

補脾湯이 methotrexate로 誘發된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

조현희, 윤혜진, 서정민, 백정환

대구한의대학교 한의과대학 소아과학교실

Effect of *Bobitang* water extracts on immunosuppression induced by Methotrexate in SD rats

Cho Hyun Hee, Yun Hye Jin, Seo Jung Min, Baek Jung Han

Department of Pediatrics, college of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Objectives : In order to investigate the effect of *Bobitang* on SD rats with deteriorated immunity caused by methotrexate.

Methods : The test sample were dosed once a day for 14 days by gastric gavage at a dosage 1,000, 500 and 250mg/kg/10ml from 2 days after last MTX-dosing, and the changes on body weight and gains, spleen weight and total blood leukocyte numbers, total lymphocyte numbers, the percentage of B-cell, T-cell, CD3+CD4+ T-cell, CD3+CD8+ T-cell and CD4+/CD8+ T-cell ratios in the blood and spleen were observed.

Results : The changes on body weight gains, the spleen weight, the total blood leukocyte numbers, the total lymphocyte numbers in the blood and spleen, the ratio of T-cell in the blood and spleen, the ratio of CD3+CD4+ T-cell in the blood and spleen were increased significantly in BBT Extracts groups as compared with control group. The ratio of B-cell in the blood and spleen was not increased significantly in BBT Extracts groups as compared with control group. The percentage of CD3+CD8+ T-cell in the blood and spleen was decreased significantly in BBT Extracts groups as compared with control group. The ratio of CD4+/CD8+ T-cell in blood and spleen was increased significantly in BBT Extracts group as compared with control group.

Conclusions : According to the above results, Bobi-Tang has an effect of increasing immune responses on SD rats with deteriorated immunity caused by methotrexate.

Key words : *Bobitang*(BBT), Methotrexate, CD3+CD4+ T-cell, CD3+CD8+ T-cell, CD4+/CD8+ T-cell

접 수 : 2007년 3월 23일, 채택일자 : 2007년 4월 21일

교신저자 : 백정환, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대부속한방병원 소아과

(Tel. 053-770-2107, E-mail: lee100@dhu.ac.kr)

I. 緒 論

韓醫學은 正氣 위주의 疾病觀을 가지고 있는데, 正氣는 인체의 生理活動을 정상적으로 유지시키고 내외의 病因으로부터 인체를 방어하며 疾病으로부터 회복시킨다. 正氣虛는 모든 疾病을 일으키는 내적 조건이므로, 疾病因子에 관한 것보다는 인체의 生活能力과 疾病에 대한 抵抗能力을 중시하여 대부분의 治療方法이 氣의 保存과 培養을 목표로 하고 있다. 이러한 관점은 현대 의학의 면역학적 개념과 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다¹⁾.

면역이란 특정질환으로부터 보호받는다는 뜻이며, 특이성, 다양성, 기억작용, 자가조절, 이물질에 대한 인식작용의 특성을 가진다²⁾. 즉, 생체가 自己와 非自己를 식별하는 기구이며 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 非自己인 항원으로 인식하고 특이하게 반응하여 항체를 생산하여 이를 배제하면서 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이다²⁻⁴⁾.

正氣의 발생과 분포는 肺, 脾, 腎 三臟과 관련이 있는데, 특히 脾는 運化作用으로 穀氣를 榮衛氣血로 化生하므로 後天의 根本이 되며^{5,6)}, 《正邪論》⁷⁾에서는 正氣를 補하고 邪氣를 除去하는 扶正祛邪法이 면역기능을 강화시킬 수 있는 치료원칙임을 강조 하였다. 扶正의 治法은 益氣, 健建, 補腎 등의 치료를 포괄하며 인체의 氣血不足을 補하여 陰陽과 臟腑機能失調를 조정하여 저항력과 면역기능을 증강시킨다^{8,9)}. 특히 실험을 통해 四君子湯 및 四物湯¹⁰⁾, 六味地黃湯¹¹⁾, 補中益氣湯^{12,13)}, 參朮健脾湯¹⁴⁾, 錢氏白朮散¹⁵⁾ 등의 補氣, 補血, 補陰 및 補陽藥 등은 특이성 면역에 상당한 촉진작용을 나타내는 것으로 보고되고

있다.

이러한 근거로 methotrexate(MTX)로 유발된 면역기능저하^{16,17)}를 개선시키는 효과에 대한 報告로 黃芪¹⁸⁻²⁰⁾, 人蔘^{20,21)}, 補中益氣湯²⁰⁾ 등의 藥鍼을 이용한 것과 何首烏²²⁾, 四君子湯 및 四物湯¹⁰⁾, 固真飲子²³⁾, 黃芪建中湯²⁴⁾ 등의 韓藥에 대한 研究들이 이루어져 왔으나, 脾土虛寒止瀉의 效能으로 小兒 慢驚風에 사용되어온 補脾湯²⁵⁾에 관한 研究는 아직 이루어지지 않았다.

이에 著者는 《東醫寶鑑》〈小兒門·慢驚風〉²⁵⁾의 補脾湯이 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTX 투여로 유발된 면역기능저하 흰쥐에 補脾湯 水抽出物(Bobitang water Extracts, 이하 BBT Extracts) 1,000, 500 및 250mg/kg을 2 주간 투여한 후 體重 및 脾臟 重量의 변화, 末梢血液 중 총 백혈구수의 변화, 脾臟 및 末梢血液에서의 총 림프구수, B 細胞率, T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率, CD4+/CD8+ T 細胞率 등을 평가하여 유의한 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 動物

체중 180g 내외의 암컷 Sprague-Dawley (이하 SD)계 Rat(생후 6주령, Charles River, Japan)를 사료(삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 10일간 적응시킨 후, 무작위배정의 5개 군으로 구분하여, 각각

12 마리씩 총 60마리를 실험에 사용하였다. 온도(20-25℃)와 습도(30-35%)가 조절된 사육실에서 환기횟수는 11~12회/hr, 조명은 12hr/day를 유지하였다. 사료는 고품사료(조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6%)를, 물은 수도물을 자유롭게 공급하였다. 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) 85-23, 1985]에 준하여 취급하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용된 약제는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입(금당제약, 영천)한 것을 정선하여 사용하였으며, 본 실험에 사용한 補脾湯(Bobitang, BBT)은 《東醫寶鑑》 <小兒門·慢驚風>²⁵⁾에 수록된 처방으로 그 내용과 20貼 분량의 조성은 아래와 같다(Table 1).

2. 實驗方法

1) 實驗群의 구분

본 실험에서는 無處置 正常群(Sham group, 이하 Sham), MTX 면역억제 對照群(Control group, 이하 Control), MTX 면역억제 유발 후 BBT Extracts 1,000, 500 및 250 mg/kg 投與群(BBT Extracts group, 이하 T1, T2 및 T3)의 5개 군으로 구분하여, 각각 12 마리씩 총 60마리를 실험에 사용하였다.

Sham을 제외한 모든 MTX 投與群에서는 MTX 투여 5일 후 (MTX 투여 종료 1일 후)에 혈중 총 백혈구수를 측정하여 Sham에 비해 약 45%이상 감소된 실험동물만 선정하여 한 군 당 6마리씩 사용하였으며, Sham의 경

우에는 체중 차이가 비교적 적은 6마리만 선정하여 실험에 사용하였다(Table 2).

2) 檢液의 조제

동일한 성분과 정확한 양으로 실험하기 위하여 아래의 방법으로 검액을 조제하였다. 補脾湯 322.50g(10貼)을 취하여 정제수 5000ml로 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(PVTFD10A; ilShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 70.24g(수율 약 21.78%)의 補脾湯 水抽出物(Bobitang Extracts, BBT Extracts)을 얻어 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of "Bobitang" Used in This Study

Oriental Crude Drug	Pharmacological Name	Dose (g)
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	97.5
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	75.0
白茯苓	Poria	75.0
半夏	Pinelliae Rhizoma	52.5
陳皮	Citri Pericarpium	37.5
黃芪	Astragali Radix	37.5
人參	Ginseng Radix	37.5
當歸	Angelicae Gigantis Radix	37.5
川芎	Cnidii Rhizoma	37.5
肉豆蔻	Myristicae Semen	37.5
乾葛	Puerariae Radix	37.5
神麩	Massa Medicata Fermentata	37.5
黃連	Coptidis Rhizoma	22.5
甘草	Glycyrrhizae Radix	22.5
Total	14 types	645.0

Table 2. Experimental Designs Used in This Study

Group ID	Treatment	Dosage	MTX-induced immunosuppression
Sham	D.W.	0mg/kg	0mg/kg
Control	D.W.	0mg/kg	2mg/kg, 4 times
T1	BBT Extracts	1,000mg/kg	2mg/kg, 4 times
T2	BBT Extracts	500mg/kg	2mg/kg, 4 times
T3	BBT Extracts	250mg/kg	2mg/kg, 4 times

BBT Extracts: Bobi-Tang Extracts; D.W.: Distilled Water; BBT Extracts were dissolved in D.W. and dosed by gastric gavage at 10ml/kg levels and MTX (methotrexate) was dosed by gastric gavage at 5 ml/kg levels using saline as vehicle. BBT and vehicle were dosed for 14 days from 2 days after last dosing of MTX. MTX was dosed once a day for 4 days (Total 4 times).

