

온열환경과 부자이중탕(附子理中湯)이 Rat의 면역반응 및 지질대사에 미치는 효과

노현인, 윤다래, 이서라, 이인희, 홍성인¹, 류재환²
경희대학교 한의과대학 내과학교실, ¹경희의료원 한방병원 동서협진실, ²경희대학교 동서의학대학원 동서학과

The Effect of Warm Environment and *Bujaijung-tang* on Immune and Lipid Metabolism in Rats

Hyun-in Noh, Da-rae Yoon, Seo-ra Yi, In-hee Lee, Sung-in Hong¹, Jae-hwan Ryu²

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee university

¹Dept. of East-west integrated medicine, Kyung-Hee Oriental Medical Hospital

²East-west medicine department, Graduate school of east-west medical science, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to test the effect of a warm environment and *Bujaijung-tang* on immune and lipid metabolism in rats.

Methods : The extract from *Bujaijung-tang* was made by the pharmacy department of Kyung-Hee oriental medical hospital. The animals were divided into four groups, by room or warm environment and *Bujaijung-tang* administration. Each group had 8 Sprague-Dawley Rats. We measured body temperature twice a week, body weight three times a week. After 3 weeks of experiment, serum lipid level, WBC, differential count, lymphocyte proliferation and immune cytokine concentration were measured.

Results :

1. warm environment induced weight loss in rats.
2. warm environment induced a decrease of total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol gain.
3. warm environment and *Bujaijung-tang* induced an increase of tumor necrosis factor (TNF)- α concentration.

Conclusions : The warm environment had a hyperlipidemia modulating effect. The warm environment and *Bujaijung-tang* had an immune modulating effect.

Key words : warm environment, *Bujaijung-tang*, body weight, lipid, immune, TNF- α

1. 서론

현대의학이 발전하고 있음에도 불구하고 인류에

게 질환은 끊임없이 위협이 되고 있다. 특히 감염에 의한 발병은 항생제가 발전하면서 치료율이 높아지고 있지만, 전반적으로 약해진 인체 면역시스템과 증가되는 환경오염, 스트레스 등의 요인도 발병요인이 되는 것으로 생각되고 있다. 암이나 AIDS, SARS 같은 난치성 질환 뿐만 아니라, 천식, allergy 같은 현대인에게 증가하는 질환들도 일면에서는 개인의 내재된 면역 균형, 항상성이 깨지면서 생겨난다고 볼 수 있다¹.

· 교신저자: 류재환 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 3313호 동서협진실
TEL: 02-958-1812 FAX: 02-958-9212
E-mail: intmed@khu.ac.kr

· 이 논문은 2013년도 경희대학교 동서의학대학원 한의학 석사학위 논문임.

한의학에서 邪氣는 인체 내외 환경 중에서 질병을 일으키는 여러 종류의 인자를 총칭하고 眞氣 혹은 正氣는 생체의 정상적인 기능을 말한다. 正氣와 邪氣가 충돌하게 되면 질병이 발생하게 되고 적절한 치료 수단을 통하여 正氣를 도와 질병을 치료한다². 면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로, 正氣는 외부로부터 침입하는 미생물 동종의 조직이나 체내에서 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들며 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하고자 하는 면역의 의미와 상통하며, 한의학에서의 면역의 개념은 보다 광범위한 의미를 가지고 있다³.

최근에는 면역요법의 하나인 종양면역이 각광을 받게 되면서⁴ 한의학적 면역 개념에 기반한 면역 증진 및 항종양요법과 관련된 한의학적 약물연구⁵⁻¹²가 활발히 진행되고 있다.

온열환경과 면역증진 관련성에 관한 연구로는 고체온 요법을 이용한 종양치료 연구¹³, 발열 상태에서 숙주 보호 및 cytokine 증진 효과¹⁴, 고온 환경에서 microphage 기능 발현 증진 효과¹⁵ 등의 연구가 발표된 바 있다. 특히 동일한 바이러스를 주입했을 때 각 군당 4 °C 차이가 나는 22 °C, 26 °C, 30 °C 온도의 환경 중 30 °C 환경에서 mouse의 항염증 및 면역증진효과¹⁶가 있었다. 따라서 본 연구에서는 24 °C 상온환경과 상온보다 4 °C 높은 28 °C 온열환경을 제공하였다.

附子理中湯은 陳師文의 《太平惠民和劑局方》¹⁷에서 脾陽虛證, 胃寒證, 脾腎陽虛證, 亡陽證 등 諸陽虛證과 이로 인한 陰寒重證에 回陽救急의 효능을 가진 방제로 수록된 이후 여러 醫家들에 의해서 활용되어 왔다. 특히 附子는 辛, 熱, 有毒하고 純陽의 성질을 가지고 있어 回陽救逆, 補火助陽, 溫中止痛, 逐風寒濕邪 등의 효능이 있으므로 溫裏, 扶陽, 祛寒의 요약이 되어 각종 만성의 陽衰의 증상과 寒濕邪가 經絡을 침습한 寒痺證 등에 활용되어 왔다^{18,19}. 하지만 附子理中湯에 관한 연구는 이²⁰, 정 등²¹의 억제성 및 흥분성 신경전달물질에 의하여 활성화되는 이온통로 조절작용 등이 있으나, 면

역증진효과에 대한 연구는 아직 발표된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 온열환경 제공 및 附子理中湯 복용이 면역증진 효과가 있는지 고찰하고자 하였으며, SD rat을 대상으로 3주간 附子理中湯 복용군과 온열환경 제공군으로 나누어 附子理中湯 투여 및 온열환경 제공시 결과를 비교하였다. 온열환경과 附子理中湯이 체중, 지질대사, 체온, WBC 및 Differential count, cytokine 농도에 미치는 영향에 대해 유의한 결과를 얻어 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에서 사용한 附子理中湯은 경희대학교 경희의료원 한방병원에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. *Bujajung-tang* Prescription of Kyung-Hee Oriental Medical Hospital.

