

# 清心溫膽湯의 면역조절 효과

박민철 · 진재호 · 정한솔 · 이광규\*

우석대학교 한외과대학 병리학교실

## Immuno-Regulatory Effects of Cheongsimondam-tang

Min Chul Park, Jae Ho Jin, Han Sol Jung, Kwang Gyu Lee\*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effect of Cheongsimondam-tang(CSODT) on the activity of immune cell and anti-carcinogenic effect of mouse leukemia cell. The addition of CSODT(1  $\mu$ g/ml) enhanced the proliferation of cultured-splenocytes and thymocytes. And also administration of CSODT(500 mg/kg) accelerated subpopulation of splenic and thymic T lymphocytes especially CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub> cells in BALB/c mice. CSODT treatment decreased cell proliferation and increased apoptotic cell death of cultured-L1210 leukemia cells, and induced apoptosis in addition to decreased mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi$ m) of transplanted-L1210 cells *in vivo*. These results suggest that CSODT have a cellular immuno-regulatory effect and anti-cancer property action.

Key words : Cheongsimondam-tang(清心溫膽湯)

### 서론

韓醫學에서는 모든 질병의 발생을 外感六淫, 七情內傷, 飮食, 勞逸 등의 病因과 관계가 있는 것으로 보고 있으나 發病因子가 인체에 작용한 후에도 병이 일어나지 않을 수 있으며, 같은 發病因子라도 어떤 사람에게는 병을 일으키고 어떤 사람에게는 병을 일으키지 않는 수도 있다. 이러한 것은 防禦因子인 正氣에 달려있다고 보아 正氣의 虛損을 중요시하였다. 따라서 正氣란 인체의 抗病과 回復能力의 생리기능을 의미한다<sup>1)</sup>. 《素問·刺法論》에 “不相染者正氣存內 邪不可干 避其毒氣”이라 하여<sup>2)</sup> 正氣가 발병의 근본이고, 邪氣가 발병의 조건임을 나타내고 있다. “正氣”에 대한 개념을 서양의학적으로 살펴보면 백혈구가 체내로 침입해 들어온 자기의 조직과 비자기를 인식하여 그것을 파괴하고 소멸시키는 체계를 면역이라는 개념으로 알 수 있다<sup>3)</sup>. 면역계는 단일 장기이 기보다는 여러 기관에서 다양한 세포들로 이루어지는 하나의 기능적인 시스템으로 외계 또는 자신 내부에서 기원하는 병적인 존재들을 인식하고 제거하는 것이다. 이것은 크게 두 부류로 나누어 지는데 하나는 자연면역으로서 하등동물 및 고등동물의 전체에 존재하는 시스템으로 인체세포에 없는 다른 박테리아나 바이러스

등에만 존재하는 부분을 탐색한다. T림프구와 B림프구로 대표되는 적응면역은 척추동물 이후에만 발견되는 고도의 면역시스템으로서, 자연면역보다 그 초기대응속도에서는 느리지만 항원이 재차 침범할 경우 또는 항원침범 후 일정기간이 지난 후에는 매우 강력한 방어기전을 제공한다<sup>4)</sup>. 질병을 치료하는 법으로는 補益을 위주로 하는 “扶正法”과 清熱 涼血 解毒 위주의 “祛邪法”을 응용하여 왔다<sup>5)</sup>. 이 둘사이의 관계는 正氣와 邪氣의 消長관계에 의해 先扶正後祛邪, 先祛邪後扶正, 扶正과 祛邪를 동시에 병행하는 攻補兼施 등의 치법이 있다<sup>6)</sup>. 黃連溫膽湯과 定志丸을 가미하여 형성된 것이 清心溫膽湯이다<sup>7)</sup>. 본 방은 醫書에 따라 구성약물에 차이가 있고, 주치증도 각각 다르나 許浚<sup>8)</sup>의 清心溫膽湯에는 心血을 보강해주는 약이 더 첨가되어 攻補兼施하는 처방이라고 사려된다. 본 방에 대한 실험연구로는 김<sup>9)10)</sup> 등의 청심온담탕의 효능에 관한 실험적 연구와 청심온담탕이 백서의 항경련 해열 진통 진정 및 GABAergic system에 미치는 영향 등이 있으나 면역학적 활성에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 이에 治諸癩, 平肝解鬱, 清火化痰, 益心血하는 효능이 있는 清心溫膽湯을 재료로 하여 T, B림프구를 위주로 한 면역조절효과와 백혈병세포에서의 항암효과를 살펴보고자 비장 및 흉선세포의 생존율, 비장 및 흉선림프구의 아집단변화와 백혈병세포주인 L1210세포의 *in vitro*계와 *in vivo*계에서의 apoptosis에 미치는 효과 등을 관찰한 결과, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 이광규, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한외과대학  
E-mail: kwangl@core.woosuk.ac.kr Tel: 063-290-1562

· 접수 : 2002/09/16 · 수정 : 2002/10/30 · 채택 : 2002/12/02

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 음성(8주령, 20±2 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide, ethidium bromide, triton X-100, RNase A, proteinase K, sodium dodesyl sulfate, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6), Concanavalin A, lipopolysaccharide, carbamoylcyanide, m-chlorophenylhydrazone (mClCCP) 등은 Sigma Co., PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 antibody 등은 Caltag Co., 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로서는 culture flask(Nunc), 96well microtiter plate(Costar Co.), inverted microscope(Zeiss), flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), ELISA reader(Dynatech, MR5000) 그 외 centrifuge(VS -15000CF), CO2 incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision Scientific Co.의 제품을 사용하였다.