3) MTX에 의한 免疫抑制 유발

Sham을 제외한 모든 실험동물에 면역억제제를 유발하기 위해 각각 MTX(Sigma, USA) 2mg/kg을 생리식염수에 녹여 5ml/kg의 농도로 매일 1회씩 4일간 경구 투여하였으며, Sham에서는 MTX 대신 같은 양의 멸균증류수를 동일한 방법으로 투여하였다. MTX 투여 5일 후 末梢血液을 채취하여, 총 백혈구수가 Sham에 비해 약 45% 이상 감소된 경우 면역억제가 유발된 것으로 판단하였다.

7(Day 7), 13(Day 13)일 후 및 최종 희생일(Day 14)에 측정하였으며, 모든 실험동물은 사료 섭취와 관련된 체중 차이를 줄이기 위해, 투여 시작일 및 최종 희생일에 18시간 이상 절식시켰다. 또한 실험 시작시의 개체별 체중 차이에 기인한 변화와 MTX 투여 후 체중의 변화를 관찰하기 위하여 아래와 같이 투여기간 동안의 체중 변화량과 면역억제 유발기간 동안의 體重 변화량을 통해 增體量(body weight gains)을 계산하였다.

4) 檢液의 투여

T1, T2 및 T3에서는 각각 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts를 멸균 증류수에 현탁시켜 10ml/kg의 용량으로 매일 1회씩 14일간 경구 투여하였다. Sham 및 Control에서는 동일 용량의 멸균 증류수를 MTX 투여 6일 후부터 14일간 투여하였다.

Body weight gains during dosing (Day 0 - Day 14)

$$= \text{Body weight at sacrifice} - \text{Body weight at initial dosing}$$

Body weight gains during induction periods(MTX 0 - MTX 5)

$$= \text{Body weight at 5 days after MTX dosing} - \text{Body weight at MTX dosing}$$

5) 體重 및 增體量の 측정

실험동물의 체중은 MTX 투여 1일 전(Day-1), MTX 투여일(MTX 0), MTX 투여 5일 후(MTX 5), BBT Extracts 투여 시작일(Day 0), BBT Extracts 투여 후 1(Day 1),

6) 脾臟 重量의 측정

모든 실험동물은 최종 희생일에 마취시킨 다음, 脾臟을 적출하여 g 단위로 絕對 重量

을 측정하였다. 또한 개체간의 체중 차이에 기인한 오차를 줄이기 위하여 아래의 공식으로 相對 重量을 계산하였다.

$$\text{Relative weight(\%)} = \left[\frac{\text{Absolute spleen weight}}{\text{Body weight at sacrifice}} \times 100 \right]$$

7) 採血

MTX 투여 5일 후에는 모든 실험동물을 ethyl ether로 마취한 다음 안와정맥총에서 1 ml의 혈액을 채취하고 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid dipotassium salt)를 처리하여 혈액응고를 방지한 뒤 사용하였으며, 최종 희생일에는 일반적인 방법으로 개복하여 5ml의 혈액을 채취하여 1ml을 EDTA 처리하여 혈액응고를 방지한 뒤 사용하였다.

8) 末梢血液 총 백혈구수의 측정

안와정맥총 및 복대정맥에서 채혈한 혈액을 이용하여, 각각 MTX 투여 5일 후 및 최종 희생일의 혈중 총 백혈구수를 측정하였다. 혈중 총 백혈구수는 백혈구용 혈구계산판과 희석 pipette을 이용하여 $1 \times 10^3 / \text{mm}^3$ 단위로 계산하였다. 이때 희석액은 Türk solution을 이용하였다. 또한 BBT Extracts 투여에 의해 변화된 혈중 총 백혈구수를 관찰하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 BBT Extracts 투여 기간 동안의 혈중 총 백혈구수의 변화를 산출하였다.

Difference of total WBC numbers during dosing periods

$$= \text{Numbers at 2 days after last MTX-dosing} - \text{Numbers at sacrifice}$$

9) 脾臟 부유액의 준비

채혈 후 복부를 70% alcohol로 완전히 도포한 후 무균적으로 脾臟을 적출한 다음 重量을 측정하고, 脾臟 실질조직만을 4°C RPMI-1640 (Gibco BRL, NY, USA) 배지로 2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어있는 Petri dish에서 脾臟 소편을 준비한 다음 homogenize하여 脾臟細胞를 부유시켰다. 준비된 부유액을 스테인레스 철망(mesh No. 100; Sigma, USA)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 세포덩어리를 제거하고 RPMI-1640으로 다시 1회, HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco BRL, USA)로 2회 세척하였다. 이 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10배 희석한 HBSS로 2회 세척하고 RPMI-1640 배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS(fetal bovine serum; Gibco BRL, USA)가 첨가된 혼합배지에 脾臟細胞를 재 부유하여 사용하였다.

10) 末梢血液 및 脾臟 림프구수의 측정

EDTA를 사용하여 응고 방지한 혈액에 동량의 PBS를 섞은 것과 脾臟細胞 부유액에 Lymphoprep($1.077 \pm 0.0001 \text{g/ml}$, Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)를 첨가한 것을 30분 동안 3,000rpm에서 원심분리하여 상층을 버리고, 중간에 하얗게 부유해 있는 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구를 PBS에 부유 시켜서 3,000rpm에서 10분간씩 2회 원심세척한 후 RPMI-1640 배지에 부유시키고, 광학현미경과 혈구계산판을 이용하여, Trypan blue exclusion으로 세포 수를 관찰하였다.

11) 末梢血液 및 脾臟 B 細胞率과 T 細胞率의 측정

EDTA tube에 담긴 末梢血液과 脾臟細胞 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣고, 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1 μ l와 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody(Sigma, USA) 0.5 μ g을 넣어 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 Lysing solution(FASS Lysing solution, Becton Dickinson, USA) 2ml를 가하고, 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

12) 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 측정

EDTA tube에 담긴 末梢血液과 脾臟細胞 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣고, 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1 μ l와 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody(Sigma, USA) 0.5 μ g을 가하여 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 Lysing solution(FACS Lysing solution, Becton Dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1,000rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액

을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

13) 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 측정

EDTA tube에 담긴 末梢血液과 脾臟細胞 부유액을 12 x 75 시험관 2개에 100 μ l씩 넣었다. 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1 μ l와 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody(Sigma, USA)를 0.5 μ g을 가하여 Vortex mixer로 잘 섞고 暗所에 30분간 방치한 후 Lysing solution(FACS Lysing solution, Becton Dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 暗所에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1,000rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 500 μ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

14) 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 측정

측정된 末梢血液 및 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率과 CD3+CD8+ T 細胞率을 이용하여, CD4+/CD8+ T 細胞의 比率을 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{CD4+/CD8+ T lymphocytes(Ratio)} \\ & = (\text{CD3+CD4+ T lymphocytes} / \text{CD3+} \\ & \quad \text{CD8+ T lymphocytes}) \end{aligned}$$

3. 統計分析

모든 수치는 Sham 및 Control과 각각 비교하여 Mann-Whitney, Wilcoxon's Rank Sum test로 유의성을 검증하였으며, 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 10.1.2, SPSS Inc., USA)를 이용하였다. 또한 모든 결과는 Control의 경우 Sham과 비교한 % changes를 아래의 공식으로 산출하였으며, T1, T2 및 T3에서는 Control과 비교한 % changes를 아래의 공식을 이용하여 산출하였다.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Changes us Sham} \\ & = -[(\text{Data of Sham} - \text{Data of Control})/\text{Data of Sham} \times 100] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \% \text{ Changes us Control} \\ & = [(\text{Data of tested group} - \text{Data of Control})/\text{Data of Control} \times 100] \end{aligned}$$

Ⅲ. 實驗成績

1. 體重 및 增體量の 변화

1) 體重의 변화

MTX 투여 전 1일, MTX 투여일, MTX 투여 5일 후, BBT Extracts 투여일, BBT Extracts 투여 후 1, 7, 13일 후 및 최종 희생일의 體重이 Sham의 경우, 각각 185.73±8.53, 189.45±6.89, 246.37±18.56, 228.73±21.84, 247.63±21.83, 275.68±24.27, 289.02±24.62 및 261.65±19.68 g/head로 관찰되었다.

