

소양인 양격산화탕의 면역 활성화 연구

정다영 · 하혜경 · 이호영 · 이진아 · 이남현 · 이준경 · 황대선 · 신현규

한국한의학연구원 한약EBM연구센터

Abstract

Stimulation of the Immune Response by Yanggyuksanhwa-tang

Da Young Jung, Hyekyung Ha, Ho-Young Lee, Jin-Ah Lee, Nam-Hun Lee, Jun Kyoung Lee, Dae Sun Huang,
Hyeun-Kyoo Shin

Herbal Medicine EBM Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Korea

1. Objectives

Yanggyuksanhwa-tang for Soyangin was applied to investigate the immunological activities on antigen (Ag)-specific or Ag-non-specific immune responses on murine macrophage cell line (RAW 264.7) and ovalbumin/aluminium (OVA/Alum)-immunized mice.

2. Methods

This study were carried out in nitric oxide (NO) synthesis on RAW 264.7 cells and cellular proliferation on mouse splenocytes. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with OVA/Alum (100 µg/200 µg) on day 1, 8, and 15. Yanggyuksanhwa-tang was administrated to mice orally for 3 weeks from day 1. On day 22, OVA-, lipopolysaccharide (LPS)-, and concanavalin A (Con A)-stimulated splenocyte proliferation and antibodies (OVA-specific antibodies of the IgG, IgG1, and total IgM classes) in plasma were measured.

3. Results

Yanggyuksanhwa-tang significantly enhanced cellular proliferation by LPS and Con A on splenocytes from OVA/Alum-immunized mice ($p < .001$). Yanggyuksanhwa-tang also significantly enhanced plasma OVA-specific IgG ($p < .001$), IgG1 ($p < .001$), and total IgM ($p < .01$) levels compared with the OVA/Alum group.

4. Conclusions

These results suggested that Yanggyuksanhwa-tang for Soyangin could be used as immunopotent.

Key Words : Yanggyuksanhwa-tang (Lianggesanhwa-tang), Antibodies, LPS, Con A, OVA

• 접수일 2010년 05월 17일; 심사일 2010년 05월 24일;
승인일 2010년 06월 25일
• 교신저자 : 신현규
대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원
한약EBM연구센터
Tel : +82-42-868-9464 Fax : +82-42-864-2120
E-mail : hkshin@kiom.re.kr

* 본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준화방치방 EBM 구축사업'에 의해 수행되었다.

I. 緒 論

涼膈散火湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』에 少陽人 胸膈熱證을 치료하는 처방으로 처음 기재되었으며, 胃受熱裏熱病 증 上消에 쓰이며¹⁾, 그 구성 약물의 효능들을 살펴보면, 清熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解癢하는 효능을 가지고 있다²⁾.

전통의학에서는 인체에 대해 불리한 반응을 초래하는 환경 인자를 ‘邪氣’라고 규정하고 이에 대한 방어 작용을 하는 인체의 모든 기전과 물질은 ‘正氣’라고 하여 正氣와 邪氣의 抗爭이란 관점에서 인체의 면역 현상을 설명하였다. 正氣는 인체 면역 계통의 정상적인 기능이며, 扶正祛邪의 원칙에 따라 질병의 치료와 예방작용을 하게된다. 그러나 특정 邪氣가 모든 사람에게 동일한 가치를 지니지 않는다. 동일한 邪氣라 할지라도 체질에 따라 나타나는 邪氣에 대한 반응에는 차이가 있게 된다. 四象醫學에서는 각 체질의 병증을 表病과 裏病으로 분류하고 체질에 따른 臟腑의 상호 관계를 정상화시켜 면역계의 균형을 회복하여 抗病力을 증강시킴으로써 病邪에 대항할 수 있다고 하여 면역에 대한 치료의 근거를 제시하고 있다³⁾. 涼膈散火湯은 少陽人에게 사용되는 처방으로 임상 및 실험 연구 결과들이 발표되었으나, 正氣를 보존하고 邪氣를 제거하여 항상성을 유지하는 가장 기본적인 면역 활성화에 대한 연구는 없었다. 체질을 기준으로 투여하는 체질 처방도 면역 활성화에 기여하는지에 대한 연구가 필요한 바, 본 논문에서는 면역반

