동의신경정신과 학회지 제21권 제4호(2010년 12월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(4):41-51

사물탕, 사군자탕, 팔물탕, 십전대보탕의 약리 활성 비교 연구

이호영*†, 하혜경*, 정다영*, 이남헌*, 신현규*

한국한의학 연구원 한약 EBM 연구센터*, 홍천메디칼허브연구소 연구개발실†

Immuno stimulatory activities of *Samul-tang*, *Sagunja-tang*, *Pamul-tang* and *Sipjeondaebo-tang in vitro*

Ho-Young Lee*†, Hye-Kyung Ha*, Da-Young Jung*, Nam-Hun Lee*, Hyeun-Kyoo Shin*

Herbal EBM reserach center, Korea Institute of Oriental Medicine*
Dept. of R&D, Hongcheon Institute of Medicinal Herb†

Abstract

Objectives :
Samul-tang(SM), *Sagunja-tang*(SG), *Pamul-tang*(PM) and *Sipjeondaebo-tang*(SJ) was used many diseases such as sterility, menstrual disorder, general prostration, recruitment in Korea. We investigated the immune stimulatory activities of SG, SM, PM and SJ in *in vitro*.

Methods :
For comparision for effective of SM, SG, PM and SJ, this study examined anti-inflammation(NO, PGE2 assay), anti-oxidation(DPPH assay) and immune response in *in vitro* assay. For immune response activities, this study used NO synthesis on RAW 264.7 cells, splenocyte proliferation and cytokine assay(IL-2, IL-4) in splenocyte.

Results :
The results showed that SG, SM, PM and SJ were no significant effect anti-oxidation and anti-inflammatory effects. For immune response, they showed the splenocyte proliferation and macrophage proliferation. We confirmed that they synthesised NO a dose-dependent manner significantly and secreted the IL-4.

Conclusions :
These results suggested the SG, SM, PM and SJ had immune stimulatory activity. A efficacy of immune response in them had produced similar results.

Key Words :
Samul-tang, *Sagunja-tang*, *Pamul-tang*, *Sipjeondaebo-tang*, Immune stimulatory activity

투고 : 2010. 11. 2. 수정 : 2010. 12. 4. 채택 : 2010. 12. 6.
교신저자 : 신현규, 대전시 유성구 전민동 461-24번지 한국한의학연구원 한약EBM연구센터
Tel) 042-868-9464, Fax) 042-864-2120, E-mail) hkshin@kiom.re.kr
본 연구는 한국한의학 연구원 '표준한방처방 EBM 구축사업'의 지원에 의해 이루어졌다.

Ⅰ. 서 론

사물탕(*Samul-tang*; SM, *siwu* decoction; China, *shimotsu-to*; Japan)은 예로부터 面色萎黃, 淡白不華에 사용한다고 알려져 왔고[1] 월경불순, 갱년기 장애 등의 치료에 사용된다. SM은 허혈성 뇌질환[2], 심장질환 치료제[3]와 혈관생성[4], 항경련[5], 면역강화[6,7,8]의 연구들이 보고되었다. 사군자탕(*Sagunja-tang*: SG, *sijunzi* decoction; China, *shikunshi-to*; Japan)은 補氣養心하여 脾胃를 돕고 기가 허약하여 숨이 가쁘고 짧으며 위가 약하고 헛배가 불러 음식을 먹을 수 없고 腸鳴下痢, 토하고 咳逆하는 자, 또는 비기가 쇠약하고 폐기가 허손하여 몸이 마르고 얼굴색이 노랗고 피부에 잔주름이 많거나 결막과 입술이 창백한 자를 치료[1]하는데 쓰며 항암[9,10], cytokine 유발 증진[11], 면역 증진[12]에 대해 보고되고 있다. 팔물탕(*Palmul-tang*; PM, *bazheng* powder; China)은 기(氣)와 혈(血)이 모두 허(虛)한 질환인 식욕 부진, 빈혈을 수반한 전신 쇠약증, 불임증, 四肢煩疼에 사용[1]된다고 알려져 있고 면역 질환[13,14], 항암 효과[15]에 대한 연구들이 있다. 십전대보탕은(*Sipjeondaebo-tang*, SJ, *Shi quan da bu tang*; China, *Juzen-taiho-to*; Japan)은 PM에 황기와 육계를 첨가한 처방으로 한의학에서 대표되는 補藥 중의 하나이다. SJ에 대한 효능연구는 빈혈, 생기 (生肌) 작용, 산후 활용 및 항암, 면역 작용에 대해 다양하게 진행되고 있다[16].

