup>3</sup> RFC/ 10 <sup>6</sup> Spleen Cell	p value
Control	15		33.47±2.42 <sup>a)</sup>	
Sample A	15	25.2	47.40±3.22	0.0018**
Sample B	15	42.2	48.07±3.36	0.0015**

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method (\*\*P<0.05). Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiuyugwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangami* treated group.

#### 8) Interleukin-2 生産能에 대한 효과

Interleukin-2 生産能을 비교하기 위해 이를 측정하였던 바 對照群이 28.9±4.40, 當歸六黃湯 投與群이 272.6±17.42, 玉屏風散加味方 投與群이 293.2±20.01이었다. 實驗群은 對照群에 비하여 모두 유의성 있는(p<0.01) 증가 효과가 인정되었다(Table 8, Fig. 8).

## IV. 考 察

疾病의 發生은 外邪의 侵入, 正氣의 不足, 體內陰陽의 平衡失調로 發生하며 人體가 가지고 있는 恒常性으로 일종의 非特異性 防禦機能이라 할 수 있다<sup>5)</sup>. 免疫反應이란 自己 것과 自己 것이 아닌 것을 區別하여 自己 것이 아닌 것을 排斥하고 自己를 保存하는 것으로

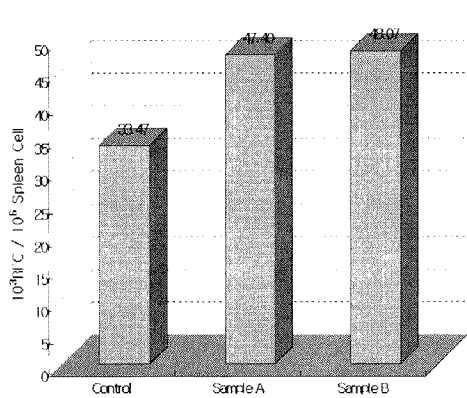


Fig. 5. Effects of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on appearance of rosette forming cells in mice sensitized with SRBC. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiyughwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

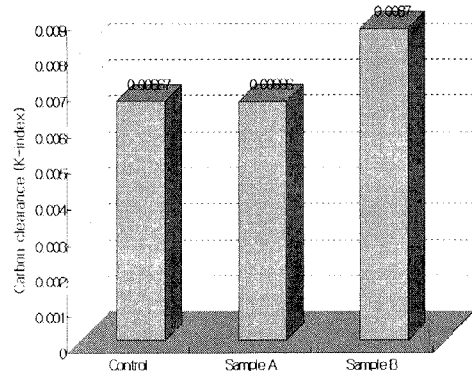


Fig. 6. Effects of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the phagocytic index K in methotrexate-pretreated mice. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiyughwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

Table 6. Effects of *Dangkwiyughwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the Phagocytic Index K in Methotrexate-Pretreated Mice

Group	No. of animals	Dose (mg/20g)	10 <sup>3</sup> RFC/ 10 <sup>6</sup> Spleen Cell	p value
Control	15		0.00667±0.001 <sup>a)</sup>	
Sample A	15	25.2	0.00666±0.001	0.991
Sample B	15	42.2	0.0087±0.001	0.069

a) Mean Standard Error. b) Student's test was used as statistical method. Control : Saline treated group. Sample A : Solid extract of *Dangkwiyughwangtang* treated group. Sample B : Solid extract of *Okbyoungpoongsangamibang* treated group.

이는 正氣와 邪氣가 반응하는 正邪抗爭으로 설명될 수 있다<sup>1)</sup>.

韓醫學에서 免疫이라는 用語는 19세기 免疫類方에 처음으로 記載되어 있지만 免疫의 思想은 內經에서부터 비롯되었다고 할 수 있고 人體의 正常的인 防禦機能은 正氣, 眞氣,

元氣, 衛氣로 表現되고 있다<sup>30)</sup>. 素問 刺法論<sup>31)</sup>에 “五疫之至不相染者. . .正氣存內 邪不可干”이라 하였는바 邪氣(病原菌)에 대한 抵抗力을 正氣라 볼 수 있고, 素問 上古天真論<sup>31)</sup>에는 “念憺虛無 眞氣從之 精神內守 病安從來”라 한 것으로 보아 眞氣 역시 病邪에 대한 防禦