응에 관여하는 대식세포 및 비장세포의 증식 효과, 면역글로불린의 생성량 변화를 통해 대표적인 少陽人 체질 처방인 涼膈散火湯이 면역반응에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 처방추출

양격산화탕의 처방 구성 약재들은 (주)옴니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jecheon, Korea)에서 각각 구입하였다. 각각의 처방에 따른 구성비는 Table 1과 같다. 이들 처방 구성 약재를 배합하고 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (추출기: 경서메디텍 COSMOS660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 sieve를 사용하여 거르고 동결건조기 (일신 동결건조기 PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 분말을 얻었으며 수득율은 16.2%였다.

2. 실험 방법

1) 대식세포의 활성화 검색

(1) 대식세포의 증식능 검색

양격산화탕이 대식세포주의 증식에 미치는 효과를 검색하기 위하여 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 양격산화탕 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 비교물질로 lip-

Table 1. The Amount and Composition of Yanggyuksanhwa-tang

Herbal Name	Scientific Name	Weight (g)
생지황 (生地黃)	Rehmanniae Radix	7.5
인동등 (忍冬藤)	Lonicerae Flos	7.5
연교 (連翹)	Forsythiae Frucus	7.5
산치자 (山梔子)	Gardeniae Fructus	3.75
박하 (薄荷)	Menthae Herba	3.75
지모 (知母)	Anemarrhenae Rhizoma	3.75
석고 (石膏)	Gypsum	3.75
방풍 (防風)	Saposhnikoviae Radix	3.75
형개 (荊芥)	Schizonepetae Spica	3.75
	Total (g)	45
	Yield (%)	16.2

opolysaccharide (LPS, Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)를 사용하였다. 2일간 배양한 후 tetrazolium salt인 CCK-8 kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배양한 다음 ELISA reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control 흡광도에 대한 양격산화당 흡광도의 비를 %로 계산하였다.

(2) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plate에 2.5×10^5 cells/well로 분주한 후 12시간 배양하여 안정화 시키고 약물독성이 없는 범위 내에서 농도별 (2-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하였다. 양성대조군으로 LPS를 농도별 (1-1000 ng/mL)로 처리하였으며 18 시간 배양 후 상층액을 수집하여 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 Griess reagent (Promega, WI, U.S.A.)를 이용하여 nitrite 양을 측정하여 계산하였다.

2) 생쥐 비장세포 분리 및 증식능 검색

(1) 비장세포의 분리 및 배양

6주령의 수컷 ICR 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 경추탈골하여 희생한 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.)로 세척하고 주사기를 이용하여 비장세포를 분리한 후 RBC lysing buffer (Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)로 적혈구를 제거하였다. 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gbico BRL, NY, U.S.A.)와 1% penicillin-streptomycin (Gbico BRL, NY, U.S.A.)을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gbico BRL, NY, U.S.A.)에 비장세포를 부유시켜 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

(2) 비장세포의 증식능 검색

양격산화당이 비장세포 증식을 검색하기 위하여 분리한 비장세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 양격산화당 추출물을 PBS에 용해하여 농도별로 첨가하였다. 세포증식 효과에 대한 비교물질로 B cell lymphocyte에 대한 mitogen인 LPS와 T cell lymphocyte에 대한 mitogen인 Con A를 사용하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit solution을 첨가하여 4시간 더

배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control 흡광도에 대한 양격산화당 흡광도의 비를 %로 계산하였다.

