

# 小建中湯 추출액과 露劑의 세포증식 및 면역활성도 비교연구

김광중\* · 배만종<sup>1</sup> · 서 영

대구한의대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 한방바이오식품학과

## Comparison Study on Activated Degree of Immunity and Anti-Cancer Effect in Extracted Liquid of *Shogunjung-tang* and It's Distilled Liquid

Kwang Joong Kim\*, Man Jong Bae<sup>1</sup>, Young Suh

Department of Physiology, College of Oriental Medicine,

1: Department of Oriental Medicine Biofood Science, Daegu haany University

In order to search for the ways of use in distilled liquid of *Shogunjung-tang*, an oriental medical prescription, the study examined the differences in the activated degree of cells and immunological effects, which are supplied by restoratives such as the existing extracted liquid and distilled liquid of *Shogunjung-tang*. As seen from the above results, both the extracted liquid of *Shogunjung-tang* and distilled liquid have remarkable efficiency in the increase of cells, the efficient condition of immunity activation degree possibly formed by these two and activation of cells and organism, in which distilled liquid in the beginning and the extracted liquid later tend to show its efficiency.

Key words : *Shogunjung-tang*(小建中湯), distilled liquid, immunological effect

### 서 론

小建中湯은 상한론 辨太陽病脈證并治 中에 기재된 것으로 芍藥酒炒18g 桂枝去皮9g 炙甘草6g 生薑10g 大棗4枚 飴糖30g로 桂枝湯에 芍藥을 培로 加하고 다시 飴糖을 重加하여 구성되었으며, 溫中補虛 和利緩急하는 방제로서 虛勞, 裏急, 腹痛, 夢遺, 咽乾 등의 증상에 사용될 수 있는 데 임상에서 中氣虛寒하고 陰陽氣血이 失調하여 발생하는 질환의 치료에 널리 활용되고 있는 처방이다.<sup>1)</sup> 결국 小建中湯은 모든 병의 중점이 後天之本으로 陰陽의 氣機이며 營衛 氣血 生化의 원천이 되는 脾胃의 기운인 中氣를 다스려 陰陽을 和하고 營衛를 調하며 氣血을 充足하게 하기 때문에 사회 일반에서 대표적인 건강관리의 보약적 의미를 가진 湯劑로 사용하고 있다.<sup>2)</sup> 그러나 요즘들어서는 이와 같은 湯劑 사용방법 외에도 전통 한방제형의 하나인 露劑에 해당되는 증류한약이 특히 소아 전문 한의원을 중심으로 만들어 사용하고 있다. 이 증류한약은 남다른 특성을 지녀 모든 질환에 사용하기 보다는 감기와 허약체질 개선에 주로 이용되고 있으며 최근 이것

을 활용하는 바가 많아짐에 따라 증류약탕기도 만들어 판매하고 있다. 그러나 현재 학계에서는 이러한 露劑에 대한 평가나 사용 지표가 없는 실정이다.

한의학에 있어서의 주된 건강관리방향은 주로 病을 유발시키는 여러 인자인 邪氣와 건강을 유지하고자 하는 正氣와의 관계에서 邪氣를 없애주고 正氣를 복돋아 주는 데 역점을 둔다고 요약할 수 있다.<sup>3,5)</sup> 正氣란 抗病능력을 총칭하는 것으로 인체 각 장부조직기관의 기능, 외계환경에 대한 적응력, 發病要素에 대한 저항력 등이라 볼 수 있는 데 이는 현대적인 의미로 파악해 볼 때 自己와 非自己의 관계에서 균형을 찾아보려는 면역이론<sup>6,7)</sup>과 매우 밀접한 관계가 있다 생각하여 한의학과 서양이론과의 연계성에 많이 거론되고 있다. 이러한 사고를 바탕으로 여러 학자들이 正氣를 補해 주는 여러 약재 즉 補養藥에 속하는 여러 약물에서 면역기능 증강효과를 실험적으로 검토하여 유의한 결과가 있음을 보고<sup>8-14)</sup>한 바가 있다.

한약은 제형마다 각기 특성상 장단점이 있으며 의사는 病情의 수요에 따라 서로 다른 제형을 적절하게 채용해야 한다. 이에 저자는 기존의 小建中湯 추출액(湯劑)과 露劑를 대상으로 補養藥이 가지는 면역학적인 효능상태의 차이를 검토함으로써 小建中湯을 비롯한 한방처방의 제형변화에 따른 효율적인 처방사용의 지표를 얻고자 한다.

\* 교신저자 : 김광중, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : kwangj@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2238

· 접수 : 2003/11/18 · 수정 : 2003/12/22 · 채택 : 2004/01/15

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 특정병원체부재(specific pathogen free) Balb/c생쥐와, 국립보건원에서 분양받은 8-10주령의 ICR계 생쥐를 실험동물 사육장에서 폴리카보네이트 사육상자(18×20cm)당 6개체의 밀도를 유지하며 사용한다. 이들 생쥐는 2주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 8-12주 사이의 생쥐를 실험에 사용한다.

#### 2) 시료

약재는 경산대학교 부속한방병원 약제과에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며, 처방은 傷寒明理論에 기재된 小建中湯의 것으로 처방내용과 1첩 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition of Shogunjung-tang used in this Study

Herbs	生藥名	Amounts(g)
白芍藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	18.75
桂枝	<i>Ramulus Cinnamomi</i>	11.25
炙甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	3.75
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	5.00
大棗	<i>Rhizoma Zizyphi Jujubae</i>	4.00
黑糖	<i>Saccharum Granorum</i>	37.50
Total amount		80.25

#### 3) 시약 및 기구

세포배양에 필요한 RPMI 1640, 항생제(antibiotic-antimycotic), FCS(fetal calf serum)는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, 2-ME (2-mercaptoethanol), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), N-1 naphthyl-ethylen-diamine와 Sulfanilamide는 Sigma(USA) 제품을 사용한다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell titer 96® Aqueous One Solution Cell proliferation Assay)와 세포독성을 측정하는데 사용한 시약(Cyto Tox 96® Non-radioactive Cytotoxicity Assay)은 Promega(USA) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체와 세포표면 단백질 분자를 염색하는 각종 항체는 Pharmingen(USA) 제품을 사용한다.<sup>15)</sup>

### 2. 실험방법

#### 1) 검액의 제조

小建中湯 1첩 분량(약80.25g)에 증류수 1,000ml를 가하여 2시간 가열 추출 여과(3M filter paper)한 후, 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 50ml될 때까지 감압농축한 것을 탕제액(추출액)으로 사용하였다. 露劑는 증류법의 원리를 이용하여 얻었다. 즉, 小建中湯추출액을 환류냉각장치 상에서 끓이면 증류액이 냉각관 장치를 통과 응축시켜 露劑를 얻었다. 이렇게 얻은 露劑는 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 동결시킨 후, freeze dryer로 동결건조하여 실험에 사용하였다. 실험시료로 사용할 때는 小建中湯 추출액에서 얻은 露劑용액을 최종 30ml의 부피가 되도록 조정하였다.