Table 7. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on [3H]-Thymidine Uptake in Balb/c Mouse Spleen Cells

Group	No. of vial	Dispense (µg/ml)	[ <sup>3</sup> H]-Thymidine Uptake (CPM)	p value
Control	6	-	108.7±29.9 <sup>a)</sup>	
Sample A	6	0.45	25.2±3.2	
Sample B	6	0.52	20.9±3.9	
Sample C	6	0.45	1819.2±268.2	0. 0110*
Sample D	6	0.52	1953.6±241.9	0. 0027**
Sample E	6	-	947.8±79.5	

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method (\*P<0.05, \*\*P<0.01). Control : Only Spleen cell group. Sample A : *Dangkwiuyugwangtang* + Spleen cell group. Sample B : *Okbyoungpoongsangamibang* + Spleen group. Sample C : *Dangkwiuyugwangtang* + Con-A + Spleen cell group. Sample D : *Okbyoungpoongsangamibang* + Con-A + Spleen cell group. Sample E : Con-A + Spleen cell group.

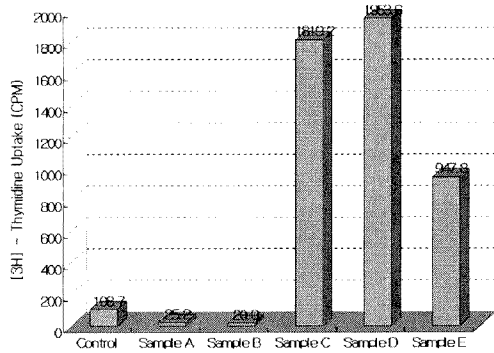


Fig. 7. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on [3H]-Thymidine Uptake in spleen cells. Control : Only Spleen cell group. Sample A : *Dangkwiuyugwangtang* + Spleen cell group. Sample B : *Okbyoungpoongsangamibang* + Spleen cell group. Sample C : *Dangkwiuyugwangtang* + Con-A + Spleen cell group. Sample D : *Okbyoungpoongsangamibang* + Con-A + Spleen cell group. Sample E : Con-A + Spleen cell group.

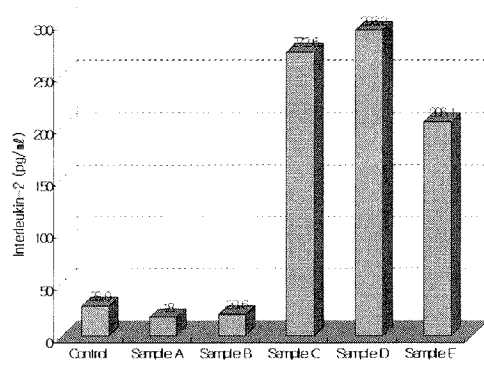


Fig. 8. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the Interleukin-2 Productivity in spleen cells. Control: Only Spleen cell group. Sample A: *Dangkwiuyugwangtang* + Spleen cell group. Sample B: *Okbyoungpoongsangamibang* + Spleen cell group. Sample C: *Dangkwiuyugwangtang* + Con-A + Spleen cell group. Sample D: *Okbyoungpoongsangamibang* + Con-A + Spleen cell group. Sample E: Con-A + Spleen cell group.

Table 8. Effects of *Dangkwiuyugwangtang* and *Okbyoungpoongsangamibang* on the Interleukin-2 Productivity in Balb/c Mouse Spleen Cells.

Group	No. of vial	Dispense (μg/ml)	Interleukin 2 (pg/ml)	p value
Control	8	-	28.9±4.40 <sup>1)</sup>	
Sample A	8	0.45	18.0±2.81	
Sample B	8	0.52	20.6±3.05	
Sample C	8	0.45	272.6±17.42	0.00293**
Sample D	8	0.52	293.2±20.01	0.00097**
Sample E	8	-	206.1±6.24	

a) Mean Standard Error. \* : Student's test was used as statistical method(\*\*P<0.01). Control : Only Spleen cell group. Sample A : *Dangkwiuyugwangtang* + Spleen cell group. Sample B : *Okbyoungpoongsangamibang* + Spleen group. Sample C : *Dangkwiuyugwangtang* + Con-A + Spleen cell group. Sample D : *Okbyoungpoongsangamibang* + Con-A + Spleen cell group. Sample E : Con-A + Spleen cell group.