### 3. 검약의 조제

본 실험에 사용한 淸心溫膽湯(CSODT)의 구성은 『東醫寶鑑』<sup>9)</sup>에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 한방병원에서 정선해서 사용하였고, 처방 2첩 분량(120 g)을 증류수 2000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과해서 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 18 g(수득율: 15%)을 얻어(이하 CSODT라 함), 동물실험시에는 생리식염수, 세포배양용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 淸心溫膽湯 1貼의 처방구성내용은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Cheongsimondam-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
姜黃連	Coptidis Rhizoma	4
半夏	Pinelliae Rhizoma	4
陳皮	Citri Pericarpium	4
茯苓	Poria	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.6
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	4
竹茹	Bambusae concretio Silicea	4
枳實	Aurantii immaturus Fructus	4
人參	Ginseng Radix	2.4
菖蒲	Acori graminei Rhizoma	4
遠志	Polygalae Radix	2.4
白朮	Attractylodis macrocephalae Rhizoma	4
麥門冬	Liriois Tuber	3.2
香附子	Cyperi Rhizoma	4
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	4
川芎	Cnidii Rhizoma	2.4
總量		60

### 1. In vitro계에서 비장 및 흉선세포의 생존율 측정

생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여 1×10<sup>6</sup>cells/well이 되도록 세포수를 조정하고 비장세포 부유액에는 LPS(5 μg/ml), 흉선세포 부유액에는 Con A(0.5 μg/ml)를 첨가하고 여기에 CSODT(1~1000 μg/ml)를 가하여 48시간 동안 37℃의 CO<sub>2</sub>배양기(5%-CO<sub>2</sub>, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μl를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μl로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>11)</sup>.

### 2. 비장 및 흉선림프구의 아집단(Subpopulation) 측정

생쥐에 CSODT(500 mg/kg body weight)를 7일 동안 경구 투여(p.o)한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 다음, 각 세포 부유액을 조제하여 1×10<sup>6</sup>cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:40 dilution)로 이중 염색하여 4℃에서 30분간 반응시키고 laser flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다<sup>12)</sup>.

### 3. L1210세포의 DNA fragmentation 측정(in vitro)

계대배양 중인 L1210세포(mouse leukemia cell)를 96 well culture plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 세포를 조정하고, 1, 10 및 100 μg/ml의 CSODT를 첨가하여 24시간 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 PI로 염색하여 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다.

### 4. 복강에 이식한 L1210세포의 flow cytometer에 의한 apoptosis 측정(in vivo)

생쥐에 5×10<sup>6</sup>cells/ml의 L1210(mouse leukemia)세포를 복강 내 주사(i.p)한 다음 CSODT(500 mg/kg body weight)를 7일간 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 복강에서 L1210세포를 무균적으로 수집하고 세포부유액을 조제해서 세정(×3회, PBS)한 후, 1×10<sup>6</sup>cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원심분리(250g, 10분, 4℃)하고 침전시킨 세포분획에 PI(10 μg/ml)를 20 μl/1×10<sup>6</sup>세포의 농도로 염색(4℃, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm emission: 620 nm)를 이용하여 DNA fragmentation(sub-G1 peak)을 정량하였다<sup>13)</sup>.

### 5. 복강에 이식한 L1210세포의 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm) 측정

생쥐에 5×10<sup>6</sup>cells/ml의 L1210세포를 복강 내 주사(i.p)한 다음 CSODT(500 mg/kg)를 7일간 경구 투여한 후, 생쥐를 경추 탈구시켜 복강에서 L1210세포를 무균적으로 수집하고 세정(×3회, PBS)한 후, 1×10<sup>6</sup>cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원

심분리(250g, 10분, 4°C)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC6(최종농도: 40nM)로 염색시켜 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm emission: 525 nm)로서 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )을 측정하였으며, 이때 negative control로서 uncoupling agent로서 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone(mCICCP, 50  $\mu$ M)을 가하여 동일한 방법으로 측정하였다<sup>14)</sup>.

6. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며,  $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험 결과

1. CSODT가 in vitro계에서 脾臟 및 胸線세포의 생존율에 미치는 효과

생쥐의 脾臟세포 배양계에서 대조군인 LPS(5  $\mu$ g/ml)군에 비하여 특히 CSODT 1  $\mu$ g/ml 첨가군에서 脾臟세포의 유의성있는 증식이 관찰되었으며, 또한 흉선세포 배양계에서도 대조군인 Con A(0.5  $\mu$ g/ml)군에 비하여 특히 CSODT 1  $\mu$ g/ml 첨가군에서 흉선세포의 증식을 현저하게 촉진시키는 효과를 나타내었다(Fig. 1). 그러나 1000  $\mu$ g/ml의 CSODT 첨가시에는 면역세포의 활성이 저하되었는데 이는 고농도(1000  $\mu$ g/ml)에서 세포독성이 일어난 것으로 추정되며, 저농도(1  $\mu$ g/ml)의 CSODT가 면역세포의 증식을 유의성있게 촉진하여 면역세포의 활성을 증강시키는 효능이 있는 것으로 사료된다.

2. CSODT가 脾臟 및 胸線림프구의 아집단에 미치는 효과

CSODT를 1주일간 경구 투여한 생쥐의 脾臟 및 흉선세포의 아집단변화를 살펴본 결과, 脾臟세포는 대조군에서 B, T세포가 각각  $36.9 \pm 2.9\%$  및  $20.7 \pm 2.1\%$ 이고 CSODT 투여군에서 각각  $40.5 \pm 3.6\%$  및  $25.6 \pm 1.7\%$ 로 특히 T세포가 증가하였으며, 脾臟내 T세포 중에서는 대조군에서의 TH세포가  $13.1 \pm 1.1\%$ , Tc세포는  $5.4 \pm 0.4\%$ 이고 CSODT 처리군은 각각  $17.2 \pm 1.4\%$  및  $7.9 \pm 0.6\%$ 로 TH세포 및 TC세포가 유의성있게 증가하였다. 또한 흉선세포에서는 대조군에서 TH세포가  $10.7 \pm 1.0\%$ , Tc세포는  $5.5 \pm 0.4\%$ 인데 비하여 CSODT 투여군은 각각  $13.9 \pm 0.9\%$  및  $6.8 \pm 0.7\%$ 로 특히 TH세포가 증가되었다(Table 2). 이 결과는 CSODT이 脾臟 및 흉선 내의 T림프구를 증가시켰으며 특히 脾臟에서는 T세포 아집단분석 결과 TH 및 TC세포의 population이 모두 증가되었고, 흉선 내 T림프구 중에서는 특히 TH세포를 증가시켜 생체 면역력을 증강시키는 것으로 추정된다.

3. CSODT가 배양 L1210세포의 생존율에 미치는 효과

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포를 계대배양해서 CSODT(1, 10 및 100  $\mu$ g/ml)를 가하여 L1210세포의 생존율을 살펴본 결과(Fig. 2), 대조군에 비하여 10 및 100  $\mu$ g/ml의 CSODT처리군에서 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 CSODT가 L1210세포에 대한

증식억제작용을 가지는 anti-carcinogenic 효과가 있음을 나타내고 있다.

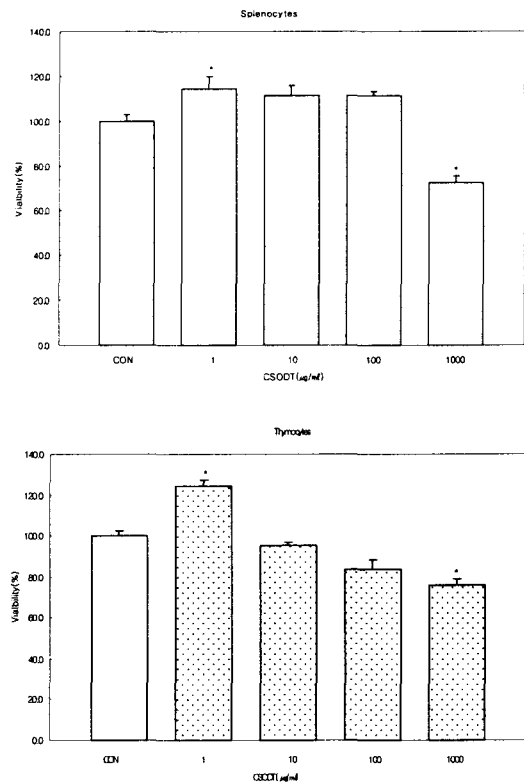


Fig. 1. Effect of CSODT on the cell viability in cultured mouse splenocytes and thymocytes in vitro. CSODT(1~1000  $\mu$ g/ml) were treated to cultured mouse splenocytes or thymocytes for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean  $\pm$  S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group( $p < 0.05$ ).

Table 2. Effect of CSODT on the lymphocyte subpopulation change in mouse splenocytes and thymocytes.

