

益黃散이 methotrexate로誘發된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

박유부 · 윤혜진 · 백정한

대구한의대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effect of Ikhwang-San on Immune Suppression Induced by Methotrexate in SD Rats

Park Yu Boo, Yun Hye Jin, Baek Jung Han

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

Objectives

This study is to investigate how dose *Ikhwang-San* can be effective on SD rats which deteriorated immunity caused by methotrexate.

Methods

The test sample were dosed once a day for 14 days by gastric gavage at the beginning of dosage 1000, 500 and 250mg/kg/10 ml from 2 days after last MTX-dosing, and the changes of the body and spleen weight, total number of blood leukocytes, total number of lymphocytes, 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 of the body and spleen weight, the total number of blood leukocytes, the total number of lymphocyte in the blood and spleen were significantly increased in IHS Extracts groups comparing with the control group. The percentage of B-cell, T-cell, CD3+CD4+ T-cell in the blood and spleen were significantly increase in IHS groups and comparing with the control group. The ratio of CD4+/CD8+ T-cell in blood and spleen was significantly increased in IHS Extracts groups comparing with the control group.

Conclusions

According to those results, *Ikhwang-San* has good immunostimulating effect on SD rats which had deteriorated immunity caused by methotrexate.

Key words : *Ikhwang-San* (IHS), methotrexate, CD3+CD4+ T-cell, CD3+CD8+ T-cell, CD4+/CD8+ T-cell ratios

I. 緒 論

韓醫學에서의 면역에 대한 개념은 正氣가 온전하여 邪氣가 들어오더라도 생명체가 스스로 파괴되지 않게 자기를 보호하는 抗爭과정으로 설명하고 있다. 正氣란 臟腑經絡系統으로부터 발휘되는 機能活動과 抗病能力을 말하며, 邪氣란 이러한 기능계에 문란을 일으키는 내외로부터 발생하는 여러 환경인자를 말한다^{1,2)}. 또한 疾病의 발생과 발전은 인체의 正氣와 발병인자인 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 과정으로 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 하였다. 이러한 관점은 현대 의학에서 다루는 생체의 방어기능인 면역학적 개념과 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다³⁻⁵⁾.

《正邪論》⁶⁾에서는 正氣를 補하고 邪氣를 除去하는 扶正祛邪法이 면역기능을 강화시킬 수 있는 치료원칙이 된다고 하였다. 扶正의 治法은 益氣, 健脾, 補腎 등의 치료를 포괄하며, 인체의 氣血不足을 補하고 陰陽과 臟腑機能失調를 조정하여 저항력과 면역기능을 증강시킨다^{6,7)}.

최근 면역에 관한 韓醫學的 實驗 研究로는 加味補兒湯⁸⁾, 加味歸茸湯⁹⁾, 鹿血生化湯¹⁰⁾, 內托千金散加味方¹¹⁾, 蘇子導痰降氣湯¹²⁾ 등에 대한 연구가 있었으며, 특히 四君子湯 및 四物湯¹³⁾, 六味地黃湯¹⁴⁾, 補中益氣湯^{15,16)}, 參朮健脾湯¹⁷⁾, 錢氏白朮散¹⁸⁾ 등의 補氣, 補血, 補陰 및 補陽藥들은 특이성 면역에 상당한 촉진작용을 나타내고 있는 것으로 보고되고 있다.

또한 면역 활성 물질의 약효를 평가하는 것으로 알려져 있는 methotrexate(이하 MTX)^{19,20)}로 유발된 면역저하를 개선시키는 연구에 대

한 보고로는 黃芪²¹⁻³⁾, 人蔘^{23,24)}, 補中益氣湯²³⁾ 등의 藥鍼을 이용한 것과 何首烏²⁵⁾, 四君子湯 및 四物湯¹³⁾, 固真飲子²⁶⁾, 究原心腎丸²⁷⁾, 黃芪建中湯²⁸⁾ 등의 韓藥에 대한 연구들이 이루어져 왔으나, 소아 만경풍의 치료로 주로 사용²⁹⁾되고 있는 益黃散(Ikbwang-San, IHS)에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

이에 著者는 《東醫寶鑑 : 小兒門·慢驚風》³⁰⁾의 益黃散이 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTX 투여로 유발된 면역저하 흰 쥐에 益黃散 水抽出物(Ikbwang-San water Extract, 이하 IHS Extract) 1,000, 500 및 250mg/kg을 2주간 투여한 후 體重 및 脾臟 重量의 변화, 末梢血液 중 총 백혈구 수의 변화, 脾臟 및 末梢血液의 총 림프구 수, 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 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 動物

체중 180g내외의 암컷 Sprague-Dawley(이하 SD)계 Rat(생후 6주령, Charles River, Japan)에 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 고탄사료(조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6%)를, 물은 수돗물을 자유롭게

게 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 OO대학교부속 OO한방병원 약제과에서 구입(금당제약, 영천)한 것을 정선하여 사용하였으며, 본 실험에 사용한 益黃散은 《東醫寶鑑 : 小兒門·慢驚風》³⁰⁾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 IHS Extract 1,000, 500 및 250mg/kg 投與群 (IHS Extract group, 이하 T1, T2 및 T3)의 5개 군으로 구분, 각각 12마리씩 총 60마리를 실험에 사용하였다.

Sham을 제외한 모든 MTX 投與群에서는 MTX 투여 5일 후 (MTX 투여 종료 1일 후)에 혈중 총 백혈구 수를 측정하여 Sham에 비해 약 45%이상 감소된 실험동물만 선정하여 한 군 당 6마리씩 사용하였으며, Sham의 경우에는 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. 益黃散 435.0g(20貼 분량)을 취하여 정제수 5,000ml로 가열 추출한 후 흡인 여과한 여과

Table 1. Composition of "Ikhwang-San" Used in this Study

Oriental Crude Drug	Pharmacological Name	Dose (g)
黃芪	Astragali Radix	150.0
人蔘	Ginseng Radix	75.0
陳皮	Citri Pericarpium	75.0
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	52.5
甘草	Glycyrrhizae Radix	37.5
白茯苓	Poria	30.0
黃連	Coptidis Rhizoma	15.0
Total	7 types	435.0

Table 2. Experimental Designs Used in this Study

Group ID	Treatment	Dosage	MTX-induced immunosuppression
Sham	D.W. ^{a)}	.	.
Control	D.W.	.	2mg/kg, 4 times
T1	IHS Extract ^{b)}	1,000mg/kg	2mg/kg, 4 times
T2	IHS Extract	500mg/kg	2mg/kg, 4 times
T3	IHS Extract	250mg/kg	2mg/kg, 4 times

IHS Extract: Ikhwang-San Extract; D.W.: Distilled Water; IHS Extracts were dissolved in D.W. and dosed by gastric gavage at 10ml/kg levels and MTX (methotrexate) was dosed by gastric gavage at 5ml/kg levels using saline as vehicle. IHS 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).