력을 意味한다. 또 素問 痺論<sup>31)</sup>에는 “衛者. . . 徇皮膚之中 分肉之間 熏于膏膜 散于胸腹 逆其氣則病 從其氣則愈”이라고 하여 衛氣는 皮膚, 肌表뿐만 아니라 臟腑도 保護하는 機能을 包含한다 할 수 있다.

衛氣의 作用은 體外로부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體 내에서 생긴 不必要한 產物 등을 非自己的인 抗原으로 認識하여 이를 排除함으로써 個體의 恒常성을 유지하는 免疫理論과 밀접한 關係를 갖은 것으로 보인다<sup>5)</sup>.

衛氣의 作用과 가장 밀접한 相關性을 갖는 免疫反應은 크게 細胞性 免疫과 體液性 免疫으로 나누며 細胞性 免疫反應은 주로 T淋巴球에 의해 이루어지는데 경우에 따라서는 T細胞나 B細胞가 아닌 淋巴球나 巨食細胞 등에 의하여 이루어지기도 한다. 體液性 免疫反應은 抗原特異的인 分子인 抗體에 의하여 이루어지는 것으로 T淋巴球의 도움을 얻어 B淋巴球에 의해 抗體가 生産되는 것으로 알려져 있다. 免疫이란 외부에서 들어오는 異物質에 대해 宿主를 보호하려는 현상으로 抗原刺戟에 의해

抗體가 만들어지는 면역반응을 抗體媒介免疫 또는 體液性免疫이라 하고, 抗原刺戟을 받은 T淋巴球나 T淋巴球가 만들어 낸 여러 단백질에 의한 면역반응을 細胞媒介免疫 또는 細胞性免疫이라 한다. 細胞媒介 免疫反應의 中추적 역할을 하는 세포는 T淋巴球로서 補助 T淋巴球, 抑制 T淋巴球, 細胞毒性 T淋巴球 그리고 遲延型 過敏免疫反應 T淋巴球로 구성되어 있는데 補助 T淋巴球는 여러 종류의 cytokine을 生産하여 B淋巴球가 효율적으로 抗體를 生産하고 細胞毒性 T淋巴球가 잘 생기도록 도와준다. 抑制 T淋巴球는 필요이상으로 抗體 또는 細胞毒性 T淋巴球가 生産되는 것을 견제하며 적절한 면역반응이 일어나도록 調節하는 기능을 갖고 補助 T淋巴球와 抑制 T淋巴球는 個體의 免疫反應을 조절하여 면역학적 平衡을 유지하고 있어 이 평형이 깨지면 疾病에 걸리게 된다. 遲延型 過敏면역반응 T淋巴球는 기능적으로는 巨食細胞 단구계열 세포들을 염증부위로 끌어 모으고 활성화시켜 宿主防禦기전의 일종인 遲延型 過敏免疫反應을 일으키게 하는 T淋巴球이다<sup>3,5)</sup>.

當歸六黃湯은 黃芪, 生地黃, 當歸, 黃芩, 黃連, 黃柏으로 구성되어 있고, 玉屏風散加味方은 黃芪, 防風, 白朮을 첨가한 처방이다.

當歸六黃湯 및 玉屏風散加味方을 구성하는 개별약재에 관한 면역관련 실험보고로 吳<sup>20)</sup>는 黃芪에 대한 細胞性 및 體液性 免疫增強을 보고하였으며, 高<sup>15)</sup>와 黃<sup>32)</sup>은 生地黃에 대한 細胞性 및 體液性 免疫反應增強 효과를 보고하였다. 당귀에 대하여 吳<sup>33)</sup>는 細胞性 및 體液性 免疫增強을, 山田<sup>34)</sup>은 補體活性化 및 抗腫瘍作用을, 文<sup>35)</sup>은 B細胞의 증식을 보고하였다. 黃芩은 肺心大腸小腸經에 入하여 清熱燥濕, 瀉火解毒효능이 있고 抗anaphylaxis의 작용도 입증되었다<sup>36-40)</sup>. 白朮에 대하여 羅<sup>41)</sup>는 細胞性 및 體液性 免疫反應增強을, 邱<sup>42)</sup>는 抗癌免疫反應의 強化를 보고하였다.

