

六味地黃湯, 八味地黃湯 및 加味地黃湯이 생쥐의 腹腔大食細胞 活性에 미치는 影響

韓一洙 · 金哲中*

ABSTRACT

Studies on the Activities of Peritoneal Macrophages Induced by Yookmijihwangtang, Palmijihwangtang and Gamijihwangtang

Hahn, Il-Soo · Kim, Cheol-Joong*

In order to investigate the effects of YOOKMIJIHWANGTANG, GAMIJIHWANGTANG and PALMIJIHWANGTANG on the various immune responses, the chemotactic, adherent, nitric oxide release ability of macrophages were studied in vivo and in vitro.

The results obtained were follows :

1. The total number of peritoneal exudate cells from mice injected with three drugs were 2~3 times more than those from the PBS.
2. The administration of three drugs enhanced significantly the Fc receptor mediated activity(phagocytosis, rosette formation activity).
3. The administration of three drugs enhanced significantly the chemotactic activity of peritoneal macrophages.
4. The administration of three drugs enhanced significantly the adherent activity of macrophages and neutrophils.
5. The administration of GAMIJIHWANGTANG and PALMIJIHWANGTANG enhanced significantly the chemotactic activity of macrophages ($p<0.01$). And also the administration of YOOKMIJIHWANGTANG enhanced significantly the chemotactic activity of macrophages($p<0.05$).
6. The administration of GAMIJIHWANGTANG and enhanced significantly the chemotactic activity of neutrophils($p<0.01$). And also the administration of YOOKMIJIHWANGTANG and PALMIJIHWANGTANG enhanced significantly the chemotactic activity of neutrophils($p<0.05$).

From above findings, it is suggested that YOOKMIJIHWANGTANG, GAMIJIHWANGTANG and PALMIJIHWANGTANG seems to produce the increase of immune response such as the Fc receptor activity, chemotactic activity, adherent activity, nitrate release of macrophages. From the above results, the GAMIJIHWANGTANG among three drugs may be the most useful drug having immunostimulating effects.

I. 緒 論

免疫(immunity)은 生體가 自己와 非自己를 識

別하는 機構로서 非自己를 除去하여 個體의 恒常性을 維持하는 現象으로¹⁻²⁾, 大食細胞(macrophage) 등이 모든 侵入異物質을 非特異적으로 食食하는 自然免疫(natural immunity)과 T, B淋巴球가 生體에 侵入한 抗原에 對하여 特異적으로 反應하는 獲

* 大田大學校 韓醫科大學 內科學教室

得免疫(acquired immunity)으로 區分한다¹⁻⁵⁾.

東洋醫學에서 免疫이란 語彙는 18世紀에 刊行된 《免疫類方》⁶⁾에 처음 사용되었으나 免疫概念은 이미 《素問·刺法論》⁷⁾에 “五疫之至, 皆相染易, 無問大小, 病狀相似, 正氣存內, 邪不可干”라 하고, 《素問·上古天真論》⁷⁾에 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”라 하며, 《素問·評熱病論》⁷⁾에서 “邪氣所湊, 其氣必虛”라 하여 疾病 發生過程 중 外邪에 對한 內的인 抗病能力, 卽 正氣를 더욱 重要視하였다⁶⁾.

正氣에 對하여 《靈樞·刺節眞邪篇》⁸⁾에서는 “眞氣者, 所受於天, 與穀氣進而充身者也”이라 하였고, 《素問·陰陽應象大論》⁷⁾에는 “天氣通於肺”라 하여 脾, 肺, 腎이 正氣와 密接한 關係가 있다고 하였는데, 劉⁶⁾ 戴⁹⁾ 등은 三臟 중 腎이 根本이라고 하였다.

八味地黃湯은 張¹⁰⁾의 《金匱要略》에 八味腎氣丸으로 처음 收載되었고 六味地黃湯은 錢¹¹⁾의 《小兒藥證直訣》에 처음 記錄되어 각각 腎陽과 腎陰을 補하는 代表的인 處方으로 臨床에서 널리 活用되고 있다^{6,9-34)}.

免疫에 對한 實驗研究 중 補劑로는, 朴³⁵⁾은 歸脾湯과 歸脾湯加味方이, 黃³⁶⁾은 十全大補湯이, 李³⁷⁾ 林³⁸⁾은 四君子湯이, 金³⁹⁾은 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이, 閔⁴⁰⁾ 李⁴¹⁾는 補中益氣湯이, 金⁴²⁾은 歸茸湯이, 朴⁴³⁾은 少陰人 十全大補湯이, 李⁴⁴⁾는 蔘苓白朮散이, 尹⁴⁵⁾은 六君子湯이, 高⁴⁶⁾는 鹿茸 熟地黃人蔘 五加皮가 免疫機能을 增強시킨다고 하였다. 그러나 六味地黃湯과 八味地黃湯이 macrophage의 活性에 미치는 影響에 對한 實驗研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 六味地黃湯과 八味地黃湯 및 六味地黃湯에 溫腎補陽, 添精補髓의 效能⁴⁷⁻⁴⁹⁾이 있는 鹿茸을 加한 加味地黃湯이 免疫에 미치는 效果를 料明할 目的으로 이 3種의 處方을 마우스에 投與하여 macrophage의 貪食能, 走化能, 附着能, 二酸化窒素 生成能의 變化를 觀察하였던 바, 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

本 實驗에 使用된 動物은 5週齡의 specific pathogen free(SPF)의 ICR系 마우스 수컷(韓國化學研究所) 중에서 體重이 25~35g 範圍에 屬하는 것 만을 골라 使用하였다. 마우스는 滅菌한 polycarbonate cage(明進機械 Co.)에 넣어 滅菌한 市販 實驗動物用 固形飼料(三養飼料 Co., 實驗動物用)를 주었고, 飲水로는 精製水를 自由로이 攝取하게 하였다. 實驗開始 前에 實驗室環境(恒溫·恒濕條件 23±2℃, 50±10%)에 2週 동안 適應시킨 다음 實驗에 使用하였다.

2) 材料

本 實驗에 使用된 藥材는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入하여 使用하였다. 處方은 方藥合篇³⁴⁾에 收錄된 六味地黃丸과 八味地黃丸을 湯劑로 使用하고 六味地黃湯에 鹿茸을 加한 加味地黃湯으로 處方內容과 一貼 分量은 다음과 같다.

Prescription of YOOKMIJIHWANGTANG(YM)

構成藥物	生藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	15.000
山 藥	Dioscoreae Radix	7.000
山茱萸	Corni Fructus	7.000
白茯苓	Poria	5.625
牡丹皮	Moutan Cortex	5.625
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	5.625
Total Amount		46.875

Prescription of GAMIJJIHWANGTANG(GM)

構成藥物	生藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	15.000
山 藥	Dioscoreae Radix	7.000
山茱萸	Corni Fructus	7.000
白茯苓	Poria	5.625
牡丹皮	Moutan Cortex	5.625
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	5.625
鹿 茸	Cervi Pantorichum Cornu	3.750
Total Amount		50.625

Prescription of PALMIJIHWANGTANG(PM)

構成藥物	生藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat	15.000
山 藥	Dioscoreae Radix	7.000
山茱萸	Corni Fructus	7.000
白茯苓	Poria	5.625
牡丹皮	Moutan Cortex	5.625
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	5.625
附子炮	Aconiti lateral preparata Radix	1.875
肉 桂	Cassiae Cortex	1.875
Total Amount		50.625

2. 方法

1) 檢液의 調製와 實驗群 및 檢液投與

①檢液의 調製

上記 處方 3貼의 分量(YM; 140.625g, GM; 151.875g, PM; 151.875g)을 各各 細切하여 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 蒸溜水를 加하여 3回, 3時間씩 加熱抽出하고 吸引濾過한 濾液을 rotary evaporator로 加壓濃縮하여 粘粗性의 YM抽出液 50ml, GM抽出液 50ml, PM抽出液 50ml을 얻어 各各 蒸溜水로 10倍 稀釋하여 500ml 檢液으로 調製하여 使用하였다.

②實驗群 및 檢液投與

3個 處方의 腹腔投與時 腹腔內에서 일어나는 免疫細胞의 動態, 腹腔macrophage의 活性에 미치는 影響을 檢索하기 위하여 마우스를 PBS投與群을 對照群으로 하고 YM投與群, GM投與群, PM投與群의 4個群으로 나누고 15 마리를 1群으로 하였다. 投與量은 各 檢液을 體重 Kg當 20ml로 腹腔投與한 後 1, 3, 5日에 各 群當 5 마리씩 放血屠殺하여 回收한 腹腔滲出液을 實驗에 使用하였다.

2) 免疫細胞의 動態에 미치는 影響

① 腹腔滲出細胞의 總細胞數 및 種類(subtype)의 測定

上記 檢液을 腹腔投與한 마우스를 一定時間後에 各 群當 5 마리씩 ether 痲醉下에 放血屠殺한 後 腹腔內에 10ml 注射器로 4℃의 PBS를 10ml씩 넣어 1分間 浸漬한 다음 腹腔滲出液을 回收하였다. 이 때 같은 群으로 부터 回收한 腹腔滲出液을 같은 試驗管에 混合하여 1,500rpm에서 10分間 3回 遠心分離한 다음 trypan blue exclusion法에 의하여 細胞生存率(cell vitality)을 確認하고 各 群當 總細胞數를 算出하였다. 그 後 細胞의 分散液을 10% fetal calf serum(FCS, Flow Laboratories), 100 μ g/ml streptomycin, 100 μ g/ml penicillin이 包含된 RPMI 1640培地에 適當한 濃度로 稀釋하여 4℃에 保存하였다. 또한 細胞 種類를 分析하기 위하여 腹腔滲出液의 一部를 採取하여 cytocentrifuge用 slide glass當 5 \times 10⁴個/ml의 濃度로 調整한 다음 cellspin(HANIL Co.)에서 1,500rpm의 速度로 5分間 遠心分離하여 塗沫標本을 製作한 後 乾燥시켜 Wright-Giemsa染色을 하였다. 各 細胞의 種類

는 顯微鏡 視野當 500個의 細胞를 計算하여 그 百分率을 算定하였다.