액을 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 84.46g(수율 약 19.42%)의 益黃散 水抽出物(Ikbwang-San water Extract, 이하 IHS Extract)을 얻어 실험에 사용하였다.

3) MTX에 의한 免疫抑制 유발

Sham을 제외한 모든 실험동물에 면역억제를 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 백혈구 수가 Sham에 비해 약 45%이상 감소된 경우 면역억제가 유발된 것으로 판단하였다.

4) 檢液의 투여

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

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), IHS Extract 투여 시작일(Day 0), IHS Extract 투여 후 1(Day 1), 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.

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

= Body weight at sacrifice - Body weight at initial dosing

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

= Body weight at 5 days after MTX dosing – Body weight at MTX dosing

6) 脾臟 重量的 측정

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.

Relative weight (%) =
 [(Absolute spleen weight / Body weight at sacrifice) × 100]

7) 採血

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

8) 末梢血液 총 백혈구 수의 측정

안와정맥총 및 복대정맥에서 채혈한 혈액

을 이용하여, 각각 MTX 투여 5일 후 및 최종 희생일의 혈중 총 백혈구 수를 측정하였다. 혈중 총 백혈구 수는 백혈구용 혈구계산판과 희석 pippet을 이용하여 $1 \times 10^3/1\text{mm}^3$ 단위로 계산하였다. 이때 희석액은 Türk solution을 이용하였다. 또한 IHS Extract 투여에 의해 변화된 혈중 총 백혈구 수를 관찰하기 위하여 아래의 공식을 이용하여 IHS Extract 투여 기간 동안의 혈중 총 백혈구 수의 변화를 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Difference of total WBC numbers during} \\ & \text{dosing periods} \\ & = \text{Numbers at 2 days after last MTX dosing} \\ & \quad - \text{Numbers at sacrifice} \end{aligned}$$

9) 脾臟 부유액의 준비

체혈 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-1640배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS(fetal bovine serum; Gibco BRL, USA)가 첨가된 혼합배지에 脾臟細胞를 재부유하여 사용하였다.

10) 末梢血液 및 脾臟의 림프구 수 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 부유시켜서 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 血液과 脾臟細胞 부유액을 12×75 시험관 2개에 100μl씩 넣고, 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1μl와 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody (Sigma, USA) 0.5μg을 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 500μl의 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 血液과 脾臟細胞 부유액을 12×75 시험관 2개에 100μl씩 넣고, 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1μl와 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody(Sigma, USA) 0.5

μg을 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 500μl의 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 血液과 脾臟細胞 부유액을 12×75 시험관 2개에 100μl씩 넣었다. 각각의 시험관에 FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody(DiaSorin, MN, USA) 0.1μl와 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody(Sigma, USA)를 0.5μg을 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 500μl의 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.

$$\text{CD4+/CD8+ T lymphocytes(Ratio)} = \frac{\text{CD3+CD4+ T lymphocytes}}{\text{CD3+CD8+ T lymphocytes}}$$

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.

$$\begin{aligned} \% \text{ Changes vs Sham} &= -\left[\frac{\text{Data of Sham} - \text{Data of Control}}{\text{Data of Sham}} \times 100\right] \\ \% \text{ Changes vs Control} &= \left[\frac{\text{Data of tested group} - \text{Data of Control}}{\text{Data of Control}} \times 100\right] \end{aligned}$$

III. 實驗成績

1. 體重 및 增體量의 변화

1) 體重의 변화

MTX 투여 전 1일, MTX 투여일, MTX 투여 5일 후, IHS Extract 투여일, IHS Extract 투여 후 1, 7, 14일 후 및 최종 희생일의 體重이 Sham의 경우, 각각 185.68±7.60, 189.75± 6.08, 246.42±19.84, 228.82±23.71, 248.33±21.51, 275.25±25.63, 288.37±24.22 및 262.42±21.85 g/head로 관찰되었다.

한편 Control에서는 각각 185.87±7.76, 189.88

±5.91, 168.52±6.46, 148.17±8.10, 146.52±10.28, 146.07±11.55, 147.45±15.40 및 130.72±14.98 g/head로 관찰되어, Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 體重의 감소가 MTX 투여 5일 후부터 실험 전 기간에 걸쳐 관찰되었다.

1,000mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 각각 185.92±7.12, 190.17±6.01, 168.77±7.27, 149.13±9.42, 147.58±11.52, 165.15±21.01, 168.27±21.53 및 155.27±20.52 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 최종 희생일에 유의성($p < 0.05$) 있는 體重의 증가를 나타내었다.

500mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 각각 184.73±7.81, 188.87±7.23, 168.33±6.58, 147.03±9.03, 148.83±10.93, 155.12±16.92, 161.17±16.69

및 149.17±15.61 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 IHS Extract 투여 7일 후부터 다소 증가된 體重을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다.

250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 각각 185.48±6.59, 189.22±7.16, 170.37±8.29, 148.07±9.11, 149.33±8.94, 151.58±15.22, 155.87±15.67 및 142.22±15.15 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 IHS Extract 투여 7일 후부터 다소 증가된 體重을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다(Table 3).

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

Group ID ¹⁾	Sham	Control	T1	T2	T3
Day-1	185.68 ±7.60	185.87 ±7.76	185.92 ±7.12	184.73 ±7.81	185.48 ±6.59
MTX 0 ^{a)}	189.75 ±6.08	189.88 ±5.91	190.17 ±6.01	188.87 ±7.23	189.22 ±7.16
MTX 5	246.42 ±19.84	168.52 ±6.46**	168.77 ±7.27**	168.33 ±6.58**	170.37 ±8.29**
Day 02, ^{b)}	228.82 ±23.71	148.17 ±8.10**	149.13 ±9.42**	147.03 ±9.03**	148.07 ±9.11**
Day 1	248.33 ±21.51	146.52 ±10.28**	147.58 ±11.52**	148.83 ±10.93**	149.33 ±8.94**
Day 7	275.25 ±25.63	146.07 ±11.55**	165.15 ±21.01**	155.12 ±16.92**	151.58 ±15.22**
Day 13	288.37 ±24.22	147.45 ±15.40**	168.27 ±21.53**	161.17 ±16.69**	155.87 ±15.67**
Day 14 ^{2,c)}	262.42 ±21.85	130.72 ±14.98**	155.27 ±20.52 ^{*,#}	149.17 ±15.61**	142.22 ±15.15**

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 Ikhwang-San extract dosing; c) At sacrifice; ** $p < 0.01$ compared to that of Sham (MW test); # $p < 0.05$ compared to that of Control (MW test).

