

六味地黃湯이 免疫細胞에 미치는 實驗的 效果

전진오, 정현우

동신대학교 한의과대학 병리학교실

Experimental Effect of Yukmi-Jihwang-Tang on the T-lymphocytes and Macrophages

Jin O-Jeon, Hyun Woo-Jeong

Department of Pathology, College of Oriental Medicine Dongshin University, in Naju

Objectives : Yukmi-Jihwang-Tang(YJT) has been used in Oriental Medicine as a drug for tonifying and nourishing yin. So, the purpose of this Study was to investigate effects of Yukmi-Jihwang-Tang extract(YJTE) on the T-lymphocytes and peritoneal macrophages in mice.

Methods : YJTE consists of the following components; Rehmaniae Radix Preparata(熟地黃), Dioscoreae Rhizoma(山藥), Corni Fructus(山茱萸), Hoelen alba(白茯苓), Moutan Cortex Radicis(牡丹皮), Alismatis Rhizoma(澤瀉).

Result : The results of this Study were obtained as follow; The administration of YJTE did not affect T-lymphocytes apoptosis. YJTE decreased sub-population of TH and TC cells, and proliferation of T-lymphocytes too. But YJTE accelerated phagocytic activity and Nitric Oxide(NO) production from peritoneal macrophages in mice.

Conclusions : These results suggest that the administration of YJTE suppresses T-cell mediated immunity, but activates peritoneal macrophages

Key Word : Yukmi-Jihwang-Tang, T-lymphocytes, apoptosis, sub-population, phagocytic activity, Nitric Oxide(NO)

I. 緒 論

『素問』·「刺法論」에 “正氣存內 邪不可干”, 「評熱病論」에 “邪之所湊 其氣必虛”¹⁾라 하여 질병의 발생을 邪氣와 正氣의 상쟁과정으로 표현하고 있는데, 이는 東醫學에서 發病過程上 생체의 저항력이 중요함을 인식한 부분으로 西醫學의 면역개념과 유사하다^{2,3)}.

免疫이란 체내에 이물질이 침입하거나 變異細胞가 발생하면 면역계가 관여하여 異物은 물론 새로이 발생된 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상을 말한다. 면역의 종류는 macrophages나 補體가 관여하는 先天

的 免疫과 T세포나 B세포가 관여하는 後天的 免疫으로 나뉘어지고, 免疫係는 림프구계통과 골수구계통으로 나뉘어진다. 이 중 림프구계통의 免疫係는 T세포, B세포가 있고, 골수구계통의 免疫係는 macrophage, NK cell 등이 있다. 이 중 T세포는 細胞性 免疫機能과 면역반응을 조절하고^{4,5)}, macrophages는 생체 항상성 유지 및 自然免疫反應에 중요한 기능을 담당하고 있다⁶⁻¹⁰⁾.

세포의 증식을 억제하는 방법에는 apoptosis와 necrosis가 있는데 apoptosis란 necrosis와는 달리 정상세포내에서 흩어져 있는 單一細胞의 壞死機轉을 설명한 것으로 그 과정은 세포질과 핵의 농축, apoptotic bodis로의 붕괴,

phagocytosis에 의해 소화되며, 임상적으로는 성인 장기의 크기를 유지시켜주고 organ atrophy와 세포를 제거시켜주는 의의를 갖는다¹¹⁻¹⁴⁾.

東醫學으로 면역기능 활성화에는 ‘補氣’, ‘補血’, ‘補陽’, ‘補陰’이 있는데, 그 중에서 대표적인 補陰劑인 六味地黃湯은 錢乙의 『小兒藥證直訣』¹⁵⁾에 “治肝腎陰虛, 腰膝痠軟, …… 舌紅少苔, 脈細數” 한다라고 最初로 收錄된 이래 歷代醫家들은 腎氣不足 및 陰虛火動한 諸證에 사용하여 왔다¹⁵⁻²⁸⁾.

이러한 六味地黃湯²⁹⁻³⁷⁾ 및 한약재를 이용한 면역기능 활성화³⁸⁻⁴⁰⁾에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있지만 아직까지 六味地黃湯이 T세포의 活性能과 peritoneal macrophages의 活性能에 미치는 연구보고들은 미흡한 실정이었다.