3) 腹腔macrophage Fc 受容體 媒介性 活性能 測定⁵⁰⁾

① 腹腔macrophage의 分離方法

上記 方法에 依하여 分離培養한 腹腔滲出細胞를 培地 1ml當 2 \times 10⁶個의 濃度로 調節한 다음 chamber slide(Nunc Inc. 177372)에 1ml씩 分注하여 2時間 培養한 後, 37℃ 培地로 3차례 씻은 다음, 附着된 細胞를 腹腔macrophage로 利用하였다.

② 赤血球抗體(erythrocyte-antibody: EA)의 準備

綿羊의 頸靜脈으로 부터 無菌的으로 血液採取하여 Alsever溶液(Difco Co., U.S.A.)에 1:1 比率로 保管하였다. 使用時 1,800rpm에서 10分間 3回 遠心分離하여 씻은 綿羊赤血球(sheep red blood cell: SRBC)에 rabbit anti-SRBC IgG (Cappel, Organon Teknika Co., U.S.A.) 抗體를 加하여 128倍의 濃度로 稀釋한 後에 37℃ shaking water bath에서 30分間 反應시킨 다음, 다시 1,800rpm에서 10分間씩 3回 遠心分離하여 씻은 赤血球를 antibody-sensitized SRBC 卽 赤血球抗體로 利用하였다.

③ 腹腔macrophage의 rosette活性能 測定

各 檢液이 腹腔macrophage의 Fc 受容體 媒介性 rosette活性能에 미치는 影響을 調査하기 위하여 chamber slide에 附着된 約 2 \times 10⁶個/ml의 腹腔 macrophage 위에 綿羊赤血球의 抗體를 塗布한 赤血球抗體를 1 \times 10⁸個/100 μ l 加하여 37℃에서 10分間 反應시킨 後 37℃의 培地로 3回 씻고 cover와 chamber를 제거한 slide를 乾燥 固定한 後 Wright-Giemsa染色을 하여 觀察하였다. 計算은 500個의 macrophage 중에서 rosette를 形成한 macrophage를 100分率로 計算하였다. 이 때 한 개의 macrophage의 細胞膜 周圍에 4個 以上の 赤血球가 附着된 것을 rosette 形成으로 判定하였다.

④ 腹腔macrophage의 貪食能 測定

各 檢液이 腹腔macrophage의 Fc 受容體 媒介性 貪食能에 미치는 影響을 調査하기 위하여 chamber slide에 附着된 2 \times 10⁶/ml個의 腹腔 macrophage에 2 \times 10⁸/100 μ l의 赤血球抗體를 加하

여 37°C에서 1시간 동안 反應시킨다. 0.83% NH₄Cl-Tris buffer 또는 蒸溜水를 加하여 貪食되지 않은 赤血球抗體를 溶血시키고 다시 더운 培地로 3회 씻은 다음 cover와 chamber를 제거한 slide를 乾燥 固定한 後 Wright-Giemsa 染色을 하여 觀察하였다. 計算은 500個의 macrophage 中에서 貪食한 macrophage의 比率을 100分率로 計算한다. 1個의 macrophage 細胞質內에 4個 以上의 赤血球가 含有된 것을 貪食作用을 한 것으로 判定하였다.

4) Macrophage의 走化能에 미치는 影響

① Macrophage 走化因子의 製作方法

各 檢液이 腹腔macrophage의 走化能에 미치는 影響을 檢索하고자 3% thioglycollate 培地를 마우스當 1ml씩 腹腔投與한 후 3일 째에 에테르 癡醉下에 屠殺하여 腹腔內에 4°C의 PBS를 10ml씩 넣어 1分間 맞사지하여 腹腔滲出液을 回收하였다. 回收한 腹腔滲出液을 1,500rpm에서 10分間 3회 遠心分離한 다음 trypan blue exclusion法에 依하여 細胞生存率을 確認하고 總細胞數를 算出하였다. 이 分離培養한 腹腔滲出細胞에 10% FCS가 包含된 RPMI 1640培地를 넣어 ml當 1×10^6 個의 濃度로 調節한 다음 24 multiwell plate에 各 well當 1ml씩 分注하였다. 그 後 2時間 培養한 다음 附着되지 않은 腹腔滲出細胞를 37°C의 더운 培地로 세차레 씻어 除去하였다. 이와 같은 方法으로 分離한 腹腔macrophage에 10% FCS를 添加한 RPMI培地를 1ml씩 넣고, 各 well當 100 μ l의 滅菌濾過한 檢液을 加하고, 對照群에는 PBS를 100 μ l씩 添加하여 24時間 培養한 다음, 그 上清液을 回收하여 1,500rpm에서 遠心分離하였다. 그 後 이 上清液을 0.45 μ m의 millipore filter를 通過시켜 濾過한 것을 macrophage活性 測定을 위한 走化因子로 使用하였다.

② 末梢白血球의 分離法

走化能 測定을 위한 走化細胞 또는 附着能 檢索에 使用된 macrophage와 neutrophil의 分離方法은 다음과 같다. macrophage의 分離法은 3% thioglycol late培地를 마우스當 1ml씩 腹腔投與한 다음 投與 5日後 에테르 癡醉下에 屠殺하고 上記와 같은 方法으로 分離 回收하였다. 이 滲出細胞

를 遠心塗抹하여 觀察한 結果 macrophage는 약 85% 정도였다. 또한 neutrophil의 分離를 위해 glycogen(type XI: from oyster, Sigma Chemical Co.)을 PBS溶液에 0.5% 濃度로 溶解시킨 다음 마우스當 2ml를 腹腔投與하고 4時間 經過後 上記와 같은 方法으로 腹腔滲出液을 回收하였다. 이 滲出細胞를 遠心塗抹하여 觀察한 結果 neutrophil은 약 95% 程度로 나타났다.

③ Macrophage와 neutrophil의 走化因子 分析(Che motatic assay)

Macrophage와 neutrophil의 走化因子 分析方法은 blind-well Boyden chamber(Duke University, Durham, NC, U.S.A.)의 方法⁵¹⁾을 變形하여 施行하였다. 各 檢液이 macrophage의 走化能에 미치는 影響을 檢索하기 위하여 陽性走化因子로는 新鮮한 Guinea pig 血清 2ml에 0.05g의 Zymosan (Zymosan A, Sigma Chemical Co.)를 添加하여 37°C에서 30分間 振盪한 다음 2,000rpm에서 10分間 遠心分離하여 그 上清液을 56°C에서 30分間 培養하여 不活性化한 血清 卽, Zymosan activated serum(ZAS)를 使用한다. 試驗方法은 chemotaxis chamber(Blind chamber, Neuro Probe Co.)의 下室에 上記한 走化因子 製作法에 따라 製作한 各 檢液分劃의 上清液과 ZAS 및 PBS를 1.1ml씩 넣고, 그 위에 nucleopore chemotaxis membrane (pore size: macrophage用 5 μ m)을 氣泡가 생기지 않도록 놓고, 上室에는 5×10^6 cell/ml의 末梢血液 白血球를 품고 있는 培地를 添加한 後 37°C에서 培養하였다. 培養時間은 約 3時間으로 하여 培養後 上室의 細胞浮遊液을 파스퇴르 피펫(Pasteur pipette)으로 吸引除去한 後 더운 HBSS로 3회 洗滌한 다음 卵白 glycerin를 塗布한 slide 위에 filter의 下面을 위로 오게하여 附着시키고 室溫에 乾燥시킨 後 methyl alcohol로 5分間 固定한 다음, Giemsa液으로 15分間 染色하여 觀察하였다. 觀察方法은 filter를 1,000倍의 immersion oil로 檢鏡하여 標本의 上面(filter의 下面)에 完全히 移住한 macrophage를 任意로 10視野 觀察하여 그 合計를 走化能으로 計算하였다.

또한 各 檢液이 neutrophil의 走化能에 미치는 影響을 測定하기 위해 陽性走化因子로는 10^{-8} M N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(FMLP)

를 利用하였다. 試驗方法은 chemotaxis chamber (Blind chamber, Neuro Probe Co.)의 下室에 上記 走化因子의 製作法에 따라 製作한 走化因子 또는 PBS를 添加培養한 macrophage 上清液 또는 陽性 走化因子(FMLP,ZAS)를 約 1.1ml 넣고 그 위에 nucleopore chemotaxis membrane(pore size: neutrophil用 3 μ m)을 氣泡가 생기지 않도록 놓은 다음 그 위 上室에는 1 $\times 10^6$ cell/ml의 neutrophil을 품고있는 培地를 添加한 後 37 $^{\circ}$ C에서 45分間 培養하여 上記한 macrophage와 같은 方法으로 計算하였다.

5) Macrophage와 neutrophil의 附着能에 미치는 影響

各 檢液이 macrophage의 附着能에 미치는 影響을 알아보기 위하여 2 $\times 10^6$ /ml 濃度로 調整된 macrophage를 chamber slide(Nunc Inc. 177372)에 1ml씩 分注한 다음 上記試驗에서 走化因子로 使用하였던 各 檢液의 各 分割의 上清液 및 ZAS를 同時에 200 μ l씩 添加하였다. 培養時間은 約 1時間으로 하여 培養後 未附着된 細胞를 파스퇴르 피펫으로 吸引除去하고 37 $^{\circ}$ C HBSS로 3回 씻은 다음, cover와 chamber를 除去한 slide를 乾燥 固定한 後 Wright-Giemsa染色을 하여 觀察하였다. 計算方法은 PBS 添加 培養液 上清液을 添加한 細胞를 基準으로 하여 任意로 5視野 觀察하여 그 平均値를 %로 比較 換算하였다.