Treatment	Cells	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)		
		B cell	T cell		T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub>
			T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub>		
CONTROL	$36.9 \pm 2.9$	$13.1 \pm 1.1$	$5.4 \pm 0.4$	$10.7 \pm 1.0$	$5.5 \pm 0.4$	
CSODT	$40.5 \pm 3.6$	$17.2 \pm 1.4^*$	$7.9 \pm 0.6^*$	$13.9 \pm 0.9^*$	$6.8 \pm 0.7$	

CSODT (500 mg/kg body weight) was administered p.o. once a day for 7 days, thereafter each cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with PE or FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. Each data represents the mean  $\pm$  S.E of 5 mice. \*: Significantly different from control group( $p < 0.05$ ).

4. CSODT가 계대배양 L1210세포의 apoptosis에 미치는 효과

L1210세포 배양계에 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml 농도의 CSODT를 첨가해서 24시간 또는 48시간동안 배양해서 sub-G1 peak를 측정 한 결과, 24시간 배양시 대조군에서  $16.2 \pm 1.3\%$ 인데 비하여 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml 농도의 CSODT 첨가군에서 각각  $24.7 \pm 2.4$ ,  $31.5 \pm 2.9$  및  $42.7 \pm 3.5\%$ 로서 L1210세포의 apoptotic cell death가 농도의 의존적으로 촉진되었으며, 또한 48시간 배양한 결과에서도 대조

군에서 25.6±2.4%에 비하여 각각의 농도의 CSODT 첨가에 의해 각각 49.5±3.9, 63.1±5.2 및 75.3±5.9%로 CSODT 첨가군에서 apoptosis가 현저하게 촉진되었다(Table 3). 이 결과로 미루어보아 CSODT가 유의성있는 항암효과를 가지고 있음으로써 항암요법제로서의 개발가능성이 있는 것으로 사료된다.

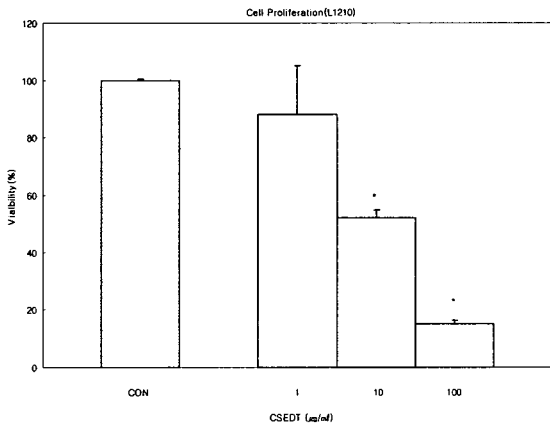


Fig. 2 Effect of CSODT on the cell viability in cultured L1210 leukemia cells. CSODT(1~1000 μg/ml) were treated to cultured L1210 mouse leukemia cells for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each data represents the mean±S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

Table 3. Effect of CSODT on the apoptosis of cultured-L1210 leukemia cells.

Treatment(μg/ml)	Apoptosis (%)	
	24 hours	48 hours
CONTROL	16.2±1.3	25.6±2.4
CSODT (1.0)	24.7±2.4*	49.5±3.9*
CSODT (10)	31.5±2.9*	63.1±5.2*
CSODT (100)	42.7±3.5*	75.3±5.9*

CSODT (1-100 μg/ml) was treated with cultured L1210 cells, and incubated for 24 or 48 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±S.E of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

5. CSODT가 이식된 L1210세포의 apoptosis에 미치는 효과(in vivo)

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포를 생쥐의 복강에 이식하고 CSODT를 7일간 경구 투여한 다음 복강에 이식된 L1210세포를 수집하여 sub-G1 peak를 측정된 결과, 대조군은 10.6±2.5%인데 비하여 CSODT를 투여한 군에서는 29.3±3.1%로 복강에 이식한 L1210세포의 apoptosis가 촉진되었다(Fig. 3). 이는 CSODT가 생체에 이식시킨 백혈병세포에 대한 직접적인 항암활성을 보유하고 있는 결과로서 매우 의미 있는 결과라 사료된다.

6. CSODT가 이식된 L1210세포의 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)에 미치는 효과

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포를 생쥐 복강에 이식하고 CSODT를 7일간 경구투여한 다음 복강에 이식된 L1210세포를 수집하여 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)을 관찰한 결과, 대조군(81.7±5.3%)에 비하여 CSODT투여군에서 68.1±4.9%로 ΔΨm가 유의성있게 감소되었다(Fig. 4). ΔΨm의 감소

는 세포의 apoptosis가 일어날 때 선행되는 필수조건으로 보고<sup>14)</sup>되어 있는데 CSODT가 L1210세포의 apoptosis를 촉진하는데 있어서 이러한 ΔΨm의 감소가 촉진되어 일어난 결과로 사료된다.