#### 2) 검액의 투여

동물실험은 생쥐 6마리를 1군으로 하여 대조군 (Control, 이하; CON), 小建中湯추출액실험군 (Aqueous Extract of Shogunjung-tang, 이하; AES), 小建中湯露劑실험군(Aqueous Distillation of Shogunjung-tang, 이하; ADS)으로 나누고, 대조군은 1.0ml saline solution/day/mouse를 경구투여하였고, 실험군 AES1은 상기방법으로 제조한 小建中湯추출액 1.0ml/day/mouse, 실험군 AES2는 실험군 AES1의 10배 희석액 1.0ml/day/mouse를 경구투여하였다. 실험군 ADS1은 상기방법으로 제조한 小建中湯露劑 1.0ml/day/mouse, 실험군 ADS2는 실험군 ADS1의 10배 희석액 1.0ml/day/mouse를 경구투여하였다. 세포단위의 실험에서는 상기 각각의 용액을 0.45µm 여과막을 통과시켜 필요량에 따라 첨가하여 활성도 측정에 사용하였다.

#### 3) 비장세포 분리

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 먼저 생쥐의 비장을 적출한 다음, 핀셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 세포수를 조정하여 실험에 사용하였다.

#### 4) 복강내 침출세포(Peritoneal exudative cells, PEC) 조제

Mouse의 복강에 주사기를 이용하여 PBS를 주입하고 맛사지 한 후, 복강세포를 채취한다. 채취한 세포부유액을 원심분리(1500rpm, 10min)하여 상층액을 제거하고 RPMI 1640으로 3회 세척(1500rpm, 10min)하여 세포수를 조정한다.

#### 5) T세포 분리

분리한 생쥐의 비장세포를 10% FCS-RPMI 1640배지 1ml에 희석하여 Nylon wool column에 넣고 37℃, 5%CO<sub>2</sub> incubator에 60분간 배양한 후, Nylon wool column을 37℃로 미리 데워진 배지로 세척하여 비부착성인 T세포만을 순수 분리하여 사용하였다.<sup>17)</sup>

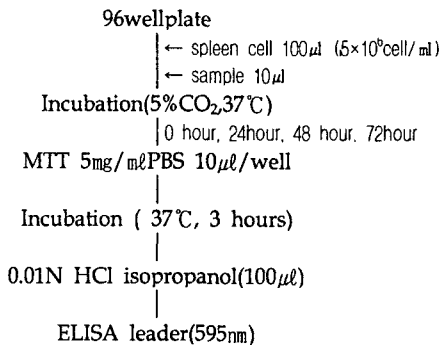
#### 6) B세포 분리

B세포는 비장세포 부유액을 T세포 특이적 항원인 Thy.1에 대한 항체와, 토끼 보체로 처리하여 T세포를 제거하고, Sephadex G-10 column을 이용하여 나머지 부착세포를 제거하여 분리한다.<sup>15)</sup> 분리한 B세포를 실험 재료와 같이 배양한 후, 증식정도는 Cell Titer 96 solution을 이용하여 측정하였다.

#### 7) 세포활성능 측정

##### (1) MTT법에 의한 생세포 증식 측정

MTT법은 담황색의 [bromo 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-terazoliu,; Thiazolyl blue] 시약이 생세포에 의해서 환원되어서 생성된 암흑색의 색소량을 측정하는 것으로써, 약제가 세포증식 촉진을 검정하는 방법으로 10% Fetal Bovine Serum 함유하는 RPMI-1640 배지에 비장세포(5×10<sup>6</sup> cell/ml/ml)을 96 Well Plate에 접종하고 각각의 시료를 10µl씩 첨가해서 배양한다. 각각의 시간대에 세포수를 측정하여 세포의 증식촉진 유무 혹은 정도를 검정했다. 37℃에서 24시간, 48시간, 72시간 배양한 후, PBS(Phosphate buffer solution)로 5mg/ml 되도록 용해한 MTT 시약을 각 well에 10µl을 가한다. ELISA-leader로 595nm의 흡광도를 측정하여 시료에 의한 세포의 증식효과를 검정했다.



Scheme 1. Measurement of MTT activity

(2) 3H-thymidine에 의한 DNA 증식측정

96 well microplate위에 적당한 농도로 희석된 시료를 각 well에 50µl씩 넣는다. 계속, 비장세포 부유액을 50µl씩 가하고 배지, 시료용액을 각각 10µl씩 첨가한 후, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양한다. 배양 마지막 4시간 전에 각각의 well에 3H-thymidine를 0.5µCi씩 가한다. 세포 barvester을 이용하여 세포를 흡입여과 하여, Glass filter paper 위에 세포를 떨어뜨리고, 10분간 건조 후 액체 scintillation counter를 이용하여 방사선 양을 측정한다. 이 cells중에 들어 있는 3H-thymidine의 양으로 부터 세포의 증식정도를 측정한다.

(3) RT-PCR(중합효소 연쇄반응)

HMC-1(human mast cell)을 sample과 함께 4시간 배양한 다음, 세포를 모아 원심분리하여 상층액을 제거하고, RNAzol을 이용하여 RNA를 추출하였다. Total RNA 1µg을 75°C에서 5분간 변성시킨 후, dNTP(1mM), oligo(dT)15(0.5µg), reverse transcriptase(15U), RNase inhibitor(0.5U), RT buffer, MgCl<sub>2</sub>(5mM)와 DEPC로 처리된 증류수로 최종 부피가 20µl가 되도록 하여, 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하여 효소 중합연쇄반응에 사용하였다. 효소중합연쇄반응은 합성된 cDNA 2µl을 주형으로 FcεRIα과 GAPDH의 sense primer와 antisense primer(15pmol/µl), Taq polymerase(0.5U), polymerase buffer를 DEPC로 처리된 증류수로 최종 부피가 20µl되도록 하여 predenaturation; 95°C 5분, denaturation; 95°C 1분, annealing; 55°C 1분, elongation; 72°C 1분을 35cycle한 다음, postelongation을 72°C에서 5분하는 조건으로 수행하였다. 효소중합연쇄반응의 product는 20µl 씩 2% agarose gel에 loading하여 100V에서 40분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV 하에서 관찰하였다. 각 primer의 염기서열은 아래와 같다.