이에 著者는 六味地黃湯을 이용하여 T세포 및 peritoneal macrophages에 미치는 효과들을 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

六味地黃湯의 處方構成은 方藥合編⁴¹⁾에 準하였으며, 藥材는 東新대학교 韓의과대학 부속 韓方병원에서 구입하여 사용하였다. 六味地黃湯 1貼分量(45.875g)을 증류수로 가열 추출한 후, 여과하여 濾液을 rotary evaporator로 농축하고 동결 건조하여 건조분말 15.5g(이하 YJTE라 함)을 얻어 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 六味地黃湯의 내용과 분량은 다음과 같다.

| 韓藥名 | 生藥名 | 重量(g) |
|-----|---------------------------|--------|
| 熟地黃 | Rehmaniae Radix Preparata | 14.0 |
| 山藥 | Dioscoreae Rhizoma | 7.5 |
| 山茱萸 | Corni Fructus | 7.5 |
| 白茯苓 | Hoelen alba | 5.625 |
| 牡丹皮 | Moutan Cortex | 5.625 |
| 澤瀉 | Alismatis Rhizoma | 5.625 |
| 總量 | | 45.875 |

2) 動物

本實驗에 사용한 mouse는 대한실험동물에서 구입한 balb/c계 22±1(g) 수컷을 온도 20±3(°C), 습도 55±5(%), light/dark 12(hr)의 사육조건에서 1주일 이상 적응시키면서 고형 pellet 사료(등록성분량 : 조단백질 22.1%이상, 조지방 3.5%이상, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이

상, 항생제·삼양프리믹스-무첨가 1.3%)와 물을 자유로이 섭취케하였다.

3) 試藥 및 器機

시약은 Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI 1640), zymosan, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), lucigenin, propidium iodide(PI), N-naphthylethylene diamine·2HCl, Interferon-γ(IFN-γ), Lipo polysacc haride(LPS), Concanavalin A (Con-A)는 Sigma Co.를, Fetal Bovine Serum(FBS), thioglycollate(TG)는 Difco Co.를, PE/FITC conjugated anti CD4 and CD8 anti body는 Molecular probes Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 또한 기기는 microplate-reader (Dynatech MR 5000), flow

cyto meter(Coulter, EPICS-XL), CO₂ incubator (Vision Co.), inverted microscope(Nikon Co.) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) T세포의 DNA fragmentation 測定

六味地黃湯 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후, 8일째 마우

스의 胸선을 적출하여 Wysocki⁴²⁾ Mizel 등⁴³⁾의 방법에 의거하여 T세포를 분리하였다. 즉 적출한 胸선을 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 분리한 T세포의 생존을 및 총세포수를 0.2% trypan blue exclusion법으로 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

T세포에 PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)를 용해시킨 PI(10 ug/ml) 20μl를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 측정하였다⁴⁴⁾.

2) T세포의 sub-population 測定

1)과 동일한 방법으로 T세포를 분리한 후, 분리된 T세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1×10⁶cells/ml 농도로 분주하여 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로 이중염색하여 4°C에서 반응시킨 다음, flow cytometer(excitation:488nm, emission:525nm-FITC, 575nm-PE)를 이용하여 sub-population을 측정하였다⁴⁵⁾.

3) T세포의 proliferation 測定

1)과 동일한 방법으로 실험하여 T세포를 분리한 후, T세포의 proliferation을 MTT법⁴⁶⁻⁴⁷⁾으로 측정하였다.

T세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.2×10⁶cells/ml 농도로 접종하여 Con-A 1ug/ml를 첨가한 후 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료시 0.01N HCl에 용해시킨 10% Sodium

Dodecyl Sulfate(SDS) 100 μ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

4) Peritoneal macrophages의 phagocytic activity 測定

六味地黃湯 500mg/kg을 마우스에 1일 1회씩 7일간 경구투여하였다. 4일째 멸균한 3% TG 2.0ml를 복강에 주입하고, 8일째 마우스를 경추탈골하여 도살하였다. 복강에 cold PBS-A 10.0ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4 $^{\circ}$ C에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, without phenol red)로 2회 세척한 후, 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양한다. 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophages로 사용하였다.

Chemiluminescence측정은 luminometer를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 측정하였다⁴⁸⁻⁴⁹. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 세포부유액 50 μ l와 lucigenin용액 50 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 전처리한 후 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 5분 간격으로 60분 동안 lucigenin chemiluminescence를 측정하였다.

5) Peritoneal macrophages의 NO 測定

4)와 동일한 방법으로 분리한 macrophages를 RPMI 1640 배지에 희석하여 24 well plate에 well당 1 \times 10⁶cells/ml을 분주한 후 각 well에 LPS 1 μ g/ml와

IFN- γ 25units/ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 생성된 NO의 양을 Griess 시약으로 측정하였다⁵⁰. 배지 100 μ l와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenedi-amine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

3. 統計處理

統計的 有意性 檢討는 對照群에 대한 變動을 "one way ANOVA test"로 하였으며, p값이 0.05미만일 때 統計적으로 有意性이 있다고 判斷하였다.

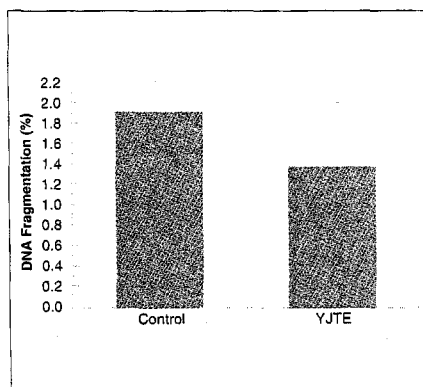


Fig 1. Effect of Yukmi-Jihwang-Tang water extract(YJTE) on DNA fragmentation of T-lymphocytes in mice. YJTE(500mg/kg) was administered p.o. for 7 days, and T-lymphocytes were prepared from BALB/c mice thymus. The cells were lysed in a hypotonic solution mixed with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments.