Constitute Herbs		Weight (g)
附子	Aconiti Lateralis Radix Preparata	4.0
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4.0
甘草(炙)	Glycyrrhizae Radix	4.0
乾薑	Zingiberis Rhizoma	4.0
人蔘	Ginseng Radix Alba	4.0
Total amount		20.0

2) 검액의 제조

附子理中湯 약재 500 g을 달아 환류냉각기가 달린 증류용 Flask에 넣고 증류수 5000 ml를 가한 후 직화 상에서 2시간 30분 추출하였다. 여과 후 잔사에 다시 증류수 4000 ml를 가하여 같은 조건에서 재탕하여 여과하였다. 여액을 합한 후 rotary evaporator (vacuum evaporator, EYELA, Japan)로 감압 농축하였다. 농축액을 -70 °C deep freezer (ultra low temperature freezer, 일신바이오, 한국)에서 4시간 냉동시킨 후 lyophilizer (programmable freeze dryer PVTFD 10A, 일신바이오, 한국)에서 72시간 동결건조하여 추출

물 112 g(수득률 22.4%)을 얻었다. 附子理中湯 추출물로 HPLC 분석을 시행하여 glucurrhizin 0.229%의 결과를 얻어 확인하였다.

3) 실험동물

실험동물의 식이 및 사육, 실험에 이용된 동물은 중앙실험동물(주)에서 구입한 체중 200 g 전후의 6주령 수컷 Sprague Dawley Rat으로 1주간 적응시킨 후 3주간 사육하였다. 실험동물은 사육실에서 사육하였으며, 사육실 온도는 24±0.5 °C, 습도 45±5%이며, 매일 광주기 및 암주기를 각각 12시간이 되도록 조절하였고, 식이와 물은 자유 공급하였다.

4) 식이

처음 1주간의 적응기간 및 이후 3주간의 실험기간 동안 모든 실험군의 rat에 normal diet(일반 쥐 사료, research diets)를 섭취시켰다. normal diet 실험 식이의 구성은 다음과 같다(Table 2).

Table 2. The Components of Normal Diet.

Ingredient	Proportion (%)
Moisture	11.03
Protein	20.89
Fat	4.75
Fiber	5.77
Ash	6.04
Calcium	1.24
Phosphorus	0.55
etc.	49.73
Total amount	100

2. 방법

1) 실험군 배정

실험은 6주령 SD rat 수컷 8마리씩을 상온 대조군(control group), 24±0.5 °C 상온 附子理中湯 투여군(BI group), 평균온도 27.6 °C(27 °C~28.7 °C) 온열군(Warm environment group), 27.6 °C(27 °C~28.7 °C) 온열 附子理中湯 투여군(Warm environment BI group)으로 나누어 진행하였다. 실험동물은 상온군 8마리씩을 stainless steel cage에 분류하여 사육하였다. 온열환경군은 8마리씩을 Ceramic Heat Emitter(Flat Type Ceramic Heat Emitter DL180050 50W, ETAN, China)로 온도를 조절하는 나무 cage에 분류하여 사육하였다(Fig. 2). 온도계는 Digital control panel meter(OKE-2002, korea)를 사용하였고, cage 내부 온도를 1일간 1시간 간격으로 실측하여 내부 온도가 평균 27.6 °C(27 °C~28.7 °C)로 조절이 되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

모든 실험군은 normal diet를 투여하였으며, 附子理中湯 투여군은 매일 1회 동일한 시각(오후 1시)에 附子理中湯 추출물을 300 mg을 증류수 2 cc에 희석하여 경구 투여하였고, 약물을 투여하지 않는 대조군과 온열군에는 normal saline를 같은 양으로 2 cc 경구 투여하였다(Fig. 2).

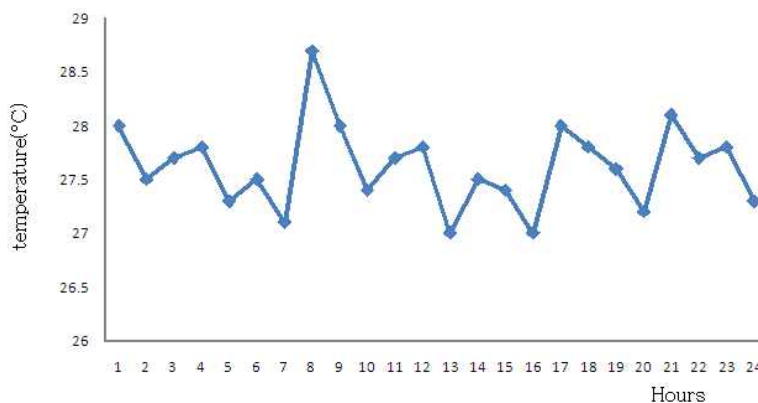


Fig. 1. Hourly measurements of temperature during the day in temperature control cage.

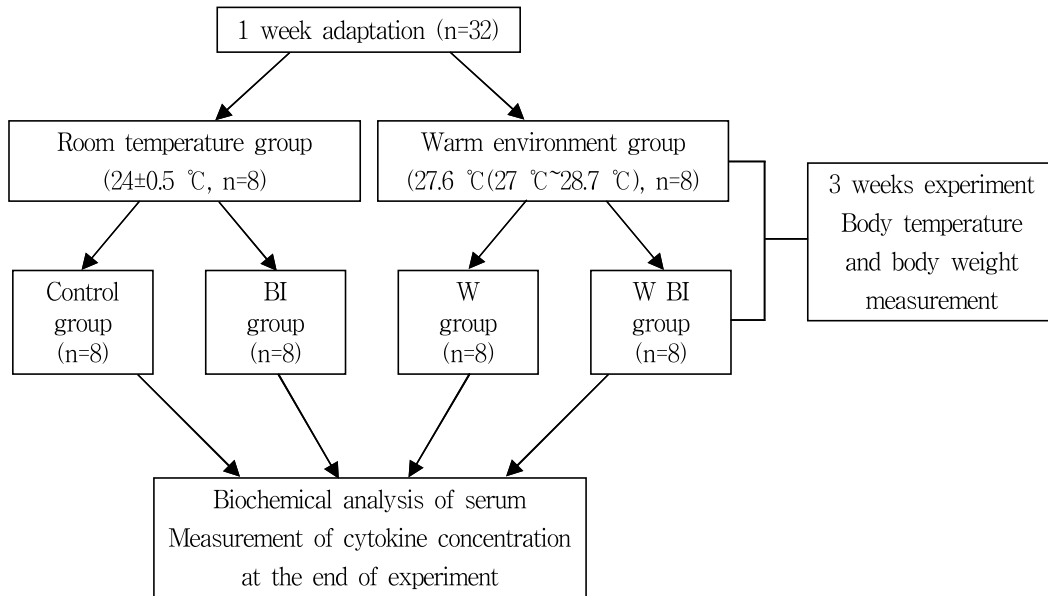


Fig. 2. The progress of the experiment.

