

# 補中益氣湯이 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향

은재순\* · 최 훈 · 송정모<sup>1</sup>

우석대학교 약학대학, 1:한의과대학

## Effect of BojungIkgi-tang on the Specific Immune Response in BALB/c Mice

Jae Soon Eun\*, Hoon Choi, Jung Mo Song<sup>1</sup>

*Department of Pharmacy, 1: College of Oriental Medicine, Woosuk University*

The purpose of this research was to investigate the effects of BojungIkgi-tang water extract (BE) on the specific immune response in BALB/c mice. When BE (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days to BALB/c mice, the cell viability of splenocytes was increased and DNA fragmentation of splenocytes was decreased. But, BE did not affect the cell viability and DNA fragmentation of thymocytes. Also, BE increased the population of Thy1<sup>+</sup> cells and TH cells in splenocytes. In addition, BE increased the production of  $\gamma$ -interferon from splenocytes. These results suggest that BE enhances the specific immune response via activation of TH1 cells in splenocytes.

**Key words :** BojungIkgi-tang(補中益氣湯), thymocyte, splenocyte, subpopulation, cytokine

### 서 론

補中益氣湯은 脾胃의 氣가 虛하고 中氣가 下陷되어 나타나는 諸證을 치료하는 방제로써, 脾胃의 氣虛로 인한 身熱有汗, 頭痛惡寒, 惕喜溫飲, 少氣瀨言, 體倦肢軟, 顏色蒼白, 大便稀泄하며, 脈象이 洪而虛하고, 舌質은 淡, 舌苔는 薄白한 증상을 치료하는데 사용되고 있다<sup>1-3)</sup>. 보증익기탕은 황기, 인삼, 배출, 감초, 당귀, 진피, 승마, 시호 등 8종의 약물로 구성되어 있는데, 실험적 연구는 주로 중추신경에 대한 영향<sup>4,5)</sup>, 운동부하 후 피로회복에 대한 영향<sup>6,7)</sup> 및 면역에 대한 영향<sup>8-10)</sup> 등이 많이 연구되었으나, 아직까지 면역반응에 정확한 작용기전은 규명되지 않았다. 한의학에서 면역에 대한 개념은 正氣 학설과 관련하여 肺, 脾, 腎 三臟에서 찾을 수 있는데, 肺는 신체의 표면에서 痘邪에 대한 방어작용을 담당하고, 腎은 先天之本으로 正氣와 衛氣의 생성에 관여하며, 脾는 後天之本으로 정기와 위기의 물질적 기반이 된다. 또한 脾胃의 손상은 元氣의 부족을 초래하므로 모든 병의 발생 원인이 될 수 있다는 점에서 脾胃의 氣는 인체의 방어기능에서 중요한 역할을 수행한다고 볼 수 있다<sup>11-13)</sup>. 면역반응은 T 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역(specific immunity)과 macrophage

가 관련된 비특이적면역 (non-specific immunity)으로 분류한다. 본 연구에서는 補脾益氣의 효능을 가진 보증익기탕의 면역작용에 미치는 영향을 관찰하고자, 특이적 면역반응을 주도하는 thymocyte 및 splenocyte의 proliferation, subpopulation 및 cytokine 분비에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷 6주령을 대실험동물에서 구입하여, 온도  $20\pm3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm5\%$ , dark/light 12시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 고형사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였다.

#### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, 055:B5), MTT,  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN, Hu  $\gamma$ -IFN), propidium iodide은 Sigma Co., mouse  $\gamma$ -IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co.,

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한의과대학  
E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr, Tel : 063-290-1569

· 접수: 2002/07/20 · 수정: 2002/08/28 · 채택: 2002/09/24

RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 보증익기탕의 처방은 方藥合編<sup>14)</sup>에 준하였으며, 약재는 우석대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 보증익기탕 3첩을 증류수 1,000 ml로 3 시간 동안 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 13.5 g을 얻어(이하 BE라 칭함), 동물 실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