3) OVA/Alum 감작 생쥐에서 면역 활성화 검색

(1) 실험동물 및 항원물질 투여

7주령 (19~20 g)의 수컷 C57BL/6 생쥐 (오리엔트바이오, 성남)를 1주일간 순화시킨 다음 대조군, Ovalbumine (Thermo, IL, U.S.A.) /Aluminium (Sigma-Aldrich Co, MO, U.S.A.) /Saline 투여군인 OVA/Alum 군, OVA/Alum 및 양격산화당 투여군 (처방 투여군)으로 분리하여 실험에 사용하였다. OVA/Alum은 항원으로 생쥐 당 100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 용량을 1일, 8일, 15일에 복강투여하여 항체 생성을 유도하였으며 대조군은 동일량의 saline을 복강 투여 하였다. 대조군과 OVA/Alum 군은 증류수를, 처방 투여군은 양격산화당 추출물을 1 g/kg/day 용량으로 OVA 감작과 동시에 21일간 투여하였다. 22일에 엔도발 (pentobarbital, 한립제약, 용인, 150 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)을 복강 투여한 후 마취하에 복강절개하여 후대정맥에서 채혈한 후 비장을 적출하고 방혈치사 하였다. 채혈된 혈액은 전혈구수 측정 후 원심분리하여 혈장을 분리하고 다음 실험시까지 -80°C에 보관하였다.

(2) OVA/Alum 감작된 마우스 비장세포의 증식능 검색 (mitogen effect)

적출한 비장에서 앞에서와 같은 방법으로 비장세포를 분리하여 96-well plate에 분주한 다음 대조군, OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 Con A (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 각각 첨가하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 kit를 사용하여 세포 증식능을 검색하는 방법으로 양격산화당 투여에 대한 mitogen effect를 검색하였다.

(3) 혈중 항체 생성량 측정

생체내 항체 생성량을 측정하기 위하여 감작항원으로 사용한 OVA에 대한 특이적 (OVA-specific) 또는 비특이적 (total) 면역 글로불린의 양을 측정하였다. 생쥐 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, total IgM level은 enzyme linked immunosorbent assay kit (ELISA; Bethyl Laboratory, Inc., Texas, USA)를 사용하여 측정하였다.

OVA-specific IgG 및 IgG1을 검색하기 위하여 microtiter plate에 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in carbonate buffer, pH 9.6) 용액을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 OVA를 부착시켰다. Total IgM을 측정하기 위하여 IgM capture antibody (Ab)를 carbonate buffer (pH 9.6)에 1:100으로 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 Ab를 부착시켰다. 각각 wash buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)로 3번 세척한 후 blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0)를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 첨가하여 상온에서 30분간 방치하여 비특이적인 결합부위를 차단하였다. Wash buffer로 세척한 후 혈장을 1:1000 (OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1) 또는 1:10,000 (total IgM)으로 희석한 후 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG, IgG1 또는 IgM을 1:100,000으로 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 가하고 상온에서 1시간 방치한 후 세척하였다. 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB) 용액을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하여 빛을 차단하고 실온에서 5분간 반응시킨 후, 2 M H_2SO_4 를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 혈중 Cytokine (IL-2, IL-4) 측정

혈중 IL-2, IL-4 level은 Duoset mIL-2 및 mIL-4 ELISA

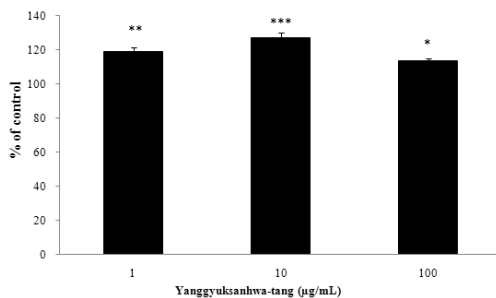


Figure 1. The proliferation of RAW 264.7 cells treated with Yanggyuksanhwa-tang.

Cells (3×10^3 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with Yanggyuksanhwa-tang for 48 hr. The values are presented as means \pm SEM. * $p < .05$, ** $p < .01$, and *** $p < .001$ compared with control.

kit (R&D systems, MN, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

4) 통계처리

모든 측정 결과는 mean \pm SEM으로 나타냈으며 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

III. 結 果

1. 양격산화탕이 대식세포 활성화에 미치는 영향

대식세포는 1차적인 면역반응과 관련되므로 양격산화탕이 대식세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향을 검색하였다. 양격산화탕은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 20% 이상의 세포독성을 나타냈으므로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도를 사용하였다. 대조군 (무처리군)과 비교하여 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $27.1 \pm 3.2\%$ ($p < .001$)로 증식효과를 나타냈다 (Figure. 1).