III. 實驗成績

1. T세포의 DNA fragmentation에 미치는 效果

마우스에 六味地黃湯 500mg/kg을 7日間 투여한 후 T세포의 DNA fragmentation을 측정한 결과, 對照群의 DNA fragmentation은 1.9 \pm 0.3(%)이었으나 六味地黃湯을 投與한 實驗群의 T세포 DNA fragmentation은 1.4 \pm 0.6(%)로 별 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1).

2. T세포의 sub-population에 미치는 效果

T세포의 sub-population은 對照群에서 CD4⁺細胞는 12.4 \pm 1.1(%), CD8⁺細胞는 6.0 \pm 0.5(%)이었으며, 六味地黃湯을 投與한 實驗群은 CD4⁺細胞가 8.7 \pm 0.6(%), CD8⁺細胞가 4.1 \pm 0.2(%)로 CD4⁺細胞 및 CD8⁺細胞의 population

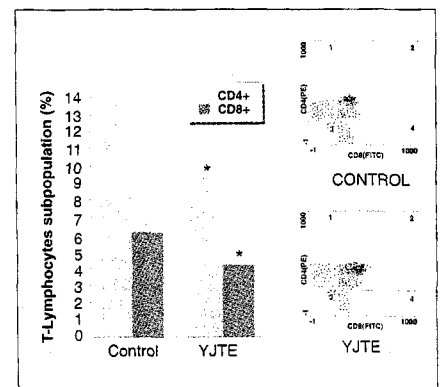


Fig 2. Effect of YJTE on T-lymphocytes subpopulation in mice. T-lymphocytes subpopulation were determined with a flow cytometer after staining with CD4-PE and CD8-FITC mAbs. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments. *: Significantly different from control group (P<0.05).

이 감소되었다(Fig. 2).

3. T세포의 proliferation에 미치는 效果

T세포의 proliferation은 Con-A를 처리한 對照群의 細胞生存率을 100(%)로 하였을 때, Con-A를 처리하지 않은 對照群(-)는 $78.5 \pm 2.8(\%)$ 로, 六味地黃湯을 투여한 實驗群은 $88.5 \pm 2.5(\%)$ 로 T-lymphocytes의 細胞生存率이 감소하였다(Fig. 3).

4. 腹腔 macrophages의 phagocytic activity에 미치는 效果

腹腔 macrophages의 phagocytic activity를 測定한 결과, 對照群에 비해 六味地黃湯을 投與한 實驗群은 phagocytic

activity를 증가시켰다(Fig. 4).

5. 腹腔 macrophages의 NO 生成에 미치는 效果

腹腔 macrophages에서 生成되는 NO 量은 對照群에서 LPS와 IFN- γ 를 첨가하지 않았을 때는 $1.1 \pm 0.3(\mu M)$ 이었으며, LPS와 IFN- γ 를 첨가하였을 때는 $17.3 \pm 0.8(\mu M)$ 이었으나 六味地黃湯을 投與한 實驗群에서는 $22.8 \pm 0.5(\mu M)$ 로 對照群에 비해 NO 生成量이 증가되었다(Fig. 5).

IV. 考 察

免疫이란 체내에 異物質이 침입하거

나 變異細胞가 발생하면 면역계가 관여하여 異物은 물론 새로이 발생된 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리하는 능력을 발휘함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상을 말한다. 면역의 종류는 先天的 免疫과 後天的 免疫으로 나뉘어지며 선천적 면역은 食細胞나 保體가 관여하고, 후천적 면역은 T세포나 B세포가 관여한다. 면역계는 골수계 계통과 림프구 계통으로 나뉘어지며 림프구 계통의 면역계는 T세포, B세포 등이 있고, 골수계 계통의 면역계는 macrophage, NK cell, dendritic cell, langerhans' cell 등이 있다^{4,5)}.

T세포는 흉선의 T前驅細胞로부터 성숙되어 세포성 면역기능(장기이식시의

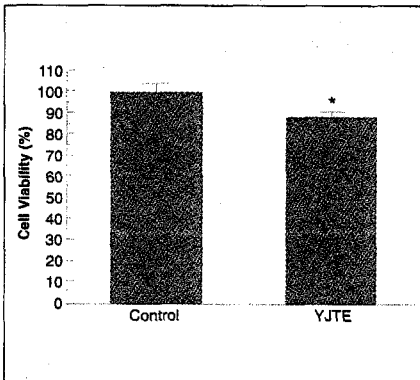


Fig 3. Effect of YJTE on proliferation of T-lymphocytes in mice. T-lymphocytes obtained from YJTE-administered mice were cultured in RPMI1640 mixed with 10%FBS. Con A was added in 96 well plate at the beginning of the culture, and then the cells were cultured in 5% CO₂-incubator for 44 hours. The cells were cultured with MTT for 4 hours. At the termination of the culture, 100 μ l of 10%SDS was added, and then the cells were cultured for 18 hours. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments. *, Significantly different from control group(P<0.01). Concanavalln A non-treated group($78.5 \pm 2.8(\%)$)