이들 처방은 SM과 SG가 합해져서 PM이 되고 PM에 황기, 육계가 첨가되어 SJ를 구성하는 상호 관계가 있는 처방들이지만 지금까지 SM, SG, PM 및 SJ에 대한 개별 효능 연구가 주를 이루었다. 따라서 본 연구에서는 4 가지 처방에 대해 세포 기반으로 확인할 수 있는 효능을 비교 검증하고자 항염증, 항산화, 면역에 대한 약리활성을 검색하였다. 대식세포주(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7을 이용한 항염증 반응과 DPPH 라디칼 소거능 검색을 통해 각 처방들의 항산화 효과를 확인하였다. 또한 mouse 비장에서 추출한 splenocyte의 증식 및 cytokine 변화를 확인하고 처방들의 면역 활성을 확인하고자 하였다. 이 결과를 토대로 각 처방들의 차이점 및 유사점을 확인하여 임상 및 처방의 EBM (evidence-based medicine) 구축을 위한 연구를 진행하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 약재 추출

감초(중국), 육계(베트남), 당귀(강원도 평창), 인삼(충남 금산), 백출(강원도 영월), 숙지황(전북 정읍), 복령(강원도 고성), 작약(전남 화순), 황기(강원도 정선), 천궁(전북 무주)을 方藥合編의 지도에 따라 Table I의 비율로 SM, SG, PM 및 SJ에 해당하는 약재를 각 3.75 g씩 혼합하여 20배량의 정제수에 넣고 2시간 동안 100℃에서 무압력으로 추출하였다. 이액을 여과하여 분무건조기(Eyela, Japan)로 건조시켜 사용하였다.

Table Ⅰ. The Composition of *Samul-tang*, *Sagunja-tang*, *Palmul-tang* and *Sipjeondaebo-tang*

Prescription			Botanical Origin	Crude Drugs	Place	Ratio(g)
Sipjeondaebo-tang	*Palmul-tang*	*Samul-tang*	*Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino	Rehmanniae Radix Preparata	Jeonbuk/Korea	3.75
			Paeonia lactiflora Pallas	Paeoniae Radix	Jeonnam/Korea	3.75
			Angelica gigas Nakai	Angelicae Gigantis Radix	Gangwon/Korea	3.75
			Cnidium officinale Makino	Cnidii Rhizoma	Jeonbuk/Korea	3.75
		Sagunja-tang	*Panax ginseng* C. A. Meyer	Ginseng Radix Alba	Chungnam/Korea	3.75
			Atractylodes japonica Koidzumi	Atractylodis Rhizoma Alba	Gangwon/Korea	3.75
			Poria cocos Wolf	Hoelen	Gangwon/Korea	3.75
			Glycyrrhiza uralensis Fischer,	Glycyrrhizae Radix	China	3.75
			Astragalus membranaceus Bge.	Fabaceae	Gangwon/Korea	3.75
			Cinnamomum cassia Blume	Lauraceae	Vietnam	3.75

2. 항염증 활성 검색

1) RAW 264.7 세포 배양 및 세포 증식 효과

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7을 96 well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 약재 추출물을 1~1000 μg/mL 농도로 처리하였다. 비교물질로는 Concanavalin A(Con A, Sigma, USA)와 lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA)를 사용하였다. 48시간 배양 후 tetrazolium salt인 Cell Counting Kit-8 kit(CCK-8 kit, Dojindo Laboratories, Japan) solution을 첨가하여 4시간 더 배한 다음 ELISA reader(Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control well의 흡광도에 대한 약물첨가 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였고, 여러 well의 평균값을 사용하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\% = \frac{(\text{약물첨가 well의 Abs450mm 평균값}) - (\text{Blank well의 Abs450mm 평균값})}{(\text{Control well의 Abs450mm 평균값}) - (\text{Blank well의 Abs450mm 평균값})} \times 100$$

2) PGE_2 생성 억제 효과(Cyclooxygenase 활성 억제 효과)

RAW 264.7세포를 2.5×10^4 cell/well로 48 well plate에 분주한 후 CO_2 incubator내에서 24시간 배양한 후 무처치군에는 배지만 처리하고 대조군과 약물 처리군에는 LPS를 1 μg/mL이 되도록 처리하였다. 시료 처리군에는 phosphate buffered saline(PBS, Gibco BRL, USA)에 용해시킨 시료 추출물을 20, 100, 200 및 1000 μg/mL로 처리하였으며, 양성 대조군으로 COX-II inhibitor인 indomethacine(ID, Sigma, USA)을 사용하였다. 약물 처리 후 18 시간 배양시키고 arachidonic acid(Sigma, USA)의 최종농도가 30 μM이 되도록 하여 15분간 처리하였으며 얼음상에서 반응을 중지시켰다. 12000 rpm에서 원심분리(Eppendorf Centrifuge 5415R, Germany)하여 상층액을 분리하고 Prostaglandin E_2(PGE_2) 정량에 사용하였다. PGE_2의 정량은 Biotrak Enzymeimmunoassay(EIA) System(Amersham Biosciences, UK)의 방법을 따라서 수행하였다. 최종적으로 450 nm에서 흡광도 측정하였으며 LPS 처리로 유발된 PGE_2 생성량에 대해서 시료 처리군의 생성 억제율을 계산하였다.

