

四君子湯 및 四物湯이 methotrexate로 誘導된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

崔允禎* · 金璋顯**

* 東國大學校 大學院 小兒科專攻

** 東國大學校 韓醫科大學

ABSTRACT

Effects of Sagunjatang and Samultang on the Immunosuppression induced by Methotrexate in Rats.

Yun-jung Choi, O.M.D · Jang-Hyun Kim*

*Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine
Dongguk University, Seoul, Korea

The effects of Sagunjatang and Samultang on the immunosuppression induced by methotrexate(MTX) in rats were investigated in this study. The multiple parameters of immunity assessed in each rats included leukocyte count, lymphocyte rate, the number of lymphocyte in tibial bone marrow, contact hypersensitivity to DNFB, morphological change of thymocyte and IgG antibody on SDS-PAGE.

Sprague-Dawley male rats were used and divided into five groups at random. Group A was normal control. Group B, the MTX treatment control, was injected i.v. with 2mg/kg of on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.

Group C, the experimental control, was treated Sagunjatang for 18days and MTX. Group D was treated Samultang for 18days and MTX. Group E was treated Sagunjatang-Samultang for 18days and MTX. The dosage of Sagunjatang and Samultang was 1ml/day respectively. In the case of Group E, rats were fed Sagunjatang 1ml in the morning and Samultang 1ml in the afternoon.

The results are summarized as follows :

1. Leukocyte count in rats induced by intravenous sensitization with SRBC was decreased significantly in Group E.
2. Leukocyte counts of 2weeks later after being treated MTX were increased significantly in Groups C and D.
3. Lymphocyte rate in rats induced by intravenous sensitization with SRBC wasn't changed significantly in all the experimental groups.
4. Lymphocyte rate of 2weeks later after being treated MTX was increased significantly in Group D.
5. The number of lymphocyte in tibial bone marrow was increased significantly in Group C.
6. Contact hypersensitivity wasn't changed significantly in all the experimental groups.
7. Morphological finding of thymocyte in group C was similar to normal group as compared with control group.
8. Purified IgG of all the experimental groups showed two bands of 50,000 and 25,000 on SDS-PAGE. But there was no difference among experimental groups.

1. 緒論

科學의 發達과 醫學水準의 向上은 疾病에 대한 既存의 認識을 變化시켜 최근에는 疾病이 免疫機能과 有關한 것으로 強調되고 있으며¹⁾, 이와 관련하여 免疫缺乏疾患, 癌 또는 慢性感染을 갖는 患者의 治療에 免疫을 增加시킴으로써 治療될 수 있으리라는 報告

들이 있다²⁾.

韓醫學에서 免疫에 관한 概念은 「內經·素問·刺法論」의 “正氣存內,邪不可干”, 「內經·素問·評熱病論」의 “邪之所湊,其氣必虛”³⁾라는 理論에서 알 수 있듯이 人體에 內在하는 一種의 疾病에 대한 抵抗力을 正氣라고 보았고, 扶正의 方法은 益氣·健脾·補腎 등의 治療를 包括하여 人體의 氣血不足을 補하여 陰陽과 臟腑機能失調를 調整하여 抵抗力을 增強시킨다는 扶正祛邪의

理論이 免疫의 가장 基本的인 이론적 배경이 됨을 알 수 있다⁴⁻⁸⁾.

최근 免疫에 관한 實驗的 報告로는 免疫機能을 亢進시키는 藥材로 靈芝⁹⁾, 人蔘¹⁰⁾, 鹿茸¹¹⁾, 熟地黃, 五加皮¹²⁾, 魚腥草 및 桑菊飲¹³⁾, 消積白朮散¹⁴⁾ 등이 있으며, 문 등²⁾은 當歸抽出物이 B細胞의 增殖과 抗體生成의 效果가 있고, 趙 등¹⁵⁾은 수종의 補虛藥이 免疫을 增加하는 效果가 있다고 報告하였으며, 補氣와 補血의 代表的 處方인 四君子湯과 四物湯에 관한 研究로는 血液¹⁶⁾, 血壓¹⁷⁾, 筋肉^{18,19)}, 成長²⁰⁾, 腫瘍^{21,22)}, 免疫²³⁻²⁵⁾ 등이 있다.