FcεRI: sense CTT AGG ATG TGG GTT CAG AAG T,  
antisense GAC AGT GGA GAA TAC AAA TGT CA  
GAPDH: sense GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG  
antisense GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC

8) 면역기능 활성화

(1) 비장세포의 사이토카인 생성능 측정

비장세포에 시료별 시간대 별로 배양후 배양 상층액을 회수하여 사이토카인의 농도를 측정하였다. 각종 사이토카인 농도 측정은 kit를 이용한 ELISA법을 이용하였다. 즉, flate-bottomed

microwell plate에 goat anti-mouse cytokine 1차 항체를 coating buffer를 이용하여 4°C에서 overnight incubation한 후, 3% BSA 용액으로 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. 실험에서 채취한 배양 상층액을, plate에 각각 넣어서, 37°C에서 2시간 incubation시킨 후, biotinylated anti-cytokine 2차 항체를 첨가하였다. 그리고, avidin-conjugated alkaline phosphate를 적당량 가하고, 37°C에서 2시간 incubation시키고, 기질로 p-nitrophenyl phosphate를 넣은 후 Microplate reader로 410nm와 450nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve를 이용하여 µg/ml 농도로 환산하여 나타내었다.<sup>18)</sup>

(2) 자연살해세포 활성 측정

생쥐의 자연살해세포에 감수성이 예민한 YAC-1 세포를 자연살해세포(Natural Killer cells) 활성 측정에 사용하였다. 실험 재료를 적정량 물에 녹여서 일정한 시간동안 투여한 실험군 생쥐의 복부를 절개하여 비장을 적출하여 세포 부유액을 만들었다. 세포 부유액을 mesh로 거른 다음 Ficoll-paque를 사용하여 400g로 원심 분리시켜서 단핵 세포층을 얻었다. 단핵세포를 PBS로 3회 세척하여 혈구계산판을 사용하여 5×10<sup>5</sup>개 또는 1×10<sup>5</sup>개의 세포로 희석하여 자연살해세포 활성도 측정에 사용하였다. YAC-1 표적(target)세포와, 분리한 단핵세포인 효과(effector)세포의 비율을 5 : 1 또는 10 : 1로 하여 round bottom plate에 final volum이 100µl가 되게 넣고 4°C, 250g에서 5분간 원심침전한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 6시간 배양하였다. 배양시간이 6시간이 되기 45분전에 target maximum과 volum correcting control에는 lysis buffer를 첨가하여 세포의 용해도가 최대가 되도록 하였다. 배양 후에 4°C, 250g에서 5분간 원심 침전시킨 후 상층액 50µl를 떠서 flat bootom 96well plate에 옮기고 여기에 50µl의 substrate mix buffer를 첨가하여 실온에서 알루미늄 호일을 덮어 30분간 반응시키고 stop solution을 50µl넣고 Microplate reader로 490nm에서 O.D.값을 측정하여 상층액 내에 있는 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 측정하여 살세포 활성 정도를 나타내었다. 살세포 활성 정도는 다음의 식을 이용하여 산출하였다.<sup>19)</sup>

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}}{\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$$

(3) Plaque Forming Cell(PFC) 검출

항체 생산 세포의 검사는 Cunningham방법<sup>20)</sup>에 의하며, 약물투여는 10일간 행하고 6일째에 SRBC를 1×10<sup>6</sup>cells/ml이 되도록 조정하여 생쥐의 복강에 0.2ml 주사하였다. 4일 후 비장을 적출하여 세포 부유액으로 만들어 3회 세척 후, 1×10<sup>6</sup>cell/ml이 되도록 조정된 비장세포 200µl와 10% SRBC 36µl, complement 21µl, 그리고 5% FCS-HBSS액 143µl를 혼합하여, 제작한 Cunningham chamber에 넣어 37°C incubator에서 1시간 배양하면 항체생산세포 주위에 적혈구가 용해된 투명한 용혈반(plaque)이 생성된다. 이때의 용혈반수를 세어 항체 생산 세포수를 산정하였다.

(4) Rosette Forming Cell(RFC)의 검출

비장세포의 Rosette형성세포의 검사는 "Method in

immunology<sup>21)</sup>에서 기술한 방법에 따라 행하였다. 즉, 비장세포 부유액( $2 \times 10^7$  cell/ml)  $200 \mu\text{l}$ 와 1% SRBC 부유액  $200 \mu\text{l}$ 를 시험관에 넣고 혼합하여 1,700rpm에서 원심 분리한 후, 이것을 다시 부유시켜 혈구계산관에 주입하여 RFC를 검정 관찰하였다. 현미경 상에서 비장세포에 SRBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 공식에 준하여 계산하였다.

$$\text{RFC/ml in rosette mixture/Viability} \times 10 \\ = \text{RFC}/10^6 \text{ viable nucleated cells}$$

9) 탐식능 측정

탐식능 측정은 小松<sup>22)</sup> 등의 방법에 따라 행한다. Candida Parapsilosis(이하CP)부유액 ( $8 \times 10^3$  cell/ml)  $50 \mu\text{l}$ 와 복강의 식세포 부유액( $8 \times 10^4$  cell/ml)  $50 \mu\text{l}$ , 그리고 5% 동계 mouse 혈청  $100 \mu\text{l}$ 를 V-bottomed microtitre tray에 주입하여 CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 에서 3시간 배양한다. 배양 후 그 중  $50 \mu\text{l}$ 를 취해서 Sabouraud's dextrose agar배지에 옮겨 35°C에서 2일간 배양하여 살아있는 CP colony수를 세어 식세포에 의해 탐식된 CP의 생균수를 표시한다.

성 적

1. 세포증식에 미치는 영향

1) MTT반응에 의한 세포증식결과

비장세포의 증식반응을 알아보기 위하여, 분리한 비장세포를 well 당  $5 \times 10^6$  개씩 넣고 실험재료를 첨가하여 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 증식정도를 비교하였다. 그 결과는 Table 1과 같다. 小建中湯추출액은 48시간대에서 가장 높은 활성을 나타내었으나, 露劑는 24시간대에 가장 높은 활성을 보인 후 시간이 경과함에 따라 활성도가 떨어졌다. 小建中湯추출액 원액이 10배 희석한 용액에 비해 높은 활성을 나타냈고, 露劑에 있어서도 露劑원액이 10배 희석한 액에 비해서 대체로 높게 나타났다.