한편 Control에서는 각각 185.82±9.42,

189.18±6.74, 168.52±8.16, 147.77±6.39, 147.48±8.55, 146.77±12.71, 146.87±19.74 및 130.60±19.06 g/head로 관찰되어, Sham에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 體重의 감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었다.

1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 각각 185.68±9.34, 189.12±6.56, 168.18±9.59, 147.87±8.93, 147.95±12.79, 159.97±22.69, 169.00±28.39 및 153.28±25.29 g/head로 관찰되어 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 體重의 감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었으며, Control에 비해 BBT Extracts 투여 7일 후부터 다소 증가된 體重을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다.

500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 각각 185.55±9.01, 188.87±6.74, 168.63±8.69, 147.95±7.53, 149.52±11.47, 155.35±18.50, 160.28±25.12 및 147.67±21.56 g/head로 관찰되어 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 體重의 감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었으며, Control에 비해 BBT Extracts 투여 7일 후부터 다소 증가된 體重을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다.

250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 각각 185.42±8.94, 188.88±6.96, 169.17±7.59, 148.78±6.65, 148.77±7.66, 151.52±15.75, 155.58±21.42 및 141.65±20.45 g/head로 관찰되어, Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 體重의 감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었으며, Control에 비해 BBT Extracts 투여 7일 후부터 다소 증가된 體重을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다 (Table 3).

2) 增體量の 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의

Table 3. Body Weight Changes in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Sham	Control	T1	T2	T3
Day-1	185.73±8.53	185.82±9.42	185.68±9.34	185.55±9.01	185.42±8.94
MTX 0 ^{a)}	189.45±6.89	189.18±6.74	189.12±6.56	188.87±6.74	188.88±6.96
MTX 5	246.37±18.56	168.52±8.16**	168.18±9.59**	168.63±8.69**	169.17±7.59**
Day 0 ^{2b)}	228.73±21.84	147.77±6.39**	147.87±8.93**	147.95±7.53**	148.78±6.65**
Day 1	247.63±21.83	147.48±8.55**	147.95±12.79**	149.52±11.47**	148.77±7.66**
Day 7	275.68±24.27	146.77±12.71**	159.97±22.69**	155.35±18.50**	151.52±15.75**
Day 13	289.02±24.62	146.87±19.74**	169.00±28.39**	160.28±25.12**	155.58±21.42**
Day 14 ^{2c)}	261.65±19.68	130.60±19.06**	153.28±25.29**	147.67±21.56**	141.65±20.45**

Mean±S.D. (n=6), g; 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Overnight fasted; a) At initial MTX dosing; b) At initial Bobi-Tang Extracts dosing; c) At sacrifice; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test).

BBT Extracts 投與群에서 MTX 투여기간 동안의 增體量은 각각 56.92±11.86, -20.67±1.98, -20.93±3.39, -20.23±2.37 및 -19.72±1.33 g/head로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 增體量의 감소가 인정되었다. 한편 Control은 MTX 투여기간 동안 Sham에 비해 -136.31%의 增體量 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 -1.26, 2.13 및 4.60%의 增體量 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 약물 투여기간 동안의 增體量은 각각 32.92±6.65, -17.17±13.01, 5.42±16.90, -0.28±14.10 및 -7.13±13.92 g/head로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 增體量의 감소가 인정되었으며, 1,000mg/kg BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.05) 있는 增體量의 증가를 나타내었고, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與

群에서도 Control에 비해 다소 증가된 增體量을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 약물 투여기간 동안 Sham에 비해 -152.61%의 增體量 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 131.57, 98.37 및 58.47%의 增體量 변화를 나타내었다(Table 4).

2. 脾臟 重量의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟 絶對 重量은 각각 0.777±0.089, 0.245±0.044, 0.423±0.135, 0.375±0.114 및 0.337±0.099 g/head로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 脾臟 絶對 重量의 감소가 인정되었다. 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.05) 있는 脾臟 絶對 重量의 증가를 나타내었고, 250mg/kg의 BBT Extracts 投與

Table 4. Body Weight Gains in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Periods of body weight gains			
	MTX 0 - 5	Changes ²⁾	Day 0 - 14	Changes
Sham	56.92±11.86		32.92±6.65	
Control	-20.67±1.98**	-136.31%	-17.17±13.01**	-152.16%
T1	-20.93±3.39**	-1.26%	5.42±16.90*·#	131.57%
T2	-20.23±2.37**	2.13%	-0.28±14.10**	98.37%
T3	-19.72±1.33**	4.60%	-7.13±13.92**	58.47%

Mean±S.D. (n=6, g; 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

Table 5. Changes on The Spleen Weight in MTX-induced Immuno-suppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Absolute weight (g) Changes ³⁾		Relative weight (%) ²⁾ Changes	
Sham	0.777±0.089		0.296±0.016	
Control	0.245±0.044**	-68.47%	0.187±0.010**	-36.82%
T1	0.423±0.135**#	72.65%	0.270±0.046#	44.39%
T2	0.375±0.114**#	53.06%	0.249±0.043**#	33.16%
T3	0.337±0.099**	37.55%	0.233±0.036**#	24.60%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Relative weight (%) = [(Absolute spleen weight / Body weight at sacrifice) ×100]; 3) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

群에서는 Control에 비해 다소 증가된 脾臟 絕對 重量을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -68.47%의 脾臟 絕對 重量의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 72.65, 53.06 및 37.55%의 脾臟 絕對 重量의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟 相對 重量은 각각 0.296±0.016, 0.187±0.010, 0.270±0.046, 0.249±0.043 및 0.233±0.036 g/head로 관찰되

어, 1,000mg/kg BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 脾臟 相對 重量의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.05) 있는 脾臟 相對 重量의 증가를 나타내었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -36.82%의 脾臟 相對 重量의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 44.39, 33.16 및 24.60%의 脾臟 相對 重量의 변화를 나타내었다(Table 5).

Table 6. Changes on The Total WBC Numbers in The Peripheral Blood in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing I: Absolute WBC Numbers

Group ID ¹⁾	At MTX 5 ($\times 10^3$ cells/mm ³) Changes ²⁾		At Sacrifice ($\times 10^3$ cells/mm ³) Changes	
Sham	8.82±0.96		8.92±0.79	
Control	4.57±0.50**	-48.19%	3.73±0.65**	-58.18%
T1	4.58±0.58**	0.22%	6.57±0.64**##	76.14%
T2	4.53±0.51**	-0.88%	5.55±0.77**#	48.79%
T3	4.52±0.49**	-1.09%	5.05±0.69**#	35.39%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; * p<0.01 compared to that of Sham (MW test); ** p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

3. 末梢血液 총 백혈구수의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 MTX 투여 5일 후의 末梢血液 백혈구수는 각각 8.82±0.96, 4.57±0.50, 4.58±0.58, 4.53±0.51 및 4.52±0.49 $\times 10^3$ cells/mm³ 으로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 末梢血液 총 백혈구수의 감소가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -48.19%의 末梢血液 총 백혈구수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 0.22, -0.88 및 -1.09%의 末梢血液 총 백혈구수의 변화를 나타내었다.

최종 희생일의 末梢血液 총 백혈구수는 각각 8.92±0.79, 3.73±0.65, 6.57±0.64, 5.55±0.77 및 5.05±0.69 $\times 10^3$ cells/mm³ 으로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 末梢血液 총 백혈구수의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液

총 백혈구수의 증가를 나타내었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -58.18%의 末梢血液 총 백혈구수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 76.14, 48.79 및 35.39%의 末梢血液 백혈구수의 변화를 나타내었다(Table 6).