Table 1. Prescription of Bojunglkgi-tang

韓藥名	生 藥 名	重量 (g)
黃 茂	Astragalus Radix	6
人 莓	Ginseng Radix Alba	4
白 尤	Atractylodis Rhizoma Alba	4
甘 草	Glycyrrhizae Radix	4
當 彌(身)	Angelicae gigantis Radix	2
陳 皮	Aurantii nobilis Pericarpium	2
升 麻	Cimicifugae Rhizoma	1
柴 胡	Bupleuri Radix	1
Total		24

### 4. Thymocytes 및 splenocytes의 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki<sup>15)</sup> 및 Mizel<sup>16)</sup> 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 BE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다. 생쥐 thymocytes 및 splenocytes는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### 5. 증식능 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 BE의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann<sup>17)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>18)</sup>이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes는 concanavalin A (Con

A) 5 μg/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide (LPS) 10 μg/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

### 6. DNA Fragmentation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes에 PI buffer (0.1% Na-citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide (10 μg/ml) 20 μl를 넣어 냉장화에서 30 분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 측정하였다<sup>19)</sup>.

### 7. Subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>20)</sup>.

### 8. Cytokines 측정

동일한 방법으로 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml로 조제하여 96 well plate에 200 μl 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500rpm, 2분, 4°C) 한 다음, 상등액 50 μl를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 즉 sample 50 μl에 assay diluent 50 μl를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 μl를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μl를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μl를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

### 9. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험성적

### 1. Thymocyte 및 splenocyte의 증식에 미치는 효과

대조군의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A

를 처리하였을 때 세포생존율은  $135.4 \pm 2.1\%$ 로 증가하였으며, BE를 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은  $103.5 \pm 1.7\%$ 로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은  $139.7 \pm 2.5\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다. 대조군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은  $142.4 \pm 2.1\%$ 로 증가하였으며, BE를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은  $111.2 \pm 1.8\%$ 로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은  $155.8 \pm 2.3\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of the administration of Bojungkgi-tang water extract (BE) on the cell viability of thymocytes and splenocytes in BALB/c mice

Samples	Cell Viability (%)			
	Thymocytes (%)		Splenocytes (%)	
	Con A (-)	Con A (+)	LPS (-)	LPS (+)
Control	$100.0 \pm 1.5$	$135.4 \pm 2.1$	$100.0 \pm 1.3$	$142.4 \pm 2.1$
BE	$103.5 \pm 1.7$	$139.7 \pm 2.5$	$111.2 \pm 1.8^*$	$155.8 \pm 2.3^*$

BE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes or splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with concanavalin A (in thymocytes) or lipopolysaccharide (in splenocytes), an activating mitogen. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p<0.001$ ). Con A (-): Concanavalin A non-treated group, Con A (+): Concanavalin A treated group, LPS (-): Lipopolysaccharide non-treated group, LPS (+): Lipopolysaccharide treated group

## 2. Thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 DNA fragmentation은  $16.5 \pm 1.7\%$  이었으며, BE를 투여하고 분리한 thymocytes 중 DNA fragmentation은  $14.3 \pm 1.5\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다. 대조군의 splenocytes 중 DNA fragmentation은  $20.8 \pm 2.1\%$  이었으며, BE를 투여하고 분리한 splenocytes 중 DNA fragmentation은  $13.4 \pm 1.8\%$ 로 대조군에 비해 감소하였다 (Table 3).

Table 3. Effect of the administration of BE on DNA fragmentation of murine thymocytes and splenocytes

Samples	DNA fragmentation (%)	
	Thymocytes	
	Splenocytes	
Control	$16.5 \pm 1.7$	$20.8 \pm 2.1$
BE	$14.3 \pm 1.5$	$13.4 \pm 1.8^*$

BE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes or splenocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

## 3. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4<sup>+</sup>) 세포는  $11.8 \pm 0.6\%$  이었으며, CD8 single positive (CD8<sup>+</sup>) 세포는  $3.1 \pm 0.3\%$ 이었다. BE를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 세포는  $12.3 \pm 0.5\%$ 로, CD8<sup>+</sup> 세포는  $3.1 \pm 0.2\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 4).