BI group mean *Bujaijung-tang* treated group in room temperature environment. W group mean in warm environment and no *Bujaijung-tang* treated group. W BI group mean in warm environment and *Bujaijung-tang* treated group.

2) 체온, 체중 측정

체온은 1주 적응기간이 끝난 후부터 3주간 매주 3회 일정한 시간에 소동물용 직장 체온계(Testo 925, Germany)로 체온을 측정하였다. 체중은 1주 적응기간이 끝난 후부터 3주간 매주 2회 일정한 시간에 0.01 g 단위까지 전자저울(CAS, Korea)로 중량을 측정하였다.

3) 혈청의 생화학적 분석

마지막 처치 후 금식시키고 12시간이 지난 후 각 군의 실험 동물을 ether 마취하에 심장 천자하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 EDTA 처리된 튜브에 담아 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈액을 분리하였다.

4) cytokine 농도 측정

보관된 혈청을 배양 후 상층액을 수집하여 cytokine bid(Bio plex Pro Assays, BIO-RAD, USA)을 사용하여 ELISA에 의하여 TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12, IL-6의 cytokine 농도를 측정하였다.

수집한 시료와 commercial kit에 주어진 표준 cytokine 을 cytokine-specific monoclonal antibody로 도포된 ELISA plate에 넣고 plate를 37도에서 2시간 동안 배양한 뒤 세척하였다. 효소가 결합된 cytokine-specific polyclonal antibody를 다시 plate에 넣고 37도에서 2시간 동안 배양하고 세척하였다. 기질 용액을 넣고 상온에서 30분 동안 방치하여 반응하도록 한 뒤 2 N sulfuric acid로 반응을 정지시켰다. ELISA plate의 각 well의 흡광도는 450 nm에서 ELISA reader(Bio-Plex Manager 6.0 software, BIO-RAD, USA)로 측정하였다.

5) 통계처리

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 혈청의 생화학적 분석은 그룹간의 통계학적인 차이를 보기 위해 SPSS(version:20, IBM SPSS Statistics, USA)를 이용하여 정규성 검정을 한 결과 정규성을 만족하지 않았다. 체온, 체중은 repeated measure by ANOVA을 실시한 후 사후 검정은 Scheffe's test을

사용하였다. 혈청의 생화학적 분석, cytokine 측정은 비모수 검정인 Kruskal Wallis test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 사후검정은 Mann-whitney U test를 시행하였다. p값이 0.05미만인 경우 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

3주간 온열환경 제공(warm environment) 및 附子理中湯(BI)이 체중 변화에 미치는 영향을 관찰

하였다. 실험 시작 시에는 4군간 평균 체중의 유의한 차이가 없었으나, 3주간의 온열 조건 제공 후 온열군의 평균 몸무게는 325.37±17.75 g, 온열 附子理中湯군의 평균 몸무게는 316.87±16.63 g으로 대조군 365.75±16.21 g과 상온 附子理中湯군 366.25±25.47 g에 비해 낮게 나타나, 온열 조건이 체중 증가 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다($p<0.05$)(Table 3). 대조군과 상온 附子理中湯군, 온열군과 온열 附子理中湯군의 평균 몸무게 차이는 유의성이 나타나지 않아 附子理中湯은 체중증가 억제효과가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$).

Table 3. Body Weight of Each Experimental Group.

	Initial (g)	day 3 (g)	day 7 (g)	day 10 (g)	day 14 (g)	day 17 (g)	day 21 (g)
Control group	256.12±8.20	298.37±11.12	311.25±11.75	331.00±11.52	340.62±10.75	358.75±13.23	365.75±16.21
BI group	253.75±12.75	294.00±16.75	308.25±20.53	330.50±20.60	343.62±22.13	360.00±23.12	366.25±25.47
W group	250.12±8.54	271.12*±4.91	286.37*±12.64	301.00*±14.22	305.87*±15.55	318.87*±17.55	325.37*±17.75
W BI group	250.25±6.54	271.87*±11.26	280.75*±10.60	294.75**±10.13	303.87**±11.93	313.75**±13.98	316.87***±16.63

Each value represents the mean±S.D (n=8). Body weight of each group at baseline was not different from the control group, but after 3 weeks, it is significantly different from the control group and the warm environment group. The significant differences with the control group statistically were calculated by repeated measure ANOVA. (* $p<0.05$ The significant differences with the control group, ** $p<0.001$ The significant differences with the control group) BI group mean *Bujaijung-tang* treated group in room temperature environment. W group mean in warm environment and no *Bujaijung-tang* treated group. W BI group mean in warm environment and *Bujaijung-tang* treated group.

2. 지질대사의 변화

1) 혈청 중 total cholesterol 함량

평균값은 대조군이 상온 附子理中湯군, 온열군, 온열 附子理中湯군에 비해 가장 높은 Total cholesterol 수치를 나타냈다. 대조군 82.50±10.65 mg/dl, 상온 附子理中湯군 78.00±10.32mg/dl, 온열군 65.62±11.16 mg/dl, 온열 附子理中湯군 61.00±6.67 mg/dl로, 온열 附子理中湯군은 상온 附子理中湯군에 비해, 온열군은 대조군에 비해 total cholesterol 수치의 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). 온열 附子理中湯군은 대조군에 비해 현저하게 유의한 감소를 보였다($p<0.001$)(Table 4). 附子理中湯 투여군은 투여하지 않은 군에 비해 수치가 낮은 경향성을 보였다

나 유의성은 없었다($p<0.05$).