이에 著者는 methotrexate로 흰쥐의 免疫反應을 低下시켜 四君子湯 및 四物湯이 免疫機能低下에 미치는 影響을 살펴보고자 血中 白血球數, 血中 淋巴球比, 脛骨內 骨髓淋巴球數, 接觸性 皮膚過敏反應, 胸腺組織 淋巴細胞의 形態變化 및 血清 電氣泳動像 등을 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 動物 및 材料

1) 動物

몸무게 200±10g의 Sprague Dawley系 수컷 흰쥐를 固形飼料(삼양유지<株>, 小型動物用)와 물을 充分히 供給하면서 實驗室 環境에 2週日 間 適應시킨 後 健康이 良好한 것을 選擇하여 使用하였다.

2) 藥材

이 實驗에 사용된 處方은 和劑局方²⁶⁾에 收載된 四君子湯과 四物湯으로서 그 內容 및 1貼당 分量은 다음과 같다.

(1) 四君子湯

藥材	生藥名	重量
人蔘	Ginseng Radix	4.6875g
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	4.6875g
白茯苓	Hoelen	4.6875g
甘草	Glycyrrhizae Radix	4.6875g
總量		18.7500g

(2) 四物湯

藥材	生藥名	重量
熟地黃	Rehmanniae Radix	4.6875g
白芍藥	Paeoniae Radix	4.6875g
川芎	Cnidii Rhizoma	4.6875g
當歸	Angelicae Sinensis Radix	4.6875g
總量		18.7500g

2. 實驗方法

1) 檢液의 調製

四君子湯과 四物湯 각각 6貼 分量을 깨끗이 씻어 反應組에 넣고 증류수 2000ml를 넣는다. 反應組에서 2시간 끓이고 난 뒤 藥液을 거르고 중탕하여 196ml가 되게 조절한다. 냉장 보관하되 오염을 최소화하기 위해 20ml vial에 나누어 保管하였

다.

2) 實驗群의 分類 및 處置

흰쥐 6마리를 1群으로 하여 별다른 處置를 하지 않은 正常群, methotrexate(MTX ; $C_{20}H_{11}N_8O_5$, Sigma, U.S.A.)를 投與하기 前 實驗始作 第5日째에 緬羊赤血球를 注入한 對照群, 四君子湯 煎湯液을 經口 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入한 實驗群 I, 四物湯煎湯液을 經口 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入한 實驗群 II, 오전 9시에 四君子湯 1ml, 오후 9시에 四物湯 1ml를 모두 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入한 實驗群 III로 나누어 實驗하였다. MTX를 投與한 後의 實驗에 있어서는 實驗始作 第5日째에 緬羊赤血球를 注入하고 MTX 2mg/kg/day를 第9日과 第11日째 尾靜脈을 통하여 注射하고²⁷⁾ 藥物投與를 하지 않은 對照群, 四君子湯 煎湯液을 經口 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入하고 第9日과 第11日째 MTX를 처리한 實驗群 I, 四物湯煎湯液을 經口 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入하고 第9日과 第11日째 MTX를 처리한 實驗群 II, 오전 9시에 四君子湯 1ml, 오후 9시에 四物湯 1ml를 모두 投與한 後 第5日째에 緬羊赤血球를 注入하고 第9日과 第11日째 MTX를 처리한 實驗群 III로 나누어서 實驗하였다.

實驗群의 藥物投與期間은 MTX 처리前 9日부터 MTX 처리後 9日까지 총 18日間 매일 투여하였다.

3) 抗原感作

胸腺依存性 抗原인 緬羊赤血球(SRBC)를 사용하여 感作시켰다. 서울대학교 목장에서 분양받은 緬羊의 頸動脈에서 注射器로 40cc를 採血한 후 同量의 Alsever氏 溶液(dextro 20.5g/l, sodium citrate 8.0g/l, citric acid 0.55g/l, sodium chloride 4.2g/l)을 섞은 후 4℃에 保管 移動하여 이를 2,000 r.p.m., 10分間 遠心分離하여 赤血球를 分離한 다음 0.5% 赤血球溶液(赤血球:Alsever 溶液:phosphate buffered saline(PBS)=1:1:18)을 만들어 1週日 以內的 것만 使用하였으며, 藥物投與 第5日째에 흰쥐의 尾靜脈에 0.2 ml를 注射하였다.

4) 採血과 血清分離

(1) 末梢血液 採取

採血은 治療를 始作하고 1次 MTX 注入하기 前과 2次 MTX를 注入한 2週後에 Nerenberg와 Zedler가 紹介한 方法²⁸⁾에 따라 實驗室에서 自體 製作한 보온용 採血裝置로 2.5 ml를 採血하여 白血球와 細分化된 鑑別 計數로 淋巴球比를 測定하였다.

