

Original Article / 원저

四君子湯이 免疫機能에 미치는 影響

이상현¹⁾ · 정 명²⁾ · 임규상²⁾ · 윤용갑¹⁾

¹⁾원광대학교 한의과대학, ²⁾원광대학교 한의학전문대학원

Effect of Sagunja-tang on Immune Function of Mouse Immune Cells

Sang-Hyun Lee¹⁾ · Myung Jung²⁾ · Kyu-Sang Lim²⁾ · Yong-Gab Yun¹⁾

¹⁾College of Korean Medicine, Wonkwang University,

²⁾Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objectives : The extract of Sagunja-tang has been traditionally used for restorative treatment of constitutional weakness, vascular and immune disorder, and nervous disease in Oriental country. This study investigated the regulatory effects of Sagunja-tang on the expression, production, and activity of immune mediators.

Methods : In this study, the extract of Sagunja-tang was prepared by extracting with distilled water at 100° C for 2.5h. The extract was freeze-dried following filtration through 0.45 μm filter. The extract was dissolved in Hank' s balanced salt solution (HBSS) and filtered again through 0.45 μm filter before use. The level of nitrite, an oxidative product of nitric oxide(NO) was measured in the culture medium by the Griess reaction. The levels of prostaglandin E₂(PGE₂), Th1 cytokines (IFN- γ, IL-2) and Th2 cytokines(IL-4, IL-5, IL-13) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and the protein levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression were determined by Western blot analysis. Also examined the effects of the extract on T-cell proliferation and cytotoxic activity of natural killer cells.

Results : In this investigation, Production levels of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) was inhibited in a dose dependent manner by treatment with the extract. I also found that the extract increased T-cell proliferation and cytotoxic activity of natural killer cells in a dose-dependent manner.

Conclusions : These results suggest that the water extract of Sagunja-tang may be useful for a therapeutic drug against a sickly constitution and immune diseases, probably by regulating the production of immune mediators.

Key words : Sagunja-tang; Immune Function; nitric oxide(NO); prostaglandin E₂(PGE₂); cyclooxygenase-2(COX-2)

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. 緒 論

四君子湯은 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로 構成된 處方으로 宋代 陳師文¹⁾의 《太平惠民和劑局方》에 “治 榮衛氣虛 臟腑怯弱 心腹脹滿 不思飲食 腸鳴泄瀉 嘔噦 吐逆”이라고 처음 收錄된 以來 一切의 氣虛諸症에 대한 補氣의 基本方劑로 活用되어 왔으며^{2,3)}, 最近에는 심혈관 질환, 소화기질환, 면역질환, 신경 및 내분비계 질환, 근육질환 등에 광범위하게 應用되고 있다^{4,5)}.

‘氣’는 體內를 流動하는 精微物質로서 主要 物質의 基礎 위에서 發現하는 人體의 各種 生理的 機能, 또는 人體代謝過程에서 生成되는 原動力을 말하며, ‘氣虛’란 이러한 氣의 作用이 不足하여 全身의 機能低下에 따른 一連의 症候로써 免疫力 低下, 中樞의 흥분성 저하에 대한 物質代謝 특히 同化作用의 減弱으로 인한 저단백혈증과 빈혈상태 등 관련 있는 것으로 알려져 있다.

한편 ‘免疫力’은 外部에서 體內로 流入된 病原 微生物에 대해 抵抗하는 힘을 의미하는데, 韓醫學의 觀點에서는 外部에서 들어오는 여러 病因에 대하여 抵抗力을 形成하는 衛氣의 作用⁶⁾, 個體의 恒常성을 유지하는 免疫理論⁷⁾ 및 正氣와 邪氣의 抗爭表現과 관련되어 있는 것으로 說明할 수 있다. 그러므로 正氣가 虛弱한 경우 신체 虛乏을 돕고 抗病력을 증진시켜주는 補氣藥을 사용하여 免疫力를 조절하는데 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 觀點에서 본다면 四君子湯이 免疫機能 調節에 밀접한 聯關性이 있음을 시사하는 바 본 實驗을 시행하였다. 지금까지의 四君子湯의 實驗的 研究로는 항산화작용^{8,9)}, 고지혈증¹⁰⁾, 악성종양에 대한 항암효과^{11,12)}, 기아회복¹³⁾, 성장¹⁴⁾, 근육피로회복¹⁵⁾, 항혈전¹⁶⁾, 항스트레스¹⁷⁾, 血壓 및 體溫¹⁸⁾, 진통, 소염과 항경련¹⁹⁾

등에 대한 효과가 보고되고 있으며, 免疫과 관련하여 生體活性²⁰⁾, prednisolone으로 유발된 免疫低下에 대한 면역증진²¹⁾, 면역반응 및 자연살해세포(natural killercell, NK)의 활성화²²⁾에 대한 보고가 있었으나 구체적인 免疫調節作用에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다.

이에 氣虛의 基本方인 四君子湯에 대한 免疫調節作用 效果를 검증하기 위하여 생쥐의 면역세포를 대상으로 nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂), cyclooxygenase-2(COX-2), Th1 cytokines(IFN- γ , IL-2)과 Th2 cytokines(IL-4, IL-5, IL-13) 등을 조사하였으며, 면역세포의 증식과 자연살해세포의 활성을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 試藥

Interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-13, PGE₂ 측정용 ELISA kits와 iNOS와 COX-2 항체는 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였다. Lipopolysacchride (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), phytohemagglutinin (PHA)와 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide는 Sigma-Aldrich 사(USA)로부터 구입했으며, lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정용 kits는 BioVision사(USA)로부터 구입하였고, cell proliferation assay kit는 Pramega사(USA)로부터 구입하였다. RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS)와 penicillin/streptomycin는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 그리고 COX activity assay kit는 Cyman Chemical 사(USA)로부터 구입하였다. 기타 사용된 모든 시약은 분석등급으로 Sigma-Aldrich와 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

Corresponding author : Yonggab Yun, PhD, Professor, College of Korean Medine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.
(Tel : 82-63-850-6834, E-mail : yunyg@wku.ac.kr)

• Recieved 2015/7/10 • Revised 2015/8/5 • Accepted 2015/8/12

2) 藥物의 추출 및 제조

실험에 사용한 人蔘은 6년 근으로 충남 금산, 白朮은 경북 의성, 白茯苓은 충남 보령 그리고 甘草는 중국 양외1호로 광주의 한약사랑(주)에서 각각 구입하였으며, 圓光大學校 韓醫科大學 方劑學教室에서 형태학적 및 화학적으로 동정하여 사용하였으며, 증거표본은 방제학 교실에 보관 중에 있다. 藥物의 제조는 四君子湯 處方 藥材인 人蔘, 白朮, 白茯苓과 甘草를 각각 5g씩 정량하면 1첩에 20g이 되고, 총 20첩인 400g을 한약추출기(대웅약탕기, SK-1600)에 주입해서, 4,000ml 증류수를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 이와 같이 추출한 藥物은 25g을 수득하였고 -70℃에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

3) 實驗動物

무균환경에서 사육된 6주령의 수컷 Balb/c계 생쥐를 중앙실험동물(주)(서울시 서초구)에서 구입하였고, 사료와 물을 무제한 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도와 습도는 대기 환경에서 유지하였다.