6) Nitrate의 活性測定

Macrophage에 의해 만들어지는 NO는 6~8秒間 存在한 後 自發적으로 酸化되어 NO₂⁻와 NO₃⁻ 狀態로 轉換 蓄積된다. 따라서 生成되는 reactive nitrogen intermediate(RNI)量은 還元酵素를 利用하여 NO₃⁻를 NO₂⁻로 轉換시켜 測定해야 正確하지만 普通은 NO₂⁻가 大部分이기 때문에 이를 發色시켜 Ding 등⁵²⁾의 方法에 따라 間接적으로 定量하였다.

① 試料의 準備⁵³⁾

3% proteose-peptone broth를 마우스에 1ml 腹腔投與한 다음 上記와 같은 方法으로 腹腔 macrophage를 分離培養하여 24 well plate에 1ml 當 1 $\times 10^6$ 個의 濃度로 附着된 macrophage에 各

well當 100 μ l의 各 檢液을 加한 다음, 24時間 培養하였다. 그 後 上清液을 버리고(nitrate은 吸光度를 測定하는 것이므로 各 檢液의 濃度 또는 色의 差에 따른 誤差를 防止하기 위하여 最初의 培養上清液을 버림) 다시 1ml의 RPMI培地를 各 well에 加한 뒤 24時間 經過後 培養上清液을 回收하여 nitric oxide 活性測定을 위한 材料로 使用하였다.

② Nitrate의 測定方法

Nitrate는 Griess reagent를 使用하여 自動分光計로 測定하였다. 前述한 培養液 400 μ l에 Griess reagent 400 μ l(2% phosphoric acid에 1%의 sulfanilamide와 0.1%의 naphthylene diamine dihydrochloride를 添加)를 添加한 後 室溫에서 15分 經過後에 UV/vis spectrophotometer를 利用하여 543nm에서 吸光度를 測定하였다. Nitrate濃度は 蒸溜水로 準備된 sodium nitrate의 standard溶液에 依해 測定된 濃度를 基準으로 吸光度를 재어 標準 曲線을 作成하여 測定하였다.

7) 統計處理

對照群과 檢液投與群의 實驗結果에 對한 統計學的 有意性은 student's t-test方法을 利用하여 統計處理하였다.

III. 成績

1. 腹腔免疫 細胞에 미치는 效果

1) 腹腔渗出細胞 總數의 變化

各 檢液을 마우스에 腹腔投與한 다음 回收한 腹腔 洗淨液內의 渗出總細胞數의 變化는 Fig.1과 같다.

投與後 1日째 마우스 個體當 腹腔渗出細胞數는 六味地黃湯投與群에서 2.2 $\times 10^6$ 個, 加味地黃湯投與群은 3.1 $\times 10^6$ 個, 八味地黃湯投與群은 2.6 $\times 10^6$ 個이었으나 PBS投與群에서는 1.2 $\times 10^5$ 個로 3個處方投與群 보다 顯著하게 적었다.

投與後 3日째 마우스 個體當 腹腔渗出細胞數는 1日째보다 多少 增加되어 六味地黃湯投與群에서 2.6 $\times 10^6$ 個, 加味地黃湯投與群은 3.5 $\times 10^6$ 個, 八味地黃湯投與群은 3.3 $\times 10^6$ 個이었으나, PBS投與群에서는 1.1 $\times 10^5$ 個로 3個處方投與群보다 顯著하게 적었다.

投與後 5日째 마우스 個體當 腹腔滲出細胞數는 3日째보다 多少 減少되어 六味地黃湯投與群은 2.3×10^6 個, 加味地黃湯投與群은 3.2×10^6 個, 八味地黃湯投與群은 2.8×10^6 個이었으나, PBS投與群에서는 9.0×10^5 個로 3個處方投與群보다 極히 적었다.

上記에 나타난 바와 같이 3個處方投與群의 腹腔滲出細胞의 總數는 각 檢液에 따라 若干의 差는 있었으나 大體로 類似한 傾向을 나타내었다. 즉 投與後 1日째보다는 3日째에 뚜렷한 細胞數가 增加되었고 5日째에는 약간 減少하는 傾向을 나타내었다. 그러나 PBS投與群에서는 投與後 1日째 부터 投與後 5日째 까지 뚜렷한 增加가 觀察되지 않았다.

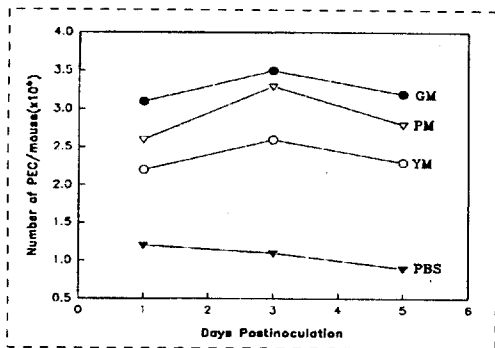


Fig. 1. Numbers of peritoneal exudate cells in mice treated with YM, GM, PM and PBS. Each point represents the mean of 5 mice.

2) 腹腔滲出細胞의 種類의 變化

各 檢液을 마우스에 腹腔投與하고 一定時間後에 腹腔滲出細胞를 分離培養한 뒤 cellspin으로 遠心塗沫한 後 鑑別計算하여 算定한 細胞의 種類의 變化는 Fig.2A(macrophage), Fig.2B(neutrophil), Fig.2C(lymphocyte)와 같다.

腹腔滲出macrophage의 總數는 檢液投與 1, 3, 5日後 六味地黃湯投與群은 各各 0.66×10^6 , 1.77×10^6 , 1.5×10^6 個이며, 加味地黃湯投與群은 1.10×10^6 , 2.40×10^6 , 2.04×10^6 個이고, 八味地黃湯投與群은 0.78×10^6 , 2.30×10^6 , 1.91×10^6 個이었으나, PBS投與群에서는 0.50×10^6 , 0.66×10^6 , 0.52×10^6 個로 세 藥物投與群보다 顯著히 적었다(Fig.2A).

腹腔滲出neutrophil의 1, 3, 5日째 細胞數 變化는

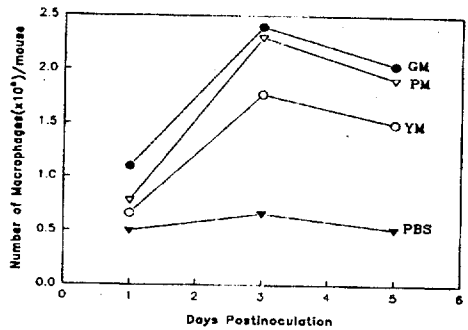


Fig. 2A. Numbers of macrophages in peritoneal exudate cells from mice treated with YM, GM, PM and PBS.

다음과 같다.

六味地黃湯投與群은 各各 1.21×10^6 , 0.13×10^6 , 0.05×10^6 個이며, 加味地黃湯投與群은 1.58×10^6 , 0.24×10^6 , 0.10×10^6 個이고, 八味地黃湯投與群은 1.40×10^6 , 0.20×10^6 , 0.06×10^6 個이었으나 PBS投與群에서는 0.34×10^6 , 0.07×10^6 , 0.02×10^6 個로 세 藥物投與群보다 顯著히 적었다(Fig.2B).

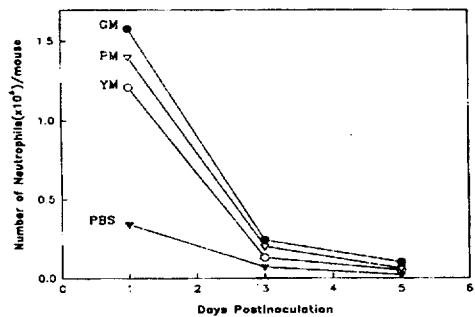


Fig. 2B. Numbers of neutrophils in peritoneal exudate cells from mice treated with YM, GM, PM and PBS.

腹腔滲出lymphocyte의 1, 3, 5日째 細胞數 變化는 다음과 같다.

六味地黃湯投與群은 0.33×10^6 , 0.70×10^6 , 0.75×10^6 個이며, 加味地黃湯投與群은 0.43×10^6 , 0.88×10^6 , 1.0×10^6 個이고, 八味地黃湯投與群은 0.41×10^6 , 0.79×10^6 , 0.82×10^6 個이었으며, PBS投與群에서는 0.25×10^6 , 0.37×10^6 , 0.35×10^6 個로 세 藥物

投與群보다 顯著히 적었다(Fig.2C).

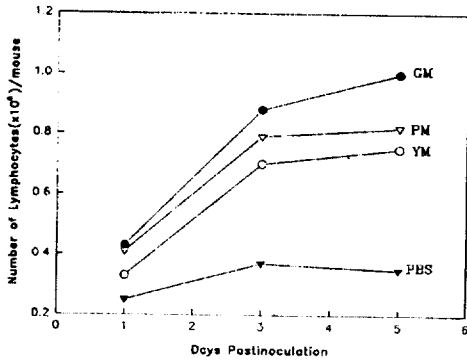


Fig. 2C. Numbers of lymphocyte from peritoneal exudate cells of mice treated with YM, GM, PM and PBS.

上記에 나타난 바와 같이 各 檢液投與群의 腹腔 滲出細胞의 種類는 各 檢液에 따라 若干의 差異는 있었으나 全般的으로 類似한 傾向을 보였다.

모든 檢液投與群에 있어서 投與後 1日째에는 neutrophil의 뚜렷한 增加가 觀察되었으며, 3日째 부터는 macrophage와 lymphocyte의 뚜렷한 增加가 일어나고 neutrophil은 뚜렷히 減少되었다. 특히 세 藥物投與群 중, 加味地黃湯投與群의 細胞塗抹上에 있어서 腹腔macrophage가 活性化되어 細胞는 擴大되어 있었으며 細胞質內에는 많은 空胞(lysosome)들이 뚜렷하게 觀察되었으나(Photo 1A)

PBS投與群의 腹腔macrophage는 腹腔常在細胞와 같은 樣相으로 觀察되었다(Photo 1B). 5日째에는 macrophage와 lymphocyte의 增加는 繼續되었으나 neutrophil은 顯著하게 減少하였다. 그러나 PBS投與 마우스에서는 投與 1日째 부터 5日째 까지 macrophage와 lymphocyte가 주로 觀察되었다.