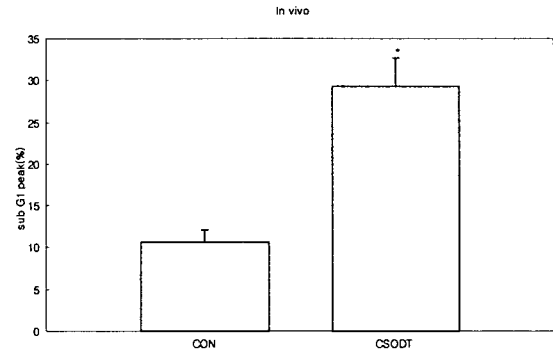


Fig. 3. Effect of CSODT on the apoptosis of transplanted-L1210 leukemia cells. L1210 leukemia cells transplanted to peritoneal cavity of BALB/c mouse. CSODT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. Transplanted-L1210 cells were collected from peritoneal cavity and sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

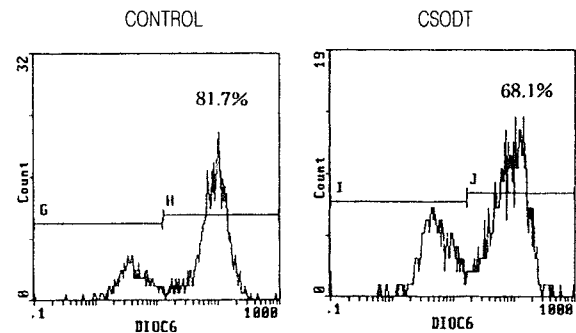


Fig. 4. Effect of CSODT on the mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm) of transplanted-L1210 leukemia cells. L1210 leukemia cells transplanted to peritoneal cavity of BALB/c mouse. CSODT(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. Transplanted-L1210 cells were collected from peritoneal cavity and ΔΨm was measured by a laser flow cytometer staining with DiOC6 (40nM). CONTROL : Normal saline administered group. CSODT : CSODT(500 mg/kg) administered group

고찰

인체내의 氣血津液과 精, 陰陽 臟腑 經絡 등이 모두 상호 依存과 制約속에서 상대적으로 평형상태를 이루면 건강하다고 할 수 있다. 이러한 상대적 평형상태가 각종 발병인자에 의해 파괴되면 질병이 발생된다. 이 질병의 발생과 進展은 氣血津液과 精 陰陽 臟腑 經絡등의 기능을 바탕으로 하는 “正氣”와 발병인자를 지칭하는 “邪氣”와의 투쟁관계 즉 正氣와 邪氣의 消長 進退과정이라고 말할 수 있다. 正氣란 인체가 邪氣의 침범과 생활환경에 저항하는 능력으로, 臟腑 經絡 氣血의 전반적인 생리 기능에서 생성되는 元氣, 혹은 眞氣로 대표되는 반면, 邪氣는 六淫뿐만 아니라 인체 내의 陰陽失調로 야기된 병리변화 및 음식, 노권, 담음 등의 一切 발병 요인을 말하는 것이다<sup>15)16)</sup>. 林<sup>17)</sup>

에 의하면 正氣에는 邪氣를 제거하고 陰陽을 조절하여 인체를 보호하는 작용이 있으므로 생체의 면역조절기능이 있음을 알 수 있다고 하였고, 趙<sup>18)</sup>는 韓醫學에서 말하는 正氣는 비특이적인 방어기능 및 이와 연관되는 방어물질들을 총칭한다고 하여 正氣를 면역의 개념으로 설명하였다. 免疫에 대한 문헌은 《素問·刺法論》<sup>1)</sup>에 "正氣存內 邪不可干", 《素問·評熱病論》<sup>19)</sup>에 "邪氣所湊 其氣必虛"라 하여 正氣가 邪氣와 相爭함으로써 人體를 防禦하는 기능을 수행한다고 하였다. 때문에 면역질환을 치료하는 법으로는 正氣의 補益을 위주로 하는 "扶正法"과 邪氣를 제거해주는 것을 위주로 하는 "祛邪法"등을 적절하게 사용하여 왔다<sup>20)</sup>. 이 둘사이의 관계는 正氣와 邪氣의 消長관계에 의해 先扶正後祛邪, 先祛邪後扶正, 扶正과 祛邪를 동시에 병행하는 攻補兼施의 처방 등이 있다<sup>6)</sup>. 扶正法으로는 補氣法 補血法 補陽法 補陰法 등이 있으며 祛邪法으로는 發汗解表 清熱瀉火 解毒 祛痰 利濕 活血化癥 瀉下등이 있다<sup>21)</sup>. 또는 이 둘을 적절하게 배합해서 치료하는 攻補兼施적 방법이 있는데, 이것의 특징은 攻下法을 쓰되 그 중에 補法도 함께 하여 攻下로 인한 正氣의 損傷을 보호해주며, 補法中에도 攻下藥을 함께 하여 邪氣가 오히려 왕성해 지는 것을 막는 역할을 하게 한다<sup>6)</sup>. "正氣"에 대한 개념을 서양의학적으로 살펴보면 백혈구가 체내로 침입해 들어온 자기의 조직과 비자기를 인식하여 그것을 파괴하고 소멸시키는 체계인 면역이라는 개념을 통해서 알 수 있다<sup>3)</sup>. 외부 병원체로부터 인체를 보호하는 데 관여하는 면역체계는 크게 선천성(비적응성)면역과 후천성(적응성)면역으로 나눌 수 있다. 적응성 면역에서의 면역반응은 특별한 병원체에 대한 특이성을 나타내며, 감염원을 기억하고 있어서 나중에 똑같은 항원이 다시 들어왔을 때 질병을 야기시키지 못하도록 막아주는 기능을 담당하고 있다. 선천성 면역을 대표하는 세포로는 단구, 대식세포, 다형핵 호중구 등의 탐식세포가 있으며, 이들은 미생물을 비특이적으로 인식하여 탐식하는 역할을 한다. 후천성 면역을 담당하는 중요한 세포로 림프구가 있는데, 이들은 각각의 병원체를 특이적으로 인식한다. 림프구에는 몇 가지 종류가 있는데 크게 T세포와 B세포로 나눌 수 있다. B세포는 표적분자인 항원을 특이하게 인식하고 결합하는 항체를 분비함으로써 병원균과 싸우며, T세포는 다방면의 기능을 수행한다. 어떤 T세포는 B세포의 성장과 항체의 분비를 조절하는데 관여하며, 어떤 T세포는 식세포와 작용을 하여 식세포로 하여금 병원체를 파괴하는데 도움을 준다. 또 다른 T세포는 바이러스에 감염된 세포를 인식하고 파괴시킨다<sup>22)</sup>. 면역의 주된 기능으로는 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데 첫째, 방어기능은 외부로부터의 면역자극에 대한 반응을 나타내는 기능으로, 미생물의 자극에 대한 방어기능이 비정상적으로 과도하게 나타나면 알레르기 반응을 보이고, 반대로 비정상적으로 낮게 나타나는 경우에는 건강인에게는 전혀 문제가 되지 않는 미생물에 대해서도 감염되는 소위 "기회감염"을 일으키게 된다. 둘째, 항상성 유지기능은 생체의 내부환경을 항상 평형상태로 유지(homeostasis) 시켜주는 기능으로, 어떤 면역자극에 의해 이 기능이 지나치게 커지게 되면 면역계 고유의 기능인 "자기(self)"와 "비자기