2. 方法

1) 비장세포의 분리

건강한 수컷 생쥐를 대상으로 에테르에 마취시킨 다음 후경골탈추법으로 즉사시킨 후 비장세포를 분리하였다. 슬라이드 글라스로 부드럽게 압착하여 단일 세포 부유액을 만든 다음 40µm 나일론 메시를 통과시켰다. 세포는 Ca²⁺과 Mg²⁺가 들어 있지 않은 HBSS를

이용하여 2회 원심 세척하였다. 그 후 Ficoll Hypaque을 사용하여 림프구를 분리한 다음 RPMI 1640 배양액으로 3회 원심세척 하였다. 세포를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시킨 후 0.4% trypan blue로 95% 이상의 세포 생존율을 확인하고 혈구계산용 슬라이드를 이용하여 세포의 수를 산정한 후 배양하면서 각종 실험에 사용하였다.

2) 복강 대식세포의 분리 및 배양

건강한 수컷 생쥐에 Brewer's thioglycollate broth를 마리당 2ml씩 복강 내로 주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 생쥐를 후경골탈추법으로 즉사시킨 다음 heparin(5U/ml)이 첨가된 HBSS 10ml를 복강에 주입하고 복강을 잘 마사지 하였다. 마사지 후 26계이지 10ml용 주사기를 이용하여 복강으로 유입된 세포를 얻은 후 2회 원심세척 하였다. 분리된 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 배양접시에 접종한 후 37℃와 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 대식세포의 다른 세포를 제거하기 위해서 냉각 HBSS를 이용하여 3회 C부착된 생쥐 복강 대식 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 접종한 후 실험 목적에 따라 시간을 정하여 배양하여 사용하였다.

3) MTT 분석

복강대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물 처리 또는 추출물과 LPS(1 µg/ml)을 동시에 처리하여 24시

Table 1. Oriental Crude Drug Composition of Sagunja-tang (400g)

Oriental drug name	Crude drug name	Scientific name	Dose(g)
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i>	100
白朮	Atractylodes Radix	<i>Atractylodes japonica</i>	100
白茯苓	Poria Radix	<i>Poria cocos</i>	100
甘草	Glycyrrhiza Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	100

간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 지룻빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. 요약하면, RPMI 1640 배지에서 $5 \times 10^5/ml$ 의 밀도로 세포를 접종하여 3시간 후에 여러 가지 농도로 藥物을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 $0.5mg/ml$ MTT용액을 well 당 100μ 를 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하였다. 그 후 96 well 플레이트를 800rpm에서 3분간 원심시키고 100μ l DMSO를 첨가하여 용해시킨 후 MTT-formazan 생성물을 570nm에 흡수되는 빛의 양을 측정함으로써 결정했다.

4) LDH Leakage 분석

LDH leakage 분석은 약물이 면역세포의 독성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 수행하였다. 복강대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물처리 또는 추출물과 LPS($1\mu g/ml$)을 동시에 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 붕괴에 따라 유리된 LDH의 활성을 측정하였다. 대조군으로 배양된 세포 전체를 sonication 하여 LDH 활성에 대한 대조군으로 사용하였다. 그리고 약물이 처리된 실험군의 LDH 유리량은 다음과 같이 계산하였다.

[약물이 처리된 배양액 LDH 활성/(대조군의 배양액 LDH 활성+sonication 후 대조군의 배양액 LDH 활성)] × 100

5) 비장세포에서 사이토카인 측정

생쥐로부터 분리한 비장세포를 $2.0 \times 10^6/ml$ 로 적정하여 24well 배양용기(flat form)에 $1ml$ 씩 분주한 후 藥物($0-400\mu g/ml$)을 2시간 동안 전처리하고 $2\mu g/ml$ PHA로 자극한 후 $37^\circ C$ CO_2 배양기($5\% CO_2/95\%$ 대기)에서 24시간 배양하였다. 배양액을 얻고 1,000rpm으로 세포를 원심 침전시키고 상등액을 얻어 $-70^\circ C$ 에서 보관하면서 사이토카인 측정에 사용하였다. IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인의 정량

은 24시간 동안 측정된 양을 측정하였다. 측정방법은 각각의 물에 대한 R&D system Inc.(Minneapolis, USA)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

6) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100μ 씩을 첨가하고, 그 혼합물을 $37^\circ C$ 에서 10분간 반응시켰다. 그 샘플 빛의 흡수는 Spectrophotometer (MD, U.S.A.)로 540nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

7) PGE₂와 COX 활성 측정

복강대식세포를 $5 \times 10^5/ml$ 밀도로 접종하고 여러 가지 농도($25-200\mu g/ml$)의 四君子湯 추출물을 2시간 동안 전 처리한 후 LDH ($100ng/ml$)로 자극한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 얻어 PGE₂의 양과 COX의 활성을 측정하였다. 이들 물질의 정량은 24시간 동안 측정된 양을 측정하였다. PGE₂의 측정 방법은 R&D system Inc.(Minneapolis, USA)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였고, COX의 정량은 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 COX activity assay kit (Cyman Chemical, USA)을 이용하여 Cyman사에서 제공하는 방법에 준하여 COX의 활성을 측정하였다.

8) iNOS와 COX-2의 Western blot

추출물이 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μ g을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution(20% methanol, 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이적반응을 제거하기 위해서 5% skim milk가 함유된 triton-tris buffered saline (TTBS)로 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 tris buffered saline (TBS)로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1:1,000) 또는 anti-COX-2 (1:500)를 주입하여 3시간 동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 goat anti-rabbit IgG(1:2,000)을 첨가하고 1 시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 enhanced chemiluminescence (ECL)방법으로 발색시켰다.

9) 비장세포 증식능 측정

생쥐로부터 분리한 비장세포를 96 well 배양용기 (flat form)에 2.0 $\times 10^6$ /ml 밀도로 well 당 100 μ l를 분주한 후 측정하고자 하는 藥物을 농도별로 주입하여 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기(5% CO₂/95% 대기)에서 48시간 배양하여 세포의 증식능도 측정하였다. 세포증식능의 측정은 Promega사의 CellTiter 96 $^{\circ}$ AQueous One Solution Cell Proliferation assay kit를 사용하였다. 요약하면, 배양종료 1시간 30분전에 시약을 20 μ l를 주입하고 상기의 배양조건을 유지한 다음 Promega사가 권하는 방법에 따라 흡광도는 ELISA reader(490 nm)로 측정하였다.

10) 자연살해세포의 살해능 측정

四君子湯 추출물이 자연살해세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 7주령의 Balb/c계 생쥐를 대상으로 1주간 각각의 藥物을 100mg/kg 농도로 투여하였다. 그 후 후경골탈추방법으로 생쥐를 죽여 시킨 후

비장을 적출하여 Ca²⁺과 Mg²⁺이 들어있지 않은 HBSS를 페트리 접시에 주입하고 비장을 슬라이드 글라스를 이용하여 으깨고 피펫팅을 하여 단일 세포를 유리하여 40 μ m의 라일론 메시로 거른 다음 1% penicillin/streptomycin가 함유된 RPMI 1640으로 2회 원심세척하고 Ficoll을 이용하여 밀도 구배법으로 원심분리하여 림프구 층을 얻고 RPMI 1640 배양액으로 1회 세척하고 적혈구 용해액을 주입하고 적혈구를 파괴시킨 후 다시 RPMI 1640 배양액을 이용하여 2회 세척하여 효과세포로 사용하였다.