Table 1. Proliferation of BALB/c spleen cells by Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang.

Group	Proliferation of BALB/c spleen cells(505nm)			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	0.18±0.06	0.18±0.06	0.18±0.06	0.18±0.06
AES1	0.18±0.06	0.60±0.07	0.80±0.09	0.80±0.09
AES2	0.18±0.06	0.30±0.06	0.50±0.06	0.40±0.07
ADS1	0.18±0.06	0.30±0.03	0.50±0.07	0.40±0.06
ADS2	0.18±0.06	0.20±0.06	0.20±0.06	0.20±0.06

Spleen cells were cultured with Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hour, 48hour, 72hour in 96 mice culture plate. Proliferation was determined by MTT assay. Resulted is respresented as OD 505nm.

2) DNA합성에 미치는 영향

Mitogen활성은 비장세포 배양을 통해서 DNA합성으로 0.5 μl:트리튬티미딘(3H-TdR)의 증식세포 측정으로 수행되었다. 배양 0hour, 24hour, 48hour, 72hour에 걸쳐서 측정한 결과는 Table 2와 같다. 小建中湯의 추출액은 72시간까지 지속적으로 DNA의 합성을 촉진하여 세포의 증식이 계속되고 있음을 확인할 수가 있었다. 그러나 露劑는 24시간대에 최대의 합성속도를 보인 후 시간이 경과함에 따라 합성속도가 감소하고 있음을 보였다.

Table 2. Mitogenic activity of BALB/c spleen cells by Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang.

Group	Inocorporation of <sup>3</sup> H-TdR(×10 <sup>3</sup> cpm)			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	4.2±0.2	4.2±0.2	4.2±0.2	4.2±0.2
AES1	4.2±0.2	6.0±0.2	8.0±0.4	8.1±0.4
AES2	4.2±0.2	5.0±0.5	7.2±0.5	7.0±0.3
ADS1	4.2±0.2	8.0±0.3	5.2±0.2	4.2±0.2
ADS2	4.2±0.2	5.0±0.2	4.2±0.2	4.2±0.2

Spleen cells were cultured with Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hour, 48hour, 72hour in 96 mice culture plate. Activity is respresented as cpm of 3H-TdR.

3) IgE가 결합하는 FcεRIα의 mRNA양 분석

본 실험은 항원이 체내로 들어와 생산된 IgE가 결합하는 비만세포 표면에 있는 IgE 수용체(IgE FcεRI)의 양을 측정하는 것이다. 즉 IgE 수용체의 양을 직접 측정하는 것이 아니라 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양을 RT-PCR법으로 측정하는 것이다. IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양이 많으면 IgE 수용체가 많이 만들어지고, IgE 수용체가 많으면 IgE와 많이 결합할 것이다. 따라서 적은 양의 항원(알레르기 유발물질)이 체내로 들어와도 비만세포와 결합한 IgE와 결합하게 되고 히스타민과 같은 알레르기 유발물질을 분비하게 될 것이다. 즉 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양이 적으면 IgE 수용체가 적게 만들어지고, IgE 수용체가 적으면 IgE와 적게 결합하여 히스타민과 같은 알레르기 유발물질을 적게 분비하게 될 것이다. 따라서 실험에 사용한 시료들을 처리하여 처리하지 않은 대조군에 비해 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양을 감소시키면 알레르기 반응을 억제할 수 있는 효과가 있는 것으로 볼 수 있다. 실험 결과 시료를 처리하지 않은 대조군(Control)에 비해 小建中湯추출액, 小建中湯露劑 시료들을 처리한 실험군에서 모두 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양이 감소한 것을 알 수 있다(즉 band의 굵기가 대조군에 비해 약하게 나타났다).

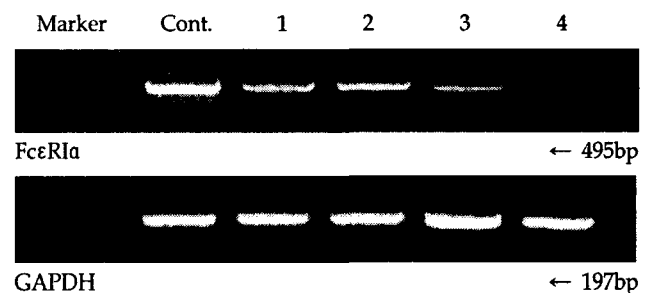


Fig. Analysis of the mRNA level for FcεRIα chain in HMC-1 cells treated with 1 and 2. After treatment with 1mg/ml(1: Aqueous Extract of shogunjung-tang), ×20 dilution(2: Aqueous stillation of shogunjung-tang) for 4 hours, total RNA was isolated from the cells.

2. 면역세포활성에 미치는 영향

1) T-세포의 증식에 미치는 영향

앞선 세포증식 실험에서 추출액, 露劑 모두 반응광과 반응시간에 따라 차이는 있으나 비장세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이때, 시스템에 직접 관여하는 비장세포속의 T세포, B세포에 미치는 영향을 확인하기 위해서 비장세포에서 T세포만을 따로 분리하여 추출액과 露劑를 첨가한 후에 직접

적으로 증식반응을 유도하는지를 검색하였다.

Nylon wool을 이용하여, 비장세포 중에서 부착성을 가진 B 세포와 대식세포를 제거한 다음, 순수한 T세포만을 분리하여 well 당  $3 \times 10^6$  개씩 넣고, 각 성분을 희석도별로 첨가하여 3일간 배양하여 증식반응을 측정하였다. 이렇게 순수하게 분리된 T세포에 대해 ConA반응이 높게 나타나는 T세포의 정제도를 확인하고, 두 가지 성분 모두 Table 3에 결과처럼 비장세포와 같은 정도의 증식반응을 유도하지는 않는 것으로 나타났다. 小建中湯추출액의 경우 증식을 유도하는 반응이 나타나지 않았고, 小建中湯露劑는 48시간대에 가장 높은 값을 나타내는 것으로 보아, 이 결과에서는 露劑가 T세포 증식을 유도하고 있음을 확인하였다.