Table 4. Effect of the administration of BE on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Thymocytes Subpopulation (%)	
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> cell	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cell
Control	$11.8 \pm 0.6$	$3.1 \pm 0.3$
BE	$12.3 \pm 0.5$	$3.1 \pm 0.2$

BE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice.

## 4. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220 positive 세포 (B220<sup>+</sup>)는  $28.7 \pm 2.5\%$  이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1<sup>+</sup>) 세포는  $18.4 \pm 2.1\%$  이었다. BE를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는  $29.3 \pm 2.7\%$ 로 Thy1<sup>+</sup> 세포는  $24.7 \pm 1.5\%$ 로 대조군에 비해 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4<sup>+</sup> 세포는  $13.4 \pm 1.5\%$ , CD8<sup>+</sup> 세포는  $4.7 \pm 0.5\%$  이었으나, BE를 투여하고 분리한 생쥐 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는  $18.3 \pm 1.8\%$ 로, CD8<sup>+</sup> 세포는  $4.4 \pm 0.3\%$ 로 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 대조군에 비해 증가되었다 (Table 5).

Table 5. Effect of the administration of BE on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Splenocytes Subpopulation (%)				
	B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
	Control	$28.7 \pm 2.5$	$18.4 \pm 2.1$	$13.4 \pm 1.5$	$4.7 \pm 0.5$
BE	$29.3 \pm 2.7$	$24.7 \pm 1.5^*$	$18.3 \pm 1.8^*$	$4.4 \pm 0.3$	

BE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

## 5. Splenocytes의 Cytokines 분비에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중  $\gamma$ -interferon의 양은  $352.7 \pm 11.2$  pg/ml 이었으며 BE를 투여한 군은  $434.5 \pm 12.8$  pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-2의 양은 대조군에서  $435.8 \pm 12.3$  pg/ml 이었으나, BE를 투여한 군은  $462.8 \pm 16.5$  pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. Interleukin-4의 양은 대조군에서  $169.7 \pm 10.9$  pg/ml 이었으며 BE를 투여한 군은  $148.3 \pm 9.7$  pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 6).

Table 6. Effect of the administration of BE on the production of cytokines from murine splenocytes

Samples	Cytokines (pg/ml)			
	$\gamma$ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4	
	Control	$352.7 \pm 11.2$	$435.8 \pm 12.3$	$169.7 \pm 10.9$
BE	$434.5 \pm 12.8^*$	$462.8 \pm 16.5$	$148.3 \pm 9.7$	

BE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 72 hours in CO<sub>2</sub>-incubator. The production of cytokines was determined with ELISA kit. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

## 고 칠

보증익기탕은 李<sup>21</sup>의 「肺胃論」에 최초로 수록된 처방으로 肺胃氣虛로 인한 食少, 身疲, 身熱有汗, 四肢無力, 中氣下陷, 內臟

下垂 및 不能攝血 등의 증상에 광범위하게 활용되어 온 처방이다<sup>3,22)</sup>. 보중의기탕의 구성 약재 중 인삼, 감초는 补脾益氣 和中瀉火하고, 황기는 补肺固表, 백출은 燥濕健脾, 당귀는 和血養陰, 진피는 理氣和中하며, 승마는 陽明清氣를 升하고 시호는 少陽淸氣를 升하는 작용을 가지고 있다<sup>23)</sup>. 또한, 황기는 면역증강작용, 항균작용 등이, 인삼은 항피로작용, 혈압조절작용, 혈당강하작용 등이, 백출은 강장, 이뇨, 항종양 작용등이 있으며, 당귀는 자궁기능 조절작용, 혈관수축작용, 진정진통작용 등이, 진피는 祛痰平喘, 항과민작용, 위궤양억제작용 등이, 승마와 시호는 해열작용과 항염, 진통진경작용등이, 감초는 해독, 진경진통작용, 항과민작용 등이 있음이 알려져 있다<sup>24,25)</sup>. 보중의기탕의 면역에 관한 연구로는, 자외선 조사로 억제된 NK 세포의 활성을 회복시키고, sarcoma 180 복수암세포를 이식한 생쥐에 생명 연장효과가 있었으며, 항사육군자탕과의 병용투여로 sarcoma 180 세포가 접종된 생쥐의 비장에서 세포성 면역을 활성화하여 T 림프구와 NK 세포의 수를 증가시키는 효과가 있음이 보고된 바 있다<sup>26,27)</sup>.