대식세포의 활성화 지표인 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군은 $0.65 \pm 0.12 \mu\text{M}$, 양성대조군 (LPS 1-1000 ng/mL)은 농도의존적으로 증가하여 1000 ng/mL에서 $23.78 \pm 1.34 \mu\text{M}$ 생성되었으나 ($p < .001$) 양격산화탕 (2-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $0.54 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 로 NO 생성을 유발하지 않았다 (Figure. 2).

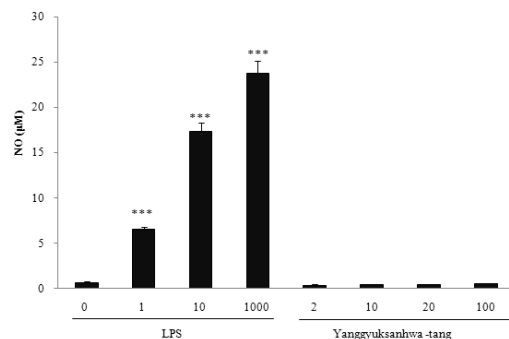


Figure 2. The stimulation of NO production on RAW 264.7 cells treated with Yanggyuksanhwa-tang.

Cells (2.5×10^5 cells/well) were seeded into 48-well plates and treated with Yanggyuksanhwa-tang for 18 hr. LPS was used as positive control. The units of concentrations of LPS and Yanggyuksanhwa-tang are ng/mL and $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The values are presented as means \pm SEM. *** $p < .001$ compared with LPS 0.

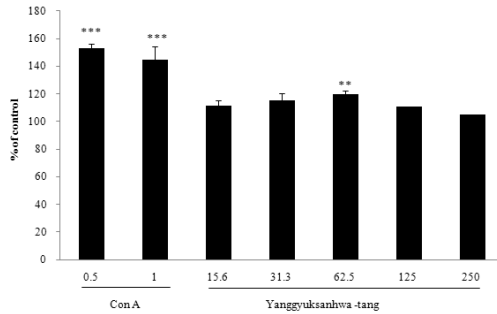


Figure 3. The proliferation of mouse splenocytes treated with Yanggyuksanhwa-tang. Isolated mouse splenocytes (5×10^5 cells/well) were seeded into 96-well plates and treated with Yanggyuksanhwa-tang for 48 hr. The unit of concentrations of Con A and herbal formulas for taeumin is $\mu\text{g/mL}$. ** $p < .01$ and *** $p < .001$ compared with control (Con A 0).

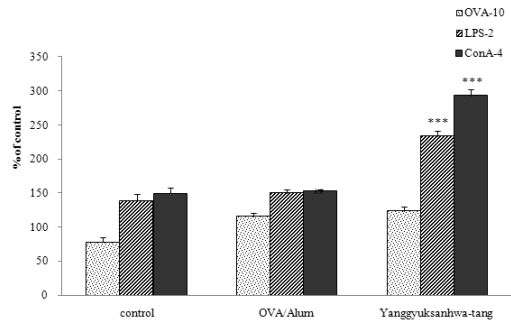


Figure 4. Effects of Yanggyuksanhwa-tang on OVA- or mitogen-stimulated splenocyte proliferation. Splenocytes were prepared from control, OVA/Alum or Yanggyuksanhwa-tang-administrated mice on Day 22 and cultured with OVA, Con A or LPS for 48 h. Cellular proliferation was shown as a percentage of the proliferation of cells cultured without a mitogen (% of control). The values are presented as means \pm SEM. Differences between OVA/Alum and Yanggyuksanhwa-tang-administrated groups were evaluated in each group. *** $p < .001$

2. 양격산화탕이 생쥐 비장세포 증식능에 미치는 영향

분리한 비장세포에 양격산화탕을 처리하여 비장세포의 증식능을 검색한 결과, 양성대조군으로 사용한 Con A는 0.5 또는 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 40% 이상의 비장세포 증식효과를 나타냈다 ($p < .001$). 양격산화탕 (15.6-250 $\mu\text{g/mL}$)은 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $19.7 \pm 3.4\%$ ($p < .01$)의 비장세포 증식효과를 나타냈다 (Figure. 3).