Table 3. Effects of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on the proliferation of splenic T cell

Group	T-cell Proliferation , O.D.(490nm)			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
ConA	0.01±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
LPS	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
AES	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
ADS	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00

B-cells were cultured with Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hour, 48hour, 72hour in 96 mice culture plate. Proliferation was determined by MTT assay. Resulted is respresented as OD 490nm. CON: control, ConA: ConcanavalinA, LPS: Lipopolisaccharide, AES: Aqueous Extract of Shogunjung-tang, ADS: Aqueous Distillation of Shogunjung-tang.

2) B세포의 증식에 미치는 영향

두 가지 성분이 모두 비장세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났지만, B세포만을 단독으로 분리하여 두 가지 성분이 B세포의 증식을 유도하는지를 검색하였다(Table 4).

Table 4. Effects of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on the proliferation of splenic B-cell

Group	B-cell Proliferation , O.D.(490nm)			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
ConA	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
LPS	0.01±0.00	0.02±0.00	0.07±0.01	0.09±0.01
AES1	0.01±0.00	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
ADS1	0.01±0.00	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01

B-cells were cultured with Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hour, 48hour, 72hour in 96 mice culture plate. Proliferation was determined by MTT assay. Resulted is respresented as OD 490nm.

T세포만이 가지고 있는 세포표면 특이 단백질인 Thy 1 항원에 대한 항체와 보체를 이용하여 T세포를 제거하고 나머지 부착성 세포들을 G-10 sephadex를 이용하여 제거한 다음, 순수한 B세포만을 분리하였다. 분리한 B세포를 well 당  $3 \times 10^6$  개씩 넣고, 각 성분을 농도별로 첨가하여 0hour, 24hour, 48hour간 배양하여 증식반응을 측정하였다. 그림 3에 나타난 것과 같이, Con A에 의해서는 증식반응이 미미하게 유도되어, LPS에 의해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 정제된 것임을 알 수 있었다. 小建中湯추출액이 반응 2일째와 3일째에 시간이 경과함에 따라 증식반응을 유도하였지만, 露劑는 상대적으로 2일째에 가장 높고 3일째는 증식반응이 다소 떨어지는 것으로 나타났다.

B세포 활성유도에 있어서는 추출액이 露劑보다 반응시간대가 다소 빨리 나타난 결과는 다른 실험과 상반된 특이한 현상이나, 추출액과 露劑가 B세포 증식에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

3) 사이토카인 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4생성에 미치는 영향

비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 가지 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 분리한 비장세포를 well 당  $5 \times 10^6$  개씩 넣고, 각 성분을 첨가하여 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 사이토카인의 농도와 종류는 ELISA로 측정하였다. 사이토카인 IFN- $\gamma$ 발현은 Table 5에서, IL-2 발현은 Table 6, IL-4발현은 Table 7에서 결과를 나타내고 있다. 즉 小建中湯추출액과 露劑, 모두 시간이 진행됨에 따라 현저하게 증가된 경향을 보여주고 있으며, 농도가 진할수록 INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4생성활성도 증가되고 있음을 보여주었다. 또한 추출액과 露劑의 사이토카인 발현 반응양상은 추출액은 시간이 경과함에 따라 72시간까지 지속적인 자극을 촉진하고 있으나, 露劑는 24시간 이후 점차적으로 활성이 감소하고 있음을 보여주었다.

Table 5. Effect of various stimulators on the secretion of IFN- $\gamma$  by spleen cells.

Group	IFN- $\gamma$ , pg/ml			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	10.3±0.5	10.3±0.5	10.3±0.5	10.3±0.5
AES1	10.3±0.5	25.6±2.1	31.3±4.0	30.3±2.5
AES2	10.3±0.5	15.3±2.5	20.3±2.5	15.3±2.3
ADS1	10.3±0.5	25.0±2.6	15.6±2.0	15.3±1.5
ADS2	10.3±0.5	15.3±2.5	10.0±0.5	10.0±0.5

Spleen cells were cultured with Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hour, 48hour, 72hour.

Table 6. Effect of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on expression of interleukin-2 receptors on BALB/c spleen cells.

Group	IL-2, $\mu\text{g/ml}$			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	20.3±2.5	20.3±2.5	20.3±2.5	20.3±2.5
AES1	20.3±2.5	25.3±1.6	30.6±3.1	30.1±2.5
AES2	20.3±2.5	20.3±2.0	25.0±2.4	20.3±2.8
ADS1	20.3±2.5	30.0±1.9	25.0±2.4	20.0±2.3
ADS2	20.3±2.5	20.6±1.0	20.5±1.2	20.5±1.2

The cell were incubated with various concentrations of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hrs, 48hrs, 72hrs at 5% CO<sub>2</sub> incubator.

Table 7. Effect of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on expression of interleukin-4 receptors on BALB/c spleen cells.

Group	IL-4, $\mu\text{g/ml}$			
	0 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CON	10.0±1.0	10.0±1.0	10.0±1.0	10.0±1.0
AES1	10.0±1.0	15.0±2.0	20.0±2.0	15.0±2.0
AES2	10.0±1.0	15.0±2.0	15.0±2.0	15.0±2.0
ADS1	10.0±1.0	15.0±2.0	10.0±1.0	10.0±1.0
ADS2	10.0±1.0	10.0±1.0	10.0±1.0	10.0±1.0

The cell were incubated with various concentrations of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang for 24hrs, 48hrs, 72hrs at 5% CO<sub>2</sub> incubator.

4) 자연살해세포 활성에 미치는 영향

小建中湯 추출액과 露劑가 자연살해세포의 암세포주 (YAC-1) 파괴 활성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 먼저, 실험하기 전 각 성분을 물에 녹여서 마우스가 2주일간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 그 후 비장세포를 분리하여 효과세포로 사용하였고, 마우스 자연살해세포에 민감한 세포주인 YAC-1 세포주를 표적세포로 사용하였다. 효과세포와 표적세포의 비율을 5:1 또는 10:1로 섞어서 6시간 배양한 다음에 파괴되는 세포에서 방출되는 LDH(lactate dehydrogenase)의 양을 측정하여 자연살해세포의 활성을 측정하였다.

Table 8에 나타난 것과 같이, 小建中湯추출액과 露劑를 2주일간 섭취시켰을 때, 자연살해세포 활성이 대조군에 비해 현저히 높게 나타났다. 이러한 경향은 효과세포와 표적세포의 비율을 5:1 또는 10:1로 하여도 비슷한 양상으로 증가하는 것으로 확인하였던 바, 小建中湯의 추출액과 露劑가 면역세포의 일종인 자연살해 세포의 활성화에도 영향을 미치고 있으며, 두 실험군간의 결과는 현저한 차이는 보이지 않았다.