2) **增體量의 변화**

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 MTX 투여기간 동안의 增體量은 각각 56.67±13.89, -21.37±2.71, -21.40±2.74, -20.53±1.58 및 -18.85±1.26 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 -137.71%의 增體量 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 -0.14, 3.93 및 11.79%의 增體量 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 약물 투여기간 동안의 增體量은 각각 33.60±6.03, -17.45±7.45, 6.13±11.50, 2.13±7.15 및 -5.85±6.90 g/head로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 增體量의 감소가 인정되었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 增體量의 증가를 나타내었다. 한편 Control은 약물 투여기간 동안 Sham에 비해 -151.93%의 增體量 변화를 나타내었으

나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 135.13, 112.21 및 66.48%의 增體量 변화를 나타내었다(Table 4).

2. **脾臟 重量의 변화**

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟 絶對 重量은 각각 0.743±0.060, 0.237±0.038, 0.415±0.135, 0.378±0.110 및 0.345±0.115 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 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 脾臟 絶對 重量의 증가를 나타내었고, 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가된 脾臟 絶對 重量을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -68.10%의 脾臟 絶對 重量의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 75.11, 59.49 및 45.57%의 脾臟 絶對 重量의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의

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

Group ID ¹⁾	Periods of body weight gains			
	MTX 0 - 5	Changes ²⁾	Day 0 - 14	Changes
Sham	56.67±13.89		33.60±6.03	
Control	-21.37±2.71**	-137.71%	-17.45±7.45**	-151.93%
T1	-21.40±2.74**	-0.14%	6.13±11.50** #	135.13%
T2	-20.53±1.58**	3.93%	2.13±7.15** #	112.21%
T3	-18.85±1.26**	11.79%	-5.85±6.90** #	66.48%

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 Control (MW test).

IHS Extract 投與群에서 脾臟 相對 重量은 각각 0.284±0.004, 0.180±0.008, 0.262±0.055, 0.250±0.047 및 0.238±0.054 g/head로 관찰되어, Control에서만 Sham에 비해 유의성($p<0.01$) 있는 脾臟 相對 重量의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p<0.05$) 있는 脾臟 絶對 重量의 증가를 나타내었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -36.62%의 脾臟 相對 重量의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 45.56, 38.89 및 32.22%의 脾臟 相對 重量의 변화를 나타내었다(Table 5).

3. 末梢血液 총 백혈구 수의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 MTX 투여 5일 후의 末梢血液 총 백혈구 수는 각각 8.95±1.57, 4.58±0.59, 4.55±0.42, 4.52±0.45 및 4.53±0.47 ×10³cells/mm³으로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p<0.01$) 있는 末梢血液 총 백혈구 수의 감소가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -48.83%의 末梢

血液 총 백혈구 수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 -0.66, -1.31 및 -1.09%의 末梢血液 총 백혈구 수의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 최종 희생일의 末梢血液 총 백혈구 수는 각각 9.03±1.26, 3.73±0.38, 6.65±0.78, 6.05±0.75 및 5.52±0.73×10³ cells/mm³으로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 있는 末梢血液 총 백혈구 수의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p<0.01$) 있는 末梢血液 총 백혈구 수의 증가를 나타내었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -58.69%의 末梢血液 총 백혈구 수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 78.28, 62.20 및 47.99%의 末梢血液 총 백혈구 수의 변화를 나타내었다(Table 6).

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 IHS Extract 투여 후 末梢

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

Group ID ¹⁾	Absolute weight (g)	Changes ³⁾	Relative weight (%) ²⁾	Changes
Sham	0.743±0.060		0.284±0.004	
Control	0.237±0.038**	-68.10%	0.180±0.008**	-36.62%
T1	0.415±0.135** #	75.11%	0.262±0.055 #	45.56%
T2	0.378±0.110** #	59.49%	0.250±0.047 #	38.89%
T3	0.345±0.115**	45.57%	0.238±0.054 #	32.22%

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).

血液 총 백혈구 수의 변화량은 각각 0.08±0.40, -0.85±0.29, 2.10±0.60, 1.53±0.33 및 0.98±0.32 ×10³cells/mm³으로 관찰되어, Sham에 비해 Control에서는 유의성(p<0.05) 있는 감소가, 모든 IHS Extract 投與群에서는 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -1,162.50%

의 末梢血液 총 백혈구 수의 변화량을 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 347.06, 280.00 및 215.29%의 末梢血液 총 백혈구 수의 변화량을 나타내었다(Table 7).

4. 末梢血液 및 脾臟 림프구 수의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 末梢血液 림프구 수

Table 6. Changes on the Total WBC Numbers in the Peripheral Blood in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after “Ikhwang-San” Extracts-dosing I: Absolute WBC Numbers.

Group ID ¹⁾	At MTX 5 (× 10 ³ cells/mm ³)	Changes ²⁾	At Sacrifice (× 10 ³ cells/mm ³)	Changes
Sham	8.95±1.57		9.03±1.26	
Control	4.58±0.59**	-48.83%	3.73±0.38**	-58.69%
T1	4.55±0.42**	-0.66%	6.65±0.78 *·##	78.28%
T2	4.52±0.45**	-1.31%	6.05±0.75 *·##	62.20%
T3	4.53±0.47**	-1.09%	5.52±0.73***##	47.99%

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).

Table 7. Changes on the Total WBC Numbers in the Peripheral Blood in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after “Ikhwang-San” Extracts-dosing II: Changes after “Ikhwang-San” Extracts Dosing¹⁾.

Group ID ²⁾	Δ WBC (× 10 ³ cells/mm ³)	Changes ³⁾
Sham	0.08±0.40	
Control	-0.85±0.29 *	-1,162.50%
T1	2.10±0.60**·##	347.06%
T2	1.53±0.33**·##	280.00%
T3	0.98±0.32 *·##	215.29%

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<0.01 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).