2) 혈청 중 low-density lipoprotein(LDL)-cholesterol 함량

평균값은 대조군이 상온 附子理中湯군, 온열군, 온열 附子理中湯군에 비해 가장 높은 LDL-cholesterol 수치를 나타냈다. 대조군 13.87±2.94 mg/dl, 상온 附子理中湯군 13.62±2.72 mg/dl, 온열군 12.12±1.72 mg/dl, 온열 附子理中湯군 9.62±2.44 mg/dl로, 온열 附子理中湯군은 대조군에 비해, 온열 附子理中湯군은 상온 附子理中湯군에 비해, 온열 附子理中湯군은 온열군에 비해 LDL-cholesterol 수치의 유의한 감소를 보였다($p<0.001$)(Table 4).

3) 혈청 중 high-density lipoprotein(HDL)-cholesterol 함량

평균값은 대조군이 상온 附子理中湯군, 온열군, 온열 附子理中湯군에 비해 가장 높은 HDL-cholesterol 수치를 나타냈다. 대조군 70.25±8.92 mg/dl, 상온 附子理中湯군 66.25±9.14 mg/dl, 온열군 53.75±10.08 mg/dl, 온열 附子理中湯군 52.62±5.80 mg/dl로, 온열 附子理中湯군은 상온 附子理中湯군에 비해, 온열군은 상온 附子理中湯군에 비해 HDL-cholesterol 수치의 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). 온열 附子理中湯군과 온열군은 대조군에 비해 현저하게 유의한 감소를 보였다($p<0.001$)(Table 4).

4) 혈청 중 triglyceride 함량

혈청 중 triglyceride은 대조군 107.25±27.48 mg/dl, 상온 附子理中湯군 99.00±19.87 mg/dl, 온열군 123.00±18.87 mg/dl, 온열 附子理中湯군 121.75±20.38 mg/dl로, 4군 모두 유의한 차이가 없게 나타났다.

5) 혈청 중 HDL cholesterol/total cholesterol 비율

각 군의 total cholesterol에 대한 HDL cholesterol의 비율을 계산해본 결과, 대조군 85.36%, 상온 附子理中湯군 84.93%, 온열군 81.91%, 온열 附子理中湯군 86.26%로, 온열 附子理中湯군의 비율이 가장 높았으나 대조군에 비해 유의한 차이는 나타내지 않았다.

Table 4. Serum Biochemical Level of Each Group.

	Control	BI group	W group	W BI group
Total cholesterol (mg/dl)	82.50±10.65	78.00±10.32	65.62*±11.16	61.00*±6.67
LDL-cholesterol (mg/dl)	13.87±2.94	13.62±2.72	12.12±1.72	9.62*±2.44
HDL-cholesterol (mg/dl)	70.25±8.92	66.25±9.14	53.75 [†] ±10.08	52.62 [†] ±5.80
AST (U/l)	188.37±27.57	174.62±20.85	154.12*±22.99	131.37*±30.55
ALT (U/l)	45.50±5.63	41.37±6.65	36.87*±5.96	36.00*±5.55
BUN (mg/dl)	25.46±3.65	20.18*±2.12	21.80*±2.24	20.48*±2.57
Creatinine (mg/dl)	0.38±0.03	0.34 [§] *±0.03	0.41±0.03	0.36 [§] ±0.04
TNF-α (pg/ml)	464.82±154.05	718.31±357.18	917.06*±125.66	1330.30*±423.08

The results are expressed as mean±S.D and are verified by Mann-whitney U test.

Control group mean in room temperature environment and no *Bujaijung-tang* treated group. BI group mean *Bujaijung-tang* treated group in room temperature environment. W group mean in warm environment and no *Bujaijung-tang* treated group. W BI group mean in warm environment and *Bujaijung-tang* treated group.

(* $p<0.05$ The significant differences with the control group, [†] $p<0.05$ The significant differences with the BI group, * $p<0.001$ The significant differences with the control group, [§] $p<0.05$ The significant differences with the W group, ^{||} $p<0.05$ The significant differences with the BI group)

3. 체온의 변화

3주간 온열환경 제공(warm environment) 및 附子理中湯(BI)이 체온 변화에 미치는 영향을 관찰하

였을 때 각 군 간에는 유의한 차이가 없어($p>0.05$), 온열환경과 附子理中湯이 중심체온에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Body Temperature of Each Experimental Group.

	initial (°C)	day 3 (°C)	day 6 (°C)	day 8 (°C)	day 10 (°C)	day 13 (°C)	day 15 (°C)	day 17 (°C)	day 20 (°C)
Control group	35.92±0.54	35.76±0.15	36.43±0.20	35.77±0.38	36.17±0.50	36.56±0.41	35.33±0.22	36.10±0.27	36.57±0.59
BI group	36.27±0.19	36.65±1.18	36.73±0.34	36.06±0.36	36.12±0.52	36.10±0.22	35.55±0.25	36.67±0.43	35.80±0.26
W group	36.33±0.29	36.35±0.17	36.26±0.31	36.27±0.24	36.75±0.37	36.20±0.31	36.61±0.49	35.92±0.38	36.60±0.23
W BI group	36.35±0.35	36.36±0.31	36.78±0.26	36.17±0.37	37.01±0.49	36.47±0.17	36.95±0.25	36.50±0.28	36.33±0.48

Each value represents the mean±S.D (n=8). There is no significant differences between each experimental group. BI group mean *Bujaijung-tang* treated group in room temperature environment. W group mean in warm environment and no *Bujaijung-tang* treated group. W BI group mean in warm environment and *Bujaijung-tang* treated group.

4. White blood cell(WBC) 및 differential count의 변화

1) 혈청 중 WBC 수치

대조군 $8.72 \pm 2.16 \times 10^3 / \mu\text{L}$, 상온 附子理中湯군 $8.84 \pm 3.21 \times 10^3 / \mu\text{L}$, 온열군 $7.01 \pm 3.38 \times 10^3 / \mu\text{L}$, 온열 附子理中湯군 6.28 ± 2.69 로, 4군 모두 유의한 차이가 없게 나타났다.