Table 8. Effects of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on NK cell activity.

Condition	% Cytotoxicity	
	(E : T) 5 : 1	(E : T) 10 : 1
CON	50.3±7.0	54.3±3.2
AES	62.0±3.6	69.0±3.6
ADS	63.0±3.0	74.0±3.2

The sample were orally fed to BALB/c for 14days. E : Effect, T : Target(YAC-1) The values represent the mean±standard deviation. Significantly different from control as determined by student's t-test (\*\* : P(0.01, )

5) 세포성면역 Plaque Forming Cell(PFC) 및 Rosette Forming Cell(RFC) 검출에 미치는 영향

항체생성능을 PFC과 RFC로 측정한 결과는 Table 9와 같다.

Table 9. Effect of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang on the plaque forming cell and rosette forming cell after the anti-SRBC response BALB/c

Group	Number of PFC/ 5×10 <sup>6</sup> spleen cell	Number of RFC/ 1×10 <sup>7</sup> spleen cell
CON	150±14	55±7
AES	220±17	78±8
ADS	193±15	72±8

The sample were orally fed to BALB/c for 10days. The mice were immunized with SRBC at 4days before assay. The values represent the mean±standard deviation. Significantly different from control as determined by student's t-test(\*P(0.05, \*\*P(0.01)

PFC에서는 CON군이 150±14인 비해서 AES군은 220±17, ADS군은 193±15으로 각각 약1.5배, 1.3배정도 증강된 PFC형성 세포수를 보였다(P<0.01, P<0.5). 또한 RFC에 있어서도 CON군이 55±7에서 AES군은 78±8, ADS군은 72±8로 각각 1.4배, 1.3배 정도 높게 나타났으나 유의성은 미미하였다(P<0.5). 小建中湯추출액과 露劑의 투여가 비장의 면역 세포에 상당한 영향을 미치는 것으로 보아, 小建中湯의 추출액과 露劑가 면역계 세포에 항체생성 능력을 증강시키는 것으로 사료됨은 물론 小建中湯추출액과 露劑를 10일간 섭취시켰을 때, 면역세포 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다.

3. 탐식능에 미치는 영향

생쥐의 복강에서 얻은 복강 침출세포(PEC)의 대식세포가 Candida parapsilosis에 대한 탐식작용을 나타낸 결과가 Table 10이다. 대조군의 탐식능이 25.0±3.0%에 비해 小建中湯추출액은 38.0±3.0%(p<0.01)로 유의한 증강을 보였으며, 小建中湯露劑는 28.0±4.0%로 탐식작용에 있어서는 미미한 증가경향을 보였다.

Table 10. Effect of Aqueous Extract of Shogunjung-tang or Aqueous Distillation of Shogunjung-tang. on phagocytic activity of peritoneal exudate

Group	Phagocytosis(%)
CON	25.0±3.0
AES	38.0±3.0
ADS	28.0±4.0

The sample were orally fed to BALB/c for 10days. The mice were immunized with SRBC at 4days before assay. The values represent the mean±standard deviation. Significantly different from control as determined by student's t-test(\*\*P(0.01)

고찰

대부분의 補養藥은 正氣가 虛하여 외부로부터 들어오는 邪氣의 침범을 받아 正氣가 虛한 상태에 正氣를 補하여 줄 목적으로 사용된다. 이 중 陰陽氣血이 모두 虛한 증상을 치료하는 대표적인 處方인 小建中湯은 상한론 辨太陽病脈證并治 中에 기재된 것으로 芍藥酒炒18g 桂枝去皮9g 炙甘草6g 生薑10g 大棗4枚 飴糖30g로 구성된다.<sup>1)</sup> 이 구성약물에 대한 性味와 효능을 살펴보면 白芍藥은 微寒無毒苦酸하여 養血柔肝, 緩中止痛하여 胸腹脅肋疼痛, 瀉利腹痛을 치료하며 桂枝는 溫無毒辛甘하여 溫經通脈, 助陽和氣하여 脘腹冷痛을 치료하고 炙甘草는 平無毒甘하여 脾胃虛弱으로 인한 食少, 腹痛便溏을 치료하며 生薑은 溫無毒辛하여 解表散寒, 溫中止嘔하여 胃寒嘔吐, 脹滿, 泄瀉를 치료하고 大棗는 溫無毒甘하여 補脾和胃, 益氣生津하여 胃虛食少, 脾弱便溏한 증세를 치료하며 飴糖은 甘溫無毒하여 補虛建中, 緩急止痛의 작용으로 小建中湯은 脾胃를 다스려 人體精氣를 化生하게 하는 역할을 가진다.<sup>23,24)</sup> 이러한 역할을 드러내는 小建中湯에 대한 실험적 연구로는 성장발육 촉진 및 항체양 효과, 위암을 기점으로한 유전자 발현에 따른 항산화효과, 세포활성에 관련되어 보고<sup>25,27)</sup>된 바 있다. 또한 전통한방제형은 중국이나 한국에 있어서 시대가 발전되면서 종류가 다양화되고 제법, 규칙, 준치, 복약법 등이 통일되었다. 한방제형은 크게 液體제제, 固體제제, 半固體제제 등으로 분류할 수 있는 데 액체제제는 湯劑, 酒劑, 飲劑, 露劑 등이고 고체제제는 丸劑, 散劑, 丹劑, 膏劑 등이며 반고체제제는 膏劑 등으로 이 중 5대제형 즉 湯, 散, 丸, 丹, 膏劑 등이 다용되었다. 제형은 각기 특성상 장단점이 있는 데 다른 형태를 채용한 것은 病情의 수요에 의하여 결정되었으며 복약법에 있어서도 전탕기간, 복용시간 등이 病情의 부위에 따라 달리하였다.<sup>28)</sup> 이 중 하나인 露劑에 해당되는 증류한약은 일반 약탕기에서 3-4시간 가량 달여 추출한 한약액을 한번 더 가열하여 그 때 발생하는 증류수를 모아 만든 이슬과도 같은 한약을 말한다. 이 증류한약에 대해 학계에서는 사용지침에 대한 구체적이고 정확한 설정이 이루어지지 않고 있으나 임상계 특히 소아전문병원을 표방하는 곳에서는 편리성과 안전성 그리고 속효성을 내세워 임

상적으로 실용화하고 있는 상태이다.