3. 양격산화탕이 OVA/Alum-감작된 생쥐에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

양격산화탕이 생체내에서 면역반응에 미치는 영향을 검색하기 위하여 양격산화탕을 투여한 생쥐의 비장세포를 분리하여 항원으로 사용한 OVA, B cell mitogen인 LPS와 T cell mitogen인 Con A에 대한 mitogen effect를 검색하였다. 각 투여군에서 mitogen을 처리하지 않은 무처리군을 대조군으로 하여 이에 대한 세포 증식효과를 Figure. 4에 나타냈다. 대조군에서 항원인 OVA에 대한 반응은 나타나지 않았고, Con A와 LPS 처리 시 각각 $38.32 \pm 10.38\%$, $49.96 \pm 7.43\%$ 로 비장세포의 증식을 유발하였다. OVA/Alum 군에서는 OVA 처리 시 $15.95 \pm 4.85\%$, LPS 처리 시 $50.58 \pm 4.98\%$

($p < .01$), Con A 처리 시 $53.61 \pm 2.00\%$ ($p < .01$)로 세포 증식이 유발되었다. 양격산화탕은 각각 $23.95 \pm 8.62\%$, $134.08 \pm 11.95\%$ ($p < .001$), $193.70 \pm 11.52\%$ ($p < .001$)로 비장세포의 증식을 유발하였다 (Figure.4).

이상의 결과를 종합하면 OVA/Alum 군에서 OVA에 대한 비장세포 증식이 약 16% 증가되었고 양격산화탕 투여 시 24% 증가되었으나 통계적인 의미는 없는 것으로 나타났다. 반면 OVA/Alum군과 비교하여 양격산화탕 투여군에서 LPS와 Con A에 대해서 mitogen effect를 증가시키는 것으로 나타났다 (각 $p < .001$).

4. 양격산화탕이 생체내에서 항체생성능에 미치는 영향

혈장에서 OVA-specific IgG, IgG1을 정량한 결과 OVA/Alum 군에서 각각 $5.53 \pm 1.30 \mu\text{g/mL}$, $48.33 \pm 11.64 \mu\text{g/mL}$ 로 OVA에 감작되었음을 나타냈다. OVA/Alum 감작 생쥐에 처방을 투여한 결과 양격산화탕은 각각 $18.71 \pm 2.13 \mu\text{g/mL}$ ($p < .001$), $141.79 \pm 5.92 \mu\text{g/mL}$ ($p < .001$)으로 OVA/Alum군과 비교해서 각각 3.4배 및 2.9배 증가되었다 (Figure.5-A).

초기 면역반응에서 증가하는 혈중 total IgM을 정량한 결과 대조군과 OVA/Alum군에서 각각 $231.80 \pm 9.63 \mu\text{g/mL}$ 와 $333.79 \pm 29.35 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군과 비교하여