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 BBT Extracts 투여 후 末梢血液 총 백혈구수의 변화량은 각각 0.10±0.19, -0.83±0.23, 1.98±0.22, 1.02±0.31 및 0.53±0.31 $\times 10^3$ cells/mm³ 으로 관찰되어, Sham에 비해 Control에서는 유의성(p<0.01) 있는 감소가, 모든 BBT Extracts 投與群에서는 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -930.00%의 末梢血液 총 백혈구수의 변화량을 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 338.55, 222.89 및 163.86%의 末梢血液 총 백혈구수의 변화

Table 7. Changes on The Total WBC numbers in The Peripheral Blood in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after “Bobitang” Extracts-dosing II: Changes after “Bobitang” Extracts Dosing1)

Group ID ²⁾	Δ WBC (× 10 ³ cells/mm ³)	Changes ³⁾
Sham	0.10±0.19	
Control	-0.83±0.23 ^{**}	-930.00%
T1	1.98±0.22 ^{**##}	338.55%
T2	1.02±0.31 ^{**##}	222.89%
T3	0.53±0.31 ^{**##}	163.86%

Mean±S.D. (n=6); 1) Difference of total WBC numbers during dosing periods = Numbers at 2 days after last MTX-dosing - Numbers at sacrifice; 2) Group ID was listed in Table 2; 3) Changes vs Sham or Control; * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test).

량을 나타내었다(Table 7).

4. 末梢血液 및 脾臟 림프구수의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液 림프구수는 각각 74.75±4.33, 43.57±3.57, 60.02±12.52, 55.28±8.65 및 50.67±6.49 ×10⁵cells/ml로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液 림프구수의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성 (p<0.05) 있는 末梢血液 림프구수의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -41.71%의 末梢血液 림프구수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 37.76, 26.88 및 16.30%의 末梢血液 림프구수의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟 림프구수는 각각 64.70±3.93, 31.23±3.48, 49.42±11.40,

42.32±7.68 및 37.87±7.58 ×10⁶cells/ml로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟 림프구수의 감소가 인정되었다. 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟 림프구수의 증가가 인정되었고, 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -51.73%의 脾臟 림프구수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 58.25, 35.51 및 21.26%의 脾臟 림프구수의 변화를 나타내었다(Table 8).

5. 末梢血液 및 脾臟 B 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液의 B 細胞率は 각각 44.65±3.62, 35.25±2.32, 39.77±5.12, 37.33±4.25 및 36.22±3.44 %로 관찰되어, 1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한

Table 8. Changes on The Lymphocyte Numbers in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Blood ($\times 10^5$ cells/ml) Changes ²⁾		Spleen ($\times 10^6$ cells/ml) Changes	
Sham	74.75 \pm 4.33		64.70 \pm 3.93	
Control	43.57 \pm 3.57**	-41.71%	31.23 \pm 3.48**	-51.73%
T1	60.02 \pm 12.52*·#	37.76%	49.42 \pm 11.40*·#	58.25%
T2	55.28 \pm 8.65*·#	26.88%	42.32 \pm 7.68**·##	35.51%
T3	50.67 \pm 6.49**·#	16.30%	37.87 \pm 7.58**	21.26%

Mean \pm S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

Table 9. Changes on The Ratio of B Lymphocytes in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extract-dosing

Group ID ¹⁾	Blood (%) Changes ²⁾		Spleen (%) Changes	
Sham	44.65 \pm 3.62		40.58 \pm 5.04	
Control	35.25 \pm 2.32**	-21.05%	33.33 \pm 2.73*	-17.87%
T1	39.77 \pm 5.12	12.82%	37.32 \pm 4.56	11.97%
T2	37.33 \pm 4.25*	5.90%	34.90 \pm 3.90	4.71%
T3	36.22 \pm 3.44*	2.75%	34.68 \pm 3.58*	4.05%

Mean \pm S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); * p<0.05 compared to that of Sham (MW test).

모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성 있는 ($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 末梢血液 중 B 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가된 末梢血液 B 細胞率을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -21.05%의 末梢血液 중 B 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 12.82, 5.90 및 2.75%의 末梢血液 중 B 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟의 B 細胞率

은 각각 40.58 \pm 5.04, 33.33 \pm 2.73, 37.32 \pm 4.56, 34.90 \pm 3.90 및 34.68 \pm 3.58 %로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성 ($p<0.05$) 있는 脾臟의 B 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가된 脾臟의 B 細胞率을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -17.87%의 脾臟의 B 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 11.97, 4.71 및 4.05%의 脾臟의 B 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 9).

Table 10. Changes on The Ratio of T Lymphocytes in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Blood (%) Changes ²⁾		Spleen (%) Changes	
Sham	52.35±2.24		50.88±2.38	
Control	41.05±2.94 ^{**}	-21.59%	38.95±1.69 ^{††}	-22.74%
T1	51.47±2.02 ^{##}	25.38%	49.92±2.29 ^{##}	30.63%
T2	50.25±2.47 ^{##}	22.41%	48.07±2.12 ^{##}	23.41%
T3	48.77±2.26 ^{##}	18.81%	45.07±1.78 ^{##}	15.71%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); † p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test).

6. 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液의 T 細胞率は 각각 52.35±2.24, 41.05±2.94, 51.47±2.02, 50.25±2.47 및 48.77±2.26 %로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.05 또는 p<0.05) 있는 末梢血液 중 T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01) 있는 末梢血液 중 T 細胞率의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -21.59%의 末梢血液 중 T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 25.38, 22.41 및 18.81%의 末梢血液 중 T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟의 T 細胞率は 각각 50.88±2.38, 38.95±1.69, 49.92±2.29, 48.07±2.12 및 45.07±1.78 %로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외

한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟의 T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01) 있는 脾臟의 T 細胞率의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -22.74%의 脾臟 T의 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 30.63, 23.41 및 15.71%의 脾臟의 T 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 10).

7. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液의 CD3+CD4+ T 細胞率は 각각 42.35±3.05, 31.03±4.19, 42.38±2.86, 41.25±3.31 및 35.38±4.55%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液의 CD3+CD4+ T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts

Table 11. Changes on The Ratio of CD3+CD4+ T lymphocytes in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Blood (%) Changes ²⁾		Spleen (%) Changes	
Sham	42.35±3.05		39.58±4.04	
Control	31.03±4.19 ^{**}	-26.73%	27.80±3.81 ^{**}	-29.76%
T1	42.38±2.86 ^{##}	36.58%	39.12±2.41 ^{##}	40.72%
T2	41.25±3.31 [#]	32.94%	37.23±3.28 [#]	33.92%
T3	35.38±4.55 [*]	14.02%	30.67±3.62 [*]	10.32%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液의 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었고, 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -26.73%의 末梢血液 중 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 36.58, 32.94 및 14.02%의 末梢血液 중 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率은 각각 39.58±4.04, 27.80±3.81, 39.12±2.41, 37.23±3.28 및 30.67±3.62%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었고, 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소

증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -29.76%의 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 40.72, 33.92 및 10.32%의 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 11).

8. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率은 각각 15.92±1.60, 18.32±1.56, 16.15±1.80, 17.42±2.04 및 17.95±1.32%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.05) 있는 末梢血液의 CD3+CD8+ T 細胞率의 증가가 인정되었다. 1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.05) 있는 末梢血液의 CD3+CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었고, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 감소되었으나,

Table 12. Changes on The Ratio of CD3+CD8+ T Lymphocytes in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after “Bobitang” Extracts-dosing

Group ID ¹⁾	Blood (%) Changes ²⁾		Spleen (%) Changes	
Sham	15.92±1.60		20.27±1.49	
Control	18.32±1.56 [*]	15.08%	19.78±1.77	-2.42%
T1	16.15±1.80 [*]	-11.84%	20.48±2.36	3.54%
T2	17.42±2.04	-4.91%	20.17±2.41	1.97%
T3	17.95±1.32 [*]	-2.02%	20.22±2.19	2.22%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2; 2) Changes vs Sham or Control; * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 15.08%의 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 -11.84, -4.91 및 -2.02%의 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟의 CD3+CD8+ T 細胞率은 각각 20.27±1.49, 19.78±1.77, 20.48±2.36, 20.17±2.41 및 20.22±2.19 %로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서 Sham과의 유의성 있는 변화는 없었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서도 Control과의 유의성 있는 변화는 없었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -2.42%의 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 3.54, 1.97 및 2.22%의 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 12).