(2) 心臟血液 採取

2次 MTX를 注入한 2週後에 chloroform으로 麻醉하고 心臟穿刺하여 血液을 2ml 採取하여²⁷⁾ 室溫에서 1時間 放置後 20℃에서 2,000 r.p.m., 30分間 遠心分離하여 血清을

었으며, 얻은 血清은 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)²⁹⁾를 活用해서 血清 蛋白質中의 IgG를 觀察하였다.

5) 測定

(1) 血中 白血球數 測定

MTX 注入하기 前날에 尾靜脈에서 採血한 血液과 MTX를 注入한 2 週後에 採血한 血液을 各各 血球計數器(Hema-5, Texas, U.S.A.)를 利用하여 白血球數를 測定하였다.

Wright 染色法으로 塗抹染色하여 光學顯微鏡을 利用하여 觀察하였다.

(2) 血中 淋巴球比 測定

MTX 注入하기 前날에 尾靜脈에서 採血한 血液과 MTX를 注入한 2 週後에 採血한 血液으로 各各 血球計數用 slide上에서 血液塗抹 標本을 만들어서 trypan blue(Sigma, U.S.A.)로 染色한³⁰⁾ 후 나타나는 색깔을 보고 數를 헤아려 單核球, 好中球, 好酸球, 好鹽球, 淋巴球들의 數를 手動 計數器를 利用하여 測定하였다.

(3) 脛骨內 骨髓淋巴球數 測定

心臟採血後 Waynforth등의 方法²⁸⁾에 準하여 mess(No.23)를 使用하여 발목에서 둔부를 향하여 皮膚를 切開하고 脛骨을 分離하였다.

Needle(21G)을 使用하여 脛骨의 medial condyloid surface를 통해 작은

구멍을 만들고 骨가위를 使用하여 반대편 끝단을 잘라낸 후 5ml의 PBS를 채운 注射器에 連結하고 骨髓腔으로 注射하여 骨髓를 밖으로 노출시켰다.

骨髓細胞가 섞여 있는 PBS를 10°C에서 2,000 r.p.m., 20分間 遠心分離하여 上層液을 除去하고 다시 PBS 5ml를 加하여 混合한 후 2回 遠心洗滌하였다. 이 淋巴球를 血球計數用 slide上에서 trypan blue로 染色하여 淋巴球들의 數를 手動 計數器를 利用하여 測定하였다.

(4) 接觸性 皮膚過敏反應 測定

何 등³¹⁾이 使用한 方法에 準하여 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)을 感作源으로 하여 實驗하였다. 實驗 第16日 및 第17日에 各各 acetone 對 olive油의 容積比(v/v)가 4:1인 溶液에 0.5% DNFB를 溶解시킨 다음 20 μ l를 取하여 剝毛한 생쥐의 腹部 皮膚에 塗抹하고, 實驗 第22日에 0.2% DNFB溶液 10 μ l를 左側 耳廓 前後 兩面에 塗抹하여 接觸性 皮膚過敏反應을 惹起시킨 24時間 後 左右 耳廓의 부은 程度를 dial thickness gauge(G,OZAKI MFG. CO. LTD., JAPAN)로 各各 0.1mm까지 左右를 測定하여 差異를 計算하였다.

(5) 胸腺組織 淋巴細胞의 形態變化 觀察

心臟採血後 Waynforth등²⁸⁾의 方法에 準하여 胸骨을 따라 鎖骨과 第1, 2, 3 肋骨을 切開하고 胸廓을 연 다

음 胸腺을 分離한 후 -20°C 에서 冷凍시켰다.

冷凍된 標本을 冷凍切片器 (Frigocut 2800, Leica Instruments GmbH, Germany)에서 組織切片用 媒質(Miles, U.S.A.)에 묻고 함께 얼린 다음 $14\mu\text{m}$ 의 切片을 만들어서 slide glass上에서 H-E 染色法³²⁾으로 染色해서 光學 顯微鏡으로 觀察하였다.