생쥐 자연살해세포의 표적세포인 Yac-1세포를 배양하여 세척한 후³⁹⁾ CrO₄(100 μ Ci)를 주입하여 방사표지한 후 사용하였다. 효과세포와 표적세포 비율을 10:1의 비율로 적정하고 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂와 95% 대기 상태의 배양기에서 4시간 배양 후 원심분리하여 상등액을 취하여 γ -counter에서 방사능을 측정하였다(A cpm). 대조군으로 표적세포에 배지만 넣어주어 방사능의 자연 누출을 측정하였으며(B cpm), 또한 0.05% Nonidet P-40을 넣어 방사능의 최고치를 측정하였다(C cpm). 자연살해세포능의 계산은 다음과 같은 식으로부터 표적세포의 specific lysis를 계산하였다.

$$\text{Specific lysis} = (A-B)/C-B \times 100$$

11) 통계 분석

결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현했다. 통계 분석은 Student's t-test를 이용했다.

III. 實驗 結果

1. 四君子湯 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

四君子湯 추출물이 LPS가 처리된 또는 처리되지 않은 복강대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 복강대식세포(5 $\times 10^5$ /ml)를 RPMI 1640(1% P/S, 10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음

여러 가지 농도의 四君子湯 추출물을 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 사용된 농도에서 세포독성이 없었다. 또한 여러 가지 농도의 四君子湯 추출물을 2시간 전에 처리하고 LPS(100ng/ml)로 자극한 다음 24시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 어떠한 藥物이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS로 자극했을 경우 생존율은 약 83%로 감소하였으나, 四君子湯 추출물을 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 세포 생존율이 높아졌다.

2. 四君子湯 추출물이 LDH 유리에 미치는 영향

四君子湯 추출물을 LPS가 처리된 또는 처리되지 않은 복강대식세포의 독성에 미치는 영향을 알아보았다. 복강대식세포($5 \times 10^5/\text{ml}$)를 RPMI 1640(1% P/S,

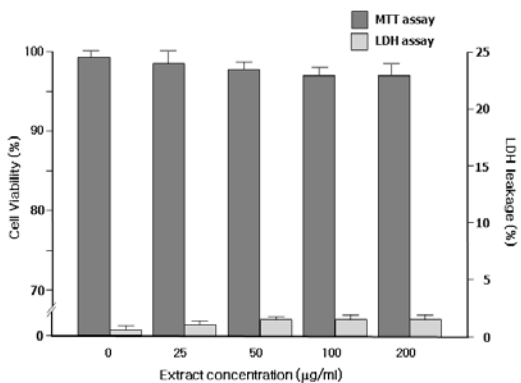


Fig. 1. Cell viability and LDH leakage in Sagunja-tang extract-treated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($5 \times 10^5/\text{well plate}$) from Balb/c mice were incubated for 24h in the presence or absence of the extract at indicated concentrations. Cell viability and LDH activity were measured by MTT assay and LDH activity assay as described in the section of Materials and Methods. Data are means \pm SD of three independent experiments.

10% FBS) 배지를 사용하여 세포 부유액을 만든 다음 여러 가지 농도의 四君子湯 추출물을 주입하고 24시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 사용된 농도에서 세포봉괴에 따른 LDH 유리량은 거의 없었다. 또한 여러 가지 농도의 四君子湯 추출물을 2시간 전에 처리하고 LPS(100ng/ml)로 자극한 다음 24시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 어떠한 藥物이 처리되지 않은 대조군의 세포 LDH 유리량 0%로 나타냈을 때 LPS로 자극했을 경우 11%로 나타났으나, 四君子湯 추출물을 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리했을 때 농도에 의존적으로 LDH 유리량이 감소되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 모든 농도의 四君子湯 추출물은 독성이 없었고, 오히려 LPS로부터 세포독성을 보호하는 효과가 있었다.

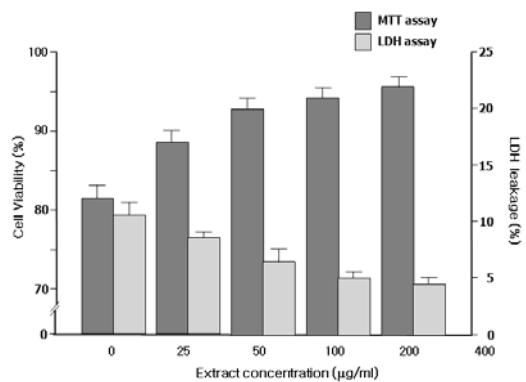


Fig. 2. Cell viability in Sagunja-tang extract-treated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($5 \times 10^5/\text{well plate}$) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without LPS(100ng/ml) for 24h. Cell viability and LDH leakage activity were measured by MTT assay and LDH activity assay as described in the section of Materials and Methods. Data are means \pm SD of three independent experiments.

3. 四君子湯 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

四君子湯 추출물이 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강대식세포($5 \times 10^5/ml$)를 접종하고 3시간 후에 각각의 藥物을 25-200 $\mu g/ml$ 의 농도로 2시간 동안 전처리한 다음 LPS(100ng/ml)로 자극한 후 24시간 배양하고 배양액에 축적된 NO_2^- 양을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 매우 흥미로운 결과를 얻었다. 저 농도 추출물(25 $\mu g/ml$)에서는 LPS로 유도된 NO 생성을 더욱 증가시킨 반면, 그 이상의 추출물 처리군에서는 농도에 의존적으로 NO 생성 억제 효과가 있었다. 특히 고농도 처리군(200 $\mu g/ml$)에서는 대조군에 비해 유의한 NO 생성 억제 효과가 있었다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로 보아 염증 매개물인 NO의 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

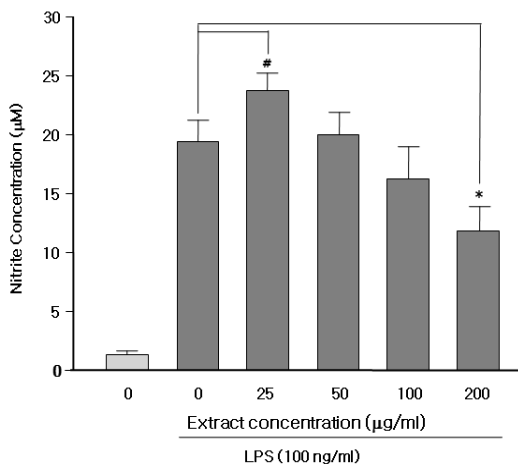


Fig. 3. Effects of Sagunja-tang extract on NO production by LPS-stimulated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($5 \times 10^5/well$ plate) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without LPS(100ng/ml) for 24h. NO produced by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments. * and #: $p < 0.05$ versus LPS-treated group.

4. 四君子湯 추출물이 PGE2 생성에 미치는 영향

四君子湯 추출물이 PGE_2 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 복강 대식세포($5 \times 10^5/ml$)를 접종하고 3시간 후에 각각의 藥物을 25-200 $\mu g/ml$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 100ng/ml의 LPS로 자극하여 24시간 배양하였다.