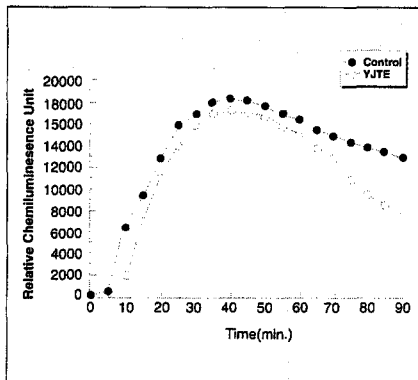


Fig 4. Effect of YJTE on phagocytic activity of peritoneal macrophages in mice. YJTE was administered p.o. for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal were cultured in DME media(without phenol red)with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 90 minutes. Other procedures were described as detailed in the materials and methods section. Each point represents the mean from 3 experiments.

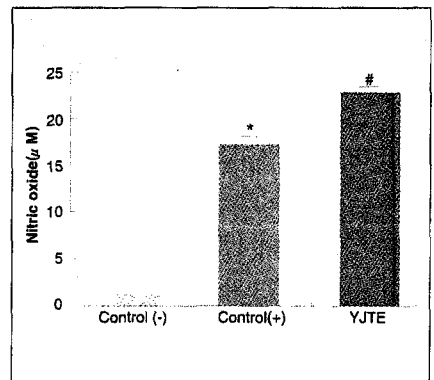


Fig 5. Effect of YJTE on nitric oxide production of peritoneal macrophages in mice. YJTE was administered p.o. for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured for 24 hours in RPMI 1640 media with LPS and γ IFN. The contents of nitric oxide was determined by Griess reagents. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments. *, significantly different from control(-) group(P<0.01). #; significantly different from control(+) group(P<0.01). Control(-); LPS and γ IFN non-treated group, Control(+); LPS and γ IF treated group

거부반응 및 종양에 대한 면역반응, 遲延型過敏症 등)과 면역반응을 조절하고, 식세포의 파괴작용을 도와 세포를 죽이는 작용을 한다. 또한 면역반응을 조절하는 기능에 따라 TH세포(협조 T세포)와 Tc세포(세포독성 T세포)로 구분되는데, 그 중 Tc세포는 식세포의 파괴작용을 도와 세포를 살해하는 작용을 가진 세포로 apoptosis를 촉진시켜주고, TH세포는 B세포의 증식과 함께 항체생산을 도와준다. 한편 B세포는 체액성 면역을 담당하는 세포로 혈액, 골수 및 림프조직에 분포하여 胎生期때는 태아의 간에서, 출생후에는 골수에서 분화되어 림프구의 10~20%를 차지하고 면역글로블린(Ig)을 갖고 있고, 항원을 인지한 후에는 항체를 유지시키는 기능을 담당하고 있다⁴⁵⁾.

T세포가 담당하는 세포성 면역(cell-mediated immunity)은 알리지반응, 접촉피부염, 동종이식거부 등을 나타내는 면역으로 화학전달 물질(lymphokine)들을 분비하며 종양세포나 Virus감염세포에 대해 직접 손상시켜 면역작용을 한다^{45,51)}.

세포의 증식을 억제하는 방법에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, apoptosis란 necrosis와는 달리 정상세포내에 흩어져 있는 단일세포의 괴사기전을 설명한 것이다. 즉, apoptosis는 多細胞 生命體에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)를 말하는 것으로 괴사와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 유전자 활성에 의하여 조절받는 생리과정을 말한다⁵²⁾. 그 과정은 細胞質과핵의 농축, apoptotic bodies로 붕괴, phagocytosis에 의해 소화되며, 임상적으로는 성인 장기의 크기를 유지

시켜주고, organ atrophy와 세포를 제거시켜주는 의의를 갖는다. 반면, necrosis는 非可逆的 傷害의 형태학적 변화 중의 하나로 세포나 세포집단이 죽어서 여전히 생체의 한 부분을 형성하는 것을 말하는 것인데, 그 과정은 독성물질이나 산소부족에 의하여 세포막 투과성이 항진되고 세포내로 물이 들어가서 팽윤되며 mitochondria내로 Ca²⁺ 유입이 일어나 ATP생성이 저하됨으로써 에너지 부족의 결과로 好酸性이 증가하고 핵융해, 핵붕괴 등의 세포사가 일어난다¹¹⁻¹⁴⁾.