2) 腹腔macrophage의 Fc 受容體 媒介性 活性에 미치는 效果

各 檢液을 마우스에 腹腔投與後 3日째에 回收한 腹腔滲出細胞로 부터 分離培養한 腹腔macrophage에 IgG를 感作시킨 綿羊赤血球抗體를 加하여 觀察한 Fc receptor 媒介性 rosette形成能 및 貪食能은 Table I에 나타난 바와 같다.

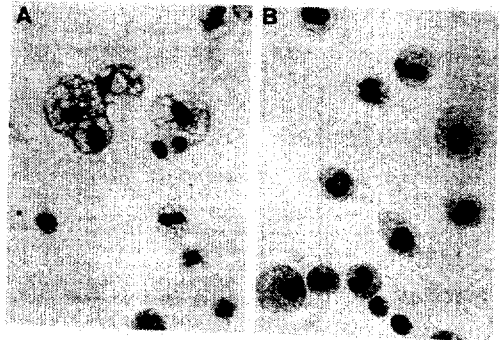


Photo 1. Cytocentrifuge preparation of peritoneal exudated cells from mice at 3 days after treatment with GM and PBS(B).

Table I. Fc receptor-mediated phagocytosis and rosette formation of IgG-coated SRBC by peritoneal macrophages(Mφ) on 3days after treatment YM, GM, PM and PBS.

Sample	Fc rosette			Fc phagocytosis		
	Mφ with bound SRBC (% of total)	Bound SRBC (mean/Mφ)	Index*	Mφ with ingested SRBC (% of total)	Ingested SRBC (mean/Mφ)	Index
YM	61	6	336	71	7	497
GM	72	7	504	82	8	656
PM	67	6	402	73	7	511
PBS	31	4	108	39	5	195

*Index : percentage of total macrophage(Mφ) with bound or ingested red cell x mean number of red cells bound or ingested/Mφ

YM: Liquid extracts of YOOKMIJIHWANGTANG(20ml/kg i.p.)

GM: Liquid extracts of GAMIJIHWANGTANG(20ml/kg i.p.)

PM: Liquid extracts of PALMIJIHWANGTANG(20ml/kg i.p.)

Wright-Giemsa stain. × 400.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 各 檢液投與群에서 分離된 腹腔滲出 macrophage의 rosette形成能은 PBS投與群보다 有意性있게 增加되었다.

加味地黃湯投與群에서 分離培養된 腹腔 macrophage의 rosette形成能은 $71.7 \pm 8.7\%$ ($p < 0.01$)로 PBS投與群의 $31 \pm 4.3\%$ 보다 뚜렷히 增加되었다. 六味地黃湯投與群은 $61.0 \pm 6.5\%$, 八味地黃湯投與群은 $66.7 \pm 7.5\%$ 을 나타내 모두 PBS投與群보다 有意性있는 增加가 觀察되었다($p < 0.01$).

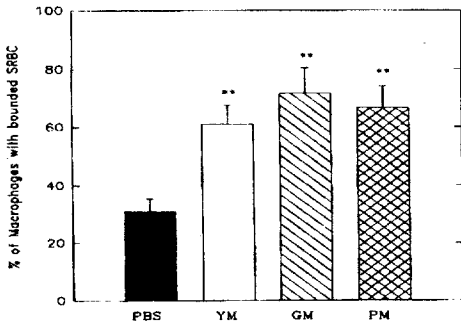


Fig. 3. Effects of YM, GM, PM and PBS on macrophage rosette formation activity to erythrocyte-antibody. (**: $p < 0.01$)

Fig.4에 나타난 바와 같이 各 檢液投與群으로부터 分離된 모든 腹腔macrophage의 貪食能은 PBS投與群보다 活性이 有意性있게 增加되었다.

加味地黃湯投與群에서 分離培養된 腹腔 macrophage의 貪食能은 $82.3 \pm 7.0\%$ ($p < 0.01$)로 가장 많이 增加되어 있었으며 細胞의 크기도 뚜렷하게 增加되어 있었다(Photo 2B). 또한 六味地黃湯 (Photo 2A), 八味地黃湯投與群(Photo 2C)은 細胞의 크기가 PBS投與群(Photo 2D)보다 다소 增加되어 있었다.

3.走化能에 미치는 效果

無菌的으로 濾過滅菌한 各 檢液을 培養腹腔 macrophage에 添加 1日後, 回收한 培養上清液을 走化因子로서 使用하여 顯微鏡 10視野當 移住한 腹腔macrophage의 數를 算定한 結果는 Fig.5에 나타난 바와 같다.

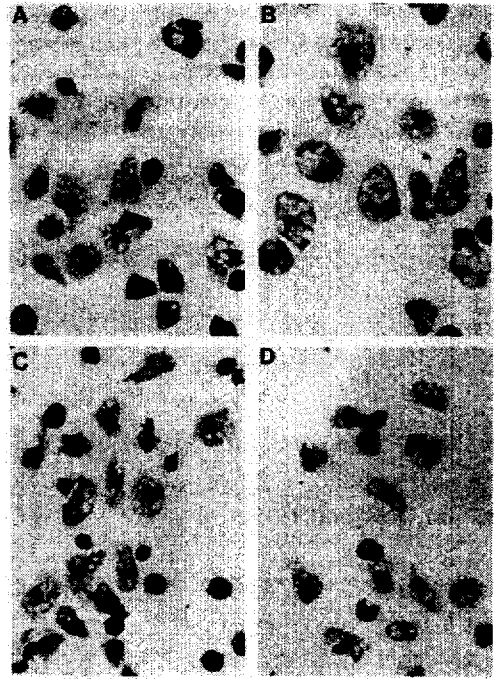


Photo 2. Fc receptor mediated phagocytic activity of peritoneal exudate macrophages isolated from mice intraperitoneally injected with YM(A), GM(B), PM(C) and PBS(D). Wright-Giemsa stain. × 400.

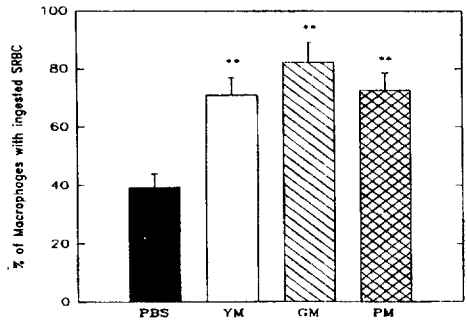


Fig. 4. Effects of YM, GM, PM on macrophage phagocytosis to EA. (**: $p < 0.01$)

加味地黃湯, 八味地黃湯을 添加한 腹腔 macrophage의 培養上清液에서는 顯微鏡 10視野當 移住한 macrophage의 數는 各各 40 ± 3 , 34 ± 4 個

로 PBS投與群의 14 ± 4 個보다 有意性있게 높았다 ($p < 0.01$). 또한 六味地黃湯投與群은 27 ± 5 個로 PBS投與群보다 有意性있게 높았다($p < 0.05$). 한편 陽性對照群으로 使用한 zymogen activated serum (ZAS)에서는 103 ± 5 個의 가장 顯著한 macrophage 走化能 增加가 觀察되었다.

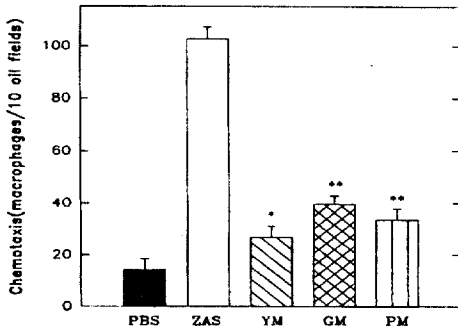


Fig. 5. Effects of various drugs on macrophage chemotactic activity. (*: $P < 0.05$, **: $p < 0.01$)

各 檢液을 培養腹腔macrophage에 添加 1日後, 回收한 培養上清液을 走化因子로서 使用하여 顯微鏡 10視野當 移住한 腹腔 neutrophil의 數를 算定한 結果는 Fig.6에 나타난 바와 같다.

加味地黃湯을 添加한 腹腔macrophage의 培養上清液에서 顯微鏡 10視野當 移住한 neutrophil의 數는 76 ± 6 個로 PBS投與群의 31 ± 7 個보다 有意性있게 높았다($p < 0.01$). 六味地黃湯, 八味地黃湯을 添加한 投與群에서는 各各 49 ± 6 , 55 ± 11 個로 PBS投與群보다 有意性있게 높았다($p < 0.05$). 한편 陽性對照群으로 使用한 FMLP에서는 129 ± 10 個의 가장 顯著한 neutrophil走化能 增加가 觀察되었다.

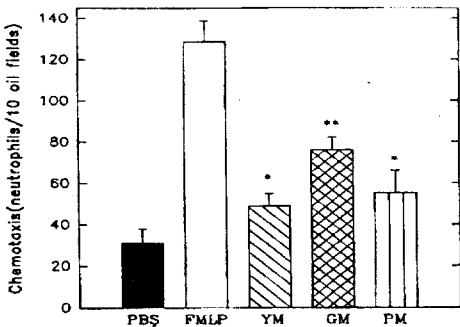


Fig. 6. Effects of various drugs on neutrophil chemotactic activity. (*: $P < 0.05$, **: $p < 0.01$)

4. macrophage의 附着能에 미치는 效果

各 檢液이 腹腔macrophage의 附着能에 미치는 效果는 Fig.7에 나타난 바와 같다.

PBS投與群에서 分離한 腹腔macrophage을 顯微鏡 視野當 觀察하여 나타난 附着細胞의 總數를 100%로 하였을 때, 六味地黃湯投與群에서는 $124.7 \pm 4.5\%$ 이며, 加味地黃湯投與群에서는 $137.3 \pm 3.5\%$ 이고, 八味地黃湯投與群에서는 $117.3 \pm 5.5\%$ 으로 PBS投與群에 比하여 모두 有意性있는 增加가 觀察되었다($p < 0.01$). 한편 陽性對照群으로 使用한 ZAS에서는 $168 \pm 10.5\%$ 로 가장 顯著한 macrophage附着能 增加가 觀察되었다.