2) Differential count

Neutrophil Seg.은 대조군 $12.88 \pm 4.99\%$, 상온 附子理中湯군 $12.57 \pm 4.58\%$, 온열군 $14.20 \pm 4.82\%$, 온열 附子理中湯군 $13.58 \pm 5.42\%$, lymphocyte는 대조군 $83.70 \pm 5.88\%$, 상온 附子理中湯군 $86.52 \pm 2.16\%$, 온열군 $81.68 \pm 6.87\%$, 온열 附子理中湯군 $82.51 \pm 7.12\%$, eosinophil은 대조군 $1.75 \pm 0.89\%$, 상온 附子理中湯군 $2.07 \pm 0.97\%$, 온열군 $2.45 \pm 2.26\%$, 온열 附子理中湯군 $2.18 \pm 1.64\%$, basophil은 대조군 $0.21 \pm 0.06\%$, 상온 附子理中湯군 $0.22 \pm 0.07\%$, 온열군 $0.20 \pm 0.07\%$, 온열 附子理中湯군 $0.17 \pm 0.07\%$, monocyte는 대조군 $1.45 \pm 0.66\%$, 상온 附子理中湯군 $1.43 \pm 0.33\%$, 온열군 $1.46 \pm 0.56\%$, 온열 附子理中湯군 $1.54 \pm 0.26\%$ 로, 수치는 4군 모두 유의한 차이가 없게 나타났다.

5. 안전성 평가

1) Aspartate aminotransferase(AST)

혈청 중 AST는 대조군에 비해 온열군과 온열 附子理中湯군이 유의하게 감소된 수치를 보였다 ($p < 0.05$)(Table 4). 그러나 AST 정상범위가 $0 \sim 40$

U/l로 4군 모두 정상범위를 초과했다.

2) Alanine aminotransferase(ALT)

혈청 중 ALT는 대조군이 온열 附子理中湯군과 온열군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였다 ($p < 0.05$)(Table 4). 그러나 ALT 정상범위가 $0 \sim 41$ U/l로 대조군과 附子理中湯군은 정상범위를 초과했다.

3) Blood urea nitrogen(BUN)

혈청 중 BUN은 대조군이 다른 세 군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였다($p < 0.05$)(Table 4). 그러나 BUN 정상범위가 $6.0 \sim 20.0$ mg/dl로 4군 모두 정상범위를 초과했다.

4) Creatinine

혈청 중 creatinine은 4군 모두 정상범위였으며, 온열군이 상온 附子理中湯군과 온열 附子理中湯군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였다. 또한 대조군이 상온 附子理中湯군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였다($p < 0.05$)(Table 4).

6. Cytokine 농도의 변화

1) 혈청 중 tumor necrosis factor(TNF)- α 농도

대조군은 상온 附子理中湯군, 온열군, 온열 附子理中湯군에 비해 가장 낮은 TNF- α 농도를 나타냈다. 대조군 464.82 ± 154.05 pg/mL, 온열 附子理中湯군 718.31 ± 357.18 pg/mL, 온열군 917.06 ± 125.66 pg/mL, 상온 附子理中湯군 1330.30 ± 423.08 pg/mL로 상온 附子理中湯군은 대조군에 비해, 온열군은 대조군에

비해 TNF- α 농도의 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Table 4). 상온 附子理中湯군이 온열 附子理中湯군에 비해 TNF- α 농도가 높았으나 유의성은 없었다($p > 0.05$).

2) 혈청 중 interferon(IFN)- γ , interleukin(IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-12, IL-6 농도

혈청 중 IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12, IL-6 농도는 4군 모두 유의한 차이가 없게 나타났다.

IV. 고 찰

면역의 개념은 초기에는 거의 전염병의 영역에서 사용되었으나, 오늘날에는 면역능력이 개체의 통합성을 유지하는 기전이란 인식하에 내분비학, 유전학, 중앙생물학 그리고 그 밖의 수많은 질병의 생물학에 적용되고 있다^{22,23}.

한의학에서 면역이란 표현은 뚜렷하게 나타나지 않지만 인체의 장부 조직 간이나 인체와 외계 환경간의 평형상태가 파괴됨으로써 질병이 발생한다고 보고 있으며, 이는 인체의 항병능력과 정상적인 장부기능 및 물질적 기초를 가리키는 정기와 각종 발병요인들을 가리키는 邪氣가 인체 내에서 항쟁하기 때문인 것으로 설명하였다²⁴.

특히 질병의 발생과정이 正氣의 성쇠 여부와 밀접히 연관된다고 인식하였는데, 《黃帝內經》<上古天真論>에서 “眞氣從之 精神內守 病安從來”, <刺法論>에 “正氣在內 邪不可干” “評熱病論”에 “邪氣所湊 其氣不虛”²⁵라 하여 正氣란 외사를 방어하고 제거하는 작용이 있음을 밝혔으며, 이는 서양의학에서의 면역과 유사하다고 할 수 있다²⁶. 이러한 扶正祛邪의 관점에 따라, 면역증진 관련 한의학적 약물 연구가 활발히 이루어지고 있다⁴.

附子理中湯은 理中湯에 附子를 가한 것으로, 脾陽虛證, 胃寒證, 脾腎陽虛證, 亡陽證 등 諸陽虛證과 이로 인한 陰寒重證에 回陽救急의 효능으로 脾胃冷弱, 心腹絞痛, 嘔吐泄痢, 霍亂轉筋, 體冷微汗, 脈微, 手足厥冷, 昏睡露睛 또는 寒中內臟에 의한 癱