그 결과 Fig. 4와 같이 아무런 藥物이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 1083.9 ± 70.7 pg/ml로 배지만 처리한 대조군에 비해 PGE_2 의 생성을 살펴보았다. 추출물을 처리한 결과 25-100 $\mu g/ml$ 의 농도에서는 대조군에 비해 PGE_2 의 생성이 유의하게 증가($p < 0.05$)된 반면, 200 $\mu g/ml$ 처리군에서는 유의하게 PGE_2 의 생성을 억제시키는 효과가 있었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 염증 매개물인 PGE_2 의 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

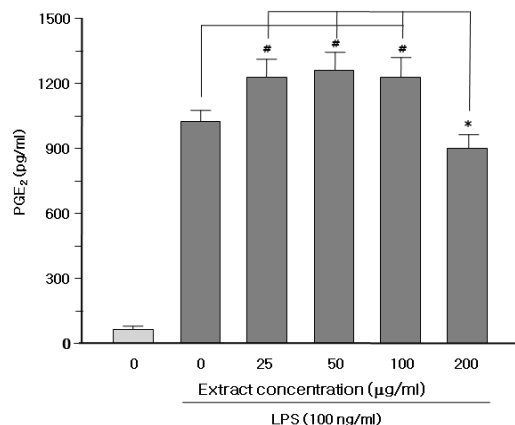


Fig. 4. Effects of Sagunja-tang extract on PGE_2 production by LPS-stimulated peritoneal macrophages. Cells($5 \times 10^5/ml$) from Balb/c mice were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without 100ng/ml LPS for 24h. PGE_2 production assay was carried out as described in the section of Materials and Methods. #: $p < 0.05$ versus LPS-treated group. *: $p < 0.05$ versus LPS-treated 25-100 $\mu g/ml$ group.

5. 四君子湯 추출물이 COX-2 활성에 미치는 영향

COX는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다. 본 연구에서도 四君子湯 추출물이 PGE₂ 생성에 중요한 COX-2 활성에 미치는 효과를 Cayman (USA)사의 COX activity assay kit를 이용하여 조사하였다.

그 결과 Fig. 5와 같이 아무런 藥物이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군을 100%로 정했을 때 추출물을 처리한 결과 25-100 μg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 PGE₂의 생성과 유사하게 COX 활성을 유의하게 증가($p < 0.05$) 한 반면, 200 μg/ml 처리군에서는 유의하게 COX의 생성을 억제시키는 효과가 있었다($p < 0.05$). 四君子湯 추출물 처리에 의한 이상의 결과는 염증 매개물인 COX의 생성을 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

6. 四君子湯 추출물이 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

상기에서 실험한 추출물에 의한 NO 생성 조절과 iNOS와의 발현 관계와 PGE₂ 생성과 COX-2 발현 관계를 알아보기 위해서 四君子湯 추출물을 25-200 μg/ml의 농도로 복강대식세포에 2시간동안 전처리한 후 2회 세척하고 LPS를 자극하여 18시간 배양하였다. 그 후 iNOS의 발현을 Western blot 방법으로 조사한 결과 Fig. 6과 같이 저농도의 추출물(25 μg/ml)에서는 NO 생성 결과와 같이 iNOS 발현이 증가되었으나, 그 이상의 농도(50-200 μg/ml)에서는 농도에 의존적으로 iNOS 발현을 억제시키는 효과가 있었다. COX-2의 경우는 25-50 μg/ml 농도에서 발현이 증가되었으나, 100-200 μg/ml의 농도에서는 25-100 μg/ml 농도 처리군에 비해 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 四君子湯 추출물이 NO와 PGE₂의 생성 조절에 미

치는 영향은 iNOS와 COX-2의 발현의 조절을 통해 이루어짐을 나타내 주었다.

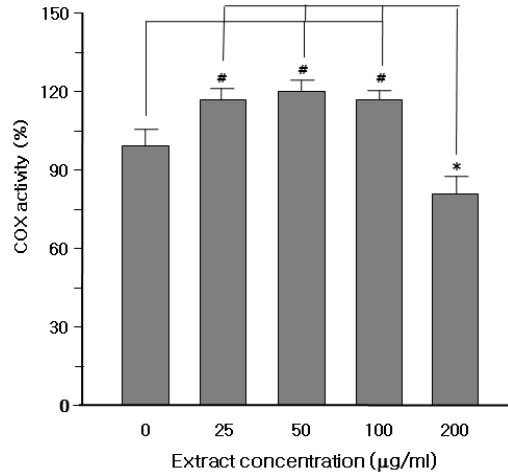


Fig. 5. Effects of Sagunja-tang extract on COX activity in LPS-stimulated peritoneal macrophages. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without 100ng/ml LPS for 18h. COX activity assay was carried out as described in the section of Materials and Methods. #: $p < 0.05$ versus LPS-treated group, *: $p < 0.05$ versus LPS-treated 25-100 μg/ml group.

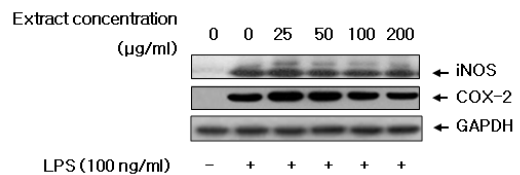


Fig. 6. Effects of Sagunja-tang extract on expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated peritoneal macrophages. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without LPS(100ng/ml) for 18h. Western blot analysis was carried out as described in the section of Materials and Methods.

7. 四君子湯 추출물이 Th1 사이토카인 생성에 미치는 영향

IFN- γ 와 IL-2는 대표적인 Th1으로 알려져 있는데, 四君子湯 추출물이 Th1에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 여러 가지 농도(25-200 $\mu\text{g/ml}$)의 추출물을 비장세포에 처리하고 2 $\mu\text{g/ml}$ PHA로 자극하여 24시간 동안 배양한 후 배양액에서 Th1을 측정했다.

Fig. 7에서와 같이 IFN- γ 의 생성은 25-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 약물 농도에서는 농도에 의존적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)된 반면, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 약간 억제하는 경향을 보였다. 또한 IL-2의 경우 Fig. 8과 같이 25-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 약물 농도에서는 농도에 의존적으로 유의하게 증가($p < 0.05$)되었다. 이러한 결과는 四君子湯 추출물이 효과적으로 Th1의 생성을 증가시킬 수 있음을 시사해 주었다.

8. 四君子湯 추출물이 Th2 사이토카인 생성에 미치는 영향

IL-4는 IgE 면역글로불린을 직접적으로 증가시키고, IL-5와 IL-13은 IL-4를 증가시키는 대표적인 Th2으로 알려져 있는데, 四君子湯 추출물이 Th2 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 여러 가지 농도 (25-200 $\mu\text{g/ml}$)의 추출물을 비장세포에 처리하고 2 $\mu\text{g/ml}$ PHA로 자극하여 24시간 동안 배양한 후 배양액에서 Th1을 측정했다.

그 결과 IL-4의 경우 Fig. 9과 같이 농도에 의존적으로 억제하였고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 유의하게 억제하는 효과가 있었다($p < 0.05$). IL-5의 경우 Fig. 10과 같이 농도에 의존적으로 억제하였고, 100-200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의하게 억제하는 효과가 있었다($p < 0.05$). IL-13의 경우도 Fig. 11과 같이 농도에 의존적으로 억제하였고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의하게 억제하는 효과가 있었다($p < 0.05$). 따라서 四君子湯 추출물은 Th2을 효과적으로 억제시키는 작용이 있음을 알 수 있었다.