本實驗에서는 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方の 免疫反應의 效果를 究明하고자 ICR계 생쥐를 이용하여 免疫反應으로는 細胞內 DNA 및 RNA 生合成을 抑制함으로써 免疫抑制效果를 나타내는 抗代謝性藥物의 一種인 methotrexate를 經口 投與하여 免疫機能低下된 狀態下에서 遲延型 過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, rosette 形成細胞數, carbom clearance에 依한 貧食能, 淋巴球增殖能, Interleukin-2 生産能에 對하여 實驗하였다.

體重의 測定에서는 對照群과 實驗群이 모두 體重이 줄었으나 이는 免疫機能低下를 위하여 投與된 methotrexate에 의한 것으로 생각되며 體重의 損失이 對照群에 비하여 實驗群에서 모두 有意性 있는 減少억제效果가 認定되었으며 玉屏風散加味方이 當歸六黃湯보다 體重減少를 더 억제하는 것으로 나타났다. 이는 玉屏風散加味方이 當歸六黃湯보다 증가된 黃芪와 白朮 때문이라고 思料된다.

細胞性 免疫反應을 測定하는 代表的 方法

인 遲延型 皮膚過敏反應을 들 수 있는데 機轉은 抗原을 減作된 T細胞들에게 傳達하여 T細胞를 活性化시키면 活性化된 行動細胞들이 여러가지 cytokine을 分泌하고 이로 因하여 주위로 單核球나 顆粒白血球들이 모여들어 活性化로 抗原을 죽이는 것으로 T細胞依存現狀이다<sup>43)</sup>. 本實驗에서는 對照群에 比하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群이 모두 有意性 있는 增加效果가 認定되었다. 감작T임과구의 활성항진 또는 單核球 및 顆粒白血球 등의 活性亢進이나 數的增加등으로 理解된다.

Rosette 形成細胞는 T細胞와 SRBC가 結合하는 現狀으로 T細胞의 分離 및 分布를 測定하는 方法으로 利用되어 細胞性 免疫反應을 측정하는 간접적인 方法으로 사용된다. 本實驗에서는 Bach 등의 방법<sup>27)</sup>에 따라 시행하여 脾臟細胞에 면양적혈구가 4개 이상 부착된 경우를 rosette 형성세포로 정하여  $10^6$  脾臟細胞當  $10^3$  rosette형성세포수를 測定하였는데 本實驗에서는 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群이 모두  $p < 0.01$ 의 有意性 있는 增加效果가 認定되었다.

細胞性 면역반응에 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方 모두 유의성 있는 증강효과가<sup>48)</sup> 인정되었는데, 이는 白朮에 관하여는 羅<sup>18)</sup>가 세포성 및 체액성 면역반응 증강을, 熟地黃은 高<sup>15)</sup>, 黃<sup>32)</sup>, 金<sup>17)</sup>이 細胞性 및 體液性 면역증강을, 金<sup>25)</sup>이 八珍湯이 세포성 및 체액성 면역을 증강효과를 보고하여 이러한 當歸六黃湯, 玉屏風散加味方の 개별약물에 대한 면역반응에 기초를 하고 있으며 일치되는 결과라고 볼 수 있었다.

赤血球表面抗原과 그에 대한 抗體와의 結合에 의해 생기는 凝集反應을 보는 赤血球凝集素價와 赤血球表面抗原과 抗體의 結合體에



異種의 補體가 加해짐으로써 생기는 溶血反應을 보는 赤血球溶血素價는 體液性 免疫反應을 評價하는<sup>44,45)</sup> 實驗으로 凝集素價에서 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 對照群에 비하여 有意性 있는 증가효과가 있었으므로 抗體인 면역 globulin 작용을 활성화시켜 體液性 免疫반응을 증가하는 효과가 있다고 생각된다. 赤血球溶血素價 실험에서 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여 증가하였지만 有意性은 없으며, 玉屏風散加味方 投與群에서는 對照群에 비하여 有意性 있는 증가 효과가 있는 것으로 보아 玉屏風散加味方이 B細胞의 활성을 통하여 體液性 免疫기능을 증가하는 효과가 있다고 생각된다. 이는 吳<sup>20)</sup>의 當歸나 黃芪의 단독 투여보다 黃芪, 當歸 합제의 투여가 면역기능이 증가되었다고 보고하였는 바 當歸, 黃芪가 들어있는 玉屏風散加味方이 當歸六黃湯보다 더 효과가 있는 것으로 思料된다.