(nonsel)"를 판별할 능력을 잃게 되어 소위 "자기면역질환"을 일으키게 된다. 셋째, 감독기능이란 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이를 일으킨 세포를 제거하도록 하는 기능으로서, 감독기능이 제대로 되지 못할 경우에는 변이된 세포를 제거하지 못하는 결과를 초래하여 악성종양을 일으킬 수 있다<sup>23)</sup>. 면역기능을 증강시키는 방법으로 한의학에서는 "扶正"法과 "祛邪法"이 있으나 주로 "扶正法"을 위주로 사용한다고 주장하고 있다<sup>9)</sup>. 扶正法은 다시 補氣法, 補血法, 補陰法, 補陽法으로 세분해 지는데 이 중 補氣·補血法을 이용하여 면역기능을 연구한 논문으로는 尹<sup>9)</sup>이 있다. 뿐만 아니라 둘을 적절하게 배합해서 치료하는 攻補兼施적 방법이 있어 攻下法을 쓰되 그 중에 補法도 함께 하여 攻下로 인한 正氣의 損傷을 보호해주며, 補法中에도 攻下藥을 함께 하여 邪氣가 오히려 왕성해 지는 것을 막는 역할을 하게 한다<sup>6)</sup>. 清心溫膽湯은 《六因條辨》의 黃連溫膽湯<sup>24)</sup>과 《得效方》의 定志丸<sup>25)</sup>이 합방된 처방으로 心膽虛損, 氣血不足에다가 肝氣鬱熱로 오는 癩疾에 사용한다고 하였는데, 본 처방의 처방이 攻補兼施적 방법이라고 사려된다. 本處方의 구성 약물에 대한 연구보고를 살펴보면, 黃連은 苦寒한 性味の 清熱燥濕, 瀉火解毒하는 약물로 생쥐의 腹腔大食細胞의 탐식기능을 높이고, 異物質에 대한 消化를 促進시키며<sup>26)</sup>, 큰 쥐의 足腫, 肉芽腫의 성장을 경감시키는 抗炎작용이 보고되었다<sup>27)</sup>. 茯苓은 淡平한 性味の 利水滲濕, 健脾安神하는 약물로 복강대식세포와 흉선의 림프구를 활성화시킴으로 免疫機能을 증강시키며<sup>28)</sup>, 일정한 抗腫瘤作用을 가진다고 보고되었다<sup>29)</sup>. 半夏는 辛溫한 性味の 燥濕化痰, 降逆止嘔의 약물로서 vivo 실험에서 腫痛 HCA, S180과 vitro 실험에서 Hela 세포에 대해 확실한 억제작용이 있음이 보고되었고<sup>30,31)</sup>, 半夏에서 分離한 葡萄糖은 免疫系統의 活性를 刺戟한다고 보고되었다<sup>32)</sup>. 白芍藥은 苦酸微寒한 性味の 養血斂陰, 柔肝止痛하는 약물로 leukotrienes의 생성과 연관되어 人體의 細胞免疫과 體液免疫 및 大食細胞의 機能을 調節한다고 보고되었고<sup>33)</sup>, 생쥐의 腹腔大食細胞의 탐식기능을 활성화시키고, T림프구를 억제시키는 cytokine에 대해 拮抗作用을 하며, 생쥐의 脾細胞의 抗體生成을 촉진시키며, 생쥐의 SRBC에 대한 特異性 體液免疫反應을 증가시키는 것으로 보고되었다<sup>34)</sup>. 遠志는 辛苦微溫한 性味の 安神益智, 消腫止痛하는 약물로 遠志의 水溶液에서 추출한 물질에는 돌연변이를 抑制하는 作用과 抗癌作用이 있는 것으로 보고되었고<sup>35,36)</sup>, 생쥐의 P388임파세포성백혈병에 抑制作用을 나타내는 것으로 보고되었다<sup>37)</sup>. 이와 같이 면역과 항암효과를 나타내는 약물로 구성된 清心溫膽湯을 재료로 하여 면역조절효과와 백혈병세포에서의 항암능력을 살펴보고자 비장 및 흉선세포의 증식, 림프구 아집단에 미치는 효과 및 백혈병세포의 apoptosis에 미치는 효과 등을 관찰하였다. 清心溫膽湯은 비장 및 흉선림프구의 증식을 촉진하였으며 또한 비장 및 흉선세포의 아집단을 분석한 결과, 특히 T림프구의 population을 증가시켰으며 특히 TH세포의 population을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 보인다. TH세포는 생체 내에서 적응성 면역을 담당하며, B세포의 활성화와 항체의 생산 및 대식세포의 활성을 도와주는 주요한 세포로서 清心溫膽湯이 생