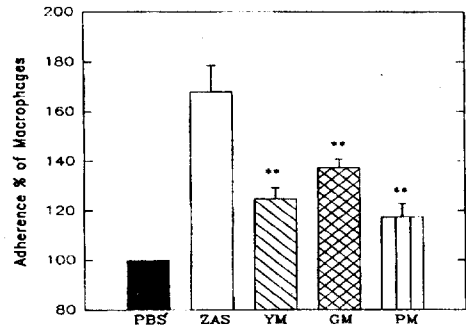


Fig. 7. Effects of various drugs on macrophage adherence to plastic dish. (**: $p < 0.01$)

5. neutrophil의 附着能에 미치는 效果

各 檢液이 腹腔neutrophil의 附着能에 미치는 效果는 Fig.8에 나타난 바와 같다.

PBS投與群의 腹腔neutrophil을 顯微鏡 視野當 觀察하여 나타난 附着細胞의 總數를 100%로 하였을 때, 六味地黃湯投與群에서는 $121.7 \pm 3.0\%$ 이고, 加味地黃湯投與群은 $140 \pm 5.6\%$ 이며, 八味地黃湯投與群에서는 $128 \pm 3.6\%$ 로 PBS投與群에 比하여 모두 有意性있는 增加가 觀察되었다($p < 0.01$). 한편 陽性對照群으로 使用한 N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine(FMLP)에서는 $185 \pm 6\%$ 의 顯著한 neutrophil의 附着能의 增加가 觀察되었다.

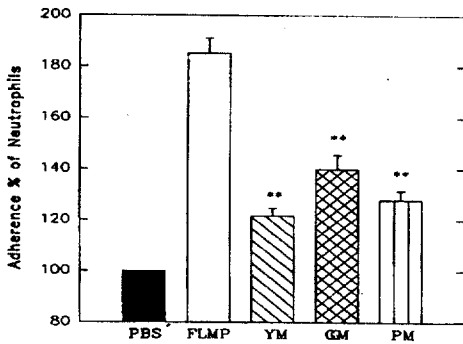


Fig. 8. Effects of various drugs on neutrophil adherence to plastic dish.(**:
p<0.01)

6. Nitrate生成能에 미치는 效果

各 檢液이 腹腔macrophage의 nitrate生成能에 미치는 效果는 Fig.9에 나타난 바와 같다. 즉 1×10^6 個의 macrophage의 nitrate生成能에 있어서, 加味地黃湯投與群에서는 $11.8 \pm 2.4 \mu \text{mole}$ 로 PBS投與群의 $1.9 \pm 0.4 \mu \text{mole}$ 보다 有意性인 活性이 觀察되었다(p<0.01). 또한 六味地黃湯投與群에서는 $3.0 \pm 0.5 \mu \text{mole}$, 八味地黃湯投與群에서는 $2.4 \pm 0.3 \mu \text{mole}$ 로 PBS投與群에 비해 若干의 增加는 觀察되었으나 有意性은 認定되지 않았다.

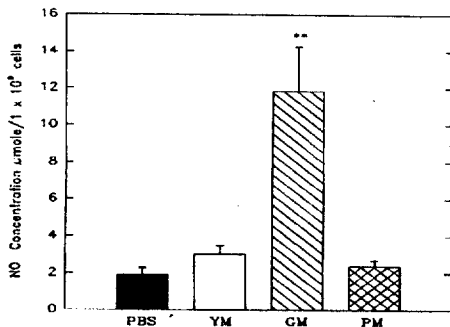


Fig. 9. Effects of various drygs on nitrate release in peritoneal macrophages.(**:
p<0.01).

IV. 考 察

免疫의 語源은 라틴語의 “Immunitas” 로, 즉 “어려운 일에서의 免除, 稅金을 免除받은 特權階

層” 이라는 말에서 由來된 것²⁾으로, 免疫學 初期의 定義는 어떤 傳染性 疾患의 再感染에 對한 防禦反應으로 認識하였다^{55,56)}. 그러나 免疫學의 發達에 따라 그 概念도 많은 變化를 가져와서 現在는 生體가 自己(self)와 非自己(nonself)를 識別하는 機構로서 外部로 부터 侵入하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에서 생긴 不必要한 產物 등과 特異하게 反應하여 抗體를 만들며 이것을 排除하여 그 個體의 恒常性을 維持하는 現象¹⁾으로 定義하고 있다.

免疫은 自然免疫(innate immunity)과 獲得免疫(acquired immunity)으로 나뉘어진다. 自然免疫은 個體가 出生할 때 부터 先天的으로 가지고 있는 것으로, 非特異的으로 免疫反應이 일어나 防禦機能을 擔當하며 NK細胞(natural killer cell)가 中心 役割을 遂行한다^{2-5,57)}. 獲得免疫이란 感染因子나 그 抗原에 對한 露出 등으로 抗體가 생기어 獲得되는 免疫으로 특히 細胞性 免疫에 關與하는 림프系 細胞 및 食細胞(phagocyte)의 反應性이 높아져 있기 때문에 생기는 特異免疫으로 說明되고 있다^{1-5,57)}.

이 때의 免疫에서는 液性 抗體 및 細胞性 免疫이 作用하는 것으로 體液性 免疫(humoral immune response)과 細胞性 免疫(cell mediated immune response)으로 區分하는데 그 基礎에는 T와 B細胞系의 相互作用이 있는 것으로, 이는 T細胞를 中心으로 한 細胞相互關係에 의한 細胞性 免疫反應과 B細胞로 부터 形成된 免疫反應에 의한 體液性 免疫反應인 것이다^{1-5,57)}.

生體防禦의 機能을 擔當하는 免疫系는 非特異的 反應을 보이는 單核貪食系(mononuclear phagocytic system; MPS)의 細胞들과 特異的 反應을 보이는 淋巴系(lymphoid system)의 細胞들로 構成되는 것으로, 특히 侵入한 異物質을 淋巴系가 認識하게 하는 抗原傳達作用과 異物質을 死滅시키고 分解하는 抗原除去作用은 貪食能에 있는 血液속의 單核球과 固定 또는 遊離된 大食細胞(macrophage) 및 好中球(neutrophil)에 依해 遂行된다⁵⁸⁾.

Macrophage는 骨髓 중의 幹細胞(stem cell)에서 由來하며 結合組織, 肝臟, 淋巴器管, 肺臟, 神經系 및 骨髓 등의 血管內에서 特殊한 內皮細胞로 存在하는데, 이들은 體內에서 貪食作用을 하는 細胞들

과 함께 大食細胞系(macrophage system) 또는 細網內皮系(reticuloendothelial system; RES)를 이룬다⁵⁹⁾. 이 細網內皮系를 構成하는 細胞들은 自他的 認識으로 老化하거나, 傷害를 받은 自己細胞, 侵入 微生物 또는 異物을 貪食하여 生體의 恒常性을 維持시킬 뿐만 아니라, 여러 酵素 또는 液性活性因子를 生産하고, 抗原提示細胞로서 또는 奏效細胞(effector cell)로서 生體의 生理機能과 生體防禦에 깊은 關係를 갖고 있다^{1-5,57-59)}.

Macrophage의 主要한 機能은 貪食, 抗原傳達, 抗體生産, 奏效細胞로서의 作用, T淋巴球의 活性化, 抗腫瘍作用 등으로 要約할 수 있다²⁾. 이러한 作用은 macrophage가 刺戟을 받아야 일어나는데 刺戟을 받기 前의 狀態를 常存하는 大食細胞(resident macrophage)라고 부르며, 刺戟을 받으면 代謝와 機能이 顯著하게 亢進되어 病原體와 腫瘍細胞를 貪食하고 活潑하게 炎症反應과 免疫反應을 일으킨다.

이러한 狀態를 活性化된 炎症性 大食細胞(inflammatory macrophage)라 한다⁶⁰⁾. 炎症性 macrophage의 特徵은 常存하는 macrophage에 比하여 形態學的으로 擴大되어 있으며, 貪食能은 亢進되고, 細胞膜의 表面에는 MHC-I, MHC-II 分子, 細胞質의 lysosome顆粒 또는 거기에 包含된 lysosome酵素 등이 增加된다. 또한 直接的이거나 間接的인 奏效細胞로 作用하여 炎症을 誘發하여 侵入微生物을 죽이고 生體에 생긴 腫瘍을 排除한다고 報告되었다^{2,57)}.

이러한 macrophage의 能力을 活性化시키는 物質로는 diethyl stilbo estrol (DES), basile Calmette-Guérin (BCG), lipopolysaccharide (LPS), Poly I: poly C, Mur-NAc-Ala-D-isoGln (MDP), interferon 등 여러 物質이 있는데 이러한 物質들은 生體의 免疫能力을 增加 또는 復活시키는 免疫補助劑(biological resposner modifier: BRM)으로 널리 活用되고 있다^{61,62)}. 또한 macrophage의 活性遮斷劑로는 silica^{63,64)}, carrageenan^{63,64)}, gadolinium chloride⁶⁵⁾, cortisone acetate⁶⁶⁾, colloid carbon, methyl palmitate⁶⁸⁾, trypan blue, lead acetate⁶⁸⁾ 등이 알려져 있는데 이러한 藥物들은 免疫反應에 있어서 macrophage의 役割을 糾明하는데 널리 使用되고 있다.

東洋醫學에서 免疫이란 語彙를 最初로 記述한

醫書는 18世紀에 刊行된 《免疫類方》⁶⁾이나, 免疫概念과 有關한 內容의 醫論들은 많은 著書에서 찾아볼 수 있는 것으로 이러한 一例를 들어본다면, 東洋醫學 最古文獻인 《黃帝內經》^{7,69)}의 醫學思想醫案에 “正氣存內, 邪不可干”, “邪氣所湊, 其氣必虛”, “風雨寒熱, 不得虛邪, 不能獨傷人” 등의 病機理論이 이미 提案되고 있다.