는 각각 74.67±5.32, 43.45±4.36, 62.08±7.47, 58.28±6.83 및 51.27±5.68 ×10⁵ cells/ml로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液 중 림프구 수의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 末梢血液 중 림프구 수의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -41.81%의 末梢血液 중 림프구 수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 59.65, 34.13 및 18.00%의 末梢血液 중 림프구 수의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟 림프구 수는 각각 63.82±6.18, 31.59±4.84, 51.77±8.05, 48.27±6.91 및 40.65±6.20 ×10⁶ cells/ml로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟 림프구 수의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾

臟 림프구 수의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -50.50%의 脾臟 림프구 수의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 63.88, 52.80 및 28.68%의 脾臟 림프구 수의 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 IHS Extract 投與群에서 末梢血液의 B 細胞率は 각각 46.27±4.52, 38.33±2.98, 44.15±4.37, 41.47±3.96 및 39.15±3.63%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.05) 있는 末梢血液 중 B 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었고, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가하였으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -17.16%의 末梢血液 중 B 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control

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

Group ID ¹⁾	Blood (× 10 ⁵ cells/ml)	Changes ²⁾	Spleen (× 10 ⁶ cells/ml)	Changes
Sham	74.67±5.32		63.82±6.18	
Control	43.45±4.36**	-41.81%	31.59±4.84**	-50.50%
T1	62.08±7.47 *,##	59.65%	51.77±8.05 *,##	63.88%
T2	58.28±6.83 *,#	34.13%	48.27±6.91 *,#	52.80%
T3	51.27±5.68**,#	18.00%	40.65±6.20**,#	28.68%

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).

에 비해 각각 15.18, 8.19 및 2.14%의 末梢血液 중 B 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟의 B 細胞率은 각각 42.28±4.67, 35.83±2.80, 38.48±3.37, 37.13±3.35 및 36.05±3.91%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가된 脾臟 B 細胞率의 변화를 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -15.26%의 脾臟 B 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 7.40, 3.63 및 0.61%의 脾臟 B 細胞率의 변화를 나타내었다(Table 9).

6. 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 末梢血液의 T 細胞率은 각각 51.67±4.86, 41.03±3.69, 50.68±3.79, 50.35±3.52 및 48.37±3.91%로 관찰되어, Control에서만 Sham에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末

梢血液 중 T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液 중 T 細胞率의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -20.59%의 末梢血液 중 T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 23.52, 22.72 및 17.89%의 末梢血液 중 T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟의 T 細胞率은 각각 50.77±3.59, 38.32±3.73, 49.22±3.61, 47.92±3.92 및 43.43±4.14%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 脾臟 T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 脾臟 T 細胞率의 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -24.52%의 脾臟 T 細胞率의 변화를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 28.44, 25.05

Table 9. Changes on the Ratio of B Lymphocytes in the Peripheral Blood and Spleen in MTX-induced Immunosuppressed Female SD Rats after "Ikhwang-San" Extracts-dosing.

Group ID ¹⁾	Blood (%)	Changes ²⁾	Spleen (%)	Changes
Sham	46.27±4.52		42.28±4.67	
Control	38.33±2.98 *	-17.16%	35.83±2.80 *	-15.26%
T1	44.15±4.37#	15.18%	38.48±3.37	7.40%
T2	41.47±3.96	8.19%	37.13±3.35	3.63%
T3	39.15±3.63 *	2.14%	36.05±3.91 *	0.61%

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).

및 13.34%의 脾臟 T 細胞率의 變化를 나타내었다(Table 10).

7. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 變化

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS 投與群에서 末梢血液의 CD3+CD4+ T 細胞率은 각각 42.13±3.60, 30.95±3.89, 40.65±3.77, 39.75±3.60 및 35.27±4.21%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 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 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液의 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었고, 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -26.54%의 末梢血液 중 CD3+CD4+ T 細胞率의 變化를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는

Control에 비해 각각 31.34, 28.43 및 13.96%의 末梢血液 CD3+CD4+ T 細胞率의 變化를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟의 CD3+CD4+ T 細胞率은 각각 39.82±3.58, 28.88±3.86, 38.15±3.83, 37.12±4.26 및 31.83±4.18%로 관찰되어, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 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 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었고, 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 한편 Control은 Sham에 비해 -27.47%의 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 變化를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 32.10, 28.53 및 10.21%의 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 變化를 나타내었다(Table 11).

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

Group ID ¹⁾	Blood (%)	Changes ²⁾	Spleen (%)	Changes
Sham	51.67±4.86		50.77±3.59	
Control	41.03±3.69 *	-20.59%	38.32±3.73**	-24.52%
T1	50.68±3.79#	23.52%	49.22±3.61##	28.44%
T2	50.35±3.52#	22.72%	47.92±3.92#	25.05%
T3	48.37±3.91#	17.89%	43.43±4.14*#	13.34%

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).

8. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 末梢血液의 CD3+CD8+ T 細胞率은 각각 16.57±1.09, 17.82±1.51, 17.13±1.07, 17.87±1.54 및 17.52±1.35%로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서 Sham에 비해 유의성 있는 변화는 없었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서도 Control에 비해 유의성 있는 변화는 없었다. 한편 Control은 Sham에 비해 7.54%의 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群

에서는 Control에 비해 각각 -3.87, 0.28 및 -1.68%의 末梢血液 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率은 각각 20.27±1.56, 19.83±1.75, 20.42±2.69, 20.18±1.88 및 20.02±2.01%로 관찰되어, 모든 MTX 投與群에서 Sham에 비해 유의성 있는 변화는 없었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서도 Control에 비해 유의성 있는 변화는 없었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -2.17%의 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화를 나타내었으며, 1,000, 500

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 "Ikhwang-San" Extracts-dosing.

Group ID ¹⁾	Blood (%)	Changes ²⁾	Spleen (%)	Changes
Sham	42.13±3.60		39.82±3.58	
Control	30.95±3.89**	-26.54%	28.88±3.86**	-27.47%
T1	40.65±3.77#	31.34%	38.15±3.83#	32.10%
T2	39.75±3.60#	28.43%	37.12±4.26#	28.53%
T3	35.27±4.21*	13.96%	31.83±4.18*	10.21%

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<0.05 compared to that of Control (MW test).

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 "Ikhwang-San" extracts-dosing.

Group ID1)	Blood (%)	Changes ²⁾	Spleen (%)	Changes
Sham	16.57±1.09		20.27±1.56	
Control	17.82±1.51	7.54%	19.83±1.75	-2.17%
T1	17.13±1.07	-3.87%	20.42±2.69	2.98%
T2	17.87±1.54	0.28%	20.18±1.88	1.77%
T3	17.52±1.35	-1.68%	20.02±2.01	0.96%

Mean±S.D. (n=6); 1) Group ID was listed in Table 2;

2) Changes vs Sham or Control.

및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 2.98, 1.77 및 0.96%의 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 變化를 나타내었다(Table 12).

9. 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 變化

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 末梢血液 CD4+/CD8+ T 細胞率은 각각 2.56±0.32, 1.74±0.19, 2.37±0.10, 2.22±0.07 및 2.01±0.14로 관찰되어, 1,000mg/kg의 IHS Extract 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 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -32.03%의 末梢血液 중 CD4+/CD8+ T 細胞率의 變化를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 36.21, 27.59 및 15.52%의 末梢

血液 CD4+/CD8+ T 細胞率의 變化를 나타내었다.