골수구 계통의 면역계인 macrophages는 結合組織 뿐만 아니라 간장과 골수 등의 혈관에서 특수한 내피세포로 존재하는 것으로 自他的 인식으로 노화하거나 상해를 받은 自己細胞, 침입미생물 또는 이물질들을 탐식하여 생체의 항상성을 유지시켜주는 한편 면역 활성물질을 생산하여 자연면역반응에 중요한 기능을 하고 있으나 다른 림프구와는 달리 암의 항원성 인식이 불가능한 대신 역으로 비특이적인 여러 종류의 종양세포를 공격할수 있는 특징도 갖고있어 종양면역에서는 가장 중요한 세포로 알려져 있다⁶⁻¹⁰⁾.

NO는 L-arginine에 NO-syn thase(NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 NOS는 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS) 2종류가 있으며, cNOS는 vascular endothelium 및 brain에서, iNOS는 활성화된 macrophages 및 여러 세포에서 발견되었다⁵³⁾. 이 중 iNOS는 macrophages 및 호중구 등과 같이 탐식작용 등에 관여하는 신체의 여러종류의 세포에서 분비되는 것으로 그 중 macrophages가 생산하는 iNOS는 interleukin 1 β · IFN- γ · Tumor Necrosis Factor(TNF)- α 등과 같은

cytokine 및 세균의 세포벽에 존재하는 LPS 등에 의해 형성된다⁵⁴⁾. 1987년 Hibbs 등⁷⁾은 마우스에 BCG를 접종 후 macrophages를 분리하고, 이에 LPS를 첨가하여 배양하게 되면 종양세포의 증식이 억제되며, 여기에 N^G-monomethyl-L-arginine(N-MMA)를 가하였을 때는 항암작용이 없어진다고 하여 복강 macrophages가 생산하는 NO에 항암작용이 있다고 최초로 보고하였다. 이것은 여러 자극제에 의해 活性化된 macrophages가 정상세포보다는 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophage-mediated tumor cytotoxicity로써 중요한 의미를 갖는다^{8,55)}.

東醫學에서는 질병의 발생을 邪氣와 正氣의 상쟁과정으로 표현하고 있는데, 『素問』·「刺法論」에 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, 『素問』·「評熱病論」에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하여 질병의 成立過程上 생체의 저항력을 매우 중요하게 파악하였다. 이와같이 생체의 저항력인 ‘正氣’가 강하면 강할수록 질병의 誘發要因인 ‘邪氣’에 대한 방어능력이 강해져서 비록 ‘邪氣’가 침범하여도 ‘正氣’가 이를 능히 방어할 수 있지만 만약 ‘正氣’가 약하면 ‘邪氣’에 대한 대항능력이 약해져 질병이 발생하게 되는 것이다.

이러한 ‘正氣’의 개념은 西醫學의 면역개념과 가장 유사하다²³⁾고 볼 수 있다.

한약재를 이용한 면역기능 활성화에 관한 연구들을 살펴보면 민³⁸⁾은 補氣劑의 代表方인 補中益氣湯을 이용하여 자외선 조사로 저하된 마우스의 면역기능 회복에 미치는 영향을 보고한 바 있고, 鄭³⁹⁾은 補氣藥物인 黃芪가 흉선세포와 비장세포의 증식을 활성화시키는 동시에 Tc세포의 population 및 흉선세포의 apoptosis를 촉진시켰으나 TH세포의

population을 감소시켰다고 報告한 바 있으며, 韓⁴⁰⁾은 補血之劑인 四物湯을 이용하여 L1210細胞의 apoptosis 촉진 및 흥선과 비장세포의 증식율이 증가되었음을 보고하였다.

補陰之劑의 代表方인 六味地黃湯¹³⁻²⁸⁾은 肝腎不足, 眞陰虧損, 精血枯渴, 憔悴羸弱, 腰痛足痠, 發熱作渴, 小便淋閉, 氣壅痰嗽, 頭目眩暈, 眼花耳聾, 咽燥舌痛, 齒牙不固 등 先天 元氣不足 또는 腎氣虛乏, 陰虛陽旺으로 발생하는 諸證을 치료하기 위하여 사용되는 처방으로 張仲景의 『金匱要略』에 “虛勞腰痛, 少腹拘急, 小便不利者, 八味腎氣丸主之”³⁶⁾라 설명하였으나 錢乙에 이르러 『小兒藥證直訣』¹⁵⁾에서는 桂皮와 附子를 除하고 湯으로 명칭을 바꿔 “治肝腎陰虛, 腰膝軟, 頭暈眼花, 耳鳴耳聾, 盜汗遺精, 或骨蒸潮熱, 或足心熱, 或消渴, 或虛火牙痛, 舌燥咽痛, 舌紅少苔, 脈細數” 한다라고 최초로 수록하였다. 그 약물구성은 補血滋陰하는 熟地黃으로 君藥을 삼아 生精生血하고, 滋補滋精하는 山茱萸와 山藥으로 臣藥을 삼아 精血을 收藏益陰하게 하며, 清熱涼血하는 牡丹皮와 滲濕行水하는 茯苓과 澤瀉로 佐藥을 삼아 新陳代謝를 도와 생기를 돕는 複合作用을 하는 것으로 되어있다⁵⁷⁻⁵⁸⁾. 이러한 六味地黃湯에 대한 실험적 연구로 이³⁴⁾는 腎性高血壓 및 百鼠의 血壓 및 血漿 renin活性度에 미치는 영향을, 이³⁵⁾는 六味 藥鍼이 腎臟機能에 미치는 影響을, 김³⁶⁾은 糖尿에 대한 免疫組織化學的 研究를, 유³⁹⁾는 腎炎에 대한 效果를, 김³⁰⁾은 血壓에 대한 效果를, 김³¹⁾은 血糖量에 대한 效果를, 신³⁷⁾은 血清 總 cholesterol含量에 미치는 영향을, 홍³³⁾은 運動負荷 後 疲勞恢復에 미치는 영향을 報告하였다.