체내에서 면역작용에 가장 중심적인 역할을 수행하는 T림프구(특히 TH세포)의 증식을 촉진하는 작용을 보유하고 있는 점에서 주목된다. 또한 항암활성을 관찰하기 위하여 in vivo와 in vitro계에서 flow cytometer에 의한 sub-G1 peak를 측정하여 apoptosis를 관찰하였다. Apoptosis는 1972년 Kerr, Willie 및 Currie박사가 조직의 괴사와는 전혀 다른 세포의 사망기전을 최초로 설명하면서 비롯되었는데 세포가 죽을 때 사전에 이미 준비된 상태에서 사망 프로그램을 가동시킴으로써 능동적인 죽음을 맞이한다는 개념이다<sup>38)</sup>. 지금까지 보고된 결과에 의하면 면역계의 apoptosis를 일으키는 환경성 인자로 glucocorticoid와 감마선조사 그리고 T세포 수용체(TCR)의 자극<sup>39)</sup> 등이 매우 중요한 factor로 알려져 있다. apoptosis의 기전은 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 chromatin과 세포내 소기관을 내포한 작은 세포체인 apoptotic body로 나뉘어지고, 마지막에는 주변의 macrophage 등의 탐식세포에 의해 처리되는 것이 특징이다. Apoptosis가 일어난 세포의 핵 chromatin 농축이 일어날 때는 DNA가 180~200개의 염기로 절단(DNA fragmentation)되어 나타나는데 이것은 핵내의 내인성 nuclease의 활성화 때문인 것으로 보고<sup>40)</sup>되었으며, 이러한 DNA 단편화는 전기영동상에서 DNA ladder로서 관찰되는 것이 특징이다. 그러나 만약 이러한 apoptosis 기전과 면역기전에 이상이 발생되면 알러지를 비롯한 암, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 AIDS 등의 질환을 초래하는 결과로 이행된다고 알려지면서<sup>41)</sup> 암을 치료하려는 많은 연구에 도입되고 있는 실정이다. 그리하여 본 방이 L1210세포의 apoptosis에 미치는 영향을 관찰한 결과 계대배양한 L1210세포와 생쥐의 복강 내에 이식한 L1210세포의 apoptosis를 현저히 촉진시키는 것으로 나타났다. 이 결과는 CSODT의 항암효능을 입증하는 것이다. 이상의 실험결과 淸心溫膽湯은 免疫細胞(T, B림프구)의 活性를 增強시켰으며 암세포에 대한 抗癌作用을 보유하고 있어서 免疫調節劑로서의 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

淸心溫膽湯(CSODT)의 in vivo 및 in vitro에서의 免疫細胞의 活性 및 白血病細胞의 apoptosis에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다. CSODT는 in vitro 培養系에서 脾臟 및 胸腺 세포의 增殖를 促進시켰다. in vivo實驗에서 脾臟 T림프구의 TH 세포 및 TC세포를 유의성 있게 增加시켰으며, 胸腺細胞에서는 TH세포를 유의성 있게 增加시켰다. 계대배양한 L1210세포의 생존율을 減少시켰고, apoptosis를 농도의존적으로 促進시켰다. 腹腔에 移植한 L1210세포의 apoptosis를 促進시켰으며, 腹腔에 移植한 L1210세포의 mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi$  m)을 유의성 있게 減少시켰다. 이상의 實驗 結果, 淸心溫膽湯은 생체 내 혹은 시험관 내 실험에서 전반적으로 免疫細胞의 活性를 增強시켰으며, 白血病細胞의 增殖抑制 및 apoptosis促進 등의 抗癌作用을 보임으로써 免疫調節劑 및 抗癌療法劑로서의 효과가 관찰되었다.