이에 저자는 한방제형에 따라 각기 특성상 장단점이 있으며 제형의 형태는 病의 정황에 의하여 결정된다고 보아 小建中湯을 비롯하여 한방처방의 露劑사용에 따른 지표를 얻고자 기존의 추출액(湯劑)과 露劑의 小建中湯을 대상으로 補養藥이 가지는 면역학적인 효능상태의 차이를 검토하였다.

이에 세포증식에 미치는 영향을 주는 비장세포의 증식반응을 알아보기 위하여, 분리한 비장세포를 well 당  $5 \times 10^5$  개씩 넣고 실험재료를 첨가하여 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 증식정도를 비교하였다. 그 결과는 Table 1과 같다. 이 결과는 小建中湯의 성분이 비장세포에 대해서 세포증식을 유발시킴을 확인할 수 있었고, 또한 小建中湯추출액과 露劑가 모두 비장세포의 증식반응을 유도하였으며, 그리고 小建中湯추출액이 露劑보다 지속적인 증식반응을 유도하는 것으로 나타났다. 따라서 반응시간대는 小建中湯의 Mitogen활성은 露劑가 추출액에 비해서 활성반응이 초기에 나타남을 확인할 수 있었다. DNA합성에 미치는 영향을 주는 Mitogen활성은 비장세포 배양을 통해서 DNA합성으로  $0.5 \mu\text{l}$ :트리티미딘(3H-TdR)의 증식세포 측정으로 수행되었다. 배양 0hour, 24hour, 48hour, 72hour에 걸쳐서 측정된 결과는 Table 2와 같다. 이 결과는, 小建中湯이 비장세포에 대해서 세포증식을 유발시킴을 확인할 수 있었다. 따라서 小建中湯추출액과 露劑의 활성도도 시간대에 따라 비교할 때 MTT에 의한 실험결과와 유사한 양상을 보인 것처럼 露劑가 추출액에 비해서 활성의 반응시간대가 초기에 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 알레르기 반응으로 항원이 체내로 들어와 생산된 IgE가 결합하는 비만세포 표면에 있는 IgE 수용체(IgE FcεRI)의 양을 측정된 결과는 실험에 사용한 시료들을 처리하여 처리하지 않은 대조군에 비해 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양을 감소시키면 알레르기 반응을 억제할 수 있는 효과가 있는 것으로 볼 수 있다. 실험 결과 시료를 처리하지 않은 대조군(Control)에 비해 小建中湯추출액, 小建中湯노재 시료들을 처리한 실험군에서 모두 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 양이 감소한 것을 알 수 있다(즉 band의 굵기가 대조군에 비해 약하게 나타났다). 따라서 시료들이 모두 IgE 수용체를 만드는 mRNA의 생산량을 감소시킨 것으로 나타났다. 면역세포활성에 미치는 영향을 주는 T-세포와 B-세포의 증식 효과는 앞선 세포증식 실험에서 추출액과 露劑가 모두 비장세포의 증식을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 T-세포, B-세포가 비장세포의 증식반응보다 낮은 것은 비장에 있는 T, B세포 이외의 다른 세포들의 도움이 증식반응에 필요하기 때문인 것으로 생각된다. 사이토카인 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4생성에 미치는 영향을 주는 비장세포의 증식반응에서 사이토카인 IFN- $\gamma$ 발현은 Table 5에서, IL-2발현은 Table 6, IL-4발현은 Table 7에서 결과를 나타내고 있다. 즉 小建中湯추출액과 露劑, 모두 시간이 진행됨에 따라 현저하게 증가된 경향을 보여주고 있으며, 농도가 진할수록 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4생성활성도 증가되고 있음을 보여주었다. 이는 앞선 실험 결과와 종합해 볼 때 세포증식과 면역증강에 영향을 주고, 그 양상은 초기에는 露劑의 성분이 그 다음에는 추출액의 성분에 의한 활성화가 진행되는 것으로 추정할

수 있었다. 자연살해세포 활성화에 미치는 영향을 주는 우리 몸에서 자연적으로 발생하는 암세포를 포함한 비정상적인 세포는 Table 8에 나타난 것과 같이, 小建中湯추출액과 露劑를 2주일간 섭취시켰을 때, 자연살해세포 활성이 대조군에 비해 현저히 높게 나타났다. 이는 앞선 세포단위의 세포활성과 증식에 미치는 결과와 종합해 볼 때 추출액이 露劑에 비하여 약효의 지속성이 연속되고 있음을 보여주고, 반면 露劑는 단시간에 속효성임을 나타내어 주고 있음을 세포활성화 실험에서 확인하였다. 세포성면역 Plaque Forming Cell(PFC) 및 Rosette Forming Cell(RFC) 검출에 미치는 영향을 주는 항체생성능을 PFC과 RFC로 측정된 결과는 Table 9와 같다. 이는 식세포, 단세포, B세포 등을 자극하여 생체방어시스템을 활성화해서 체질을 강화하는 성분일 것으로 추정할 수 있겠다. 따라서 성분에 따라 반응시간의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 탐식능에 미치는 영향을 주는 생쥐의 복강에서 얻은 복강 침출세포(PEC)의 대식세포가 Candida parapsilosis에 대한 탐식작용을 나타낸 결과가 Table 10이다. 대조군의 탐식능이  $25.0 \pm 3.0\%$ 에 비해 小建中湯추출액은  $38.0 \pm 3.0\%$  ( $p < 0.01$ )로 유의한 증강을 보였으며, 小建中湯露劑는  $28.0 \pm 4.0\%$ 로 탐식작용에 있어서는 미미한 증가경향을 보였다.