3) Nitric oxide(NO) 생성 억제 효과 검색

RAW 264.7세포를 2.5×10^4 cell/well로 48 well plate에 분주한 후 CO_2 incubator내에서 24시간

배양한 후 무처치군에는 배지만 처리하고 대조군과 약물 처리군에는 LPS를 1 μg/mL이 되도록 처리하였다. 시료 처리군에는 PBS에 용해시킨 시료추출물을 20, 100, 200 및 1000 μg/mL로 처리하였으며, 양성대조군으로 iNOS inhibitor인 N^G-monomethly-L-arginine(NMMA, Sigma, USA)을 사용하였다. 18 시간 반응 후 얼음상에서 반응을 중지시키고 12000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상층액을 분리하고 NO 정량에 사용하였다. NO의 정량에는 Griess reagent(Promega, USA)를 사용하였으며 LPS 처리로 유발된 NO 생성량에 대해서 시료 처리군의 생성 억제율을 계산하였다.

3. 항산화 활성 검색

1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성

0.2 mM DPPH (in EtOH)를 96-well plate에 50 μL/well로 첨가 후 0.1 M Tris-HCl buffer에 시료를 농도별로 제조하여 첨가하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 분해되지 않고 남아있는 DPPH 라디컬 소거능을 측정하였다.

$$EDA(\text{electron donating ability})\ (\%) = \frac{\text{Abs of control group} - \text{Abs of treatment group}}{\text{Abs of control group}} \times 100$$

4. 면역 활성화 작용 검색

1) RAW 264.7 세포의 Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/well로 48 well plate에 분주하여 CO_2 incubator 내에서 24시간 배양한 후 양성 대조군으로 LPS를 처리하고 처방 추출물을 농도별로 처리하였다. 약물 처리군에는 각 처방을 1, 10, 100 및 1000 μg/mL 처리하고 18시간 배양 후 상층액을 분리하고 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 Griess reagent를 이용하여 반응시켰으며 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 비장 세포의 활성화 효능 검색

(1) 비장 세포의 배양

7주령의 수컷 C57BL/6 mouse(한림실험동물, 충북 음성)를 경추탈골 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 Hank's Balanced Salts solution (HBSS, Gbico BRL., USA)로 세척하고 세포 분리 후 원심 분리하여 RBC lysis buffer(Sigma, USA)로 적혈구를 제거한 후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL., USA)과 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin(P&S, Gibco BRL., USA)을 함유하는 RPMI 1640(Hyclone, USA) 배지에 부유시켜 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다.

(2) Cytokine (IL-2, IL-4) 유발 효과

비장세포에 각 처방을 농도별로 첨가하여 배양한 상층액을 24시간 후에 회수하여 EIA kit (R&D, USA)로 상층액에 포함된 Interleukin (IL)-2, IL-4의 양을 측정하였다. 양성대조군으로 LPS를 사용하였다. 방법은 JE/IL-2, IL-4에 결합하는 1차 항체가 코팅된 microwell plate에 standard, control, sample을 각각 넣어서 2시간 반응하고 JE/IL-2, IL-4 conjugate를 넣어 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 발색시약으로 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 용액을 첨가하여 발색시킨다. 1 M H_2SO_4를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 450 nm(detection)와 570 nm(reference)에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 비장세포의 세포 증식 효과

처방 추출물이 비장 세포 증식에 미치는 효과

를 검색하기 위하여 96 well plate에 분리 배양한 비장 세포를 5×10^5 cells/well로 분주하고 처방 추출물을 1~1000 μg/mL 농도로 PBS에 용해하여 첨가하였다. 처방의 세포증식 효과에 대한 비교물질로 Con A와 LPS를 사용하였다. 2일간 배양한 후 CCK-8 용액으로 세포 증식도를 측정하였다.

5. 자료의 통계적 분석

실험결과 자료의 통계처리는 SYSTAT 프로그램(SYSTAT ver 8.0, SPSS Inc., USA)을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하고 각 군 간의 차이를 검증하기 위하여 Bonferroni multiple comparison test를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 통계학적인 유의수준은 $P<0.05$로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 처방 추출물의 제조

각 처방의 열수 추출물의 수득율은 SM 21.1%, SG 11.0%, PM 17.8% 및 SJ 17.0%였다. 처방의 종류에 따라 수율이 모두 다르게 나타났으므로 이후의 활성 검색 시 동일한 양의 시료를 처리하기 위하여 건조약재 중량으로 환산하여 사용하였다.