## 참고문헌

1. 전국한의과대학 병리학교실 편: 동의병리학, 일증사, pp.187-188, 1999.
2. 金達鎬, 李鍾聲: 注解 補注 黃帝內經素問(全) 下卷, 醫聖堂, p.746, 2001.
3. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Poper, J.S.: Cellular and molecular immunology. 2: 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A, 1994.
4. 대한병리학회: 병리학 (제4판), 고문사, p.127, 2001
5. 광동중의학원: 중의방약학, 중국, 광동인민출판사, p.7, 1973.
6. 楊醫井 主編: 中醫學問答 上冊, 人民衛生出版社, p.121, 1985.
7. 江克明 外1人: 校訂方劑大辭典, 도서출판의성당, p.1037, 1990.
8. 許浚 著, 東醫寶鑑國譯委員會 譯: 東醫寶鑑, 법민문화사, p.195, 1999.
9. 김인섭: 淸心溫膽湯의 效能에 關한 실험적 연구, 경희대 석사학위논문, 1992.
10. 김재형: 청심온담탕이 백서의 항경련, 해열, 진통, 진정 및 GABAergic system에 미치는 영향, 대전대 석사학위논문, 1995.
11. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65: 55-63, 1983.
12. Shortman, K. and Backson, H.: The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. Cell. Immunol., 12: 230-246, 1974.
13. 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: 271-279, 1991.
14. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L. Petit, P.P.X. and Kroemer, G.: Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med., 181, 1661-1672, 1995.
15. 宋驚永: 中醫病因病機學. 北京, 人民衛生出版社, pp.62-67, 1987.
16. 鄭遇悅: 韓方病理學. 全州, 三進社, pp.15-17, 94-95, 1988.
17. 林通國 編著: 實用臨證中藥指南, 四川科學技術出版社, pp.180-182, 1990.
18. 趙鍾寬: 免疫에 關한 東洋醫學的 考察, 東洋醫學 12(1): 19-23, 1986.
19. 楊維傑: 黃帝內經素問解釋, 서울, 成輔社, p.3, 266, 1980
20. 광동중의학원: 중의방약학, 중국, 광동인민출판사, p.7, 1973.
21. 王明輝: 中醫是怎樣治病的(修訂本) 人民衛生出版社, p.17, 1996.
22. Roitt, Brostoff, Male: Immunology sixth edition, Mosby, p.2, 2001.

23. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D.: Immunology. 4th Ed. 1.1-2.18, Mosby Publishing, U.K, 1998
24. 江克明, 包明慧: 校訂 方劑大辭典, 圖書出版 醫聖堂, p.982, 1991.
25. 許浚 著, 東醫寶鑑國譯委員會 譯: 東醫寶鑑, 법인문화사, p.190, 1999.
26. 張明華 小檗碱的抗整體小鼠缺氧作用, 中國藥理學通報, p.7, 1991.
27. 万民德 等: 中國生理科學會論文摘要匯編, p.77, 1964.
28. 山口一香: 朝鮮醫學會志, (86) p.173, 1928.
29. 顏正華: 中藥學, 人民衛生出版社, p.329, 1991.
30. 雷載權, 張廷模: 中華臨床中藥學, 人民衛生出版社, p.1289, 1998.
31. KimChongSuk et al, Koryo Teahekkyo, Vnikwa Teahak Nonmunjip, pp.22~375, 1985.
32. 權田良子 等: 半夏中具有免疫系統激活活性的葡聚糖的分離及性狀. 國外醫學, 中醫中藥分冊, p.44, 1995.
33. 雷載權, 張廷模: 中華臨床中藥學, 人民衛生出版社, p.1429, 1998.
34. 梁曼若: 新中醫, p.51, 1989.
35. 雷載權, 張廷模: 中華臨床中藥學, 人民衛生出版社, p.1520, 1998.
36. 黃秦康 主編: 常用中藥成分與藥理手冊, 中國醫藥科學技術出版社, p.741, 1994.
37. 王黎 等: 最新中藥藥理與臨床應用, 華夏出版社, p.393, 1999.
38. Willie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R.: The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 68: 251-306, 1980.
39. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179: 873-879, 1994.
40. Willie, A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature, 284: 555-556, 1980.
41. 金鐘暉: 臨床免疫學的展望, 大韓醫學協會誌 21(7): 546-551, 1978.