Carbon clearance의 측정은 생체에 주입된 Carbon이 細網內皮系에 의하여 貪食되는 정도를 평가하는 방법이다. 細網內皮系의 貪食作用은 주로 單核細胞나 大食細胞가 주된 역할을 하는데 貪食能을 구하기 위하여 carbon clearance 貪食指數를 산출한 바 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비해 다소 감소하였지만 有意성이 인정되지 않았으며, 玉屏風散加味方 投與群에서는 對照群에 增加하는 傾向을 보였으나 有意성이 認定되지는 않았다. 따라서 Carbon clearance의 측정은 玉屏風散加味方과 當歸六黃湯의 실험에서는 有意하지 않는 것으로 思料되었다.

淋巴球增殖能의 測定은 淋巴球機能을 間接的으로 把握할 수 있는 免疫指標로 應用되고 있다. 抗原과 非特異的 反應 및 非特異的 刺戟에 의해서 IL-2 依存性 T淋巴球의 增殖이

發顯되는데 이의 增加는 淋巴球活性의 亢進이나 數的增加를 反映하고 있다<sup>46)</sup>. 本實驗에서는 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비하여  $P<0.05$ 의 뚜렷한 有意성이, 玉屏風散加味方 投與群은  $P<0.01$ 의 有意성이 認定되었다. 崔<sup>33)</sup>의 四物湯 投與群이 methotrexate투여 2주후에 임과구비가 증가된 것으로 보고하였는 바 當歸六黃湯, 玉屏風散加味方の 補陰, 補血시키는 熟地黃, 當歸가 영향을 미친 것으로 思料된다.

Morgan 등<sup>47)</sup>에 의해서 최초로 發見된 IL-2는 末梢血液 림프구 培養液에 存在하면서 T 림프구 增殖을 可能하게 하는 因子로 처음에 T細胞成長因子(T-cell growth factor)라 불렀다. 補助 T細胞와 細胞毒性 T細胞의 增殖, NK細胞와 細胞毒性 T細胞作用活性化, B細胞增殖 및 活性化의 作用을 가지고 個體내에서 免疫反應의 중심적인 役割을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1,48)</sup>. 本實驗에서는 對照群에 비하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두  $P<0.01$ 의 有意性 있는 증가효과가 인정되어 淋巴球의 增殖과 一致되는 結果를 나타내고 있으며 이는 淋巴球의 增殖이 增加되고 T細胞로부터 IL-2 生産能이 增加된 것으로 보아 淋巴球의 數와 活性이 增加되고 補助 T細胞의 活性을 增加시켜 免疫系細胞의 增殖과 分化가 直接的으로 亢進된 것으로 思料된다.

本 실험을 통해 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方 모두 免疫增強效果를 인정할 수 있었으나, 玉屏風散加味方이 체액성 면역반응에 면역증강효과가 인정되었으므로, 當歸六黃湯에 비해서 다소 免疫增強效果가 더 있다고 볼 수 있다. 이는 當歸六黃湯보다 증가된 黃芪와 白朮에 의한 것으로 思慮된다. 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方은 臟腑가 연약한 소아가 白汗

이나 盜汗의 증상이 심하고 免疫機能이 低下되었을 때 免疫增強의 작용을 유도할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

當歸六黃湯과 玉屏風散加味方이 metho-trexate로 免疫을 低下시킨 생쥐의 면역반응에 미치는 효과를 살펴보고자 體重變化, 遲延型過敏反應, 赤血球凝集素價, 赤血球溶血素價, rosette形成細胞, carbon clearance에 의한 食食能, 淋巴球增殖能 및 IL-2生産能을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 體重變化에 대한 效果는 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 對照群에 비하여 有意性 있는 減少抑制效果를 보였다.
2. 遲延型 過敏反應에 대한 效果는 對照群에 비하여 當歸六黃湯과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 有意性 있는 增加效果를 보였다.
3. 赤血球凝集素價는 對照群에 비하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 有意性 있는 增加效果를 보였다.
4. 赤血球溶血素價는 玉屏風散加味方 投與群에서만 對照群에 비하여 有意性 있는 增加效果를 보였다.
5. Rosette 形成細胞數에 對한 效果는 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 對照群에 비하여 有意性 있는 增加效果를 보였다.