(6) 蛋白質電氣泳動像

(SDS-PAGE) 觀察

IgG를 分離 檢査하기 위하여 Jones E. 등의 方法²⁹⁾에 準하여 心臟穿刺하여 2.0ml의 血液을 室溫에서 1時間 放置後 20°C 에서 2,000 r.p.m., 30分間 遠心分離하여 血清을 얻어 6時間 透析하여 無機質을 除去한 후 농축하여 同量의 treatment solution(0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 20% 2-mercaptoethanol, 10% Bromphenol Blue)과 섞은 뒤 100°C 에서 90秒 동안 끓여 $15\mu\text{l}$ 씩 同하게 負荷하였다. Protein size marker로는 phosphorylase B 97,400Dalton, Bovine Serum Albumin 66,200Dalton, Glutamate Dehydrogenase 55,000Dalton, Ovalbumin 42,700Dalton, Aldolase 40,000Dalton, Carbonic Anhydrase 31,000Dalton, Soybean Trypsin Inhibitor 21,500Dalton, Lysozyme 14,400Dalton(Mid Range Protein Molecular Weight Marker; promega, U.S.A.)를 使用하였다³³⁾.

電氣泳動은 30% acrylamide gel에서 Tall Mighty Small(Hoefer, U.S.A.)을 使用하여 15mA에서 6時間 동안 展開시켜 2時間 以上 染色(0.025% coomassie blue R-250, 40% methanol, 7% acetic acid)하고 2回 脫色(40% methanol, 7% acetic acid에서 2時間, 7% acetic acid, 5% methanol에서 2時間)하여 血清蛋白質의 構成을 觀察하였다.

(7) 統計 處理

各群의 統計處理는 SAS를 利用하였으며 分散分析法³⁴⁾에 의한 分散比(F-value)를 통하여 各群 사이의 平均值 差異에 대한 有意性 檢定(p 값 決定)後, $\alpha = 0.05$ 水準에서 Duncan檢定法에 의해 多重比較하였다.

III. 實驗 成績

1. 血中 白血球數

1) 藥物投與後 MTX 注入前 白血球數

藥物治療 8일째에 尾靜脈에서 採取한 血液中の 白血球數는 正常群의 $6.08 \pm 0.45 (10^3 \text{cells/mm}^3)$, 對照群은 $12.90 \pm 0.77 (10^3 \text{cells/mm}^3)$ 로 나타났으며, 四君子湯投與群은 $13.57 \pm 1.17 (10^3 \text{cells/mm}^3)$, 四物湯投與群은 $12.30 \pm 1.13 (10^3 \text{cells/mm}^3)$ 으로 나타났으며, 混合投與群은 $8.25 \pm 0.81 (10^3 \text{cells/mm}^3)$ 로 對照群에 比하여 減少하였다.

이는 統計學的 有意水準 0.05에서 全體實驗群間에 有意性있는 差異를 나타냈으나($p < 0.01$), 對照群과 實驗群의 比較에서 四君子湯投與群이 增加하는 傾向은 있었으나 有意성은 찾아볼 수 없었다(Table I, Fig. 1).

Table I. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the WBC in rats induced by intravenous sensitization with SRBC on 5th day.

Group	No. of animals	WBC (10^3 cells/mm ³)	Duncan grouping
Normal	6	6.08 ± 0.45 ^{a)}	B ^{b)}
Control	6	12.90 ± 0.77	A
Sample I	6	13.57 ± 1.17	A
Sample II	6	12.30 ± 1.13	A
Sample III	6	8.25 ± 0.81	B
F-value		13.08 [*]	

a) Mean ± standard error

b) The same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ level by duncan test

Normal : untreated group.

Control : group of sensitization with SRBC.

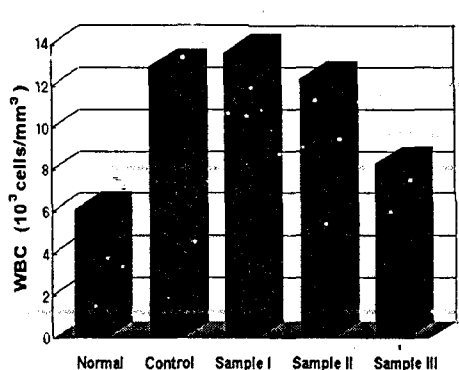
Sample I : group of Sagunjatang administered and sensitization with SRBC.

Sample II : group of Samultang administered and sensitization with SRBC.

Sample III : group of Sagunjatang-Samultang administered and sensitization with SRBC.

* : Statistically significant value by the analysis of variance procedure (* : $P < 0.01$)

Fig. 1. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the WBC in rats induced by intravenous sensitization with SRBC on 5th day.