亂으로 吐瀉, 中寒腹痛, 身痛, 口禁, 四肢強直, 失音不語, 心下逆滿, 腹中藹鳴, 飲食不進, 糞色青白 등 一切沈寒痼冷을 치료하는데 사용되어 왔다^{17,27}. 附子理中湯을 구성하는 각 약물의 효능과 약리를 고찰해보면, 附子는 溫裏藥에 속하여 性熱 有毒, 味辛甘하여 純陽의 성질을 가지고 있어서 回陽補火救逆, 散寒除濕, 溫經散寒通絡, 祛寒止痛의 효능이 있다^{18,28}. 특히 전신기능쇠약중인 陽虛에 사용하는 데 이의 주요한 표현으로는 陰證의 水腫, 亡陽虛脫, 陽虛衰弱, 風寒濕으로 인한 痺痛, 寒證腹痛, 虛寒咳喘 등이며, 전신성 虛寒證인 少陰病이 이에 해당하고 방약의 운용에 있어서 仲景은 附子를 다용하여 助陽散寒에 중점을 두었다^{29,30}. 약리학적으로는 혈압상승, 강심작용, 항이뇨 등의 작용이 있다^{31,32}. 人蔘은 性微溫無毒, 味甘微苦하여 大補元氣, 固脫生津, 安神的 작용이 있으며, 白朮은 性溫無毒, 味苦甘하여 補脾益胃, 燥濕和中, 除心下急痛의 효능이 있고, 甘草는 性平無毒, 味甘하여 和中緩急, 溫中和氣, 通血脈, 潤肺解毒, 調和諸藥의 효능이 있으며, 乾薑은 性熱無毒, 味辛하여 溫中逐寒, 回陽通脈한다³³. 특히 附子는 性味が 大熱하여 전신성 虛寒證인 少陰病에 주로 사용되었고, 附子의 체온 상승 또는 혈액순환의 개선 작용에 대한 연구³⁴가 보고된 바가 있으며, 정²¹의 실험에서는 附子理中湯이 체온하강을 억제하는 효과를 보였으나 정상체온을 상승시키는 결과는 나타나지 않았다. 본 실험에서는 附子理中湯 및 온열환경 제공시 정상체온 상승에 대해서는 유의한 결과가 나타나지 않아($p > 0.05$), 附子理中湯과 온열환경의 체온상승 효과는 없는 것으로 나타났다. 이는 주변환경의 온도가 4 °C 정도 상승하였을 때 항온동물에서 체온의 항상성이 유지되기 때문이라고 생각된다. 이러한 결과는 주변환경의 온도가 변화해도 중심체온은 변하지 않는다는 기존의 연구결과¹³와 일치하였다.

체온 상승이 면역 증진 효과가 있다는 최초의 보고서는 Busch(1866), Fehleisen(1833), Coley(1893)가 암환자에 있어 암의 쇠퇴와 수명이 연장된 예를

검토하면서 암환자가 열을 유발하는 병을 앓았을 경우 수명이 연장됨을 보고하였고, 1975년 Dietzedd의 보고에 의하면 지방성 말라리아가 창궐한 지방에서는 암 발생률이 낮다고 하였다¹⁴.

Mouse를 대상으로 한 연구로는 동일하게 바이러스 역가를 주입했음에도 불구하고 22 °C, 26 °C, 30 °C의 주변온도 환경 중 30 °C 온열환경에서만 항염증효과가 있으며, 인플루엔자 감염의 생리학적 인 징후들을 감소시키고, 개체 방어능력의 과정을 향상시킨다는 연구가 있었다¹³. 본 연구에서는 면역 반응을 관찰하기 위하여 24 °C와 28 °C 온열환경만 비교하였다. 이외에도 발열 온도 범위에서 대식세포의 기능이 향상되며 cytokine 표현이 증진되어 숙주를 보호하는 효과가 있다는 연구가 있으며¹⁵, 세포 단백질 수준의 연구로는 분자학적인 기전이 명확히 밝혀지지 않는으나 대식세포 뿐만 아니라 여러 종류의 면역세포 표면에서 발현된다고 알려진 Ca²⁺ permeable cation channel인 TRPM2 단백질이 온도에 의해서 활성화되어 대식세포의 식균작용이 증가한다는 연구결과¹⁶가 발표되었다. 이러한 연구결과들을 통해 면역 증진에 체온이 중요한 역할을 하고 있는 것이 밝혀졌으며, 고체온을 이용한 다양한 치료방법¹⁴들이 제시되고 있다.

그러므로 본 실험에서는 온열환경과 附子理中湯이 체온 상승 및 면역 관련 지표에 나타내는 효과를 관찰하기 위해 SD rat을 이용하여 3주간의 처치가 대조군에 비하여 체중, 지질대사, 체온, WBC, differential count, cytokine 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

3주간 매주 3회씩 체온을 측정한 결과, 온열환경과 附子理中湯은 체온상승 효과는 없는 것으로 보인다. 실험 시작 시에는 4군간 평균 체중에 유의한 차이가 없었으나, 실험 시작 3일 후부터 온열환경을 제공한 군이 그렇지 않은 군에 비하여 유의성 있는 체중 감소가 있어 온열환경이 체중 증가 억제 효과를 나타내었다. 이는 고온 환경에서는 생리적으로 말초 혈액량의 증가, 호흡수의 증가 등 열

발산량을 증가시키는 경향이 있기 때문에 에너지 소비량이 증가하며, 체온 상승에 따른 대사량의 증가에서도 에너지소비량은 증가하기 때문이라고 보고한 연구결과³⁵와 동일한 의미라고 사료된다. 그러나 附子理中湯을 투여한 군과 투여하지 않은 군 사이에는 유의한 체중의 차이가 없어 附子理中湯의 체중 증가 억제 효과는 나타나지 않았다.

혈청 검사상 total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol 함량은 온열 附子理中湯군은 대조군에 비해, 온열 附子理中湯군은 상온 附子理中湯군에 비해, 온열 附子理中湯군은 온열군에 비해 유의한 감소를 보였다. 특이하게도 HDL cholesterol 함량도 함께 감소하여 HDL cholesterol/total cholesterol의 비율을 측정해본 결과, 대조군 85.36%, 상온 附子理中湯군 84.93%, 온열군 81.91%, 온열 附子理中湯군 86.26%로, 온열 附子理中湯군의 비율이 가장 높았으나 대조군에 비해 유의한 차이는 나타내지 않았다. 따라서 지질대사와 관련하여 온열환경을 제공하는 것은 total cholesterol과 LDL cholesterol 증가 억제 효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

혈청 중 AST, ALT 수치는 온열 附子理中湯군과 온열군이 대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 보였으며, 이를 통해 온열환경을 제공하는 것이 간기능 개선에 유의한 영향을 미친다고 볼 수 있다. 하지만 실험 모델이 간기능을 저하시킨 모델이 아닌 정상모델을 이용하였고, 정상식이임에도 불구하고 AST, ALT 수치가 정상치를 넘은 것에 대해 명확히 설명할 수 없는 한계점이 있다.