이에 저자는 六味地黃湯을 이용하여 T세포의 apoptosis, sub-population 그리

고 proliferation을 살펴보고, 이와함께 腹腔 macrophages의 activity 및 NO의 생성량에 미치는 효과를 알아보았다.

마우스에 六味地黃湯 500mg/kg을 7日間 투여한 후 T세포의 DNA fragmentation을 측정한 결과, 對照群의 DNA fragmentation은 $1.9 \pm 0.3(\%)$ 이었으나 實驗群의 T세포 DNA fragmentation은 $1.4 \pm 0.6(\%)$ 로 특별한 효과가 없어 T세포의 apoptosis에는 영향을 주지 않고 있음을 시사하였고, sub-population에 있어서는 對照群의 CD4+세포가 $12.4 \pm 1.1(\%)$, CD8+세포가 $6.0 \pm 0.5(\%)$ 이었으나 實驗群의 CD4+세포가 $8.7 \pm 0.6(\%)$, CD8+세포가 $4.1 \pm 0.2(\%)$ 로 CD4+세포 및 CD8+세포의 population이 감소되어 六味地黃湯 투여가 T세포의 분화를 억제할 수 있음을 나타내었다. 또한 proliferation은 Con-A를 처리한 對照群의 세포생존율을 100(%)로 하였을 때, Con-A를 처리하지 않은 對照群(-)은 $78.5 \pm 2.8(\%)$ 로, 實驗群은 $88.5 \pm 2.5(\%)$ 로 T-lymphocytes의 세포생존율이 감소되어 六味地黃湯의 투여가 T세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여주었다.

또한 六味地黃湯을 투여하여 腹腔 macrophages의 phagocytic activity를 측정한 결과, 對照群에 비해 六味地黃湯을 투여한 實驗群은 phagocytic activity를 증가시켰고, NO의 생성량에서도 LPS와 IFN- γ 를 첨가하지 않은 對照群(-)은 $1.1 \pm 0.3(\mu\text{M})$ 이었으나 LPS와 IFN- γ 를 첨가한 對照群(+)은 $17.3 \pm 0.8(\mu\text{M})$ 로 증가하였고, 六味地黃湯을 투여한 實驗群에서도 $22.8 \pm 0.5(\mu\text{M})$ 로 對照群에 비해 NO 生成量이 증가되어 六味地黃湯이 복강 macrophages의 phagocytic activity를 활성화시킬 수 있음을 나타내었다.

以上과 같은 결과들을 미루어보면 선천적 면역인 非特異的 免疫은 先天之氣에 해당되고, 후천적 면역인 特異的 免疫은 後天之氣에 해당된다⁵⁹⁾라는 보고를 볼 때 六味地黃湯의 補陰效果는 선천적 면역에 해당되는 복강 macrophages의 機能과 相關性을 갖고 있으며, 後天的 免疫인 T세포와는 관련성이 없는 것으로 思料된다. 이에 韓醫學의 補陰效果는 先天之氣를 복돋아주는 동시에 면역학적으로는 선천적 면역의 증강에 효과가 있는 것으로 思料된다. 그러나 韓醫學의 補益과 西醫學의 免疫의 상관성에 대해서는 앞으로 더욱 더 연구를 진행해야 될 것이다.

V. 結 論

六味地黃湯을 마우스에 경구투여한 후 T세포의 apoptosis, sub-population 그리고 proliferation을 살펴보고, 또한 복강 macrophages의 phagocytic activity 및 NO의 생성량을 측정하였던 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 六味地黃湯은 T세포의 apoptosis에 영향을 미치지 못하였다.
2. 六味地黃湯은 T세포의 sub-population을 감소시켰다.
3. 六味地黃湯은 T세포의 proliferation을 감소시켰다.
4. 六味地黃湯은 macrophages의 phagocytic activity를 증가시켰다.
5. 六味地黃湯은 macrophages에서 생성되는 NO의 양을 증가시켰다.