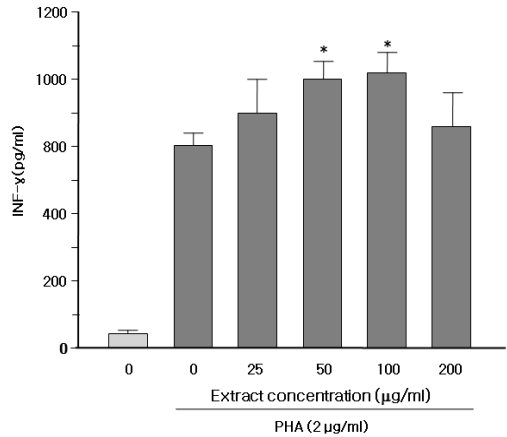


Fig. 7. Effects of Sagunja-tang extract on productions of IFN- γ (Th1) in Balb/c mouse spleen cells stimulated with PHA. Cells($5 \times 10^5/\text{ml}$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without PHA(2 $\mu\text{g/ml}$) for 24h. The productions of IFN- γ was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. *: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

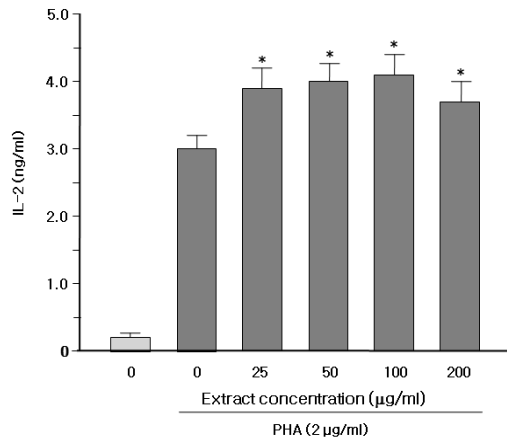


Fig. 8. Effects of Sagunja-tang extract on productions of IL-2(Th1) in Balb/c mouse spleen cells stimulated with PHA. Cells($5 \times 10^5/\text{ml}$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without PHA(2 $\mu\text{g/ml}$) for 24h. The productions of

IL-2 was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. *: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

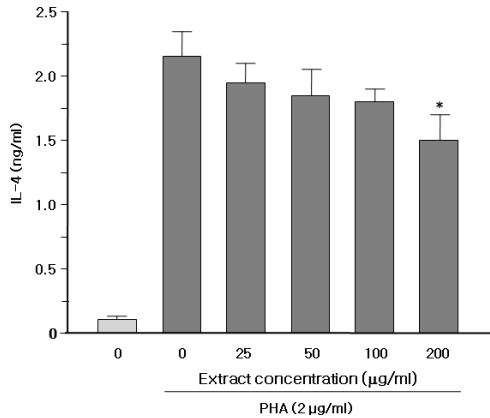


Fig. 9. Effects of Sagunja-tang extract on productions of IL-4(Th2) in Balb/c mouse spleen cells stimulated with PHA. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without PHA($2 \mu g/ml$) for 24h. The productions of IL-4 was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. *: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

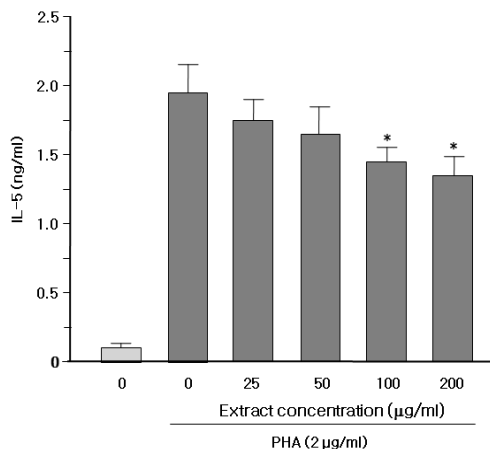


Fig. 10. Effects of Sagunja-tang extract on productions

of IL-5(Th2) in Balb/c mouse spleen cells stimulated with PHA. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without PHA($2 \mu g/ml$) for 24h. The productions of IL-5 was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. *: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

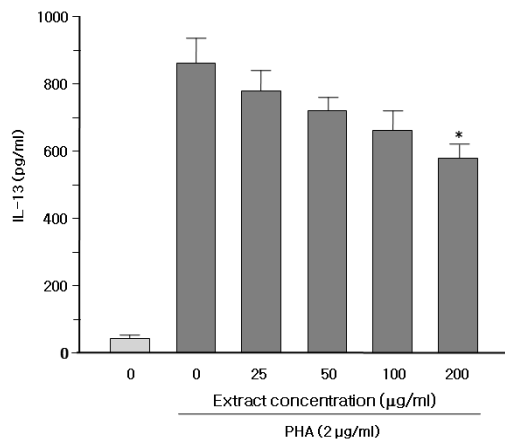


Fig. 11. Effects of Sagunja-tang extract on productions of IL-13(Th2) in Balb/c mouse spleen cells stimulated with PHA. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without PHA($2 \mu g/ml$) for 24h. The productions of IL-13 was determined as described in Materials and Methods. Each column represents the means \pm SD from three independent experiments. *: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

9. 四君子湯 추출물이 비장세포 증식능에 미치는 영향

지금까지 四君子湯 추출물이 세포독성, NO와 PGE₂ 생성, iNOS와 COX-2의 발현, Th1/Th2의 생

성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 四君子湯은 추출물의 농도에 따라 면역 활성을 조절할 수 있는 藥物로 확인되었다. 따라서 이러한 四君子湯 추출물의 면역조절 효과를 보다 상세하게 조사하기 위해서 생쥐 비장세포의 증식 효과를 실험 하였다.

마우스 비장세포를 분리하여 96 well plate에 접종하고 3시간 동안 방치한 후 四君子湯 추출물을 여러 농도(25-200 $\mu\text{g/ml}$)로 2시간 동안 처리한 후 2회 원심 세척한 후 PHA (2 $\mu\text{g/ml}$)로 48시간 동안 자극한 후 세포증식능을 측정된 결과 Fig. 12과 같이 PHA로 자극한 경우 추출물의 농도에 의존적으로 세포증식을 유도하였고, 100-200 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 가장 유의하게 세포의 증식을 유도하였다($p < 0.01$).

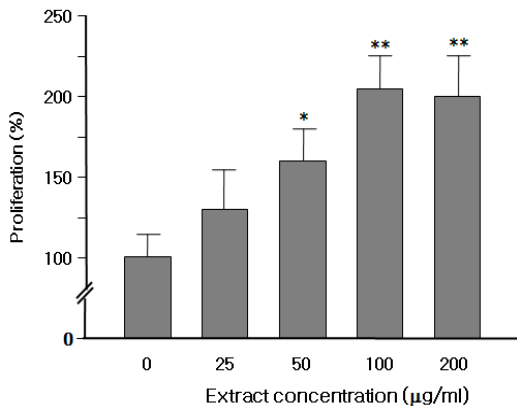


Fig. 12. Effects of Sagunja-tang extract on the spleen cell proliferation of Balb/c mouse by PHA treatment. Cells($5 \times 10^5/ml$) were pretreated with or without the extract at indicated concentrations for 2h, and then incubated with or without 2 $\mu\text{g/ml}$ PHA for 48h. Cell proliferation assay was carried out as described in Materials and methods. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.05$ versus PHA-treated group.