본 실험에서는 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 보중의기탕 물 추출물 (BE)의 영향을 관찰하기 위해, 생쥐에 BE를 경구로 투여하고 thymocyte 및 splenocyte의 면역반응에 대한 변화를 관찰하였다. BE를 투여하고 분리한 thymocytes의 생존율은 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, splenocytes의 세포생존율은 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 증가되었다. 이는 BE가 생체에 투여되었을 때 splenocytes의 세포생존율을 증가시킴으로써, 생체의 면역능을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 일반적으로 생체 내 세포 사는 necrosis로 일어나는 것은 극히 일부분이고, 대부분의 세포는 apoptosis에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>28,29)</sup>. BE를 투여하고 분리한 thymocyte 및 splenocyte의 DNA fragmentation을 측정한 결과, BE는 thymocyte의 DNA fragmentation에는 영향을 주지 않았으나, splenocyte의 DNA fragmentation은 대조군에 비해 감소되었다. 이는 BE가 splenocytes의 apoptosis를 억제하고 있음을 의미하는 것이며, BE 투여에 의해 splenocyte의 세포생존율이 증가된 현상이 BE에 의해 splenocyte의 apoptosis가 억제되어 나타난 결과라고 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 과제이다. Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 종식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, 분화된 Th1 cell은  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 분비하여 다른 T 세포, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>. 대조군의 thymocytes 중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 11.8%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 3.1%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells은 약 12%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며<sup>31)</sup>, BE 투여시 12.3% 및 3.1%로 대조군과 별 차이가 없었

다. 대조군의 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는 28.7%, Thy1<sup>+</sup> 세포는 18.4% 이었으나, BE를 투여하였을 때는 B220<sup>+</sup> 세포는 29.3%, Thy1<sup>+</sup> 세포는 24.7%로 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population이 대조군에 비해 증가되었다. 대조군의 splenic T-lymphocytes 중 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포는 13.4%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포는 4.7% 이었으나, BE를 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포는 18.3%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포는 4.4%로 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포의 population이 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 BE가 thymocytes의 subpopulation에는 영향을 주지 않으나, splenocytes의 subpopulation에는 영향을 주고 있음을 시사하는 것이다. 또한, BE 투여에 의해 splenocytes 중 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다는 것은 splenocyte의 T 세포의 population이 증가되었음을 의미하는 것이고, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 세포의 population이 증가되었다는 것은, T 세포 중 주로 Th 세포의 population이 증가되었음을 의미하는 것이다. Th 세포는 Th1 및 Th2 세포로 분화되어 다양한 cytokine들을 분비하기 때문에 BE가 Th 세포 중 어느 쪽을 활성화하는지를 관찰하기 위해, Th1 세포에서 분비되는  $\gamma$ -IFN과 IL-2, Th2 세포에서 분비되는 IL-4의 양을 측정하였다. BE 투여시  $\gamma$ -IFN의 양은 대조군에 비해 증가하였으나, IL-2 및 IL-4의 양은 대조군과 별 차이가 없었다. 이는 BE가 splenocytes의 helper T 세포 중 Th1 세포를 활성화하고 있음을 시사하는 것이다.