9. 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 末梢血液 CD4+/CD8+ T 細胞率은 각각 2.67±0.09, 1.69±0.10, 2.64±0.15, 2.38±0.13 및 1.97±0.14로 관찰되어, 1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液 CD4+/CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -36.70%의 末梢血液 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 56.21, 40.83 및 16.57%의 末梢血液 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 脾臟의 CD4+/CD8+ T 細胞率은 각각 1.95±0.08, 1.40±0.08, 1.92±0.13, 1.85±0.09 및 1.52±0.06로 관찰되어,

Table 13. Changes on The Ratio of CD4+/CD8+ T Lymphocytes¹⁾ in The Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Bobitang" Extracts-dosing

Group ID ²⁾	Blood (Ratio) Changes ³⁾		Spleen (Ratio) Changes	
Sham	2.67±0.09		1.95±0.08	
Control	1.69±0.10 ^{* *}	-36.70%	1.40±0.08 ^{* *}	-28.21%
T1	2.64±0.15 ^{# #}	56.21%	1.92±0.13 ^{# #}	37.14%
T2	2.38±0.13 ^{* ·# #}	40.83%	1.85±0.09 ^{# #}	32.14%
T3	1.97±0.14 ^{* ·# #}	16.57%	1.52±0.06 ^{* ·# #}	8.57%

Mean±S.D. (n=6); 1) CD4+/CD8+ T lymphocytes (Ratio) = (CD3+CD4+ T lymphocytes / CD3+CD8+ T lymphocytes); 2) Group ID was listed in Table 2; 3) Changes vs Sham or Control; ** p<0.01 compared to that of Sham (MW test); * p<0.05 compared to that of Sham (MW test); ## p<0.01 compared to that of Control (MW test); # p<0.05 compared to that of Control (MW test).

1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -28.21%의 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 각각 37.14, 32.14 및 8.57%의 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 13).

IV. 考 察

면역이란 외부로부터 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들고, 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상을 말하며, 특이성, 다양성, 기억작용, 자가조절, 이물질에

대한 인식작용의 특성을 가가진다^{1,3)}. 즉 인체가 미생물에 의해 침입되는 과정에서 나타나는 저항성(resistence)을 말하며²⁶⁾, 이러한 면역 조절 작용은 생명유지에 있어 가장 근본되는 과정으로 면역반응을 통해 조직, 세포, 분자들이 감염원에 대하여 기관을 보호하는 것이다²⁷⁾. 이 저항성은 태어날 때부터 선천적으로 지니고 있는 선천성 면역(innate immunity) 또는 자연적 면역(natural immunity)과 출생 후 여러 가지 원인에 의해 후천적으로 획득되는 후천성 면역(adaptive immunity) 또는 획득성 면역(acquired immunity)이 있다. 이중에서 후천성면역이 면역기능의 실체라 할 수 있다²⁸⁾.

이러한 후천성 면역반응은 B 림프구에 의한 체액성 면역반응(humoral immune response)과 T 림프구에 의한 세포 매개성 면역반응(cell-mediated immune response)으로 나눌 수 있다^{2,3)}. B 림프구는 항체를 생성하는 형질세포의 전구세포로 성숙 B 림프구는 대략 말초혈액 림프구의 10-15%, 비장 림프구의 50%, 골수 림프구의 10%를 차지하며, T 림프구는 세포성 면역 반응에서 중개자 역할

을 하며 성숙 T 림프구는 말초혈액 림프구의 70~80%, 흉선 림프구의 90%, 림프절 세포의 30~40%, 비장 림프구의 20~30%를 차지한다²⁸⁾.

T 림프구의 아집단은 다시 기능적으로 보조 T 림프구(helper T- lymphocyte), 세포독성 T 림프구(cytotoxic T-lymphocyte), 억제 T 림프구(suppressor T-lymphocyte) 그리고 지연형 과민면역반응 T 림프구(delayed-type hypersensitivity T-lymphocyte)로 구성되어 있다²³⁾.

보조 T 림프구(helper T- lymphocyte)는 면역반응을 조절하는 세포로 세포 표면에 CD4를 가지고 있기 때문에 CD4 cell이라고도 한다²³⁾. 모든 혈액세포와 면역세포는 조혈간세포라는 단일한 원시적인 세포에서 분화되어 생긴다. 조혈간세포가 분화됨에 따라 면역세포의 표면에는 각기 독특한 유형의 세포표면 단백질을 발현하는데, 이를 CD(cluster of differentiation)라고 하며, 림프구 분화의 다양한 표식자에 대해 특이적인 단일클론 항체의 군을 의미한다^{29,30)}. CD3은 모든 T 세포에 있으며 T 세포 항원수용체(T-cell receptor, TCR)에 결합하여 항원 인식에 의한 신호를 세포핵에 전달하는 역할을 담당하며 TCR의 세포 표면에 발현되며, CD4는 보조 T 림프구의 표지가 되는 세포 표면 단백질로 T 세포 수용체가 제2형 주조직적합성 복합체(Class II MHC)에 결합된 항원성 펩티드를 인지하는데 중요한 역할을 하며, 제2형 주조직적합성 복합체의 측면에 결합하여 공동수용체로 작용하고, CD8은 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구의 일부가 가지고 있는 세포 표면 단백질로 T 세포 수용체가 제1형 주조직적합성 복합체(Class I MHC)에 결합된 항원성 펩티드를 인지하는데 중요한 역할을 하며, 제1형 주조직적합성 복합체의 측면에 결합하여

공동 수용체로 작용한다^{31,32)}.

T 림프구가 골수에서 생겨 흉선으로 이동한 뒤 성숙하는 동안 서로 다른 세포막 단백질들이 발현하는 과정은 초기의 흉선세포는 CD4도 CD8도 발현하지 않는 CD4-CD8- 또는 더블 네가티브 (Double Negative)에서 CD4+CD8- 혹은 더블 포지티브(Double Positive)의 단계로 되었다가 마지막 단계에서 CD4+CD8- 혹은 CD4-CD8+인 싱글 포지티브(Single Positive)의 세포로 발달해 가는데 세포성 면역반응에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려진 대부분의 보조 T 림프구는 CD4 표면단백질을, 또 대부분의 세포독성 T 림프구는 CD8 표면단백질을 발현한다^{31,32)}.

T 림프구 표면의 항원 수용체를 TCR(T-cell receptor)이라 하며 항원전달세포가 처리하여 항원전달세포 표면에 주 조직적합 복합체(MHC: major histocompatibility complex) 제1항원 또는 제2항원 분자와 결합시켜 내놓은 MHC/펩타이드 복합체(Class II MHC, Class I MHC)와만 반응한다³³⁾. 보조 T 림프구 상의 CD4는 Class II MHC와의 결합을 보조적으로 형성하고 있으며, 세포독성 T 림프구상의 CD8도 Class I MHC와 결합하고 있다³³⁾.

CD4는 T 림프구 활성화에 있어 MHC 제한 T 림프구의 MHC분자에 대한 특이적 친화도에 의해 APC(antigen presenting cell: 항원제시세포) 혹은 표적세포와의 부착을 증가시키며, T 림프구가 APC의 펩타이드-MHC를 인식할 때에 발생하는 초기 신호전달반응에 참여한다^{32,33)}. 이처럼 CD4 보조 수용체의 부착 및 신호전달기능의 연합은 성숙 T 림프구의 항원자극 효율을 크게 향상시킨다³³⁾. 이러한 역할을 하는 림프구 표면의 표지 단백질에 대한 항체를 사용하여 면역을 정량할 수

있으며^{34,35)}, 일반적인 면역력의 표지로도 광범위하게 응용되고 있다^{36,37)}.

Class II MHC와 항원복합체로 활성화된 CD4+ T 림프구가 생산한 싸이토카인은 자연 세포독성세포(natural killer cell: NK세포)와 대식세포를 활성화하며 CTL(cytotoxic T lymphocyte)이 출현하기 전에 바이러스에 감염된 세포를 죽이고, Class I MHC 항원복합체로 활성화된 CD8+ T 림프구는 세포독성 T 림프구를 유도하고, 유도된 CTL이 특이항원-MHC 복합체를 표현하는 표적세포를 용해시킨다³³⁾. 또한 억제 T 림프구에 대해서는 아직 논란의 여지가 많으나 많은 실험적 방법들에 의하면 면역반응을 억제하는 세포는 CD8+ T 림프구이며, CD8+ T 림프구의 감소가 末梢血液에서 항원에 대한 T 림프구의 반응성을 증가시킨다는 보고가 있으며³⁸⁾, 지나친 면역반응을 억제하기 때문에 ‘自己’에 대한 무반응성을 유지하는데 중요한 의의를 가지고 있다²⁹⁾.