2. 항염증 활성 검색

1) PGE_2 생성 억제 효과

처방의 독성을 검색하기 위하여 RAW 264.7 세포에 1~2000 μg/mL까지 처리하여 독성 유무를 판단하였다. 그 결과, 각 처방은 농도 2000 μg/mL까지 독성이 없었다. 이 후 실험에서는 최대 1000 μg/mL로 처리하여 실험을 진행하였다(data not shown).

RAW 264.7 세포에 LPS로 유발되는 COX의 활성 증가로 생성되는 PGE_2 생성량 검색 결과, 정상군은 1.85±0.15 ng/mL, LPS 유도군은 21.23±4.70 ng/mL로 정상군에 비해 약 11배의 PGE_2 생성이 증가하였다. 양성 대조군인 ID는 농도 의존적으로 PGE_2 생성을 감소(IC_{50}=5.11 μg/mL) 시켰다. 하지만 처방 SM, SG, PM 및 SJ는 PGE_2 생성 억제 효과를 나타내지 않았다(Fig. 1-A).

2) NO 생성 억제 효과 검색

염증반응이 일어나면 iNOS가 활성되고 그 후 NO의 생성이 증가한다. RAW 264.7 세포에 LPS을 반응시켜 염증반응을 유도하고 각 처방을 처리하여 염증 억제 반응을 검색하였다. 그 결과, 정상군(0.28±0.03 μM)에 비해 LPS 유도군(25.37±0.40 μM)에서 약 92배의 NO 생성이 증가되었고 양성대조군인 NMMA가 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다(IC_{50}=20.03 nM). 하지만 각 처방 처리군에서는 NO 생성 억제 효과는 나타나지 않았다(Fig. 1-B).

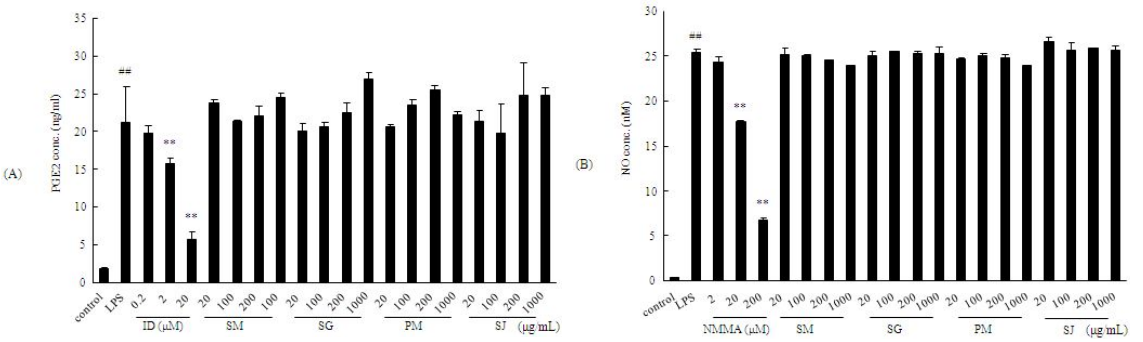


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of *Samul-tang*(SM), *Sagunja-tang*(SG), *Palmul-tang*(PM) and *Sipjeondaebo-tang*(SJ) extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.
Cells were treated with LPS(1 μg/ml) for 18 hr in the presence or absence of SM, SG, PM and SJ extracts. PGE2 assay (A) NO inhibition assay (B) (##p<0.01 compare with control group, *p<0.05, **p<0.01 compare with LPS group).

3. 항산화 활성 검색

대표적인 항산화 활성 검색법인 DPPH 라디칼 소거능에 대한 연구 결과, 양성 대조군으로 사용한 L-ascorbic acid(1 mg/mL)는 약 98%의 DPPH 라디칼 소거능이 나타남을 확인하였다. 하지만 Table II에서 나타낸 바와 같이 각 처방에 대한 DPPH 라디칼 소거능은 4~11%로 매우 낮았다. 각 처방 중에서 SM의 라디칼 소거능은 11%로 다른 처방들 보다 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보여 주었다.