Sham, Control, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率은 각각 1.96±0.04, 1.45±0.07, 1.88±0.11, 1.84±0.06 및 1.59±0.05로 관찰되어, 1,000mg/kg의 IHS Extract 投與群을 제외한 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 감소가 인정되었다. 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성(p<0.01 또는 p<0.05) 있는 증가가 인정되었다. 한편 Control은 Sham에 비해 -26.02%의 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 變化를 나타내었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 각각 29.66, 26.90 및 9.66%의 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 變化를 나타내었다(Table 13).

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 “Ikhwang-San” Extracts-dosing.

Group ID ²⁾	Blood (Ratio)	Changes ³⁾	Spleen (Ratio)	Changes
Sham	2.56±0.32		1.96±0.04	
Control	1.74±0.19**	-32.03%	1.45±0.07**	-26.02%
T1	2.37±0.10 [#]	36.21%	1.88±0.11 [#]	29.66%
T2	2.22±0.07*, [#]	27.59%	1.84±0.06*, [#]	26.90%
T3	2.01±0.14*, [#]	15.52%	1.59±0.05**, [#]	9.66%

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).

IV. 考 察

韓醫學에서는 면역에 대한 개념을 正氣가 온전하여 邪氣가 들어오더라도 생명체가 스스로 파괴되지 않게 자기를 보호하는 抗爭과정으로 설명하고 있다^{3,4}. 여기서 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 身體 內부의 陰陽의 失調에서 발생된 病理 變化와 病理的 產物 등의 病邪를 말한다^{1,2,4}. 《素問: 刺法論》³¹의 “正氣存內 邪不可干”, 《素問: 評熱病論》³¹의 “邪之所湊 其氣必虛”, 《靈樞: 口問篇》³²의 “邪之所在 皆爲不足”, 《素問: 通評虛實論》³¹의 “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.

또한 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 인식하며, 發病의 성립과정 중에서 致病素인인 邪氣 보다는 오히려 防禦因子인 正氣의 虛損을 더욱 중요시 하였기에^{3,5}, 《素問: 四氣調神大論》³¹에서 “不治已病而治未病”이라고 한 바와 같이 질병 제거의 의미뿐만 아니라 예방을 위주로 하여 현대의학에서 말하는 면역의 개념과 연관성을 찾을 수 있다^{4,5,33}. 이를 바탕으로 《正邪論》³에서는 正氣를 補하고 邪氣를 除去하는 扶正祛邪法이 면역기능을 강화시킬 수 있는 치료원칙이 된다고 하였다^{4,5,33}.

正氣의 발생과 분포는 肺, 脾, 腎 三臟과 유관하므로 免疫과 관련된다고 볼 수 있는데, 그 중에서도 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^{1,2}, 全身의 陰陽을 滋助하고 調節하며 平衡기능을 도모하는 것이 곧 면역기능의 조절의 근본이 된다고 볼 수 있다^{4,33}.

서양의학에서의 免疫이란 생체가 自己와 非自己를 구별하는 기전으로서 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 현상으로^{19,34,35}, 인체가 미생물에 의해 침입되는 과정에서 나타나는 저항성(resistence)을 말한다³⁶. 또한 면역 조절 작용은 생명유지에 있어 가장 근본 되는 과정으로 특정 질환으로부터 보호받는다라는 뜻이다³⁷.

人體의 免疫反應은 自然 免疫反應(innate immunity response)과 特異 免疫反應(specific immunity response)의 두 종류로 분류되며, 特異 免疫反應은 體液性 免疫(humoral immunity)과 細胞性 免疫(cellular immunity)의 두 가지 면역반응으로 구분된다^{34,35}. 體液性 免疫은 B 림프구에 의해 생성된 항체에 의해 매개되며 항체가 세균과 결합함으로써 세포의 미생물이나 미생물이 분비하는 독소에 대한 방어 작용을 담당하고, 細胞性 免疫은 T 림프구에 의해 매개된다. 바이러스나 일부 박테리아와 같은 세포내 미생물은 다른 숙주 세포내에서 순환 항체와 접촉함이 없이 생존하고 증식할 수 있으므로, 그러한 감염에 의한 방어를 細胞性 免疫이 담당하여 포식세포 내에 있는 미생물을 파괴하거나 혹은 감염된 세포를 용해시킨다^{35,38}.

體液性 免疫이나 細胞性 免疫 반응에 관여하는 주요세포는 림프구로, 면역반응에 관여하는 림프구는 B 림프구와 T 림프구로 나눌 수 있다. B 림프구는 항체를 생성하는 형

질세포의 전구세포로 성숙 B 림프구는 대략 말초혈액 림프구의 10-15%, 脾臟 림프구의 50%, 골수 림프구의 10%를 차지하며, T 림프구는 細胞性 免疫 반응에서 중개자 역할을 하며, 성숙 T 림프구는 말초혈액 림프구의 70~80%, 흉선 림프구의 90%, 림프절 세포의 30~40%, 脾臟 림프구의 20~30%를 차지한다³⁹⁾.

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 있다³⁵⁾. 보조 T 림프구는 여러 종류의 사이토카인(cytokine)을 생산하여 B 림프구가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 또한 세포매개면역반응의 필요행동세포인 세포독성 T 림프구가 잘 생기도록 도와준다³⁴⁾. 한편 억제 T 림프구는 필요 이상으로 항체 또는 세포독성 T 림프구가 생산되는 것을 견제하며 적절한 면역반응이 일어나도록 조절하는 기능을 갖고 있으나, 이러한 억제 T 림프구의 본질과 생리적인 역할에 대해서는 아직 논란이 많다. 세포독성 T 림프구는 표적이 되는 세포와 직접 접촉하여 표적세포를 파괴하는 작용을 가진다. 이때 바이러스 감염세포 또는 암세포 등을 표적세포로 공격한다. 지연형 과민면역 T 림프구는 분명히 구별할 수는 없지만 기능적으로는 대식세포, 단구 계열 세포들을 염증부위로 끌어들여 모으고 활성화시켜 숙주방어기전의 일종인 지연형 과민 면역반응을 일으키게 한다^{35,39)}.

이러한 T 림프구의 아집단을 분석하거나 확인하는데 있어서 세포막 단백질이 각기 다른 림프구 집단을 구분 짓게 해주는 표현형 표지(phenotypic maker)로서 이용된다. 모든 혈액세포와 면역세포는 조혈간세포라는 단일한

원시적인 세포에서 분화되어 생기는데, 조혈간세포가 분화됨에 따라 면역세포의 표면에는 각기 독특한 유형의 세포표면단백질을 발현한다. 이를 CD(cluster of differentiation)라고 하며, 림프구 분화의 다양한 표식자에 대해 특이적인 단일클론 항체의 군을 의미한다^{40,41)}.