WBC의 differential count 중 neutrophil은 대식세포가 갖는 외부 이물질에 대한 식균작용과 염증 반응에 중요한 영향력을 발휘하며, eosinophil는 산화물을 형성하고 세포내 살균작용을 가지며, 비면역성 염증반응을 완화시켜서 조직 손상을 방어한다. monocyte는 탐식능이 있고, 세균 및 암세포의 성장을 억제하거나 죽이며, 분비기능이 있고 혈관생성을 자극하고 상처를 치유하며, 림프구에 항원을 제공하는 기능을 한다. lymphocyte는 항원의 자

극을 받아 작동세포로서 최종적으로 분화하는데, 기능 및 세포 표면 항원에 따라 T 림프구, B 림프구, 자연살해세포(NK cell)로 구분할 수 있다^{36,37}. 본 실험에서는 WBC 및 Differential count는 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이는 실험 모델이 염증을 유발시킨 모델이 아니라 정상모델이라 유의한 변화가 없었던 것으로 생각된다.

Cytokine은 다양한 세포반응을 조절함으로써 면역반응을 조절하는 활성화세포가 분비하는 단백질이다. 대부분의 cytokine은 특이 항원에 의해 결정되지 않는다는 면에서는 비특이적이다. 또한 대부분의 cytokine은 다중활성을 갖고 있어서 여러 형태의 세포에 작용할 수 있다. Cytokine은 숙주 방어에 있어서도 기능을 발휘하는데 선천적 면역에 있어서는 미생물에 대한 초기 염증반응을 매개하여 후천적 면역반응을 자극하고, 후천적 면역에서는 cytokine 자체가 항원으로 자극된 림프구를 증식시키고 분화시켜 대식세포와 같이 전문화된 효과세포를 활성화시킨다. Cytokine은 아주 낮은 농도에서도 기능을 발휘할 수 있으며, 그 활성은 대부분 생산된 그 위치에서 제한되지만 간혹 전신적으로 효과를 나타내기도 한다³⁸.

특히 TNF- α 는 종양괴사인자로, 주로 Gram 음성세균이나 기타 전염성 미생물에 대한 급성 염증반응을 매개한다. TNF- α 수용체는 다양한 종류의 세포에서 유전자 전사를 자극하거나 apoptosis를 유도한다. 주요 생리활성은 첫째, 호중구와 단핵구를 감염 부위에 보충시키는 것을 자극하고 둘째, 호중구와 단핵구를 활성화시켜 미생물을 제거한다. 낮은 농도에서는 백혈구와 상피세포에 작용하여 급성 염증을 유도하고 중간 정도의 농도에서는 염증반응의 전신적 효과를 매개한다. 종양세포를 파괴하는 능력이 있어서 항암제로 사용될 수 있지만 반면에 정상세포에도 치명적인 부작용이 있다³⁸. TNF- α 는 대식세포의 NO 생성을 위한 trigger로 작용한다고 알려져 있으므로³⁹, NO 생성을 위한 세포 내의 정보전달 기능을 수행할 것으로 여겨진다.

대식세포로부터 분비되는 TNF- α 는 IL-2에 의해서 촉진되며 IL-2와 IFN- γ 는 TNF 생성에 있어서 상승 작용 효과를 발휘하여 TNF의 생산을 증가시키며⁴⁰, 이들은 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 생체 내에서 표적세포의 괴사, NK 세포의 활성화 및 항바이러스능을 가지며, 세포매개성 면역에 참여하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 cytokine 농도 측정상 TNF- α 농도가 상온 附子理中湯군과 온열군이 대조군에 비해 유의한 증가가 있었다. 따라서 증가된 TNF- α 는 생체에서 다양한 면역반응을 유도할 것으로 추정되며, 온열환경과 附子理中湯 모두 면역증진작용이 있으며 특히 종양치료에 효과가 있을 것이라 예상할 수 있다. 다만 상온 附子理中湯군과 온열 附子理中湯군을 비교했을 때 상온 附子理中湯군의 TNF- α 농도가 더 높다는 점이 특이했는데 온열환경과 附子理中湯을 같이 제공했을 때 어떠한 기전으로 면역반응이 일어나는지 추가적인 연구가 필요할 것이라 생각된다. 이외에 cytokine 농도의 유의한 변화가 나타나지 않았던 것은 3주간의 짧은 기간 동안의 관찰이었던 관계로 여겨지며 실험 기간을 연장하여 그 효과에 대한 지속적 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 온열환경 제공과 附子理中湯 투여가 면역불균형을 개선할 수 있는 면역증진작용이 있는 것으로 생각된다. 온열환경을 제공하는 시간 및 온도를 변화시켜 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지 연구해 볼 것을 제안할 수 있겠다. 더불어 온열환경 제공은 비만, 고지혈증과 같은 대사성 질환에도 효과를 보일 가능성이 있는 것으로 보여진다. 앞으로 추가적인 연구를 통하여 附子理中湯 및 온열환경 제공이 면역 조절 능력을 향상시켜 아토피, 비염과 같은 알레르기성 질환 및 항암치료에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 앞으로 임상연구를 통해 附子理中湯의 정확한 효과를 연구할 필요가 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

附子理中湯을 3주간 온열환경 제공과 함께 투여하여 대조군과 비교한 결과는 다음과 같다.

1. 온열환경 제공은 체중저하 효과가 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그러나 附子理中湯 투여는 유의한 효과가 없는 것으로 보인다.
2. 온열환경 제공은 Total cholesterol과 LDL cholesterol 증가 억제에 유의한 효과가 있는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 그러나 附子理中湯 투여는 유의한 효과가 없는 것으로 나타났다.
3. 온열환경 제공과 附子理中湯은 TNF- α 농도 증가에 유의한 효과가 나타났다($P < 0.05$).