그러나 東洋醫學에서 말하는 免疫의 範疇은 보다 廣範圍하여 단지 疫病만을 免除하는데 그치지 아니하고 諸病 全體를 防治한다는 豫防醫學의 學術思想에서 病治理論을 提示하는 것으로 例를 들어 《素問·四氣調神大論》⁷⁾에서 “不治已病, 治未病”이라 記述한 것은 東洋醫學의 疾病治療概念이 豫防醫學에 基礎하고 있음을 알 수 있다.

또한 나아가서 疾病을 豫防하기 위한 具體的인 學理로는 疾病을 誘發시키는 病因의 三因 중에서 內因이 되는 要素를 특히 重視하고 있는 바, 《素問·刺法論》⁷⁾에서 “正氣存內, 邪不可干”이라 하였고, 《素問·上古天真論》⁷⁾에는 “眞氣從之, 精神內守, 病安從來”라 하였으며, 《素問·評熱病論》⁷⁾에서는 “邪氣所湊, 其氣必虛”라 하였다.

東洋醫學에서 人體의 抗病能力은 正氣, 眞氣, 元氣 등과 有關한 바 이들은 生體를 構成하고 生命을 維持시켜주는 精華物質이면서 機能으로서 서로 同·한 氣機作用으로 正氣·眞氣·元氣는 同·한 意味이기도 한 것으로서 人體內에 存在하는 抗病能力 또는 恒常性 維持機構를 말하며^{6,13)}, 外部 邪氣에 對抗하여 疾病을 豫防하는 人體의 防禦機構를 의미한다¹³⁾.

正氣에 對하여 《靈樞·刺節眞邪篇》⁸⁾에서는 “眞氣者, 所受於天, 與穀氣進而充身者也”이라 하였고, 《素問·陰陽應象大論》⁷⁾에서는 “天氣通於肺”라 하여 脾, 肺, 腎이 正氣와 密接한 關係가 있다고 하였는데, 劉⁶⁾ 戴⁷⁾ 등은 三臟 중 腎이 根本이 된다고 하였다.

八味地黃湯은 張¹⁰⁾의 《金匱要略》에 八味腎氣丸으로 처음 收載되어 虛勞腰痛, 小腹拘急, 小便不利를 治한다고 記錄된 以後 腎陽을 補하는 代表方으로 널리 使用되었다^{10-17,19-34)}. 六味地黃湯은 錢¹¹⁾이 八味丸에서 肉桂와 附子를 去하여 六味地黃丸을 만들어 神怯失音, 總關不合, 神不足, 目中白睛多而色眇白을 治療한다고 《小兒藥證直訣》에 收載한 以後, 腎陰을 補하는 代表方으로 廣範圍하게 使用

되었다^{6,9,11-15,17-24,32,34}).

東洋醫學에서 免疫에 關한 實驗研究 中 補劑가 應用된 境遇를 살펴보면, 朴³⁵은 歸脾湯과 歸脾湯 加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響을, 黃³⁶은 十全大補湯加 鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響을, 李³⁷는 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK 細胞毒성에 미치는 影響에 對해, 林³⁸은 四君子湯 煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響을, 金³⁹은 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響을, 閔⁴⁰은 補中益氣湯의 投與가 紫外線照射로 低下된 마우스의 免疫機能의 恢復에 미치는 影響에 關하여, 李⁴¹는 생쥐 細網內皮系 機能低下에 미치는 補中益氣湯의 效果에 對해, 金⁴²은 歸茸湯이 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 影響을, 朴⁴³은 少陰人 十全大補湯이 免疫反應에 미치는 影響을, 李⁴⁴는 蔘苓白朮散 煎湯液 投與가 Mouse의 生體 및 試驗管內 免疫反應에 미치는 影響을, 尹⁴⁵은 六君子湯, 小柴胡湯, 魚腥草 및 加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實驗的 研究를, 高⁴⁶는 鹿茸 熟地黃 人蔘 五加皮가 免疫反應 NK細胞活性度에 미치는 影響을, 朱⁷⁴는 八味地黃湯 煎湯液의 投與가 마우스의 自然致死 細胞의 活性度 및 免疫反應에 미치는 影響 등의 研究를 施行, 以上の 藥物들이 免疫機能을 增強시킨다고 報告하였다. 그러나 六味地黃湯과 八味地黃湯 및 鹿茸을 加한 加味地黃湯이 macrophage의 活性에 미치는 影響에 對한 實驗研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 六味地黃湯과 八味地黃湯 및 六味地黃湯에 溫腎補陽, 添精補髓, 暖腎助陽의 效能⁴⁷⁻⁴⁹이 있는 鹿茸을 加味한 加味地黃湯이 免疫에 미치는 效果를 糾明할 目的으로 3種의 方劑를 마우스에 投與하여 macrophage의 貪食能, 走化能, 附着能, 二酸化窒素 生成能의 變化를 觀察한 結果는 다음과 같다.

六味地黃湯, 加味地黃湯, 八味地黃湯의 3種의 藥物이 腹腔免疫細胞의 動態에 미치는 效果에 있어서, 檢液을 投與한 處置群의 마우스에서 分離한 腹腔滲出 總細胞數는 PBS投與群의 總細胞數보다 뚜렷하게 增加되었다. 특히 加味地黃湯投與群의 腹腔滲出細胞의 總數는 다른 檢液投與群보다 顯著하게 增加되었다(Fig.1).

Macrophage가 生體에서 效果的인 生體防禦의 役割을 遂行하기 위해서는 機能的으로 炎症狀態 또는 活性化된 狀態로 分化되고 機動性을 지녀야 하는데⁷¹, thioglycollate나 peptone과 같은 炎症誘發物質들은 resident macrophage를 inflammatory macrophage로 活性化 시킨다^{72,73}고 報告되었다.

또한 neutrophil은 生體防禦의 最前線에서 最初에 出現하는 貪食能力을 가진 細胞로 壽命이 매우 짧아 末梢血液內에서 半減期가 6-7 時間, 試驗管內에서 壽命은 約 6時間 以內이다. Monocyte/macrophage 生成物質들 中 IL-1, TNF- α 및 chemotactic factor는 炎症部位에 neutrophil 蓄積作用을 誘發한다고 알려져 있다⁷⁴.

實驗結果에 따르면 세 藥物은 macrophage를 活性化 시키는 因子를 많이 含有하고 있으며, 이 때 誘發된 炎症反應이 白血球의 流出, 浸潤, 增殖에 이르는 生體防禦에 重要な 役割을 擔當하여 侵入 微生物을 죽이는 것으로 思料되며, 특히 加味地黃湯이 보다 많은 炎症反應 誘導因子를 含有하고 있는 것으로 나타났다.

세 藥物投與群의 腹腔滲出細胞의 種類는 大體로 類似한 傾向을 나타내었다(Fig2A, 2B, 2C). 腹腔滲出細胞의 種類에서 投與後 1日째에는 neutrophil의 뚜렷한 增加가 觀察되었으나, 投與後 3日째 부터는 macrophage의 뚜렷한 增加가 일어나고 neutrophil은 뚜렷히 減少되었으며, 5日째에는 macrophage와 lymphocyte의 增加가 繼續되었으나 neutrophil은 顯著하게 減少하였다. 특히 投與 初期에 neutrophil數가 增加하였는데 이러한 結果는 모든 炎症反應의 가장 基本的인 것으로 投與 初期에 活性化된 腹腔macrophage에 의해 生成된 chemotactic factor가 炎症部位에 neutrophil을 蓄積시킨 結果라고 思料되었다. 또한 세 藥物投與群의 腹腔macrophage의 수는 PBS投與群보다 2~3 배 以上 크다. 특히 세 藥物 中에서도 加味地黃湯의 細胞質內에 空胞(lysosome)가 보다 뚜렷하게 觀察되는 바(Photol), 이는 藥物投與로 macrophage가 活性化된 뚜렷한 證據로 생각된다.

Macrophage가 異物質을 除去하는 過程은 두 段階로 나뉘는데 먼저 異物質을 貪食한 後 貪食한 異物質을 死滅, 解體시켜야 한다⁷⁴. Macrophage는 老廢한 細胞, 外部에서 侵入한 異物 및 微生物 등을 貪食空胞(phagocytic vesicle), 食胞(phagosome

에 의해 原形質內에 집어넣어 原形質內의 lysosome과 融合하여 phagolysosome을 形成한 뒤 lysosome내의 酵素와 殺害能이 있는 여러 物質들에 의해 消化處理한다. 이 때 異物質에 IgG 또는 補體 C3와 結合한 것을 macrophage의 Fc 受容體(Fc receptor), 補體 C3 受容體(C3 receptor)가 認識하여 貪食하는 것으로 報告되었다^{59,75)}. Macrophage의 Fc 受容體를 통한 貪食作用과 macrophage의 腫瘍細胞 殺害能을 비롯한 여러 作用은 macrophage의 活性도와 密接한 關係가 있다. Macrophage가 活性化되었을 때는 Fc 受容體를 통한 貪食作用이 增加되므로 macrophage의 貪食作用의 增加는 macrophage 活性化를 意味한다⁷⁶⁾. 따라서 macrophage를 活性化시킬 수 있는 여러 免疫增強劑들은 Fc 受容體를 통한 貪食作用을 增加시킨다고 報告되었다⁷⁷⁾.

또한 rosette는 사람의 T細胞와 SRBC가 結合하는 現象으로 rosette의 形成手技는 T細胞의 分離 및 T細胞의 分布를 測定하는 方法으로 利用되고 있다. 그러나 mouse에 있어서는 사람에서와는 달리 rosette를 形成하는 細胞가 전부 T細胞만은 아니고 大部分의 T細胞와 小數의 macrophage가 모두 rosette를 形成하고 있음이 밝혀졌다. 따라서 mouse에서의 rosette 形成細胞의 測定은 macrophage의 測定方法이 될 수 있다³⁷⁾.