따라서 B 細胞率과 T 細胞率 및 T 細胞 아집단들의 細胞率 측정이 면역 기능 검사들 중 하나이고, 末梢血液내의 CD4+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 세포비율은 면역결핍성 질환이나 자가면역질환 등을 평가하는데 응용되는 면역 기능 검사방법이다^{35,37)}.

일반적으로 면역에 영향을 미치는 약물의 약효 검증은 화학물질 및 여러 가지 기타의 원인으로 면역억제를 일으킨 실험동물에 일정 기간 후보물질을 투여한 다음 혈액 중의 면역담당 세포의 변화를 관찰하거나, 이들을 생산하는 기관인 脾臟에서의 면역담당 세포의 변화를 관찰하는 방법과 실제 동물에서 MTX 같은 화학물질로 면역반응 이상을 유발시킨 다음 면역담당세포 및 脾臟과 같은 면역관련 장기의 변화를 관찰하는 방법이 있다³⁹⁾.

MTX는 현재 항암제, 류마티스 치료제 및 면역억제제로 사용되고 있으며 주로 용모탁암에 탁월한 효과를 보인다^{40,41)}. 작용기전은 folic acid에서 folinic acid로의 전환에 관여하는 folic acid reductase를 저해하여 DNA 합성을 방해하기 때문이며, 생체에 있어서는 folic acid 결핍을 초래하여 과량의 세포독작용으로 골수를 억제하여 백혈구 감소현상이 나타나며, 주로 T-cell(주로 helper T-cell)의 증식을 차단하며^{40,41)}, MTX에 의한 면역억제 모델에서 일반적으로 體重의 변화, 면역담당 장기인 脾臟 重量의 변화 및 末梢血液과 脾臟內 면역담당세포의 변화 등을 관찰하여 면역활성 물질의 약효를 평가하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

서양의학에서는 면역계통이 방어, 자기안정, 면역감시의 3대 기능을 갖고 있다고 인식하고 있는데, 방어는 곧 각종 미생물의 감염에 저항하는 것, 즉 正氣가 外邪의 작용을 방어하는 것이고, 자기안정은 자기 신체의 항원을 제거하는 것으로 內邪를 없애고 인체의 陰陽平衡作用을 유지하는 것이며, 면역감시는 생체 세포의 돌발적인 변화를 만들어 내는 異己分子를 방지하는 것이다⁴²⁾. 즉 현대 면역의 개념은 ‘非自己’를 식별하여 ‘非自己’를 배척하고 ‘自己’를 보존하는 것이며 이는 韓醫學에서의 正氣의 작용과 일치되는 것이다^{5,42)}.

正氣란 身體內에서 일체의 疾病에 저항하는 물질로 臟腑經絡 榮衛氣血의 정상적인 생리 기능을 포괄하고 있으며, 邪氣란 일체의 疾病을 일으키는 원인 요소를 총칭하고 外部의 六淫의 邪를 지칭하며, 또 신체 내부의 陰陽의 失調에서 발생된 병리 변화와 병리적 산물 등의 病邪를 말한다^{7,42)}. 이는 《黃帝內經》<素問·刺法論>⁴³⁾의 “正氣存內 邪不可干”, <素問·評熱病論>⁴³⁾의 “邪之所湊 其氣

必虛”, <靈樞·口問>⁴⁴⁾의 “邪之所在 皆爲不足”, <素問·通評虛實論>⁴³⁾의 “邪氣盛則實 正氣奪則虛”에서 살펴볼 수 있듯이 正氣와 邪氣의 세력균형을 통하여 虛實이 분별됨을 설명하였다.

韓醫學에서는 疾病의 발생과 발전을 인체의 正氣와 발병인자인 邪氣의 抗爭 및 消長 進退의 과정으로 發病의 성립과정 중에서 그 관건은 致病素인인 邪氣라기 보다는 오히려 防禦因子인 正氣에 달려있어서 正氣의 虛損을 더욱 중요시 하였기에^{5,7,42)}, <素問·四氣調神大論>⁴³⁾에서의 “不治已病而治未病”이라고 한 바와 같이 疾病除去의 의미뿐만 아니라 예방을 위주로 하여 현대의학에서 말하는 면역의 개념과 연관성을 찾을 수 있다^{5,6)}. 이를 바탕으로 <正邪論>⁷⁾에서는 正氣를 補하고 邪氣를 除去하는 扶正祛邪法이 면역기능을 강화시킬 수 있는 치료원칙임을 강조 하였다^{5,6)}.

扶正의 治法은 益氣, 健脾, 補腎 등의 치료를 포괄하며 인체의 氣血不足을 補하여 陰陽과 臟腑機能失調를 조정하여 저항력과 면역기능을 증강시키며^{8,9)}, 특히 실험을 통해 四君子湯 및 四物湯¹⁰⁾, 六味地黃湯¹¹⁾, 補中益氣湯^{12,13)}, 參朮健脾湯¹⁴⁾, 錢氏白朮散¹⁵⁾ 등의 補氣, 補血, 補陰 및 補陽藥 등은 특이성 면역에 상당한 촉진작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

최근 면역에 관한 韓醫學的 實驗 研究로는 崔⁴⁵⁾, 林⁴⁶⁾, 李⁴⁷⁾ 등의 藥鍼을 포함한 鍼灸療法이 면역기능에 미치는 영향에 대하여 研究하였고, 宋⁴⁸⁾, 鄭⁴⁹⁾, 韓⁵⁰⁾, 李⁵¹⁾, 金⁵²⁾ 등이 黃芪, 加味補兒湯, 加味歸茸湯, 鹿血生化湯 등의 韓藥이 면역반응에 미치는 영향에 대해 연구 보고하였으며, 면역억제제인 MTX^{16,17)}로 유발된 면역저하를 개선시키는 효과에 대한 연구로 黃芪¹⁸⁻²⁰⁾, 人蔘^{20,21)}, 補中益氣湯²⁰⁾ 등

의 藥鍼을 이용한 것과 何首烏²²⁾, 四君子湯 및 四物湯¹⁰⁾, 固真飲子²³⁾, 黃芪建中湯²⁴⁾ 등의 韓藥에 대한 研究들이 이루어져 왔으나, 脾 止虛寒止瀉의 效能으로 小兒 慢驚風에 사용되어온 補脾湯²⁵⁾에 관한 研究는 아직 이루어지지 않았다.

<東醫寶鑑> <小兒·慢驚風門>²⁵⁾의 補脾湯은 補脾益胃 燥濕和中的 白朮, 養血柔肝 緩中止痛의 白芍藥, 利水滲濕 健脾寧心の 白茯苓, 燥濕化痰 降逆止嘔의 半夏, 理氣調中 燥濕化痰의 陳皮, 益衛固表 補中益氣의 黃芪, 大補元氣 固脫生津의 人蔘, 補血和血 調經止痛의 當歸, 活血行氣 祛風止痛의 川芎, 澀腸止瀉 溫中行氣의 肉豆蔻, 升陽解肌 透疹止瀉의 乾葛, 健脾和胃 消食調中の 神麩, 清熱燥濕 清心除煩의 黃連, 和中緩急 潤肺解毒의 甘草로 구성되어, 扶正의 治法인 益氣, 健脾, 養血의 效能을 가진 處方이다³³⁾.

이러한 益氣, 健脾, 養血의 效能을 지닌 약물들로 구성되어진 補脾湯이 인체의 면역기능의 증강에 효과가 있을 것으로 생각되어, MTX 투여로 유발된 면역억제 흰쥐에 BBT Extracts 1,000, 500 및 250mg/kg을 2주간 투여한 후 體重 및 脾臟 重量의 변화, 末梢血液 총 백혈구수의 변화, 脾臟 및 末梢血液 총 림프구수, B 細胞率, T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率 및 CD4+/CD8+ T 細胞率 등을 평가하여 유의한 결과를 얻었다.