따라서 온열환경을 제공하는 것은 혈청 total cholesterol과 LDL cholesterol의 증가를 억제하여 고지혈증 및 비만 질환 치료법으로 개발될 수 있다고 보이며, 온열환경과 附子理中湯은 면역증진작용 특히 종양치료에 이용될 수 있다고 생각되며, 향후 추가적인 임상 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 심지영, 정인성, 김찬화, 윤연숙, 송지영. 인삼다당체 진산과 유사구조 다당체의 면역증강활성작용. *Immune network* 2004;(2):94-9.
2. Lim EM, Lee SH. The meaning of immunity in the documents of oriental medicine. *J Kor Inst Orient Med Inform* 2006;12(1):129-45.
3. 안덕균 역. 면역과 한방. 서울: 열린책들; 1998, p. 19-21, 23-7.
4. 강연이, 김태임, 박종오, 김성훈, 박종대, 김동희. 한의학의 항종양 면역치료에 관한 연구. *동의생리병리학회지* 2003;17(1):5-16.
5. 서영호. 金水六君煎이 면역반응에 미치는 실험적 연구. 학위논문(석사). 동의대학교 한의학대학원; 2006, p. 7-10.
6. 조현우, 신우진, 강철우, 박동일. 소자강기탕이 면역반응에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* 2003;17(4):1005-6.
7. 박민철, 진재호, 정한솔, 이광규. 청심온담탕의 면역조절 효과. *동의생리병리학회지* 2002;16(6):1225-8.
8. 민영규, 김성훈, 김동희. 청열대보탕의 면역조절 작용을 통한 항종양효과. *동의병리학회지*. 2000; 14(2):199-215.
9. 이기억, 정지천. 골쇄보 ethanol 추출물의 면역조절 작용에 관한 연구. *대한한방내과학회지* 2004; 25(1):16-27.
10. 정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선 등. 대표적인 보음지제의 면역 활성화 비교 연구. *대한한의학회지* 2010;31(5):112-23.
11. 안택원, 임석인, 왕수경. 동충하초(Cordyceps sinensis)추출물을 첨가한 발효김치의 급여가 생쥐의 면역작용에 미치는 영향. *대한예방의학회지* 2002;6(2):156-67.
12. 오정석, 함인례, 김형민, 최호영. 육종용류의 면역증진 효과 비교 연구. *대한본초학회지* 2005; 20(1):63-72.
13. 한성. 高體溫을 利用한 腫瘍細胞 治療研究. 원광대학교 한의과학전공 석사학위논문. 2004:31-44.
14. Hasday JD, Fairchild KD, Shanholtz C. The role of fever in the infected host. *Microbes and Infection* 2000;2:1891-904.
15. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, et al. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2(TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(17):6745-50.
16. Jhaveri KA, Trammell RA, Toth LA. Effect of

- environmental temperature on sleep, locomotor activity, core body temperature and immune responses of C57BL/6J mice. *Brain Behav Immun* 2007;21:975-87.
17. 江克明, 包明蕙 편저. 簡明方劑辭典. 상해: 상해 과학기술출판사; 1989, p. 569-99.
 18. 전국한의학대학교 본초학교실 공저. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p. 331-3.
 19. 김경옥. 실용본초학. 서울: 정담; 2001, p. 213-5.
 20. 이혜정, 서정철, 이재동, 김이화, 이충열, 정주호 등. 부자이중탕과 보중익기탕의 억제성 및 흥분성 신경전달 물질에 의하여 활성화되는 이온통로 조절작용. 대한침구학회지 2000;17(4):5-17.
 21. 정명채, 류봉하, 박동원, 유기원. 부자이중탕의 효능에 관한 실험적 연구. 대한한방종양학회지 1998;4(1):1-16.
 22. 이부영 편. 의학개론 1. 서울: 서울대학교출판부; 1995, p. 25, 27, 31.
 23. 이부영 편. 의학개론 2. 서울: 서울대학교출판부; 1995, p. 228.
 24. 김완희, 최달영. 장부변증론치. 서울: 정보사; 1990, p. 50, 201, 381.
 25. 홍원식. 정교황제내경소문. 서울: 동양의학연구원출판부; 1985, p. 11, 123, 285.
 26. 조종관. 면역에 관한 동양의학적 사고. 동양의학 1986;12(1):19-23.
 27. 한의과대학 방제학교수. 방제학. 서울: 영림사; 1999, p. 145.
 28. 왕호고. 탕액본초. 서울: 대성문화사; 1991, p. 363.
 29. 김완희. 한의학원론. 서울: 전통의학연구소; 1984, p. 300.
 30. 조장충. 중의변증학. 상해: 상해중의학원출판사; 1987, p. 364-70.
 31. 과학백과사전출판사편. 약초의 성분과 이용. 서울: 일월서각; 1999, p. 270.
 32. 문대원. 부자류의 기원 및 포제에 의한 Aconitum 함량 연구. 학위논문(박사). 동신대학교 한의학대학원. 2011, p. 29-31.
 33. 안정화. 중약학. 북경: 인민위생출판사; 1991, p. 362, 371, 762, 742, 751.
 34. Mitamura M, Horie S, Sakaguchi M, Someya A, Tsuchiya S, Van de Voorde J, et al. Mesaconitine-induced relaxation in rat aorta: involvement of Ca²⁺ influx and nitric-oxide synthase in the endothelium. *Eur J Pharmacol* 2002;136:217-25.
 35. Washington. D.C. National Research Council. Effect of environment on nutrients requirements of domestic animal. National Academy Press. 1981.
 36. Invitti, C. Obesity and low-grade systemic inflammation. *Minerva Endocrinol* 2002;27(3):209-41.
 37. 대한진단검사의학회. 진단검사의학. 서울: 이퍼블릭; 2010, p. 149-59.
 38. 최승구, 강태숙, 김선희, 김유현, 김윤희, 김인환 등. 면역혈청학. 서울: 청구문화사; 2009, p. 61-70.
 39. Bendtzen, K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Letters* 1988;19:183-92.
 40. Sakurai T, Suzu S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Hatake K, et al. Induction of tumor necrosis factor in mice by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:80-5.