腹腔滲出macrophage의 Fc 受容體 媒介性 rosette形成能 및 貪食能에 있어서, 세 藥物投與群은 PBS投與群에 比하여 有意性있게($P<0.01$) 活性和 細胞의 크기가 增大되었다(Fig.3, 4). 특히 加味地黃湯投與群의 活性은 六味地黃湯 및 八味地黃湯投與群에 比하여 그 活性이 增加되었다(Photo2). 活性的 增加와 細胞 크기의 增大는 rosette形成能과 貪食能 增強을 意味하는 것으로 思料되며, 이러한 結果는 腹腔滲出細胞의 塗抹上에서 觀察한 腹腔macrophage의 細胞質內 lysosome의 增加와 關係되는 것으로, 세 藥物의 成分 中에는 Fc 受容體의 媒介性 貪食能 및 rosette形成能을 活性化시키는 成分이 包含되어 있고, 藥物投與를 통한 Fc 受容體의 活性은 免疫能의 增加效果와 直接 關係되는 것으로 示唆되었다.

3種의 藥物을 腹腔macrophage에 投與한 後 回收한 培養上清液의 macrophage 및 neutrophil의 走化能에 있어서, 加味地黃湯 및 다른 두 藥物을

添加한 macrophage의 培養上清液은 PBS를 添加한 macrophage의 培養上清液보다 腹腔 macrophage에 對하여 有意性있는($P<0.01$) 走化能 增加를 誘發시켰다(Fig.5, 6).

走化性은 貪食作用을 誘發시키는 一連의 過程 中에 매우 重要한 段階로 macrophage와 neutrophil 등 貪食細胞들이 異物質의 成分이나 異物質 刺戟으로 分泌되는 成分에 依하여 異物質이 있는 곳으로 모이는 化學的 感受性을 意味한다⁵⁸⁾.

實驗結果로 부터 세 藥物의 投與는 細菌 등의 感染部位 또는 腫瘍部位에서 化學走化性에 依한 macrophage와 neutrophil의 集積을 誘導하여 炎症 反應, 抗腫瘍作用, 免疫反應을 誘發시키는 것으로 보여진다.

腹腔macrophage와 neutrophil의 附着能 實驗結果는 세 藥物 모두 對照群에 比하여 有意性있는($P<0.01$) 增加가 나타났다(Fig.7, 8). 특히 加味地黃湯을 加하여 培養한 上清液이 보다 높은 附着能 增加를 誘發시켰다.

Macrophage 등이 支持體 表面에 附着하는 能力은 貪食의 前段階로써 細胞의 活性和 密接한 關係가 있는데, macrophage 등이 僞足を 伸展하는 데는 細胞質內의 構造體인 microfilament가 關與하고 있다고 報告되었다⁷⁸⁾. 특히 macrophage는 特異 表面受容體를 가지고 있어서 C5a, Crystal-induced chmotic factor(CCF), LTB₄는 물론 生成된 폴리펩타이드 化學走性을 認知하고, 이들 細胞表面에 化學走性因子가 附着되면 化學走性物質 濃度差를 感知하여, 原來의 圓形狀態에서 三角形으로 變形되어 三角形의 밑면이 化學走性物質이 發生된 場所를 向하게 된다. 이러한 細胞形態의 變化는 細胞內 細胞骨格 要所를 再配置하고 microtubule이 極化되며 actin filament가 前後面에 蓄積되어 움직이는데 必要한 收縮力을 提供한다고 한다⁷³⁾.

實驗結果에서 처럼 세 藥物 모두 macrophage와 neutrophil의 附着能을 增加시키므로 이 세 藥物의 投與는 投與部位 및 生體內의 炎症部位 또는 腫瘍細胞에 對하여 接觸能力을 增加시켜 異物質에 對한 貪食作用을 誘發할 수 있다고 思料되었다.

3種의 藥物이 腹腔macrophage의 Nitric Oxide(NO) 生成能에 미치는 效果는 加味地黃湯投與群에서만 有意性있는($p<0.01$) 結果가 나타나고

六味地黃湯과 八味地黃湯投與群은 PBS投與群에 비해 若干의 增加는 觀察되었으나 有意性은 認定되지 않았다(Fig.9).

NO는 神經細胞에서는 信號傳達物質로의 作用⁷⁹⁾을 하고 循環期系에서는 endothelium derived relaxing factor(EDFR)으로 알려졌으며⁸⁰⁾, 大部分의 組織細胞에 影響을 주는 血管弛緩作用^{81,82)}을 하고, 免疫系에서는 MPS系 細胞에서 만들어져 細胞내 侵入微生物의 死滅作用이나 生長停止作用, 또는 腫瘍細胞에 細胞毒性을 나타낸다^{80,82,83)}고 報告되고 있다.

趙⁸⁴⁾는 BCG로 感染시킨 rat의 大食細胞가 많은 量의 NO를 生成한다고 報告하였고, 전⁸⁵⁾은 MPS系에 속하는 腦의 小橋細胞가 腹腔大食細胞와 같이 NO 生成이 可能하다고 報告하였으며, Hibbs 등^{86,87)}은 마우스에 BCG를 投與하고 macrophage를 試驗管內에 培養한 다음, 다시 腫瘍細胞와 함께 混合培養하고, 여기에 LPS를 添加할 때 活性化된 macrophage가 NO를 生産해서 腫瘍細胞를 殺害하거나 抑制한다고 報告하였다. 따라서 NO는 tumor necrosis factor(TNF)와 함께 macrophage가 放出하는 非特異的 腫瘍增殖 抑制因子로서 注目を 받고 있다^{88,89)}.

一般的으로 NO를 放出시키기 위해서 macrophage에 klebsiella, E. Coli, salmonella 등 細菌의 刺戟이 必要하다고 알려져 있다⁹⁰⁾. 그러나 加味地黃湯投與群은 PBS投與群보다 有意할 만한 nitrate의 增加를 誘發시켰으며 六味地黃湯 및 八味地黃湯에서도 活性이 增加되는 傾向을 나타냈다. 이러한 結果는 NO의 生産에는 반드시 菌의 感染이나 菌體成分에 의한 刺戟은 必要가 없으며 macrophage 單獨으로도 充分히 NO를 生産할 수 있다는 報告⁹²⁾와 一致되었다. 따라서 加味地黃湯投與로 生成된 NO는 macrophage 內部에서 抗菌作用 外에 抗癌作用 등 多樣한 免疫作用 誘發이 可能할 것으로 思料되었다.

以上の 結果로 부터 六味地黃湯, 加味地黃湯, 八味地黃湯의 세 藥物은 macrophage의 活性化를 誘發시킨다는 사실을 알 수 있었다. 특히 加味地黃湯은 세 藥物 중 가장 뚜렷한 有意性을 보여 炎症細胞의 動員 및 增殖, macrophage의 貪食能 增加, 投與部位에 走化性 物質의 增加에 依한 macrophage의 走化能 增加, 附着能 增加, Nitrate

生成能 增加 등에 作用하는 有效成分이 多量 含有되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 免疫療法的 가장 根本이 되는 免疫擔當細胞의 免疫增強藥物로 또는 機能復活의 處方으로 그 效果가 立證되어 臨床에서 活用될 수 있을 것으로 思料되었다.

V. 結 論

六味地黃湯, 八味地黃湯 및 加味地黃湯 세 藥物이 腹腔macrophage의 動態, 腹腔macrophage의 貪食能, rosette形成能, 走化性, 附着能, Nitrate生成能에 미치는 影響을 알아보기 위하여, 세 藥物을 마우스에 投與하여 여러 免疫反應을 檢討한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 六味地黃湯, 加味地黃湯, 八味地黃湯投與群의 마우스로 부터 分離한 腹腔滲出細胞의 總數는 PBS投與群의 마우스로 부터 分離한 腹腔滲出細胞數 보다 2~3배 增加되었다.

2. 腹腔滲出macrophage의 Fc 受容體 媒介性 rosette 形成能 및 貪食能에 있어서 세 藥物投與群의 macrophage 活性度는 PBS投與群에 比하여유의하게($P < 0.01$) 增加되었다.

3. 腹腔macrophage에 세 藥物을 加하여 培養한 細胞上清液을 利用한 macrophage의 走化能試驗에 있어서 加味地黃湯과 八味地黃湯($p < 0.01$), 六味地黃湯($p < 0.05$)投與群은 PBS投與群 보다 有意性 있는 macrophage 走化能 增加를 誘發하였다.

4. 腹腔macrophage에 세 藥物을 加하여 培養한 細胞上清液을 利用한 neutrophil의 走化能試驗에 있어서 加味地黃湯($p < 0.01$), 六味地黃湯 및 八味地黃湯($p < 0.05$)投與群은 PBS投與群보다 neutrophil의 走化能이 有意하게 增加되었다.

5. 腹腔macrophage에 세 藥物을 加하여 培養한 細胞上清液을 利用한 macrophage와 neutrophil의 附着能試驗에 있어서 세 藥物投與群은 PBS投與群보다 有意한($P < 0.01$) 附着能增加가 觀察되었다.

6. 加味地黃湯의 投與는 腹腔macrophage의 Nitric Oxide 生成能을 PBS投與群에 比하여 有意하게($p < 0.01$) 增加시켰다.

以上の 結果로 보아 세 藥物은 모두 macrophage의 活性을 誘發시켰으며, 그 중에서도 加味地黃湯은 다른 藥物보다 뚜렷한 免疫增強效果

및 腹腔macrophage의 活性效果가 나타나서 免疫 增強藥物로 또는 免疫機能復活의 處方으로 臨床에 서 活用될 수 있을 것으로 思料되었다.