Table Ⅱ. DPPH Raical Scavenging Effects of *Samul-tang*, *Sagunja-tang*, *Palmul-tang* and *Sipjeondaebo-tang*

Sample (1mg/ml)	Extracts (EDA %)
Samul-tang	11.243±0.220
Sagunja-tang	4.525±0.441
Palmul-tang	8.765±1.597
Sipjeondaebo-tang	4.635±1.322
L-ascorbic acid	98.47±0.078

4. 면역 활성화 작용 검색

1) 대식세포의 활성화

대조군(100.0±1.9%)과 비교하여 Con A(2 μg/mL) 처리 시 1.6 배의 세포증식 효과가 나타났다(161.81±1.73%). 하지만 LPS의 경우에는 고농도 일수록 오히려 세포증식이 억제 되는 것을 알 수 있었다. 이것은 LPS에 의한 세포독성으로 인한 결과라고 볼 수 있다(data not shown). SM, SG, PM 및 SJ의 모든 처리 농도에서 세포 증식 효과가 나타났다. 그 중 PM의 경우 모든 처리 농도에서 다른 처방들 보다 높은 세포 증식도를 나타냈고 특히, 100 μg/mL 처리 시 183.6±8.3%로 가장 높게 나타났다(Fig. 2-A).

외부 침입 물질의 제거기능을 하는 NO의 생성량을 측정한 결과, 양성 대조군으로 사용한 LPS는 정상군(0.86±0.34 μM)에 비해 1 μg/mL 처리 시 약 57배(35.79±0.73 μM) NO 생성량이 증가하였다. 처방을 농도별로 처리한 결과, SM, PM, SG는 농도 의존적으로 NO의 생성량이 증가시켰고, 특히 각 처방의 처리농도 1000 μg/mL에서는 양성대조군인 LPS만큼 증가 하였다(SM; 31.69±0.98 μM, SG; 35.31±0.98 μM, PM; 32.74±0.35 μM). 반면 SJ의 경우, 처리농도 100, 1000 μg/mL에서 NO의 생성이 크게 증가하였지만

SM, SG 및 PM보다는 NO의 생성량이 낮았다(Fig. 2-B). SJ도 처리 농도 1000 μg/mL에서 19.49±0.82 μM로 정상군에 비해 약 22배의 증가하여 NO 생성에 효과가 있음을 확인하였다.

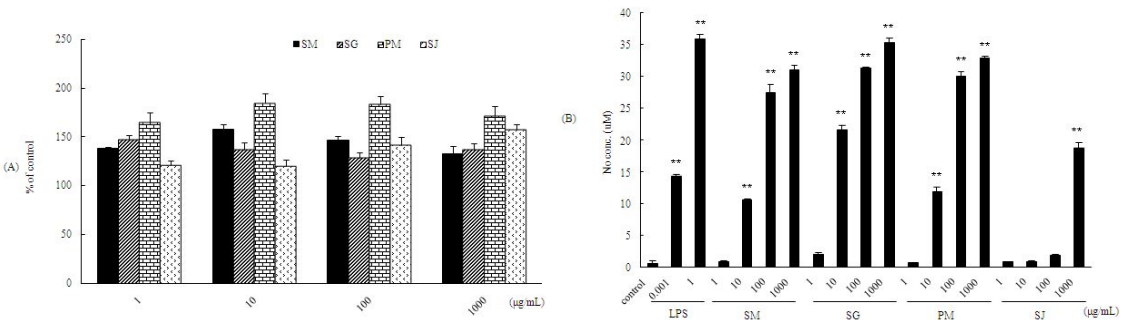


Fig. 2. The activities of macrophage cell(RAW 264.7) of *Samul-tang*(SM), *Sagunja-tang*(SG), *Palmul-tang*(PM) and *Sipjeondaebo-tang*(SJ) extracts on in RAW 264.7 Cell.
Cells for 24 hr in the presence of SM, SG, PM and SJ extracts. NO production(2.5×10^5 cells/well) (A) The macrophage proliferation(3×10^3 cells/well) (B) (**p<0.01 compare with control group).

2) 비장세포의 세포 증식 효과

T, B 세포 등 다양한 면역 관련 세포가 포함되어 있는 비장세포가 증식한다는 것은 면역 작용에 있어서 중요한 단서가 될 수 있다. 분리한 비장세포에 처방 및 시료를 처리하고 48시간 후 세포증식도를 측정한 결과, 양성 대조군으로 사용한 con A는 0.5, 1 μg/mL 처리 시 179.5±26.2%, 214.0±7.4% 증가하였고, LPS를 0.5, 1 μg/mL 처리 시 193.0±4.0%, 239.9±37.3% 증가하였음을 확인하였다. 각 처방을 10~1000 μg/mL 처리 시 약 1.2~2.3배 이상 비장세포 증식 효과를 나타냈다. 그 중 SG 1000 μg/mL 처리군은 230.7±1.3%로 가장 높은 활성을 나타냈다. SM과 PM 처리군은 세포 증식도가 비슷한 양상을 나타냈다. SJ 처리군은 10, 100 μg/mL 처리 시에는 약 2배의 증식을 나타냈지만 1000 μg/mL에서는 1.2배로 증식도가 감소하였다. 하지만 정상군에 비해 약 1.2배의 증식이 있었으므로 이 농도에서도 증식 효과가 있었다고 할 수 있다(Fig. 3).