이상과 같이 小建中湯을 대상으로 기존의 추출액(湯劑)과 露劑에 대한 일반적으로 제기되고 있는 면역학적인 효능상태의 차이를 검토해 본 결과, 약효성은 조금 떨어지나 어느 정도의 유효성을 유지하면서 속효성을 기대하는 경우에 露劑사용도 가능하다고 보여진다. 이는 小建中湯을 비롯하여 제형변화에 따른 효율적인 처방의 활용방안을 세우는 데 도움되리라 보며, 본 연구를 토대로 작용시간과 투여량이 조정된 동물대상 실험연구, 그리고 임상실험연구가 앞으로 병행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

小建中湯을 비롯한 약물의 제형변화에 따른 효율적인 약물 사용의 지표를 얻고자 기존의 추출액(湯劑)과 露劑의 小建中湯을 대상으로 補養藥이 가지는 세포활성도와 면역학적인 효능상태의 차이를 검토해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

비장세포의 증식 효과에 小建中湯추출액과 露劑 모두가 대조군에 비해 현저한 증식활성을 보였으며 초기에는 露劑가, 후반부에는 추출액이 증식반응의 활성화를 우수하게 나타냈다. 비만세포의 IgE 수용체인 IgE FcεRIα의 양은 小建中湯추출액과 露劑 모두 별 차이없이 IgE 수용체를 만드는 mRNA 양을 감소시켜 면역기능으로 따른 알레르기 억제효과가 나타났다. T-세포와 B-세포의 증식에 小建中湯추출액과 露劑 모두 대조군에 비해 미미한 증식활성을 보였으며 그 양상은 비장세포의 경우와 비슷하게 초기에는 露劑가, 후반부에는 추출액이 우세하게 나타났다. 비장세포의 사이토카인 생산 효과에 小建中湯추출액과 露劑 모두 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 생산을 유도하였다. 생산양상은 세포증식과 같이 초기에는 露劑가, 후반부에는 추출액이 증식반응을 활성화시켜 지속성은 露劑보다 추출액이 장기간 유지되었다. 자연살해세포 활성화는 小建中湯추출액과 露劑 모두 대조군에 비해 자연살

해세포의 활성이 증가하였고, 露劑보다는 추출액이 활성이 더 강하게 나타났다. PFC 및 RFC 형성을 지닌 비장의 면역세포는 PFC에서 小建中湯 추출액이 대조군에 비해 1.5배, 露劑는 1.3배, RFC에서 추출액이 1.4배, 露劑는 1.3배의 유의한( $P < 0.01$ ,  $P < 0.5$ ) 증강을 보였다. 탐식능의 효과는 대조군에 비해서 추출액이 13% ( $p < 0.01$ ), 露劑는 3%의 증강을 나타내었다.

이상의 결과에서 보여 주듯이 小建中湯추출액과 露劑 모두가 세포증식, 면역활성도 효능상태와 세포와 생체에 활성도를 일으키는 효능을 현저하게 가지고 있었으며 그 양상을 볼 때 露劑는 초기에, 추출액은 露劑에 비해 후반부에 효능이 발휘한다고 볼 수 있었다.

### 참고문헌

1. 염성병, 상한명리론간석, 사천, 사천과학기술출판사, p.250, 1988.
2. 한의과대학 방제학교실 공편저, 방제학, 영림사, p.237, 1999.
3. 장지총 마시, 황제내경소문영추(장마합주), 대북, 대연국풍출판사, p.15, 1974.
4. 문준전 외, 동의병리학, 서울, 고문사, pp. 23, 256-257, 1990.
5. 김광중 외, 장부학의 이론과 임상, 일중사, 1997.
6. 이문호, 내과학, 서울, 박애출판사, pp. 1989-1999, 1977.
7. 이종훈, 병원미생물학, 서울, 수문사, pp. 133-183, 1976.
8. 고병희, 녹용, 숙지황, 인삼, 오기피가 면역반응 및 NK세포활성도에 미치는 영향, 경희대학교박사학위 논문, 1986.
9. 김덕호 외, 귀룽탕이 면역기능에 미치는 실험적 연구, 대한한의학회지 6(2):55-63, 1985.
10. 김장현, 공진단이 면역반응 항피로 및 내분비기능에 미치는 영향, 경희대학교박사학위논문, 1988.
11. 하대유 외, 인삼에 관한 세균학 및 면역학적 연구(제3보), 인삼이 mouse의 면역반응에 미치는 영향, 대한면역학회지, 1(1):45-52, 1979.
12. 한용남 외, 인삼이 면역증강효과에 관한 연구, 인삼연구보고, pp. 285-294, 1979.
13. 황영명 외, 수치에 따른 3종의 지황이 면역반응에 미치는 영향, 경희의학 3(3), 1987.
14. 고병희 김광호 송일병, 四種 녹용의 면역학적 효능에 관한 실험적 연구, 한의학회지, pp. 197-201, 1994.
15. S. J. Jeong, S. T. Yee, W. S. Jo, S. H. Yu, Sang H. Lee, Y. J. Lim, Y. H. Yoo, J. M. Kim, J. D. Lee and M. H. Jeong. A Novel Factor Isolated from Actinobacillus actinomyces-temcomitans Stimulates Mouse B Cells and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Infection and Immunity, pp. 5132-5138, 2000.
16. 정영란, 하미혜, 김성호, 조성기, 변명우, 조현욱, 서권일, 이성태, 일부 한약재의 동종항원에 대한 세포증식 및 살세포반응 억제효과. 한국식품영양과학회지: 29(6):1133-1138.
17. S. T. Yee, T. Kato, T. Tamura and H. Nariuchi, Different Requirements of CD3 Cross-Linkage for the Activation of Memory and Naive CD8+ T Cell. Cellular Immunology, 157, 48-58, 1994.
18. T. Kato, T. Morokata, O. Igarashi, S. T. Yee, M. Inobe, T. Uede, M. Azuma, K. Okumura and H. Nariuchi. Costimulatory Effect of IL-2 on the Activation of Naive, Memory CD4+ T Cells, and Th1 Clone. Cellular Immunology 176, 50-58, 1997.
19. Lanier, L.L., and Phillips, J.H.: Evidence for three types of human cytotoxic lymphocyte. Immunol. Today, 7:132, 1986.
20. Cunningham, A J and Szemberg, A: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cell. Immunology, 14,599, 1968.
21. Garvey, J. S. : Method In Immunology., W. A. Benjamin Inc. pp.449-450, 1980.
22. 小松靖弘, 小野尚彦, 安部千之 : 食能の測定法-マウス腹腔細胞および candida parapsilosis (CP) を用いて-. 炎症 4 : 379-380, 1984.
23. 전국한의과대학본초학교실 공저, 본초학 2, 서울, 영림사, pp.124, 137, 492, 513, 541-542, 582, 1994.
24. 신민교, 임상본초학 1, 서울, 남산당, pp.179, 364-365, 1986.
25. 김태중, 소건중탕가용골모려 환취의 실험적 위궤양에 미치는 영향, 경산대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
26. 윤한룡, 소건중탕과 육진단이 백서의 성장발육에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
27. 김태중 외, 소건중탕가용골모려의 항산화효과, 세포활성도 및 유전자 발현에 미치는 영향, 대한본초학회지 제18권 제2호, 2003.
28. 한관석 외, 전통한방제형에 대한 문헌적 고찰, 본초학회지, 1989.