CD45RB는 백혈구 공통 항원으로 주로 조혈세포에서 발현되며 T 림프구 및 B 림프구의 항원 수용체 매개적 신호전달에 중요한 역할을 하는 티로신 인산 분해 효소인 CD45의 이형이다. CD3은 모든 T 림프구에 있으며 T 세포 항원수용체(T-cell receptor, 이하 TCR)에 결합하여 항원 인식에 의한 신호를 세포핵에 전달하는 역할을 담당하며 TCR의 세포표면에 발현된다. 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 작용한다. 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^{38,39)}.

T 림프구가 골수에서 생겨 흉선으로 이동한 뒤 성숙하는 동안 서로 다른 세포막 단백질들이 발현하는 과정은 초기의 흉선세포가 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 細胞性 免疫반응에

서 중추적 역할을 하는 것으로 알려진 대부분의 보조 T 림프구는 CD4라는 표면단백질을, 또 대부분의 세포독성 T 림프구는 다른 표지인 CD8이라는 표면단백질을 발현한다^{38,39)}.

T 림프구 표면의 항원 수용체를 TCR이라 하며 항원전달세포가 처리하여 항원전달세포 표면에 구조적합성 복합체(MHC: major histocompatibility complex) 제1항원 또는 제2항원 분자와 결합시켜 내놓은 MHC/펩타이드 복합체(Class II MHC, Class I MHC)와만 반응한다⁴²⁾. 보조 T 림프구 상의 CD4는 Class II MHC와의 결합을 보조적으로 형성하고 있으며 이와 마찬가지로 세포독성 T 림프구 상의 CD8도 Class I MHC와 결합하고 있다⁴²⁾.

CD4는 T 림프구 활성화에 있어 MHC 제1항원 T 림프구의 MHC분자에 대한 특이적 친화도에 의해 APC(antigen presenting cell: 항원 제시세포) 혹은 표적세포와의 부착을 증가시키고, 또한 T 림프구가 APC상의 펩타이드-MHC를 인식할 때에 발생하는 초기 신호전달반응에 참여한다. 이처럼 CD4 보조 수용체의 부착 및 신호전달기능의 연합은 성숙 T 림프구의 항원자극 효율을 크게 향상시킨다. 이러한 역할을 하는 림프구 표면의 표지 단백질에 대한 항체를 사용하여 免疫을 정량할 수 있으며^{43,44)}, 일반적인 면역력의 표지로도 광범위하게 응용되고 있다^{45,46)}.

Class II MHC와 항원복합체로 활성화된 CD4+ T 림프구가 생산한 싸이토카인은 자연 세포독성세포(natural killer cell: NK세포)와 대식세포를 활성화하며 CTL(cytotoxic T lymphocyte: CTL)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 용해시킨다⁴²⁾. 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 있다⁴⁷⁾. 이 세포는 지나친 면역반응을 억제하기 때문에 '自己'에 대한 무반응성을 유지하는데 중요한 意義를 가지고 있다⁴⁰⁾.

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의 CD4+ T 細胞率과 CD4+/CD8+ T 세포비율은 면역결핍질환이나 자가면역질환 등을 평가하는데 응용되는 면역 기능 검사방법이다^{44,46)}.

일반적으로 면역에 영향을 미치는 약물의 약효 검증은 화학물질 및 여러 가지 원인으로 면역억제를 일으킨 실험동물에 일정기간 후보물질을 투여한 다음 혈액 중의 면역담당세포의 변화를 관찰하거나, 이들을 생산하는 기관인 脾臟에서의 면역담당세포의 변화를 관찰하는 방법과 실제 동물에서 MTX와 같은 화학물질로 면역반응 이상을 유발시킨 다음 면역담당세포 및 脾臟과 같은 면역관련 장기의 변화를 관찰하는 방법이 있다⁴⁸⁾.

MTX는 현재 항암제, 류마티스 치료제 및 면역억제제로 사용되고 있으며 주로 용모암에 탁월한 효과를 보인다^{49,50)}. 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 보조 T-cell의 증식을 차단하며^{49,50)}, MTX에 의한 면역억제 모델에서 일반적으로

體重의 변화, 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 있다²⁰⁾.

최근 면역에 관한 韓醫學的 實驗研究로는 崔⁵¹⁾, 林⁵²⁾, 李⁵³⁾ 등의 藥鍼을 포함한 鍼灸療法이 免疫기능에 미치는 영향에 대하여 연구하였고, 宋⁵⁴⁾, 鄭⁸⁾, 韓⁹⁾, 李¹⁰⁾, 金¹²⁾ 등이 黃芪, 加味補兒湯, 加味歸茸湯, 鹿血生化湯, 蘇子導痰降氣湯 등의 韓藥이 면역반응에 미치는 영향에 대해 연구 보고하였으며, 면역억제제인 MTX^{19,20)}로 유발된 면역저하를 개선시키는 효과에 대한 연구 보고로 黃芪²¹⁻³⁾, 人蔘^{23,24)}, 補中益氣湯²³⁾ 등의 藥鍼을 이용한 것과 何首烏²⁵⁾, 固真飲子²⁶⁾, 究原心腎丸²⁷⁾, 黃芪建中湯²⁸⁾, 四君子湯 및 四物湯¹³⁾ 등의 韓藥에 대한 연구들이 이루어져 왔으나, 小兒 慢驚風의 치료에 주로 사용되고 있는 益黃散²⁹⁾에 관한 연구는 아직 없었다. 益黃散은 《東醫寶鑑 : 虛勞門》³⁰⁾에서 黃芪益黃散이라고도 하며 益衛固表 補中益氣의 黃芪, 大補元氣 固脫生津의 人蔘, 理氣 調中 燥濕 化痰의 陳皮, 養血 柔肝 緩中止痛的 白芍藥, 和中 緩急 潤肺解毒의 生甘草, 利水滲濕 健脾寧心の 白茯苓, 清熱燥濕 清心除煩의 黃連⁵⁵⁾으로 구성되어 있으며, 黃芪, 人蔘, 甘草는 元氣를 補하며, 陳皮, 白茯苓은 津液을 보충하며, 白芍藥은 血氣를 調和하면서 肝木을 瀉하여 風症을 진정시키고 生甘草, 黃連은 虛熱을 제거하며 驚症을 치료하는 처방이다^{56,57)}.

益黃散은 대부분 健脾, 益氣, 養血의 效능을 지닌 藥물들로 구성되어져 소아의 면역기능의 증강에 효과가 있을 것으로 생각되어, MTX 투여로 면역기능저하가 유발된 흰쥐에 IHS Extract 1,000, 500 및 250mg/kg을 2 주간

투여한 후 體重 및 脾臟 重量, 末梢血液의 백혈구 수, 脾臟 및 末梢血液의 림프구 수, 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 結果를 얻었다.