10. 四君子湯 추출물이 자연살해세포의 활성화에 미치는 효과

四君子湯 추출물이 생쥐 자연살해세포 활성화에 미치

는 효과를 알아보기 위해서 1주일간 여러 농도의 四君子湯 추출물을 경구 투여한 후 비장을 적출하여 림프구를 분리한 후³⁹⁾ CrO_4 가 부착된 Yac-1 세포와 혼합 배양하여 세포 살해 활성을 측정하였다. 그 결과 四君子湯 추출물의 농도에 의존적으로 자연살해능이 향상됨을 확인할 수 있었다(Fig. 13). 특히 100-200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 그 효과가 현저했다($p < 0.01$). 이러한 결과는 四君子湯 추출물이 생쥐의 자연살해세포의 활성을 증가시킬 수 있으며, 면역강화제로 사용할 수 있는 가능성을 제시해 주었다.

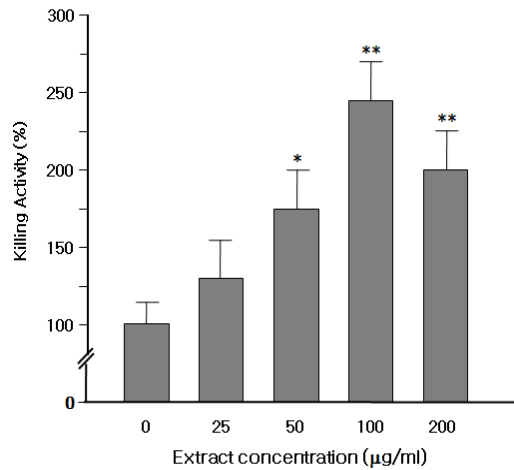


Fig. 13. Effects of *in vivo* administration with Sagunja-tang extract administration on the cytotoxic activity of natural killer cells. Mice were administrated with or without Sagunja-tang extract (25-400 mg/kg body weight) for 1 week, and then killed the mice with cervical dislocation method. Cells($1 \times 10^6/ml$) were obtained lymphocytes from spleen and incubated with CrO_4 -conjugated Yac-1 cells. Cytotoxic activity of natural killer cells was assayed as described in Materials and Methods. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.05$ versus PBS-treated control group.

IV. 考 察

四君子湯은 陳¹⁾이 榮衛氣虛·臟腑怯弱한데 사용한 이후, 龔²⁾은 元氣虧損·脾胃虛弱에, 許³⁾는 眞氣虛弱을 補하는 等 歷代醫家들은 四君子湯을 氣虛에 대한 代表的인 補氣劑로 使用되었다. 최근에는 四君子湯을 脾胃氣虛에 활용되는 補氣劑다 하여 元氣增進, 氣力回復, 食慾增進에 處方하였다^{4,5)}. 李²³⁾는 四君子湯을 식욕부진, 구토, 하리 等の 胃腸虛弱症, 老人과 虛弱者의 出血 및 심한 貧血, 四肢無力症, 半身不隨, 遺尿症, 夜尿症, 치질, 탈항으로 貧血이 있으면서 元氣가 衰弱한자에 應用할 수 있는 것으로 보고하였다. 尹²⁴⁾은 四君子湯을 陰陽氣血病理에서는 氣虛, 陽虛를 中心으로 한 疾病을 治療하고, 臟腑病理에서는 脾胃의 運化機能이 虛弱하여 발생하는 여러 가지 病症과 脾胃機能虛弱이 續發的으로 派生하는 他臟腑의 疾病 등을 治療하는 方劑다 하였다.

四君子湯 構成藥物의 알려진 藥理作用을 보면, 人蔘(*Radix Ginseng*)은 大補元氣, 安神益智, 健脾益氣, 生津하는 效능이 있으며, 中樞神經系의 흥분성을 높여 피로감을 輕減하고 뇌하수체-부신피질계의 흥분으로 저항력을 높임으로써 消化吸收, 蛋白合成, 新陳代謝를 促進하며 強心作用, 性機能增強작용을 가지므로 전신의 기능을 높여 物質代謝를 促進한다^{25,26)}. 實驗的 研究로는 노화억제, 항혈전, 피로회복, 항염, 혈압강하, 항당뇨, 항암, 면역증강 등의 效능이 있음을 보고하였다²⁷⁻³⁰⁾.

白朮(*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*)은 補脾益氣, 燥濕利尿하여 健胃, 止瀉, 鎮靜, 利尿하는 效능이 있으며, 胃腸의 분비를 높여 消化吸收를 促進하며 蛋白合成을 促進한다^{25,26)}. 人蔘과 白朮은 방사선이나 化學물질에 의해 감소된 백혈구를 증가시킨다. 實驗的 研究로는 血壓降下작용, 멜라닌 생성, 세포성 및 체액성 면역증강에 대해 보고하였다.

白茯苓(*Poria*)은 利水滲濕, 健脾和中, 寧心安神하는 效능이 있고, 滋養작용이 있으며 白朮과 함께 소화관

내의 剩餘水分을 血中에 끌어들여 止瀉시키고 體內의 剩餘水分을 利尿作用에 의해 排泄한다^{25,26)}. 특히 人蔘과 炙甘草는 코르티코이드(corticoid)樣 效능을 도와 抗利尿 作用으로 체내의 수분을 貯溜하는 傾向이 있기 때문에 이 作用에 拮抗하기 위하여 白朮·茯苓을 배합한다⁵⁾. 實驗的 研究로는 신장 기능, 지방산 및 트리테페노이드(triterphenoid) 성분과 관한 연구 등이 있다³¹⁾.

甘草(*Radix Glycyrrhizae*)는 補脾益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳의 效능이 있으며, 機能促進과 諸藥의 調和를 위해 배합한다^{25,26)}. 면역조절, 항바이러스, 항암작용이 있으며, 코티솔(cortisol)의 증가, 멜라닌 자극호르몬의 감소, 해독작용 및 동맥경화 예방, 염증반응 완화 등의 藥理作用도 알려져 있다³²⁾.

韓醫學에서 모든 疾病을 일으키는 內的인 病理條件이 正氣虛에서 비롯되며, 正氣는 인체의 生理活動을 保存하고 內的인 病因으로부터 인체를 防禦하고 疾病으로부터 回復시켜 體內의 恒常性을 維持한다는 의미로 해석할 수 있다⁷⁾. 이러한 觀點에서 보면, 生體의 防禦體系를 통하여 體內의 恒常性을 維持하는 免疫學的 概念과 類似性을 가지고 있다. 現代 韓醫學은 傳統的으로 處方된 韓藥材의 效능을 탐색하고 그 效能價値를 높이기 위하여 藥劑의 보완 處方을 하여 正氣를 回復시키기 위한 研究를 활발히 進行하고 있다²⁴⁻²⁷⁾.

생체는 면역계를 작동하여 외부와 내부의 이물질을 제거함으로써 체내의 항상성을 유지하는데, 면역계는 탐식세포, 자연살해세포, 보체(complement) 등으로 이루어진 자연면역(natural immunity)을 담당하는 선천면역(innate immunity)과 T세포와 B세포 같이 특이면역(specific immunity)을 담당하는 획득면역(acquired immunity)으로 나눌 수 있는데, 획득면역은 T세포 작용에 의한 세포매개성 면역(cell mediated immune response)과 B세포 작용에 따른 체액성 면역(humoral immunity)으로 구분된다²⁸⁾.