VI. 要約文

免疫이란 異物은 물론 變異細胞를 非自己로 인식하여 처리함으로써 개체의 항상성을 유지하려는 현상으로 食細胞

나 保體가 관여하는 先天的 免疫과 T세포나 B세포가 관여하는 後天的 免疫으로 나뉘어진다.

T세포는 세포성 면역기능과 면역반응을 조절하는 동시에 식세포의 파괴작용을 도와 세포를 죽이는 작용을 하는데, 면역반응을 조절하는 기능에 따라 TH세포(협조 T세포)와 Tc세포(세포독성 T세포)로 구분된다. 그 중 Tc세포는 apoptosis를 촉진시켜주고, TH세포는 B세포의 증식과 함께 항체생산을 도와 준다.

한편, macrophages는 自他の 인식으로 노화하거나 상해를 받은 自己細胞, 침입미생물 또는 이물질을 탐식하여 생체의 항상성을 유지시켜주는 동시에 면역 활성물질을 생산하여 자연면역반응에 중요한 기능을 하고 있다.

세포의 증식을 억제하는 방법에는 necrosis와 apoptosis가 있는데, apoptosis란 necrosis와는 달리 정상세포내에 흩어져 있는 단일세포의 괴사기전을 설명한 것이고, NO는 L-arginine에 NO-synthase(NOS)가 작용하여 생성되는 것으로 그 중 iNOS는 활성화된 macrophages 및 여러 세포에서 발견된 이래 tumor cell을 선택적으로 파괴할 수 있기 때문에 macrophage-mediated tumor cytotoxicity로써 중요한 의미를 갖는다.

이에 저자는 六味地黃湯을 이용하여 T세포의 apoptosis, sub-population 그리고 proliferation을 살펴보고, 이와함께 腹腔 macrophages의 activity 및 NO의 생성량에 미치는 효과를 알아본 결과 六味地黃湯의 補陰效果는 선천적 면역에 해당되는 복강 macrophages의 機能과 相關性을 갖고 있는 것으로 思料되기 때문에 韓醫學의 補陰은 先天之氣 즉, 선천적 면역에 효과가 있는 것으로

기대된다.

VI. 參考文獻

- 楊維傑編 : 黃帝內經釋解, 서울:成輔社, 1980:263~267.
- 康命吉 : 濟衆新編, 서울:杏林書院, 1982:182.
- 傅芳 : 中醫免疫思想及成就, 新中醫, 1984;25(11):55~57.
- 김상호 외 4인 : 일반병리학, 서울:高文社, 1995:51~54, 348~349.
- 하대유 외 25인 : 免疫學, 서울:高文社, 1994:1~32, 109~114.
- Roitt, L. : Essential immunology(7th edition), London, Black Scientific publications, p. 4, 1991.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 1987:235, 473.
- Nakabo, Y., Harakawa, N., Yamamoto, K., Okuma, M., Uri, K. and Sasada, M. : Mechanism of leukemic cell lysis by activated human macrophages: leukemic cells can be lysed without direct contact. Int. J. Hematol, 1994;60(1):51~57.
- Biozzi, G., Stiefel, C., Mouton, D., Bouthillier Y., Deceusefound, C. : A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes, J. Immunol. Methods, 1968;14(1):7~20.
- Yamazaki, M., Tsunawaki, S. : Anti-tumor effect by leukocyte-derived active oxygens, Tanpakushitsu Kakusan Koso., 1988;33(16):3031~3036.
- McConkey, D.J., Orrenius, S., Jondal, M. : Cellular signaling programmed death(apoptosis). Immunol. Today., 1990;11(4):120~121.
- Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R.E., Jenkinson, E.J. and Owen, J.J. : Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures, Nature, 1989;337(6203):181~184.
- Zarnzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G. : Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med., 1995;181(5):1661~1672.
- Zhou, T., Edwards, C.K.3rd. and Mountz, J.D. : Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. J. Exp. Med., 1995;182(1):129~137.
- 錢乙 : 小兒藥證直訣, 江蘇, 江蘇科學技術出版社, 1983:5~6, 47~48.
- 周命新 : 醫門寶鑑, 서울:杏林書院, 1975:450.
- 李兆華編 : 腎與腎病的證治, 河北:河北人民出版社, 1979:32.
- 南京中醫學院編 : 中醫學, 江蘇:江蘇科學技術出版社, 1983:305~306.
- 戴克敏 : 常用中藥的藥理和應用, 江蘇:江蘇科學技術出版社, 1981:23~24, 47~49, 103~104, 173~176.
- 尹吉榮 : 東醫方劑學, 서울:高文社, 1980:51~52.
- 黃道淵 : 醫宗損益(上卷), 서울:醫藥社, 1976:466~467.
- 辛民教 : 本草維新, 서울:慶苑社, 1978:58, 78, 89, 91~92, 96~97.
- 汪詡庵 : 醫方集解, 서울:綜合醫苑社, 1976:1~2, 4.
- 武之望 : 濟陰綱目, 서울:柳林社, 1975:133.
- 許俊 : 東醫寶鑑, 서울:大星文化社, 1981:364~369.
- 金定濟 : 診療要鑑, 서울:東洋醫學研究院, 1974:189.
- 申信求 : 申氏本草學, 서울:壽文社, 1981:92, 102, 104, 357, 367, 694.
- 李尙仁·康舜洙 : 方劑學, 서울:螢雪出版社, 1979:41~43.
- 柳志允 : 六味地黃湯 및 八味地黃湯이 抗改良型 馬杉腎炎에 미치는 影響, 圓光漢醫大論文集, 1983;3:541~546.
- 金雨植·李東熙 : 六味地黃湯 煎湯液이 家兔血壓 및 白鼠肝 TBA식에 미치는 影響에 관한 研究, 慶熙漢醫大論文集, 1979;2:145~152.
- 金聖泰·曹東鉉·杜鎬京 : 加味地黃湯이 Streptozotocin投與 白鼠 血糖量에 미치는 影響, 慶熙漢醫大論文集, 1992;15:397.
- 金宇炫·申玟圭·金完熙 : 六味地黃湯 投與가 Rat의 成長 및 血清 總cholesterol含量에 미치는 影響, 慶熙漢醫大論文集, 1978;1:111~115.
- 金吉萱·洪茂昌·申玟圭·金完熙 : 運動