體重 및 增體量의 변화에서 본 실험의 결과 이전의 보고들^{58,59)}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. Control에 비해 1,000mg/kg IHS Extract 投與群에서 최종 희생일에 국한되어 유의성($p < 0.05$) 있는 體重의 증가가 인정되었다. IHS extract 투여 기간 동안의 增體量의 변화에서 모든 MTX 投與群에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 增體量의 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 增體量의 증가를 나타내었다. 일반적으로 MTX 투여시 점진적인 體重 감소가 나타나며, 이로 인해 항암제로서의 MTX 사용이 제한되는 것으로 알려져 있으나^{58,59)}, 이러한 體重增加는 益黃散의 구성 약재 대부분이 健脾, 益氣, 養血의 效능을 가지고 있으므로 體重增加가 나타난 것으로 판단된다.

脾臟 絶對 重量의 변화에 있어서 모든 MTX 投與群은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였고, 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群은 對照群에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 脾臟 絶對 重量의 증가를 나타내었다. 脾臟의 相對 重量의 변화에서 Control에서만 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있게 감소하였고, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 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 초기면역반응을 담당하고 특히 細胞免疫反應과 體液性 免疫反應에 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 있다⁶⁰. 體重에 대한 脾臟의 비율을 脾臟-體重 지수 (spleen weight index)로 계산해 Control와 비교하여 지표로 사용되기도 한다⁶¹. MTX 투여시 현저한 脾臟細胞의 증식 억제가 실험동물에서 초래되며⁶², 이러한 免疫細胞의 증식억제에 의해 脾臟 重量의 감소가 초래되는데⁶³, 益黃散이 脾臟의 絶對 重量 및 相對 重量을 증가시켜 脾臟의 免疫細胞의 활성화에 기여하는 것으로 생각된다.

末梢血液 총 백혈구 수의 변화에서 Control에서는 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$) 있는 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 IHS extract 투여 후 末梢血液 총 백혈구 수 및 백혈구 수의 변화량에서 유의성($p < 0.01$) 있는 증가가 인정되었다.

末梢血液 및 脾臟 림프구 수의 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 IHS Extract 投與群에서는 Control에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 림프구 수의 증가가 인정되었다. MTX는 전형적인 면역억제 물질로 MTX 투여시 현저한 백혈구 특히 림프구의 감소가 초래되는데⁶³, 益黃散이 末梢血液의 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($p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 B 細胞率의 감소가 인정되었다. 末梢血液 중 B 細胞率의 변화에서 1,000mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 나타내었고, 脾臟 B 細胞率의 변화에서 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群은 Control에 비해 다소 증가된 脾臟 B 細胞率의 변화를 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. MTX에 의한 B 림프구의 감소는 이미 잘 알려져 있으며, 이로 인해 MTX를 조직이식 거부 반응 억제를 위해 사용되기도 하는데⁶⁴, 益黃散은 B 림프구에 대한 활성화는 미약한 것으로 판단되어 體液性 免疫 증강에는 큰 효과가 없는 것으로 생각된다.

末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群은 Control에 비해 유의성($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率의 증가가 인정되었다. T 림프구의 수적 감소 역시 MTX에 의해 초래되는 것은 이미 잘 알려져 있으며^{65,66}, 실험 결과로 益黃散의 T 림프구 수를 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 IHS Extract 投與群은 Control에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率의 증가가 인정되었다. MTX 투여시 일반적으로 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率이 감소되는 것으로 알

려져 있으나⁶⁷⁾, 이로써 益黃散이 末梢血液 및 脾臟의 보조 T 림프구를 증가시킨다고 볼 수 있으므로 細胞性 免疫의 증강에 일정한 역할을 할 것으로 판단된다.

末梢血液 및 脾臟 CD3+CD8+ T 細胞率의 변화에서 모든 MTX 投與群은 Sham과의 유의성 있는 변화는 없었으며, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서도 Control과의 유의성 있는 변화는 없었다. 여러 가지 반론이 있으나, 일반적으로 MTX 투여시 CD8+ T 림프구는 큰 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있어⁶⁸⁾, 益黃散의 세포독성 T 림프구와 억제 T 림프구에 대한 명확한 효과를 밝히지는 못하였다.

末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 변화에서 Control은 Sham에 비해 유의성 ($p<0.01$) 있는 감소가 인정되었으나, 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群은 Control에 비해 유의성($p<0.01$ 또는 $p<0.05$) 있는 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率의 증가가 인정되었다. MTX 투여시 CD4+/CD8+ T 細胞率은 일반적으로 감소되므로⁶⁹⁾, 益黃散이 細胞性 免疫의 증가에 일정한 역할을 하는 것으로 생각되며 이러한 비율의 증가는 CD8+ 보다는 CD4+ T림프구의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

이로써 益黃散이 MTX로 인해 초래된 體重減少와 면역세포 증식억제로 인한 脾臟 重量의 감소를 증가시켰고 면역활성을 유도하여 백혈구 및 림프구의 유의성 있는 수적 증가를 나타내며, MTX 투여에 의해 초래된 면역억제에 매우 유효한 효과를 나타내는 것이 관찰되었다. 특히 CD4+ 림프구를 활성화시키는 것으로 생각되며, T 림프구의 증식과 분화를 자극하여 T 림프구를 활성화시켜, 면역기능을 증가시키는 것으로 생각된다.

V. 結 論

益黃散이 면역기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTX 투여로 면역기능저하가 유발된 흰쥐에 IHS Extract을 투여한 후 體重 및 脾臟 重量, 末梢血液 총 백혈구 수, 脾臟 및 末梢血液의 총 림프구 수, 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 結果를 얻었다.

1. 體重은 1,000mg/kg IHS Extract 投與群에서 최종 희생일에 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였고, 약물 투여기간 동안의 增體量은 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
2. 脾臟 絶對 重量은 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를, 脾臟 相對 重量은 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 유의성 있는 증가를 보였다.
3. 약물 투여 후 末梢血液 총 백혈구수 및 변화량은 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extrac 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
4. 末梢血液 및 脾臟 림프구수는 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
5. 末梢血液 B 細胞率은 1,000mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
6. 末梢血液 및 脾臟 T 細胞率은 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.
7. 末梢血液 및 脾臟 CD3+CD4+ T 細胞率

은 1,000 및 500mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.

8. 末梢血液 및 脾臟 CD4+/CD8+ T 細胞率は 1,000, 500 및 250mg/kg의 IHS Extract 投與群에서 Control에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.