體重 및 增體量의 변화에서 본 실험의 결과 이전의 보고들^{54,55)}과 유사하게 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01) 있는 현저한 體重감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 BBT Extracts 투여 7일

후부터 유의성은 인정되지 않았으나 다소 증가된 體重을 나타내었다. BBT Extracts 투여 기간 동안의 增體量의 변화에서 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 增體量의 감소가 인정되었으나, 1,000mg/kg BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 增體量의 증가를 나타내었다. 일반적으로 MTX 투여시 점진적인 體重 감소가 초래되며, 이로 인해 항암제로서의 MTX 사용이 제한되는 것으로 알려져 있으나^{54,55)}, 이러한 體重增加는 補脾湯의 약물 구성 대부분이 益氣, 健脾, 養血의 효능을 가지고 있으므로 體重增加가 초래된 것으로 판단된다.

脾臟 絶對 重量의 변화에서 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였고, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 脾臟 絶對 重量의 증가를 나타내었고, 脾臟 相對 重量의 변화에서 1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群을 제외한 MTX 投與群은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였고, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群은 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 脾臟 相對 重量의 증가를 나타내었다.

脾臟은 생체내 면역방어기능을 담당하고 있는 이차면역기관으로 외래적으로 유입된 항원에 대한 초기 면역반응을 담당하고 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 중요한 기관이다. 또한 T 세포(30-35%), B 세포(25-35%), 대식세포 등의 여러 가지 림프구가 밀집되어 있어, 脾臟의 크기 및 세포의 수는 면역반응에 밀접한 관련이 있으며⁵⁶⁾, 체중에 대한 脾臟의 비율을 비장-체중 지수 (spleen weight index)로 계산해 Control과 비

교 지표로 사용되기도 한다⁵⁷⁾. MTX 투여시 현저한 脾臟細胞의 증식 억제가 실험동물에서 초래되며⁵⁸⁾, 이러한 면역세포의 증식억제에 의해 脾臟 重量의 감소가 초래되는데⁵⁹⁾, 補脾湯이 脾臟의 絶對 重量 및 相對 重量을 증가시켜 脾臟의 면역세포의 활성화에 기여하는 것으로 생각된다.

末梢血液 총 백혈구의 수적 변화에서 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 末梢血液 백혈구수와 BBT Extracts 투여 후 末梢血液 총 백혈구수의 변화량에서 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 증가가 인정되었다.

末梢血液 및 脾臟 림프구수의 변화에서 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液 림프구수의 증가가, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 脾臟 림프구수의 증가가 인정되었다. MTX는 전형적인 면역억제 물질로 MTX 투여시 현저한 백혈구, 특히 림프구의 감소가 초래되는데⁵⁹⁾, 補脾湯이 末梢血液 총 백혈구와 末梢血液 및 脾臟 림프구의 수를 증가시키는 효과를 가지고 있는 것으로 판단된다.

末梢血液 및 脾臟 B 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 B 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가된 末梢血液과 脾臟의 B 細胞率을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다.

MTX에 의한 B 림프구의 감소는 이미 잘 알려져 있으며, 이로 인해 MTX를 조직이식 거부 반응 억제를 위해 사용되기도 하는데⁶⁰⁾, 補脾湯은 B 림프구에 대한 활성은 미약한 것으로 판단되어 체액성 면역 증강에는 큰 효과가 없는 것으로 생각된다.

末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 증가가 인정되었다. T 림프구의 수적 감소 역시 MTX에 의해 초래며^{61,62)}, 실험 결과로 補脾湯의 T 림프구수를 증가시키는 효능이 현저함을 알 수 있었다.

末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 감소가 인정되었으나, 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群은 Control에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었다. 일반적으로 MTX 투여시 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率은 감소되는데⁶³⁾, 이로써 補脾湯이 末梢血液 및 脾臟의 보조 T 림프구를 증가시킨다고 볼 수 있으므로 세포성 면역의 증강에 일정한 역할을 할 것으로 판단된다.

末梢血液 및 脾臟의 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 증가가 인정되었으나, 1,000mg/kg의 BBT Extracts 投與群은 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었고, 모든 MTX 投與

群은 Sham에 비해 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 유의성 있는 변화가 없어 補脾湯의 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구에 대한 명확한 효과를 밝히지는 못하였다. 일반적으로 MTX 투여시 CD8+ T 림프구는 큰 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있지만⁶⁴⁾, 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 유의성 있는 감소로 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구에도 부분적인 영향을 줄 것으로 생각된다.

末梢血液 및 脾臟의 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 증가가 인정되었다. MTX 투여시 CD4+/CD8+ T 細胞率은 일반적으로 감소되므로⁶⁵⁾, 補脾湯이 세포성 면역의 증가에 일정한 역할을 하는 것으로 생각되며 이러한 비율의 증가는 CD8+ 림프구의 감소보다는 CD4+ T림프구의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

以上の結果로 보아 益氣, 健脾, 養血의 효능을 가진 補脾湯은 T 림프구의 증식과 분화를 자극하여 보조 T 림프구수를 증가시켜 인체의 면역기능 중 세포성 면역기능을 회복하는데 유의한 효과가 있을 것으로 추측되며, 보다 다각적인 면역학적 연구를 통한 임상적 활용이 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

補脾湯이 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTX 투여로 면역기능저하가 유발된 흰쥐에 BBT Extracts를 투여한 후 體重 및 脾臟 重量, 末梢血液 총 백혈구수, 脾臟 및 末梢血液에서의 총 림프구수, B 細胞率, T 細胞率, CD3+CD4+ T 細胞率, CD3+CD8+ T 細胞率 및 CD4+/CD8+ T 細胞率 등을 평가하여 다음과 같은 유의한 結果를 얻었다.

1. 增體量은 1,000mg/kg BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
2. 脾臟 絶對 重量은 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를, 脾臟 相對 重量은 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
3. 末梢血液 총 백혈구수 및 백혈구수의 변화량은 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
4. 末梢血液 림프구수는 1,000, 500 및 250 mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를, 脾臟 림프구수는 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
5. 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率은 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
6. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞

率은 1,000 및 500mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.

7. 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率은 1,000 mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 감소를 보였다.
8. 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率은 1,000, 500 및 250mg/kg의 BBT Extracts 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.

以上の 實驗結果로 보아 補脾湯이 비장의 생리적 기능을 활성화시켜 MTX로 免疫機能 低下가 유발된 흰쥐에서 면역기능을 회복시키는 효과가 있으며 細胞性 免疫의 회복과 증강에 유의한 효과가 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. 전국한의학대학병리학교실. 한방병리학. 서울:한의학문화사. 2004:128-32.
2. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울:서울대학교 출판부. 1996:1-3, 14.
3. 김세종. 면역학. 서울:고려의학. 1994:9, 144.
4. 정태호, 김정철, 김문규. 최신면역학강의. 대구:경북대학교출판부. 1996:2-15, 186-99.
5. 낙화생, 안덕균. 면역과 한방. 서울:열린책들. 1998:19-20, 46-7.
6. 具本泓. 면역과 알레르기. 대한한의학회지. 1990;11(2):9-10.
7. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫. 1984;6:5-6.
8. 韓先達. 試論中醫治則與免疫調節. 浙江中