林³⁰⁾은 四君子湯이 血球數에는 별다른 영향을 주지는 않았으나, γ -globulin 생산을 促進시킬 뿐만 아니

라 adenine triphosphate (ATP)의 생성과 ATPase의 활성도를 촉진시켜주며, 면역성을 증가시키는 補氣作用을 한다 하였고, 金²¹⁾은 四君子湯, 四物湯, 八物湯 모두 Prednisolone으로 유발된 생쥐의 세포성 및 체액성 면역반응저하를 回復시키는 효능이 있다고 보고하였으며, 李²²⁾는 四君子湯의 投與는 숙주의 체액성·세포성면역능이 증가하고 자연살해세포의 활성화도 현저히 증가하여 四君子湯이 면역능을 증가시킨다고 보고하였으나 이는 遲延性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity, DTH)과 Rosette 形成能의 細胞性免疫能과 赤血球凝集素 및 溶血素價의 體液性免疫能 등 抗原-抗體反應의 增加를 통해 면역능이 增加됨을 보고한 것으로 그 구체적인 免疫活性에 대한 研究는 아직 이루어지지 않았다.

특정 藥物을 이용한 면역 활성을 조사하기 위해서는 탐식세포의 탐식능과 관련되고 염증 매개물질로 알려진 NO 및 PGE₂의 생성에 미치는 영향뿐만 아니라 T세포의 활성 및 탐식세포의 활성과 관련된 Th1과 Th2의 생성에 작용하는 효과 그리고 T세포의 증식능과 자연살해세포의 살해능력을 조사해야 한다.

따라서 본 研究는 正氣를 補益하고 虛弱을 治療하는 補益藥 중 四君子湯의 효과를 조사하기 위해서 생쥐의 복강대식세포를 대상으로 먼저 이들 藥物이 세포독성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 탐식세포의 탐식능에 미치는 영향을 알아보기 위해서 복강내 대식세포를 LPS로 자극하여 NO와 PGE₂의 생성과 이들을 조절하는 iNOS와 COX-2의 발현을 조사하였다. PHA로 자극된 비장세포에서 Th1과 Th2를 조사하였고, 비장세포의 증식능력을 조사한 후에 四君子湯 추출물을 생쥐에 1주일간 경구 투여하여 자연살해세포의 살해능을 측정하였다. 그 결과 유의한 결과를 도출할 수 있었다.

MITT와 배지의 LDH 활성을 조사한 결과 본 연구에 사용된 四君子湯 추출물의 모든 농도(25-200 μg/ml)에서 세포독성이 없었고, 오히려 LPS에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있었다(Fig. 2). LPS로 자극

된 탐식세포의 활성을 조사한 결과 저농도의 四君子湯 추출물은 NO와 PGE₂의 생성을 저농도에서는 증가시키고 고농도에서는 억제시키는 조절 효과가 있었다. 이들의 결과는 iNOS와 COX-2의 발현을 조절하는 四君子湯 추출물의 효과에 기인된다는 사실을 확인하였다(Fig. 6). NO는 높은 반응성을 가진 생체에서 생성되는 분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포를 IFN-γ와 TNF-α로 자극하면 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하면서 활성화 된다^{33,35)}. 또한 COX는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 소량의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 활성화된 대식세포로부터 과량의 prostanoid생성은 면역반응에 관여하여 다양한 염증성 질환의 원인이 된다³⁶⁾.

IFN-γ는 CD4⁺ 세포 중 Th1 세포에 의해서 생성되고 항바이러스 효과뿐만 아니라 대식세포를 활성화시켜 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성과 NO의 생성을 촉진하는 사이토카인으로 알려져 있다^{38,39)}. 또한 IL-2는 T세포의 증식을 유도하는 Th1으로 알려져 있으며, 본 연구 결과 四君子湯은 Th1을 증가시키는 효과가 있었다(Fig. 7, 8).

IL-4는 IL-5와 IL-13의 작용에 의해 IgE의 생산에 직접적인 영향을 주는 대표적인 Th2으로³⁹⁾, 이들 사이토카인이 생체 내에서 과량 생산되면, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma)을 비롯한 알러지성 비염(allergic rhinitis)을 유발할 수 있는 주요 요인으로 알려져 있다⁴⁰⁾. 본 연구의 결과 四君子湯 추출물은 IL-4는 IL-5와 IL-13과 같은 Th2의 생성을 효과적으로 억제하였다(Fig. 9-11).

四君子湯 추출물이 생쥐 비장면역세포 중 T세포의 증식과 자연살해세포의 살해능에 미치는 효과를 조사한 결과 Fig. 12와 같이 T세포의 증식을 증가시켰을 뿐만 아니라 자연살해세포의 살해능을 향상시키는 효

과가 있었다(Fig. 13). 따라서 四君子湯 추출물은 T세포 증식을 통한 면역 활성 조절뿐만 아니라 생체에서 자연살해세포의 살해능을 증가시키는 면역 강화 작용이 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험결과 四君子湯 추출물은 세포독성이 없고 오히려 손상된 세포를 보호할 수 있는 효과와 NO와 PGE₂ 등 염증 매개물을 조절할 수 있었다. 뿐만 아니라 Th1, Th2 생성을 조절할 수 있는 면역효과가 있음을 보여주었다. 더욱이 T세포의 증식과 자연살해세포의 활성을 조절할 수 있는 효능이 확인되어 免疫調節機能이 低下된 각종 人體 疾患의 治療劑로 활용할 수 있는 方劑라고 생각되며 그 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. 따라서 이러한 결과를 韓醫學的인 관점으로 볼 때 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로 配伍된 四君子湯이 免疫調節 作用에 效果的임을 나타내고 있어, 方劑學的 君臣佐使 理論에 입각한 處方 構成이 매우 중요함을 입증하여 주고 있으며, 韓藥을 이용한 새로운 치료제 개발에 方劑學的 處方 構成 理論 도입이 필요함을 시사하고 있다. 앞으로 *in vitro*뿐만 아니라 *in vivo* 실험에 方劑學的 개념을 이용한 處方 構成 理論인 君臣佐使論을 활용한다면 보다 效果的이고 副作用이 없으면서, 實用性이 높은 天然物을 이용한 治療劑 開發에 대한 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

V. 結 論

人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로 配伍된 四君子湯은 傳統的으로 氣力의 衰弱에 따른 元氣回復, 循環器 疾患 및 免疫疾患 그리고 神經疾患에 활용되어 왔으나, 면역 매개물의 생성 및 발현에 미치는 영향에 대한 四君子湯의 구체적인 연구 조사가 없는 실정이다. 본 연구는 四君子湯의 免疫機能 調節과의 聯關性을 究明하기 위한 研究의 일환으로 四君子湯에 대한 免疫調節 作用 效果를 검증하기 위하여 생쥐의 면역세포를 대

상으로 NO, PGE₂, COX-2, IFN- γ 와 IL-2 등 Th1과 IL-4, IL-5, IL-13 등 Th2을 조사하였으며, 면역세포의 증식과 자연살해세포의 활성을 조사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

MTT와 LDH 측정을 통하여 四君子湯은 대식세포에 독성이 없음을 확인하였고, LPS에 의해 유도된 대식세포 손상을 보호하는 효과가 있음을 확인하였다. 저농도(25 $\mu\text{g/ml}$)에서 NO 생성을 증가시켰고, 50-200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 LPS에 의한 NO 생성을 억제하였다. 25-100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 추출물은 PGE₂ 생성과 COX-2 활성을 유도한 반면, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 억제하는 효과가 있었으며, iNOS와 COX-2의 발현은 이들의 결과와 유사했다. PHA로 활성화된 비장세포에서 생성되는 Th1(IFN- γ 와 IL-2)의 생성을 증가시키는 효과가 있었다. 반면, Th2(IL-4, IL-5와 IL-13)의 생성은 추출물의 농도에 의존하여 억제하는 효과가 있었고, T세포의 증식과 자연살해세포의 살해능은 추출물의 농도에 의존해서 증가하는 효과가 있었다.