以上の 結果로 보아 健脾, 益氣, 養血의 작용을 가진 益黃散이 MTX로 면역기능저하가 유발된 흰쥐의 脾臟機能을 활성화시켜 체중 및 면역기능을 회복시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 문준전, 안규석, 최승훈. 동의병리학. 서울:高文社. 1993:22, 78-80.
2. 김완희, 최달영. 장부변증론치. 서울:成輔社. 1990:50, 201, 381.
3. 趙鐘寬. 免疫에 관한 東洋醫學의 考察. 東洋醫學. 1986;12(1):20.
4. 낙화생, 안덕균. 면역과 한방. 서울:열린책들. 1998:19-20, 46-7.
5. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫. 1984;6:5-6.
6. 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.
7. 沈自尹. 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.
8. 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.
9. 韓在敬, 金允姬, 柳同烈. 加味歸茸湯이 생쥐의 면역세포에 미치는 影響. 대한한

방소아과학회지. 2000;14(2):47-60.

10. 李晟來. 鹿血生化湯이 마우스의 면역반응에 미치는 영향. 경희대한의대는문집. 1991;14:85-130.
11. 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. 대한외관과학회지. 1999;12(2):20-52.
12. 김흥기, 박동일, 전중철. 蘇子導痰降氣湯이 면역반응에 미치는 효과. 대한동의생리병리학회지. 2001;15(5):739-44.
13. 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.
14. 전진오, 정현우. 六味地黃湯이 면역세포에 미치는 실험적 효과. 대한한방내과학회지. 2000;21(2):243-50.
15. 강재훈, 홍무창. 補中益氣湯이 면역세포에 미치는 영향. 동의생리학회지. 1999;14(1):23-34.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 李淵台. 最新免疫學. 서울:集文堂. 1991:1.
20. Artym J, Zimecki M, Kruzel ML. Effect of lactoferrin on the methotrexate-induced sup-

- pression of the cellular and humoral immune response in mice. *Anticancer Res.* 2004;24(6):3831-6.
21. 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.
 22. 朴鎭雄, 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.
 23. 金正憲, 朴喜濬, 李香淑 외. 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.
 24. 高敬錫. 인삼수침이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *경희대한의대논문집.* 1988;11:37-54.
 25. 김일영, 이상재, 김광호. 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. *대한예방의학회지.* 2000;4(2):152-69.
 26. 강대원, 강석봉. 固眞飮子가 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. *대한한방내과학회지.* 2004;25(4):117-28.
 27. 崔舜皓. 究原心腎丸이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. *大邱韓醫大學校 大學院.* 2004.
 28. 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.
 29. 신재용. 방약합편해설. 서울:成輔社. 1989:344.
 30. 許浚. 原本 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1991:641.
 31. 裴秉哲 譯. 今釋黃帝內經素問. 서울:成輔社. 2000:12, 19, 150, 168, 388.
 32. 裴秉哲 譯. 今釋黃帝內經靈樞. 서울:成輔社. 1995:277.
 33. 具本泓. 면역과 알레르기. *대한한의학회지.* 1990;11(2):9-10.
 34. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울:서울대학교 출판부.1996:1-3, 14.
 35. 김세중. 면역학. 서울:고려의학. 1994:9, 144.
 36. 차성웅, 남태호, 백영호. 운동과 영양이 인체의 면역기능에 미치는 영향. *J of the Research Institute of Physical Education & Sports Science.* 1996;12:405-27.
 37. Jacqueline Sharon. *Basic Immunology.* Williams & Wilkins. 1995.
 38. Abbas, Lichtman, Pober. 강재성 외 역. 세포 분자면역학. 서울:법문사. 2002:3-38, 243-74.
 39. 김태규, 박수정, 서영훈 외. 면역생물학 (5th). 서울:라이프사이언스. 2002:3-33.
 40. 타다 토미오. 황상익. 免疫의 意味論. 서울:한울. 1998:75-87, 100-3, 117-21.
 41. Roitt. 김주덕외. 로이트 필수 면역학. 서울:고문사. 1991:35-62.
 42. 김세중. 면역학 길라잡이. 서울:고려의학. 2000:37-48.
 43. 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;10(12):1339-47.
 44. 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.
 45. 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.
46. Everaus H. Hormones and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1992;8(6):483-9.
 - 47.金光赫. 細胞分子免疫學. 서울:正門閣. 1998:30.
 48. Cetiner M, Sener G, Schirli AO et al. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;209(1):39-50.
 49. 홍사석. 이우주의 약리학강의. 서울:의학문화사. 1993:622, 646-8.
 50. 대한임상약학회. 임상약리학총서 I 임상약학개론. 서울:희성출판사. 1991:180, 770.
 51. 崔旼燮. 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 관한 고찰. *대한침구학회지*. 1993;10(1):61-74.
 52. 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.
 53. 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.
 54. 宋峰根, 李彦政, 金炯均 외. 黃芪가 면역세포의 기능에 미치는 영향. *大韓本草學會誌*. 1998;13(2):115-28.
 55. 전국한의과대학 본초학교실. *本草學*. 서울: 도서출판 永林社. 1992:180, 302, 347, 531, 534, 540, 581.
 56. 윤길영. *동의임상방제학*. 서울:명보출판사. 1989:560.
 57. 조선의학과학원 동의학연구소편. *동의처방학*. 서울:여강출판사 1992:279.
 58. 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.
 59. 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.
 60. Burleson GR, Dean JH, Munson AE. *Methods in Immunotoxicology*. vol. 2. New York:Wiley-Liss Inc. 1995:15.
 61. Ramunas Z, Ins SZ, Robert. HB et al. 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.
 62. Lee YS, Han OK, Park CW et al.. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted *As-tragali radix* in methotrexate-treated mouse spleen cells. *J Ethnopharmacol*. 2003;84(2-3): 93-8.
 63. 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.
 64. Bohm I. Decrease of B-cells and autoantibodies after low-dose methotrexate. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(7):278-81.
 65. Zaitsevskaja EV, Babichev VA, Maksimova GF. Effect of methotrexate on the level of T- and B-lymphocytes. *Farmakol Toksikol*. 1997; 40(3):322-6.

66. Massa M, de Benedetti F, Robbioni P et al. 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.
67. Balsa A, Gamallo C, Martin-Mola E et al. Histologic changes in rheumatoid synovitis induced by naproxen and methotrexate. *J Rheumatol.* 1993;20(9):1472-7.
68. Martin PJ, Rowley SD, Anasetti C et al. 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.
69. Fuhrman C, Parrot A, Wislez M et al. Spectrum of CD4 to CD8 T-cell ratios in lymphocytic alveolitis associated with methotrexate-induced pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(7):1186-91.