6. Carbon clearance에 의한 食食能에서는 當歸六黃湯 投與群은 對照群에 비해 다소 감소하였지만 有意性이 인정되지 않았으며, 玉屏風散加味方 投與群은 對照群에 비하여 다소 증가하였지만 有意性이 인정되지 않았다.
7. 淋巴球增殖能은 對照群에 비하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 有意性 있는 增加效果가 認定되었다.
8. Interleukin-2 生産能은 對照群에 비하여 當歸六黃湯 投與群과 玉屏風散加味方 投與群 모두에서 有意性 있는 增加效果를 보였다.

## 참고문헌

1. 문준진. 동의병리학. 서울:고문사. 1990:23, 26-27, 118-123.
2. 安德均譯. 免疫과 韓方. 서울:열린책들. 1992:19, 35.
3. 김세중. 免疫學. 서울:고려의학. 1994:2-4, 151-154.
4. 이문호. 내과학. 서울:학림사. 1986:1996-9.
5. 菊地浩吉. 最新免疫學. 서울:集文堂. 1993: 27, 33.
6. 徐春甫. 古今醫統秘方大全. 臺北:新文豐出版公司. 1997:1026-44.
7. 薛己. 保嬰全書. 臺北:新文豐出版公司. 1978: 1017-35.
8. 虞天民. 醫學正傳. 서울:醫藥社. 1973:479-83.
9. 정규만. 동의소아과학. 서울:행림출판. 1988:

- 266-7.
10. 李用粹. 證治彙補. 香港:萬葉出版社. 1975: 154-5.
  11. 朱櫛. 普濟方. 서울:翰成社. 1975:896.
  12. 李東元. 蘭室秘藏. 文淵閣四庫全書 745卷. 서울:여강. 1988:559.
  13. 長介賓. 景岳全書. 臺北:旋風出版社. 1980: 214-5.
  14. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울:대성문화사. 1989: 650-1.
  15. 高炳熙. 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK 細胞活性도에 미치는 影響. 서울:大韓韓醫學會誌. 1986;7(2):157-73.
  16. 김덕호. 歸茸湯이 면역반응에 미치는 실험적 연구. 서울:경희대학교대학원. 1985.
  17. 김성수. 人蔘 및 熟地黃이 methotrexate로 誘發된 생쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 서울: 慶熙韓醫大論文集. 1986;9:355-66.
  18. 羅瑛杰. 白朮과 枸杞子가 생쥐의 細胞性 및 體液性免疫反應에 미치는 影響. 서울: 慶熙韓醫大論文集. 1987;10:579-87.
  19. 李進容. 蔘芪湯 및 芪歸補腎湯이 면역반응에 미치는 영향. 서울:慶大學校大學院. 1993.
  20. 吳旻哲. 黃芪 및 當歸의 免疫增強效果에 關한 研究. 서울:慶熙韓醫大論文集. 1986; 9:343-54.
  21. 이동현. 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 抗알레르기와 免疫反應에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校大學院. 1988.
  22. 김영신. 淸肌散과 淸肌散加味方이 抗알레르기와 免疫反應에 對한 實驗的 研究. 서울: 慶熙大學校大學院. 1990.
  23. 金中鎬. 消風散과 加味消風散이 免疫反應 및 抗알레르기에 미치는 影響. 서울: 大韓韓方外官科學會誌. 1991;4(1):1-21.
  24. 盧石善. 當歸飮子水抽出液이 抗allergy反應과 MOUSE의 免疫細胞機能에 미치는 影響. 서울: 大韓韓方外官科學會誌. 1991; 4(1):23-42.
  25. 김혜정. 八珍湯과 加味八珍湯이 抗알레르기와 免疫反應에 미치는 영향. 서울:경희대학교대학원. 1998.
  26. Mitsuoka A. et al.. Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes, evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction. Immunol. 1978;13:363-370.
  27. Bach J. F., Dardenne M. Antigen recognition by T-lymphocytes thymus and marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in the mouse. Cellular Immunol.. 1972;3:1.
  28. Biozzi G. et al. A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice Immunized Intravenously with sheep erythrocytes. Immunol. 1968;14: 7-20.
  29. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek. Current protocols in immunology. John Wiley & sons, Inc.. 1994:2.1.1~2.1.21.
  30. 嚴宗正. 正邪論新續. 新中醫. 1984;16(6):5.
  31. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985: 素問 11, 124, 198, 285, 靈樞, 85, 317.
  32. 黃永明. 生地黃, 乾地黃, 熟地黃이 細胞性 免疫反應 및 體液性免疫反應에 미치는 영향. 서울:慶熙韓醫大論文集. 1987;10:207-18.
  33. 최윤정. 四君子湯 및 四物湯이 methotrxate로 유도된 흰쥐의 면역기능 저하에