- 醫學院學報. 1991;15(5):8-9.
9. 沈白尹. 中醫藥對免疫功能影響的綜述與評析. 中國中西醫結合誌. 1992;12(7):443-6.
 10. 崔允禎, 金璋顯. 四君子湯 및 四物湯이 methotrexate로誘發된 흰쥐 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지. 1999;13(1):253-75.
 11. 전진오, 정현우. 六味地黃湯이 면역세포에 미치는 실험적 효과, 대한한방내과학회지. 2000;21(2):243-50.
 12. 姜재훈, 홍무창. 補中益氣湯이 면역세포에 미치는 영향, 동의생리학회지. 1999;14(1):23-34.
 13. 洪律喜, 姜允皓. 補中益氣湯과 香砂六君子湯의 병용투여가 S-180 腹水癌細胞를 接種한 생쥐 가슴샘의 세포의 세포성 면역에 미치는 영향. 東國論集. 1995;14:355-75.
 14. 李承蓮, 金璋顯. 參朮健脾湯이 흰쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 대한한방소아과학회지. 1998;12(1):257-76.
 15. 沈文敬, 朴恩貞. 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. 대한한방소아과학회지. 1994;8(1):39-58.
 16. 李淵台. 最新免疫學. 서울:集文堂. 1991:1.
 17. Artym J, Zimecki M, Kruzal ML. Effect of lactoferrin on the methotrexate-induced suppression of the cellular and humoral immune response in mice. Anticancer Res. 2004;24(6):3831-6.
 18. 裴元永, 高炯均, 金昌煥. 黃芪藥鍼이 methotrexate를 투여한 생쥐의 免疫機能低下에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1994;11(1):49-66.
 19. 朴鎮雄, 高炯均, 金昌煥. 濃度差에 따른 黃芪藥鍼이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1994;11(1):67-81.
 20. 金正憲, 朴喜濬, 李香淑, 李惠貞. 補中益氣湯, 人蔘 및 黃芪藥鍼이 MTX로 유발된 백서의 면역기능저하에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2000;3(2):79-97.
 21. 高敬錫. 인삼수침이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 경희대한의대논문집. 1988;11:37-54.
 22. 金일영, 이상재, 김광호. 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한예방한의학회지. 2000;4(2):152-69.
 23. 姜대원, 姜석봉. 固眞飮子가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2004;25(4):117-28.
 24. 具珍淑, 白政翰. 黃芪建中湯이 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 2004;18(1):27-48.
 25. 許浚. 原本 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1991:641.
 26. 차성웅, 남태호, 백영호. 운동과 영양이 인체의 면역기능에 미치는 영향. J of the Research Institute of Physical Education & Sports Science. 1996;12:405-27.
 27. Jacqueline Sharon. Basic Immunology. Williams & Wilkins. 1995.
 28. 김태규, 박수정, 서영훈 외. 면역생물학 (5th). 서울:라이프사이언스. 2002:3-33.
 29. 타다 토미오. 황상익 역. 免疫의 意味論. 서울:한울. 1998:75-87, 100-3, 117-21.
 30. Roitt. 김주덕 외역. 로이트 필수 면역학. 서울:고문사. 1991:35-62.

31. Abbas, Lichtman, Pober. 강제성 외 역. 세포분자면역학. 서울:범문사. 2002;4:3-38, 243-74.
32. Janeway. 김태규 외. 면역생물학. 서울:라이프사이언스. 2002:307-56.
33. 김세중. 면역학 길라잡이. 서울:고려의학. 2000:37-48.
34. Hofman B. et al. Buspirone, a serotonin receptor agonist, increases CD4+ T-cell counts and modulates the immune system in HIV-seropositive subjects. AIDS. 1996;Oct.10(12):1339-47.
35. Robert E. Anderson et al. Use of β 2-microglobulin level and CD4+ lymphocyte count to predict development of AIDS in person with HIV infection. Arch Intern Med. 1990;150:73-7.
36. Chiappelli F. et al. Pituitary-Adrenal Immune system in normal subject and in patients with anorexia nervosa: The number of circulating helper T lymphocytes(CD4+) expressing the homing receptor Leu8 is regulated in part by pituitary-adrenal products. Psychoendocrinology. 1991;16(5):423-32.
37. Everaus H. Hormones and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 1992;8(6):483-9.
- 38.金光赫. 細胞分子免疫學. 서울:正門閣. 1998:30.
39. Cetiner M, Sener G, Sehirlil AO, Eksioglu-Demiralp E, Ercan F, Sirvanci S, Gedik N, Akpulat S, Tecimer T, Yegen BC. Taurine protects against methotrexate- induced toxicity and inhibits leukocyte death. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;209(1):39-50.
40. 홍사석. 이우주의 약리학강의. 서울:의학문화사. 1993:622, 646-8.
41. 대한임상약학회. 임상약리학총서 I 임상약학개론. 서울:희성출판사. 1991:180, 770.
42. 趙鐘寬. 免疫에 관한 東洋醫學的 考察. 東洋醫學. 1986;12(1):20.
43. 裴秉哲. 今釋精帝內經素問. 서울:成輔社. 2000:12, 19, 150, 168, 388.
44. 裴秉哲. 今釋精帝內經靈樞. 서울:成輔社. 1995:277.
45. 崔旼燮. 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 관한 고찰. 대한침구학회지. 1993;10(1):61-74.
46. 林사비나, 李惠貞. 靈芝水鍼이 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1992;13(1):71-84.
47. 李栽東, 金在圭. 鹿茸, 黃芪, 當歸水鍼이 放射線 被曝에 의한 免疫機能 低下에 미치는 影響. 경희대한의대논문집. 1994;17(2):119-40.
48. 宋峰根, 李彥政, 金炯均, 陳善斗, 金成宰, 金東赫. 黃芪가 면역세포의 기능에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 1998;13(2):115-28.
49. 鄭連熙. 柳同烈. 加味補兒湯의 免疫調節作用에 對한 實驗的 研究. 대한한방소아과학회지. 2000;14(2):61-84.
50. 韓在敬, 金允姬, 柳同烈. 加味歸茸湯이 생쥐의 免疫細胞에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지. 2000;14(2):47-60.
51. 李晨來. 鹿血生化湯이 마우스의 면역반응에 미치는 영향. 경희대한의대논문집. 1991;14:85-130.
52. 金喜澤, 盧石善. 內탁천금산가미방이 3-

- MCA로誘發된 皮膚癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 대한의관과학회지. 1999; 12(2):20-52.
53. 전국한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울:도서출판 永林社. 1992:148, 180, 302, 347, 370, 409, 448, 531, 534, 536, 540, 578, 581, 612.
 54. Grossie VB Jr, Ho DH, Loo TL. Effect of malnutrition on methotrexate toxicity and tissue levels of dihydrofolate reductase in the rat. *Cancer Treat Rep.* 1982;66(1):85-9.
 55. Nyfors A, Poulsen H. Liver biopsies from psoriatics related to methotrexate therapy. 1. Findings in 123 consecutive non-methotrexate treated patients. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1976;84(3): 253-61.
 56. James GL, *Methods in Immunotoxicology.* vol2. Wiley-Liss. Inc. 15. 1995.
 57. Ramunas Z., Ins S. Z., Robert. H.B., C. Max L., and Parica. J. M., In vivo effect of chronic treatment with (met5)-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in asthymic mice. *Life Sci.* 2000;66(9):829-34.
 58. Lee YS, Han OK, Park CW, Suh SI, Shin SW, Yang CH, Jeon TW, Lee ES, Kim KJ, Kim SH, Yoo WK, Kim HJ. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *J Ethnopharmacol.* 2003;84(2-3): 93-8.
 59. Sandovsky-Losica H, Segal E. Interaction of *Candida albicans* with murine gastrointestinal mucosa from methotrexate and 5-fluorouracil treated animals: in vitro adhesion and prevention. *J Med Vet Mycol.* 1990;28(4):279-87.
 60. Bohm I. Decrease of B-cells and auto-antibodies after low-dose methotrexate. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(7):278-81.
 61. Zaitsevskaja EV, Babichev VA, Maksimova GF. Effect of methotrexate on the level of T- and B-lymphocytes. *Farmakol Toksikol.* 1997;40(3):322-6.
 62. Massa M, de Benedetti F, Robbioni P, Ramenghi B, Albani S, Martini A. Association of methotrexate treatment with a decrease of double negative (CD4-CD8-) and gamma/delta T cell levels in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1993;20(11): 1944-8.
 63. Balsa A, Gamallo C, Martin-Mola E, Gijon-Banos J. Histologic changes in rheumatoid synovitis induced by naproxen and methotrexate. *J Rheumatol.* 1993;20(9):1472-7.
 64. Martin PJ, Rowley SD, Anasetti C, Chauncey TR, Gooley T, Petersdorf EW, van Burik JA, Flowers ME, Storb R, Appelbaum FR, Hansen JA. A phase I-II clinical trial to evaluate removal of CD4 cells and partial depletion of CD8 cells from donor marrow for HLA-mismatched unrelated recipients. *Blood.* 1993;94(7):2192-9.
 65. Fuhrman C, Parrot A, Wislez M, Prigent H, Boussaud V, Bernaudin JF, Mayaud C, Cadranel J. Spectrum of CD4 to CD8 T-cell ratios in lympho-

cytic alveolitis associated with metho-
trexate-induced pneumonitis. Am J
Respir Crit Care Med. 2001;164(7):
1186-91.