비장세포에서 IL-2, IL-4의 분비량을 검색한 결과, IL-2는 모든 처방 처리군에서 정상군에 비해 낮게 분비 되었다(Fig. 4-A). IL-4 분비량은 정상군(6.23±0.14 ng/mL)에 비해 양성대조군인 LPS 처리 시 분비량이 1.7배 증가되었고 모든 처방 처리군에서 IL-4의 분비가 LPS만큼 증가하였음을 확인하였다(Fig. 4-B). 즉, SM, SG, PM 및 SJ는 T세포를 활성화시키는 작용보다는 B세포를 활성화 시키는 면역 반응에 반응한다고 추측할 수 있었다.

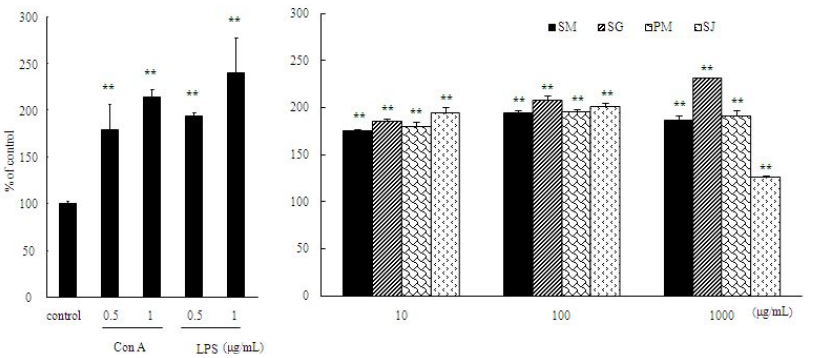


Fig. 3. The proliferation of splenocyte treated with *Samul-tang*(SM), *Sagunja-tang*(SG), *Palmul-tang*(PM) and *Sipjeondaebo-tang*(SJ).
Cells were seeded into 96-well plates and treated with SM, SG, PM and SJ extracts for 48 hr. Con A and LPS were used as positive control. The splenocyte proliferation (B) (**p;<0.01 compare with control group).

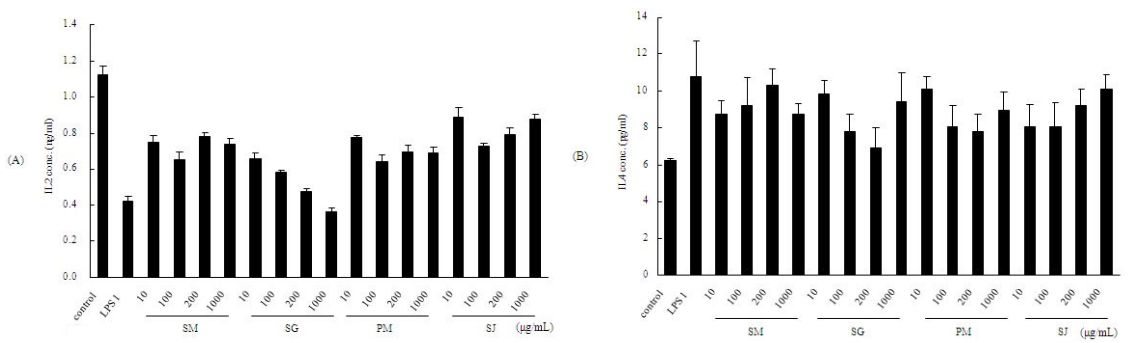


Fig. 4. The stimulation of cytokine production of *Samul-tang*(SM), *Sagunja-tang*(SG), *Palmul-tang*(PM) and *Sipjeondaebo-tang*(SJ) extracts on mouse splenocyte.
Cells were treated with SM, SG, PM and SJ extracts for 24 hr. Con A and LPS were used as positive control. The stimulation of IL-2 (A) The stimulation of IL-4 (B).