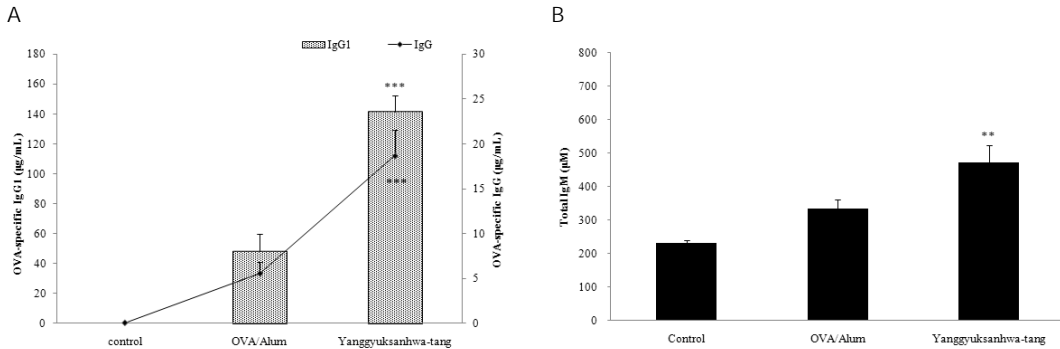


Figure 5. The plasma levels of OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1, (A) and total IgM (B) on OVA/Alum-immunized mice. Data represent the means±SEM (n=5~6) **p<.01 and ***p<.001 compared with OVA/Alum

OVA 감작 시 1.4배 증가된 것으로 나타났으며, 양격산화탕군에서 $473.52 \pm 55.55 \mu\text{g/mL}$ ($p < .005$)으로 OVA/Alum군과 비교하여 1.4배 증가되었다 (Figure. 5-B). 따라서 본 연구에 사용한 양격산화탕은 OVA-specific IgG, IgG1 및 total IgM level을 상승시켜 체액성 면역을 증가시키는 것으로 나타났다.

IV. 考 察

대표적인 少陽人 처방인 涼膈散火湯은 임상적 연구에서 소양인 외전신경마비 사시환자를 胸膈熱證으로 치료하고, 사시의 빠른 회복과 제반증상을 호전시키고⁴, 뇌경색 환자의 치료에 효과적인 것으로 보고되었으며⁵, 급성기 중풍 환자에서 중풍진행을 억제시키고 운동기능을 호전시켰으며⁶, 중풍으로 유발된 배뇨·배변장애를 만족할 만큼 호전시킨다고 보고되었다⁷. 少陽人 上消의 小便頻數, 渴而多飲 등의 증상을 호전시키며, 혈중 glucose, 혈압을 감소시키는 것으로 알려져 있다⁸. 또한 실험적 연구로 Allergy성 접촉피부염에서 일어나는 면역과민반응 억제와 항염증작용을 통해 Allergy성 접촉피부염으로 기인된 피부 손상을 완화시키는 효과를 보였고⁹, 허혈로 유발된 뇌 손상에 방어적인 효과가 있으며¹⁰, 白鼠의 뇌허혈로 인한 뇌혈류량 감소의 회복, 뇌손상 면적과 체적의 축소 및 TNF- α 의 억제에 유효하였으며¹¹, 당뇨 유발 흰쥐의 국소뇌허혈 모델에서 신경세포 유해 스트레스와 자연사를 억제함을 보고하였고¹², 아토피 피부염에

유발 모델에서 각질층 내 지방방어구조의 회복과 그로 인한 급성 염증유발 기전의 조절을 통해 피부 손상을 완화시켰다고 보고된 바 있다¹³. 또한 간 glucokinase 활성도를 증가시켜 혈당을 조절하며¹⁴, 공간 기억능력 및 불안반응 억제에 모두 유의한 효과가 있음을 확인하여 스트레스로 인한 증상 완화 및 항우울 효과가 있다고 보고되었다¹⁵. 본 연구에서는 涼膈散火湯에 대해 인체 방어에 가장 기본적인 면역 활성을 검색하기 위하여 대식세포 및 비장세포의 활성화 효과, 면역 글로불린의 생성량 변화 등을 확인하였다.

대식세포는 면역 초기단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 활성화된 면역반응 산물이 T cell을 활성화하여 세포성 면역반응이 유도되므로 면역활성 검색에 주로 이용된다¹⁶. 대식세포 활성화 지표 중의 하나인 NO는 cytokine이나 미생물의 영향을 받아 대식세포에서 생성되는 반응질소중간체 (Reactive nitrogen intermediates, RNI)로서 nitric oxide synthase (NOS)와 산소와 결합하여 L-알지닌을 산화시켜 NO가 생성된다. 생성된 NO는 체내에서 면역기능 조절물질로서 작용한다고 보고되고 있다^{17, 18, 19}. 양격산화탕의 NO 생성능을 검색한 결과 NO 생성능이 나타나지 않아 대식세포의 활성화로 인한 효과는 아니며 다른 기전의 면역세포를 활성화 하는 것으로 사료된다.