이상의 결과에서 四君子湯 추출물은 면역세포의 활성을 조절할 수 있는 효과를 나타내었다. 따라서 四君子湯은 補氣藥으로 免疫調節機能이 低下된 각종 人體 疾患에 활용할 수 있는 方劑라 思料된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨

References

1. Jin SM, Taiping Benevolent Dispensary Bureau, Beijing:Chinese Medicine Press, 1996:18.
2. Gong YH, Susebowon, Seoul:Euseongdang, 1993:227.
3. Heo J, Dongeuibogam, Seoul:Namsandang.

- 1969:90.
4. Kang SS, Proper Traditional Medical Formulae, Seoul:Daeseongmunhwasa, 1996:120-1.
 5. Yun YG, (Graphic additions) East Medical prescription and prescription Commentary, Seoul:Euisseongdang, 2002:330-2,344-5.
 6. Cho JG, Oriental medical study on immunity, Oriental Medicine, 1986;12(1):19-23.
 7. Lee MH, Internal Medicine, Seoul:Fraternity Press, 1977:1989-99.
 8. Jeong UC, Protective Effects of *Sagunja-Tang* on Oxidative Stress-Induced Death of H9c2 Cardiomyoblast Cells, Graduate school of Wonkwang University, 2002:1-35.
 9. Pak JY, Protective Effect of Sagunja-tang on H₂O₂-induced Oxidative Stress in Human Vascular Endothelial Cells, Wonkwang University, 2007:1-32.
 10. Lee SJ, Effects of the Ijin-tang, Sagoonja-tang, and Yuggoonja-tang on the Hyperlipidemia induced Rabbits, Wonkwang University, 1992:1-38.
 11. Jeong UY, Effects of Sagunjatang and Sagunja-tang plus Mylabris phalerata on Human Stomach Cancer Cells, Kyunghee University, 2001:1-50.
 12. Kim GO, Yugeunpi for uterine cancer cells, sagunja-tang, anti-cancer effects of sagunja-tang-ga-yugeunpi, Daejeon University, 1993:1-34.
 13. Kang JS, Effects of Sagoonja-tang, Samool-tang and Palmool-tang on the Hormones, Metabolic Substances and Blood Components in the Recovery of starvation, Daejeon University, 1995:1-58.
 14. Bae JG, Influence of Sakunza-tang and Samul-tang extract administration on growth in Rats, Kyunghee University, 1978:1-17.
 15. Lee CW, The experimental studies of Sagunja-tng, Samul-tang and Palmul-tang affecting the recovery of fatigue of muscles, Kyunghee University, 1988:1-39.
 16. Ha JY, Choi SH, Ahn GS, Effect of Samul-tang and Sagunja-tang on the Intravascular Cagulation Induced by Endotoxin in rats, J of KyungHee Oriental Medicine, 1988;11(1):113-22.
 17. Kim DS, Effect of Yukmizihwang-tang, Samul-tang and Sagunza-tang on the Catecholamines contents of Immobilization stressed Rats, Kyunghee University, 1995:1-46.
 18. Jeong WU, Sagunja-tang effects on blood pressure and body temperature, Wonkwang University, 1989:1-39.
 19. Nam YJ, Study on the efficacy of sagunja-tang, Kyunghee University, 1990:1-27.
 20. Lim GS, Effects of Sagunja-tang water extract on the physiological activity of rabbits, Wonkwang University, 1987:1-62.
 21. Kim SH, Effects of Sagoonja-tang, Samool-tang and Palmool-tang on depressed immune response in mice induced by prednisolone, Kyunghee University, 1987:1-42.
 22. Lee NG, Lee CH, Ju YS, Effect of SA GUN JA TANG on Immune Response and Natural Killer Cells Activity to SRBC in Mice, J Korean Oriental Med, 1989;10(2):115-22.
 23. Lee JH, Illustrated the Chinese side treatment Prescriptions, Seoul:Uibang publisher, 2004: 382-4.
 24. Yun YG, Prescripational survey about crinical application of Sagoonja-tang in the Dongeuibogam, J of Oriental Medical

- Prescription, 2001;9(1):11-34,
25. Shin MG. Clinical herbalogy. Seoul:Namsandang, 1986:250-61,166-7,172-3,175-7.
 26. Lee SI, et al. Clinical application of Chinese medicine. Seoul:Seongbosa, 1986:151-3,308-13, 320-2,323-7.
 27. Ahn YG. The Effect of Panax Ginseng Extract on the Immunotoxicity of Cimetidine in Mice, Journal of Korean Environmental Toxicology Society, 1991;6(1):25-38.
 28. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. New York:W.B. Saunders company, 2000:3-16.
 29. Oh JS. Effects of Korea Ginseng, Deer Horn Extracts and Filtrate of Escherichia coli Culture on Leukocyte Chemotaxis. Korean Society of microorganisms, 1985;20(2):247-55.
 30. Go BH. An Experimental Study on the Effects of Deer horn, Rehmannia glutiosa, Panax ginseng and Acanthopanax sessiliflorum on Immune Response & NK Cell Activity in Mice. Journal of KyungHee Oriental Medicine, 1986;9:193-216.
 31. Shim JC. Pharmacological Study on the Effect of *Poria* and *Radix Cynanchi Wilf ordii*, Wonkwang University, 2002:1-40.
 32. Kim HM, Song BK, Lee E, Jeong HT. Herbal Medicinal Pharmacology. Seoul:Goryeo medicine, 2000:315-9.
 33. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. Blood, 1995;86(3):1184-95.
 34. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. J Biochem Mol Biol, 2002;35(1):116-26.
 35. Lee JH, Ryu H, Han MK, Kim UH, Chung HT. Nitric oxide inhibits capping in HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun, 1997; 232(3):827-31.
 36. Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, et al. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. J Exp Med, 2000;191(12):2131-44.
 37. Long M, Slaiby AM, Wu S, Hagymasi AT, Mihalyo MA, Bandyopadhyay S, et al. Histone acetylation at the Ifng promoter in tolerized CD4⁺ cells is associated with increased IFN-gamma expression during subsequent immunization to the same antigen. J. Immunol, 2007;179(9):5669-77.
 38. Ren FY, Jin H, Piao XX, Piao FS. Ribavirin and IFN-alpha combination therapy induces CD4⁺ T-cell proliferation and Th1 cytokine secretion in patients with chronic hepatitis B. World J. Gastroenterol, 2007;13(41):5440-5.
 39. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Saunders co, 2000:235-69.
 40. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest, 2004;113(5):651-7.