Ⅳ. 고 찰

지금까지 SM[17], SG[18], PM[19] 및 SJ에 대한 다양한 문헌 및 실험 연구들이 진행되었다. 또한, 사군자탕, 사물탕 등이 항스트레스 효과에 대한 효능[20], 향부자팔물탕에 대한 항스트레스[21] 및 alzheimer's disease에 대한 효능[22]과 십전대보탕의 신경교세포의 산화성 손상을 방어한다는 보고[23]들이 있다. 지금까지의 연구들은 주로 각 처방 및 처방의 가감방에 대한 연구들이 주를 이루었다. 본 연구는 SM, SG, PM 및 SJ에 대한 차이점 및 유사점을 확인하고자 항염증, 항산화 및 면역 반응에 대한 연구를 진행하였다. 모든 처방들이 SJ을 구성하는 약재들로 구성되어 있지만 적용 질환들에 차이가 있으므로 그 이유에 대한 과학적인 해답을 찾고자 하였다. 그 결과, SM, SG, PM 및 SJ은 항염증 및 항산화반응에 대해 효과적이지 않았다. 따라서 SM, SG, PM 및 SJ는 한의학적으로 보기(補氣)에 해당하는 처방이므로 항염증 및 항산화 효능 보다 면역 증강 효능이 우수할 것이라 기대되었다. Murine

macrophage RAW 264.7 cell을 이용한 대식세포 증식 효과를 확인한 결과 모든 처방의 농도별 처리에서 세포 증식 효과가 나타남을 확인하고 면역 증강 효능 검색에 중점을 두고 연구를 진행하였다.

대식세포는 식균 작용을 하기 때문에 대식세포가 증가하였다는 것은 외부 물질에 대한 항원을 제거할 수 있는 면역 반응의 1차 단계 기능이 증가하였다는 것을 의미한다[24]. 대식 세포 증식은 모든 처방 처리 시 증가하였고 그 중 PM 처리군이 가장 많은 증식율을 나타냈다. 외부 항원에 대한 대식세포의 활성반응을 확인하기 위하여 NO 생성량 측정 결과, 양성 대조군인 LPS 1 μg/mL 처리 시 증가한 NO의 분비량만큼 SM, SG 및 PM은 농도 의존적으로 NO의 생성이 증가되어 SM, SG 및 PM은 외부 침입 물질 제거 기능이 우수함을 확인하였다. SJ의 경우 낮은 농도에서는 효과가 미비하였지만 100 μg/mL 이상에서 NO의 생성량이 증가하여 NO 생성에 효과적이고 대식세포의 증식이 증가하였으므로 SJ 역시 면역 증진 효과가 있는 것으로 사료된다.

비장세포는 T 및 B 림프구 등에 의한 다양한 면역 반응이 이루어지므로 비장세포의 증식은 비장내 면역 세포의 활성화를 촉진한 것으로 해석할 수 있다. 각 처방에 대한 비장 세포의 증식을 확인한 결과, 모든 처방 처리 시 의미있게 증가되었다($p<0.01$). 이는 모든 처방이 대식 세포뿐만 아니라 비장세포의 증식에도 효과가 있음을 확인한 것이다. 면역 반응 활성화와 관련된 기전 확인을 위하여 IL-2와 IL-4의 분비량 측정 결과, SM, SG, PM 및 SJ 처방들은 T 세포를 활성화 시키는 IL-2 보다는 T 세포에서 분화되어 B세포의 활성화를 돕는 IL-4 분비를 증가시켰다. 이것은 SM, SG, PM 및 SJ가 모두 B 세포의 활성과 연과된 것으로 사료된다. 이후 B 세포의 활성에 대한 심도있는 기전 연구를 진행한다면 처방들에 대한 면역활성 경로를 확인할 수 있을 것이다. 본 연구팀은 면역활성과 관련하여 동물실험 및 microarray등을 활용한 기전 연구를 진행하여 추후 면역 활성과 관련된 기전을 규명하고자 한다.

결론적으로 SM, SG, PM 및 SJ는 항염증과 항산화 효과 보다는 면역 활성에 보다 효과적으로 반응하는 것을 확인하고 면역 저하 및 면역 관련 질환에 적용하는 것이 바람직하다고 사료된다. 각 처방이 면역 기능 활성화에 미치는 명확한 차이점은 발견하지 못하였지만 각 처방들이 고문헌 및 적용 범위의 사례들을 고려하였을 때 유사한 점들이 많아 본 연구의 결과와도 일치한다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

SM, SG, PM 및 SJ는 항염증과 항산화 효능이 미비하였지만 각 처방에 대한 면역 활성을 검색한 결과, 모든 처방에서 대식세포 및 비장세포를 활성화한다는 것을 확인하였다. 이것은 T세포 활성에는 직접적인 영향을 주지 않지만 B 세포의 활성에는 효과가 있는 것으로 판단된다. SM, SG, PM 및 SJ 처방은 면역 저하 및 면역 활성 관련 질환 치료에 적용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원이 지원하는 '표준한방처방 EBM 구축사업'으로 진행되었다.