參考文獻

1. 李淵台 譯: 最新免疫學 서울, 集文堂, pp.33~35, 162~163, 316~337, 1989.
2. 김세중: 면역학, 서울, 고려의학, pp.2~5, p.34, 166, 169, 178, pp.244~246, 295~296, 1994.
3. 서울대학교 의과대학: 면역학, 서울, 서울대학교출판부, pp.1~3, 9~15, 1993.
4. 이중달: 병리학, 서울 고려의학, p.99, pp.119~121, 1990.
5. A. ABBAS 外: Cellular and Molecular Immunology, Saunders, pp.4~5. 19~21.
6. 劉正才 外: 中醫免疫, 重慶, 重慶出版社, pp.8~14, p.25, pp.50~51, 60~61, 1983.
7. 王琦 外: 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, p.1, 3, pp.409~413, 1981.
8. 河北醫學院: 靈樞經校釋(下), 北京, 人民衛生出版社, p.352, 1982.
9. 戴新民: 中醫免疫學, 啓業書林有限公司, 台北, pp.7~24, 1983.
10. 蔡仁植: 金匱要略正解, 大邱, 東洋綜合通信教育院出版部, pp.58~59, 1982.
11. 楊蘊祥 外: 古今名方, 河南, 河南科學技術出版社, pp.130~131, 140~141, 1983.
12. 안덕균 譯: 면역과 한방, 서울, 열린 책들, p.3, pp.25~27, 294~295, 1992.
13. 杜鎬京: 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究院, pp.8~11, p.21, 1991.
14. 上海中醫學院: 方劑學, 香港, 商務印書館, pp.235~237, 246~248, 1983.
15. 許凌: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.146~147, 1983.
16. 廉泰煥: 景方類聚, 서울, 癸丑文化社, pp.286~290, 1974.
17. 汪詡庵: 醫方集解, 서울, 成輔社, pp.1~5, 1983.
18. 顏正華 外: 六味丸과 八味丸의 臨床應用例, 東洋醫學, 2:62~66, 1983.
19. 吳謙 外: 醫宗金鑑, 北京, 人民衛生出版社, pp.753~756, 1982.
20. 張介賓: 景岳全書(中國醫學大系), 서울, 驪江出版社, pp.487~488, 883~884, 1987.
21. 陳修園: 醫學三字經(陳修園醫書七十二種), 文光圖書有限公司.
22. 蔡仁植: 傷寒論譯註, 서울, 高文社, pp.517~520, 1979.
23. 成輔社: 天真處方解說, 서울, 成輔社, pp.93~94, 1987.
24. 康舜洙 外: 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp.41~42, 1984.
25. 金定濟: 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究院, pp.188~189, 1983.
26. 丁民聲: 方藥原理, 서울, 京城文化社, pp.154~155, 1982.
27. 方廣: 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, p.676, 1982.
28. 韓宗鉉: 韓醫學의 實際의 研究(處方編), 서울, 一中社, pp.471~473, 1988.
29. 陳師文: 太平惠民和劑局方(卷五), 台北, 旋風出版社, p.21, 民國 64年.
30. 李仲梓: 醫宗必讀, 台南, 綜合出版社, p.237, 民國 65年.
31. 李兆華: 腎與腎病的證治, 河北, 河北人民出版社, pp.28~31, 1979.
32. 上海中醫學院: 內科學(上), 上海, 上海科學技術出版社, pp.11~13, 1979.
33. 顏正華 外: 六味丸과 八味丸의 臨床應用例(Ⅱ), 東洋醫學, 3:28~31, 1983.
34. 黃度淵: 方藥合編, 서울 南山堂, pp.382~384, 1991.
35. 朴恩貞: 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1990.
36. 黃忠淵: 十全大補湯加 鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1989.
37. 李南九 外: 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK 細胞毒性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 10:2 pp.115-125, 1989.
38. 林圭彦: 四君子湯 煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 博士學位論文,

1988.

39. 金聖勳: 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1987.

40. 閔勇泰: 補中益氣湯의 投與가 紫外線照射로 低下된 마우스의 免疫機能의 恢復에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院 博士學位論文, 1990.

41. 李宰熙: 생쥐 細網內皮系 機能低下에 미치는 補中益氣湯의 效果, 慶熙大學校 大學院, 碩士學位論文, 1986.

42. 金德鎬: 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集(3), 1985.

43. 朴聖浩: 少陰人 十全大補湯이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 碩士學位論文, 1991.

44. 李漢哲: 參苓白朮散 煎湯液 投與가 Mouse의 生體 및 試驗管内 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1992.

45. 尹相協: 六君子湯, 小柴胡湯, 魚腥草 및 加味方의 抗癌作用과 免疫反應에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 博士學位論文, 1991.

46. 高炳熙: 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 NK細胞活性度에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 博士學位論文, 1986.

47. 李尙仁: 本草學, 서울, 修書院, pp.66~67, 1981.

48. 安德均 外: 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.331~332, 1990.

49. 上海中醫學院: 中草藥學, 香港, 商務印書館, pp.532~533, 1983.

50. Wright SD, Silverstein SC: Tumor promoting phorbol ester stimulated C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes, J. Exp. Med., 156:1149-1162, 1982.

51. Van Dyke TE, Horoszewicz HU, Cianciola LJ, Genco RJ: Neutrophil chemotaxis dysfunction in human peritonitis, Infect. Immun., 27:124, 1980.

52. Ding A, Nathan CF and Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse

peritoneal macrophages: Comparision of activating cytokines and evidence for independent production, J. Immunol., 141:2407, 1988.

54. Lin JY, Chadee K: Macrophage cytotoxicity against Entameba histolytica trpphozoties is mediated by nitric oxide from L-Argine, J Immunol., 148: 3999-4005, 1992.

55. 趙鍾寬: 免疫에 關한 東洋醫學的 考察, 東洋醫學, 12:1, pp.19~23, 1986.

56. 蔡禹錫: 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 關한 文獻的 考察, 大韓韓醫學會誌, 11:2, pp.54~91, 1980.

57. 文希柱 外: 基本免疫學, 서울, 大學書林, pp.13~28, 49~58, 1992.

58. 정헌택 外: 면역학 입문. 高文社, 1988.

59. 정헌택: 알기 쉬운 면역생물학. 의학종설, pp.93~122, 1991.

60. Nakano N: Macrophage activation and signal transduction. Clinical Immunology 26(9):977-983, 1994

61. 山崎正利: 臨床免疫, 13:215, 1981.

62. 德永徹: マクロファージ, 東京, 構談社, pp.40~66, 1986.

63. Yoshikai S, Miake T, Matsumoto K, Nomoto Takeya K: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice, Immunology, 38:577, 1979.

64. Nakayama H, Nii A, Sadahiko O, Satoshi I, Nobuhiko O, and Fujiwara K: Effect of reticuloendothelial system blocking on Tyzzer's disease of mice, Jpn. J.Vet. Sci., 48(2): 211~217, 1986.

65. Lazar G: The reticuloendothelial-blocking effect of rare earthmetals in rats, J. Reticuloendothel. Soc., 13:231-237, 1973.

66. Weiner J, Cottrell T.S, Margaretten W et al.: An electron microscopic study of steroid induced reticuloendothelial blockade, Am. J. Pathol., 50:187-201, 1967.

67. Saba TM and Di Luzio NR: Evaluation of humoral and cellular mechanisms of methyl

palmitate induced reticuloendothelial depression, *Life Sci.*, 7:337-347, 1968.

68. Filkins JP and Buchanan BJ: Effects of lead acetate on sensitivity to shock, intravascular carbon and endotoxin clearances and hepatic endotoxin detoxication, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142:471-475, 1973.

69. 河北醫學院: 靈樞經校釋(上), 北京, 人民衛生出版社, p.499, 1982.

70. 朱松竹 外: 八味地黃湯 煎湯液의 投與가 마우스의 自然致死 細胞의 活性度 및 免疫反應에 미치는 影響, 圓光韓醫學, 1:429-450, 1992.

71. 양용태: 거식세포와 감염, 감염, 5:17, 1973.

72. Adams DO and Hamilton TA : Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages, *Immunol. Today*, 8: 151, 1987.

73. Stossel TP: Phagocytosis, *N. Engl. J. Med.*, 290:717, 1974.

74. Roitt I: Immunology, pp.1.1~1.12, Mosby Press, 1993.

75. Nakano N: Macrophage activation and signal transduction. *Clinical Immunology* 26(9):977-983. 1994.

76. Leu RW, Rummage JA, Bahimi MB and Herriot MJ: Relationship between murine macrophages Fc receptor-mediated phagocytic function and complemency for activation for non-specific tumor cytotoxicity, *Immunobiol.* 171:220-233, 1986.

77. Hamilton TA, Weiel JE, and Adams DO: Expression of the transferrin receptor in murine peritoneal macrophages is modulated in the different stages of activation, *J. Immunol.*, 132:2285-2291, 1984.

78. 山崎正利, 名取俊二, 水野傳一: 生體防禦, 共立出版, p.592, 1980.

79. Snyder SH, and Brecht DS: Biological roles of nitric oxide, *Scientific American*, May:28, 1992.

80. 최혜심 외: 외부 및 내부의 여러 인자들이 마우스 대식세포의 Nitric Oxide 생성에 미치는 영향, 대한 BRM 학회지, 3:1, pp.15~22, 1993.

81. 吉川敏一: free radical, p.15~31, 메디칼

ビュ社, 1988.

82. Palmer PM, Ferrige JAG and Monada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxant factor, *Nature*, 327:524, 1987.

83. Fishnan PS and Savitt JM: Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 48:212, 1989.

84. 趙誠璟: Nitric Oxide의 면역반응 조절기능, 圓光大學校 大學院, 博士學位論文, 1992.

85. 전창덕 외: 뇌의 선천적 면역반응, 대한면역학회지, 15:1, pp.25~35, 1993.

86. Hibbs JB Jr., Taintor RR and Vavrin Z: Macrophages cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235:473, 1987.

87. Hibbs JB Jr., Vavrin Z and Taintor, RR: L-arginine is required for expression of the activated macrophages effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138:550, 1987.

88. Higuchi MM, 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 mechanisms of activated macrophages, *J. Immunol.*, 144:1425, 1990.

89. Suther DJ, and Marletta MA: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ , *J. Immunol.*, 139:518, 1987

90. Isobe, K.: Tumor cell killing by NO from macrophages, *Clinical Immunology* 26(6):622-628. 1994.