- 負荷後의 疲勞恢復에 미치는 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 果, 慶熙漢醫大論文集, 1984;7:121~134.
34. 李彥政 : 六味地黃湯 煎湯液이 腎性 高血壓 白鼠의 血壓 및 血漿 rene活性度에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院(博士), 1985.
 35. 李文鎬 : 六味地黃湯 및 八味地黃湯의 藥鍼이 腎臟機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院(博士), 1995.
 36. 卞晟喜 : 六味地黃湯 및 鹿茸加味方이 흰 쥐 糖尿에 對한 免疫組織化學的 研究, 慶山大學校 大學院(博士), 1993.
 37. 金宇炫 · 申玟圭 · 金完熙 : 六味地黃湯 投與가 Rat의 成長 및 血清總 Cholesterol 含量에 미치는 影響, 慶熙漢醫大論文集, 1978;1:111~115.
 38. 閔勇泰 : 補中益氣湯의 投與가 柴外線 照射로 低下된 마우스의 免疫 機能의 恢復에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院(博士), 1991.
 39. 정현우 · 문한주 : 黃芪와 杏仁이 免疫細胞의 Apoptosis 및 Nitric Oxide에 미치는 效果, 大韓方劑學會誌, 1998;6(1):175~186.
 40. 한중현 · 강성용 · 정현우 · 오찬호 · 권진 · 은재순 : 수중 보익제가 免疫細胞의 조절 및 Apoptosis에 미치는 影響, 大韓本草學會誌, 1997;12(1):85~93.
 41. 申載鏞 編著 : 方藥合編解說, 서울:成輔社, 1988:44.
 42. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. : "Planning" for lymphocytes; A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 1978;75(6):2844~2848.
 43. Mizel, S.B., Rosenstreich, D.L. : Regulation of lymphocyte- activating factor (LAF) production and secretion in P388D1 cells: identification of high molecular weight precursors of LAF. J. Immunol. Methods, 1979;122(6):2173~2179.
 44. Nicoletti, L., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, 1991;139(2):271~279.
 45. Suda, T. and Nagata, S. : Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 1994; 179(3):873~879.
 46. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 1983;65(1-2):55~63.
 47. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. Methods, 1990;129(1):23~30.
 48. Blair, A.L., Cree, L.A., Beck, J.S. and Hastings, M.J. : Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 1998;112(2):163~168.
 49. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line, J. Immunol. Methods, 1994;174(1-2):259~268.
 50. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, L.A. : Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immun., 1991;59(9):3280~3283.
 51. 이중달의 8인 譯 : 그림으로 보는 병리학, 서울:고려의학, 1990:99~124.
 52. Cohen, J.J. : Apoptosis, Immunology Today, 1993;14(3):126~130.
 53. Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J., 1992;6(12):3051~3064.
 54. Higuchi, M.M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. : Cytolytic mechanisms of activated macrophages; Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages, J. Immunol. Methods, 1990;144(4):1425~1431.
 55. Grisham, M.B., Ware, K., Gilleand, H.E.Jr., Gilleland, L.B., Abell, C.L. and Yamada, T. : Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. Gastroenterology, 1992;103(4) :1260~1266.
 56. 中國中醫研究院 : 正統 金匱要略, 서울:醫學研究社, 1987:148.
 57. 辛民教 : 臨床本草學, 서울:南山堂, 1986:253.
 58. 時逸人 : 中國藥物學, 北京:東方書店, 1960:59, 109, 187, 262~263, 275, 340~341.
 59. 史知洪 : 淺談祖國醫學中正氣與現代免疫學的關係, 新中醫, 1988;9:1~2.