비장은 생체내 면역방어기능을 담당하고 있는 2차 면역기관으로 외부로부터 유입된 항원에 대한 초기면역반응을 담당하고 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 관여하는 주요기관이다²⁰. 또한 T 세포,

B 세포, 대식세포 등의 여러 가지 림프구가 밀집되어 있는 비장의 크기 및 세포의 수는 면역반응에 밀접한 관련이 있으므로^{21, 22} 면역증진능을 관찰하기 위한 지표로 비장세포 증식능을 평가한다. 이에 양격산화탕에 대한 비장세포 증식효과를 검색한 결과 의미있는 비장 세포 증식효과를 나타내었다.

생체 내에서 면역반응에 미치는 영향을 확인하고자 OVA/Alum를 외부 항원으로 사용하여 감작시킨 생쥐에 양격산화탕을 투여한 후 비장세포의 mitogen effect를 검색하였다. 감작 항원으로 사용한 OVA, 각각 T 세포와 B 세포의 mitogen인 Con A와 LPS에 대한 mitogen effect를 상승시키는 것으로 나타나 비장내 T 세포와 B 세포를 매개로 하는 면역반응, 즉 세포성 면역과 체액성 면역을 증가시키는 것으로 판단된다.

생체 내에서 체액성 면역을 조절 효과를 검색하고자 혈장내 항체 생성능을 검색한 결과, 양격산화탕은 일차적인 항체 반응에 관련된 IgM level을 상승시켰고, 그 후 항원에 대한 2차 항체 반응에서 중요한 부분을 차지하는 OVA-specific IgG 및 OVA-specific IgG1 level 또한 증가시키는 것으로 나타나 양격산화탕은 항원 특이적 면역 반응을 활성화 시키는 것으로 판단된다. 이외에 Th1 또는 Th2 type의 분화차이를 측정하고자 혈중 IL-2 및 IL-4 level을 측정하였으나 검출되지 않아 (data not shown) 각 처방의 자세한 작용 경로는 언급할 수 없었다.

양격산화탕은 대식세포의 NO 생성에 대해 활성화 효과를 나타내지 않았고 비장 세포 증식능은 상승시켰다. OVA/Alum로 감작된 생쥐에 투여 시 비장 세포에서 Con A 및 LPS에 대해 mitogen effect를 나타냈으며, 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 모두 증가시켰으므로 면역반응의 1차단계인 항원 비특이적 면역반응보다는 항원특이적 면역 반응을 활성화시키는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에 대한 결과로 소양인 대표처방인 양격산화탕은 면역 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 판단되며 면역 저하로 인해 발생할 수 있는 질환들에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 結 論

소양인 양격산화탕의 면역반응 조절 효과를 연구한 결과 대식세포를 활성화 시키지 않으나 OVA/Alum 감작된 생쥐에 투여시 B cell의 mitogen인 LPS와 T cell의 mitogen인 Con A에 대해 비장세포증식효과를 상승시켰으며 혈중 OVA-specific IgG, OVA-specific IgG1 및 total IgM level을 증가시키는 것으로 나타나 양격산화탕은 면역반응의 1차단계인 항원 비특이적 면역반응보다는 항원특이적 면역반응을 활성화시키는 것으로 판단된다.