- 미치는 영향. 서울:동국대학교대학원. 1996.
34. 山田陽城. 當歸의藥理效果,現代東洋醫學. 1992;13:104.
  35. 문은이. 당귀 추출물이 면역계에 미치는 영향(II). 서울:대한면역학회지. 1991;13(1):56-67.
  36. 강병수 외. 본초학. 서울:영림사. 1992:131-2, 178, 192, 534-6, 578-81.
  37. 中佶求. 中氏本草學. 서울:壽文社. 1988:9-16, 80-4, 88-95, 268-71, 641-7, 649-57.
  38. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李暎鍾, 金先熙. 漢藥臨床應用. 서울:성보사. 1982:50-2, 120-2, 130-6, 353-6, 358-9, 395-7.
  39. 상해중의학원. 中草藥學. 香港:商武印書館. 1983:32-3, 120-1, 195-201, 517-21, 561-2, 564-6.
  40. 吳儀洛. 本草從新. 서울:행림출판. 1989:8-9, 14-5, 20-3, 29-30, 46-9, 118.
  41. 신원규. 黃芪湯이 생쥐의 불감증발을 통한 수분손실에 미치는 실험적 연구. 서울:大韓韓方小兒科學會誌. 1993;7(1):72-86.
  42. 邱佳信外. 健脾中藥防治消化道惡性腫瘤的作用原理研究. 上海:上海中醫學雜誌. 1987;6:45-7.
  43. Wing E. J. et al. Delayed hypersensitivity reaction in basic and clinical immunology. California, Lange Med. Pub.. 1980:129-34.
  44. 하대유, 박성배, 이정호. Colchicine이 마우스의 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. 대한의학협회지. 1987;30(4):409-20.
  45. 하대유, 이정호. 면양적혈구 감작량이 Mice의 지연형 과민반응과 항체생산에 미치는 영향. 전북의대논문집. 1979;3(1):95-100.
  46. Sell S. Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity. Hagerston, Maryland, Harper & Row Pub. 1980:144-71.
  47. Morgan D. A. et al. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. Science. 1976;193:1007-8.
  48. 이정호, 하대유. 화살나무의 항종양작용과 그 기전. 대한면역학회지. 1993;15:243-53.
  49. 이우주. 약리학강의. 서울:태광문화사. 1984:498.
  50. 정태호. 면역학강의. 대구:경북대출판부. 1993:3, 263.
  51. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1986:123-4.
  52. 김성훈. 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 prednisone으로誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校人學院. 1987.
  53. 박형주, 김금재, 하대유. 종양마우스 비장세포의 IL2생산과 마이토젠으로 유도한 세포 증식반응. 대한면역학회지. 1994;16:331-8.
  54. 배원영. 黃芪 수침이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 서울:경희대학교대학원. 1993.
  55. 鄭東郁. 補中益氣湯과 그 加味方이 抗알레르기 및 抗菌作用에 미치는影響. 서울:慶熙大學校論文集. 1991;20:441-61.
  56. 王伯岳. 中醫兒科學. 서울:圖書出版鼎談. 1983:126-32.
  57. 傅芳. 中醫免疫思想成就. 中醫雜誌. 1984;25(11):55.
  58. 中島泉. 新免疫學入門. 서울:지구문화사. 1997:13-6.
  59. Claman H. N. et al. Thymus marrow cell combination, synergism in antibody production. Soc. Exp. Biol. Med. Proc.. 1966;122:1167.

60. Miller T. E. et al. Immunopotiation with BCG, Modulation of referance to the sheep red blood cells, J. Nat. Cancer Inst. 1973;51:1669.
61. Zaalberg O. B. A simple method for detecting single antibody forming cell. Nature. 1964;202:1231.