참고문헌

1. Kim HC. Herbal pharmacology. Jipmoondang. 2001.
2. Kang SS, Recommended Prescription of Herbs. Daesung Culture press. Seoul. 1993;122-3.
3. Shin MK, 1996. New Clinical Therapies of Oriental Traditional Medicine. Younglim press. Seoul. 1996;99:389-90.
4. Xu X, Wang S, Chen W, Chen G. Effects of taohong siwu decoction II in the chick chorioallantoic membrane(CAM) assay and on B16 melanoma in mice and endothelial cells ECV304 proliferation. J Tradit Chin Med. 2006;26(1):63-7.
5. Li R, Qin L, Wang Y. Experimental study on preventive effect of traditional Chinese medicine replenishing recipe on acute oxygen toxicity caused by hyperbaric oxyge, Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1998;18(10) :623-5.
6. Xu AH, Gong YX, Gu WR, Wang XW. Comparison of the effect of sijunzi decoction, siwu decoction and bazhen decoction on immune function in mice. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1993;18(4):240-56.
7. Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. Effect of a Herb Mixture(HIM-I) on the protection of the Hematopoirtic-immune System and Self-renewal Tissues against Radiation Damage. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005;34(5):605-12.
8. Lee BR, Ahn BC. The effects of Sakunjatang and Samultang Aqua-acupuncture on immune response. K.O.M.S. 1997;18(1):357-74.
9. Jung W, Ryu BH, Kim JS, Yoon S, Ryu KW. Effects of Sagunjatang and Sagunjatang plus Mylabris phalerata onHuman Stomach Cancer Cells. Korean J Orient Int Med. 2001; 22(4):579-87.
10. Han SH, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The inhibitory Effects of Cheonsagunja-tang and Leech on the IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA Level by Human Epithelial Cells. Korean J Orient Int Med. 2001;22(4):414-9.
11. Nam YJ, Hwang WJ. Lim KS. The study of Effects on Sagunjatang. Korean Orient Med prescription. 1991;2(1):85-95.
12. Son JH, Jeong JH, Yoo DY. Effects of Pal-Mul-Tang on Cytokines Production from Immune cells during the late stage of Pregnancy in BALB/c mice. J. Orient Gynecology. 1999;12(2):341-74.
13. Heo MK, Hong HY, Kam CW, Park DI, Expreimental Study on the Anti-allergic Effects of Pamul-tang. Kor J Orient Physiology & Pathology. 2003;17(4):1075-81.
14. Oh JJ, Won JH, Lee EJ, Moon SJ. The Side Effects of Paljin-tangGagambang by anticancer immune response and anticaner-durgs. KIMS. 1998;19(2):219-32.
15. Nathan C and Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immuno. 1991;3:65-70.
16. Lee HY, Ha H, Jung DY, Choi J, Lee NH, Ma JY, Yu YB, Shin HK, Study on pharmacological activity of Sipjeondaebotang which were difference a component ratio between Astragalea Radix and Cinnamomum

cortex. J Korean Oriental Med. 2008;29(1) :156-66.

17. Kim JH, Lee JK, Ha H, Seo CS, Lee HY, Jung DY, Lee NH, Lee JA, Huang DS, Shin HY. Analysis of Studies on Samul-tang for Fundamental Establishment of Evidence Based Medicine. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2009;23(4):779-88.
18. Kim JH, Lee JK, Shin HY. Analysis of Studies on Sagunja-tang(Silunzi-tang) to Establishment the Funfament for Evidence Based Medicine. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(2):206-19.
19. Ma CJ, Lee NH, Ma JY, Ha H, Yu YB, Shin HK. Analysis of Studies on Palmul -tang for Establishment of Evidence Based Medicine. Kor J Orient Med Prescription. 2007;15(2):35-45.
20. Kang YG, Lee TH. Yookmijihwang-tang on the plasma corticosterone level in mice exposed to heat, cold and immobilization stress. Korean J of Oriental Medicinal Prescription. 2002;10(2):97-112.
21. Lee SG, Kim JW, Whang WW. The experimental study on the effects of Hyanbujapalmultang on anti0stress and immune response in immobilization stressed rats. J of Oriental Neuropsychiatry. 1997;8(1):81-93.
22. Kang HG, Kim JW, Whang WW. The effects of Hyanbujapalmultang on learning and memory of AD rats using morris water maze paradigm. J of Oriental Neuropsychiatry. 1999;10(1):39-51.
23. Ryu JY, Yun JM, Cho KH, Moon BS. Effects of sibjeondaebo-tang on oxidative stress of C6 glial cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(4):1120-8.
24. Lowenstein, CJ, Alley, EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russel SW, Murphy WJ. Macrophage nitric interferon Y and lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:9730-4.