## 결 론

보중의기탕 (BE)은 생쥐에 경구로 투여되었을 때, splenocytes의 apoptosis를 억제하여 세포생존율을 증가시키고, splenocytes의 Thy1<sup>+</sup> 세포 중 TH1 세포를 활성화하여 특이적 면역반응을 증가시킬 수 있는 탕제라 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

1. 金相贊 外: 方劑學, 永林社, 韓國, p.279-280, 1999.
2. 汪認庵: 醫方集解, 성보사, 서울, p.129, 1983.
3. 宋炳基: 方證新編, 동원출판사, 서울, p.272, 1985.
4. Ryu, J. H., Kim, M. S., Hwang, Y. S. and Yook, C. S.: Anxiolytic effects of the three kinds of traditional chinese medicine, Shin-Ki-Hwan, Bo-Jung-Ik-Ki-Tang and Sa-Mul-Tang, using the elevated plus-maze test. J. Appl. Pharm., 9(2), 125-130, 2001.
5. Hong, N. D., Chang, I. K., Lee, S. I. and Kim, N. J.: Studies of the efficacy of combined [reparation of crude drugs (XVI). Effects of Bojungikki-Tang on the central nervous system. Kor. J. Pharmacog., 15(3) 115-120, 1984.

6. 宋順基: 補中益氣湯 투여가 장거리 달리기 선수의 에너지 및 전해질 대사에 미치는 영향. 東國大學校 大學院 碩士學位論文, 1998.
7. 韓大熙: 雙和湯, 八物湯, 六味地黃湯 및 補中益氣湯 전탕액의 운동부하조건에 따른 근육피로회복. 大田大學校 大學院 碩士學位論文, 1991.
8. 韓晟奎: 補中益氣湯, 수점산 및 補中益氣湯 합수점산의 항암과 면역조절작용에 관한 실험적 연구. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1995.
9. 김정현: 補中益氣湯, 人蔘 및 黃芪약침이 면역기능저하에 미치는 영향. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1999.
10. 張賢鎮: 少陽人 형방지황탕, 십이미지황탕과 소음인 보증의 기탕, 십전대보탕의 면역반응에 관한 실험적 연구. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1994.
11. 심승항: 中醫與免疫, 浙江中醫學院學報, 14, 6-7, 1990.
12. 서증명: 脾與免疫系統關係研究近況, 四川中醫, 1, 16-18, 1993.
13. 박재현: 보증의기탕이 Cyclosporin A를 투여한 흰쥐의 간 및 신손상에 미치는 영향, 대한한의학회지, 15, 451-456, 1994.
14. 申載鏞: 方藥合編解說, 成輔社, 서울, p.33, 1988.
15. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844-2848, 1978.
16. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosenstreich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol., 120, 1497-1503, 1979.
17. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65, 55-63, 1983.
18. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods, 129, 23-30, 1990.
19. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, 139, 1497-1503, 1991.
20. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994.
21. 李東垣: 脾胃論, 東垣十種醫書, 대성문화사, 서울, p.86-87, 1983.
22. 汪認庵: 醫方集解, 성보사, 서울, p.129, 1983.
23. 안덕균, 이상인, 신민교: 漢藥臨床應用, 성보사, 서울, p.358-359, 1982.
24. 李尚仁: 本草學, 수서원, 서울 p.51-60, p.101-102, p.194-196, 1981.
25. 范崔生: 中藥的應用, 人民衛生出版社, 北京, p.51, p.75-79, p.194-195, p.396-398, 1989.
26. 김수진, 임락철, 김성훈: 보증의기탕 및 소음인 보증의기탕이 S-180에 대한 항종양효과와 Cyclophosphamide에 의한 부작용에 미치는 영향, 동의병리학회지, 8, 119-136, 1993.
27. 김호현, 김동환: 보증의기탕 합 향사육군자탕이 복수암 유발 생쥐 비장의 세포성 면역 활성에 미치는 영향에 관한 면역조직화학적 연구, 세명대학교 한의학연구소논문집, 3:17-32, 2001.
28. Alles, A.K.: Apoptosis. A general comment. FASEB J., 5, 2127-2128, 1991.
29. Willie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R.: Cell death: The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 68, 251-306, 1980.
30. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology, 53, 59, 1993.
31. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.