VI. 感謝의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 ‘표준한방처방 EBM 구축사업 (K10030)’에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

VII. 參考文獻

1. Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul:Yeogang Publishing Co. 1992:243-271.(Korean)
2. Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul:Shinil Publishing Co. 1964:70.(Korean)
3. Kim KY. The approach of Sasang constitutional medicine in incurable disease and immunity. J Sasang Constitut Med. 1995;7(2):113-128.(Korean)
4. Choi AY, Ha JH, Lee JH, Jang WS, Goo DM. A clinical study on strabismus patient of abducence nerve paralysis in Soyangin improved with Yangkyuksanhwa-tang. J Sasang Constitut Med. 2008;20 (3):176-183.(Korean)
5. Lo HS, Lee SM, Bae YC, Park HS, Lee JS, Song SG, et al. The Effect of Yangkyuksanhwa-tang on cytokine production in the patients with cerebral infarction J Sasang Constitut Med. 2004;16(1):120-129. (Korean)
6. Choi DJ, Ryu SH, Jung WS, Moon SK, Cho KH, Kim YS. The clinical efficacy of Yangkyuksanwha-tang on acute stroke. J Korean Oriental Med. 2004;25(1):111-116.(Korean)
7. Kim SJ, Kim MS, Seo BI, Gu DM, Seo HY, An HD.

- One case report of urinary and bowel dysfunction treated with Yangkyuksanwha-tang in cerebrovascular accident patient. *Kor J Herbology*. 2003;18(3):1-8.(Korean)
8. Jung SI, Kim JW. Clinical study about the diabetes mellitus patients administration of Yangkyuksanwha-tang. *Korea J Oriental Physiology & Pathology*. 2002; 16(6):1308-1313. (Korean)
 9. Cho SW. Effects of Yangkyuksanhawtang on the allergic contact dermatitis. *Korean Journal of Korean Medical Institute of Dermatology & Aesthetics*. 2005;1(1):16-40. (Korean)
 10. Soh YJ. Protective effect of Yangguksanwha-tang metabolized by liver homogenate on hypoxia-reperfusion induced PC12 cell damage. *Yakhak Hoeji*. 2005;49(1): 97-102. (Korean)
 11. Son SK, Shin MG, Song IB. Effects of Yanggyuksanhwa-tang on cerebral blood flow and Ischemic brain damage in rats. *J Sasang Constitut Med*. 2001;13(2):165-176. (Korean)
 12. Boo IG, Kim YS. Immunohistochemical study of Yanggyuksanhwa-tang on focal cerebral ischemia of diabetic rats. *Korea J Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(3):741-747.(Korean),
 13. Yun BH, Park SS. Yangkyuksanhwa-tang effected to atopic dermatitis. *J Sasang Constitut Med*. 2004;16(2): 84-98.(Korean)
 14. Kim EJ, Kim YS. Effects of Yanggyuksanhwa-tang on global cerebral ischemia of diabetic rats induced by streptozotocin. *Korea J Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(2):474-478.(Korean)
 15. Lee SY, Choi AY, Ha JH, Lee JH, Kim PJ, Goo DM. An experimental study on the anti-stress effect by Soyangin Hyeongbangdojeok-san and Yanggyeoksanhwa-tang. *J Sasang Constitut Med*. 2008;20(3): 151-163.(Korean)
 16. Liew FY, Lia Y, Millot S. Tumor necrosis factor synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol*. 1990;145:4306-4310.
 17. Thornberry NA, Molineaux SX. Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cystein protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci*. 2005;4:3-12.
 18. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Clin Rheumatol*. 2006;20(5):879-896.
 19. Sung CS, Wong CS. Cellular mechanisms of neuro-inflammatory pain: the role of interleukin-1beta. *Act Anaesthesiol Taiwan*. 2007;45(2):103-109.
 20. Weiss L. *Cell and tissue biology* 6th ed. Urban & Schwarzenbeg. Baltimore. 1988;481-538.
 21. Zalus R, Zagon IS, Bonneau RH, Lang CM, McLaughlin PJ. In vivo effect of chronic treatment with (MET5)-enkephalin on hematological values and natural killer cell activity in athymic mice. *Life Sci*. 2000;66:829-834.
 22. James GL. *Methods in Immunotoxicology*. John Wiley-Liss, Inc, San Diego. 1995;2-15.