2) MTX 投與 2週後 白血球數

MTX 投與 2週後 尾靜脈에서 採取한 血液中の 白血球數는 正常群이 $6.32 \pm 0.53 (10^3 \text{ cells/mm}^3)$, 對照群이 $5.48 \pm 0.77 (10^3 \text{ cells/mm}^3)$ 로 나타났으며, 四君子湯投與群은 $8.08 \pm 0.37 (10^3 \text{ cells/mm}^3)$, 四物湯投與群은 $9.25 \pm 0.49 (10^3 \text{ cells/mm}^3)$, 混合投與群은 $6.88 \pm 0.413 (10^3 \text{ cells/mm}^3)$ 으로 對照群에 比하여 增加하였다. 이는 統計學的 有意水準 0.05에서 全體實驗群間에 有意性있는 差異를 나타냈으며 ($p < 0.01$), 對照群과 實驗群의 比較에서 四君子湯投與群과 四物湯投與群이 有意한 差異를 나타내었고, 두實驗群間의 有意한 差異는 없었다(Table II, Fig. 2).

Table II. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the WBC in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.

Group	No. of animals	WBC (10 ³ cells/mm ³)	Duncan grouping
Normal	6	6.32 ± 0.53 ^{ab}	C ^b
Control	6	5.48 ± 0.77	C
Sample I	6	8.08 ± 0.37	AB
Sample II	6	9.25 ± 0.49	A
Sample III	6	6.88 ± 0.41	BC
F-value		7.72 [*]	

a) Mean ± standard error

b) The same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by duncan test

Normal : untreated group.

Control : group of MTX administrated and sensitization with SRBC.

Sample I : group of Sagunjatang and MTX administered and sensitization with SRBC.

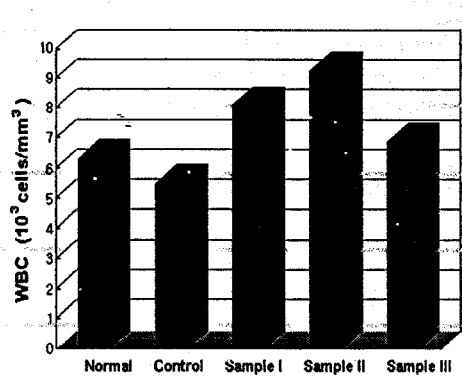
Sample II : group of Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

Sample III : group of Sagunjatang-Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

* : Statistically significant value by the analysis of variance procedure

(* : P<0.01)

Fig. 2. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the WBC in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.



2. 血中 淋巴球比

1) 藥物投與後 MTX 注入前 淋巴球比

藥物治療 8일째에 尾靜脈에서 採取한 血液中的 淋巴球比는 正常群이 45.67±0.61(%), 對照群이 59.00±1.75(%), 四君子湯投與群은 54.00±1.15(%), 四物湯投與群은 53.83±1.38(%), 混合投與群은 55.83±3.60(%), 混合投與群은 55.83±3.60(%), 混合投與群은 55.83±3.60(%)으로 나타났다. 이는 統計學的 有意水準 0.05에서 全體實驗群間에 有意性있는 差異를 나타냈으나(p<0.01), 對照群과 實驗群의 比較에서는 有意한 差異가 없었다(Table III, Fig. 3).

Table IV. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the lymphocyte in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.

Group	No. of animals	lymphocyte (%)	Duncan grouping
Normal	6	46.83 ± 2.04 ^{a)}	AB ^{b)}
Control	6	42.67 ± 2.47	B
Sample I	6	48.33 ± 1.38	AB
Sample II	6	50.50 ± 0.85	A
Sample III	6	45.67 ± 2.11	AB
F-value		2.48 [*]	

a) Mean ± standard error

b) The same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by duncan test

Normal : untreated group.

Control : group of MTX administrated and sensitization with SRBC.

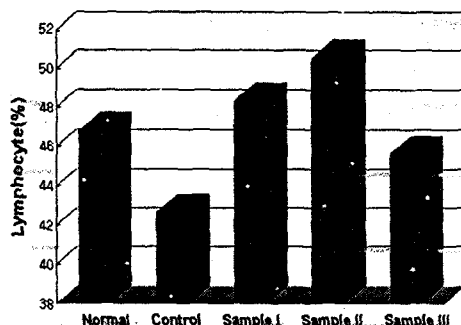
Sample I : group of Sagunjatang and MTX administered and sensitization with SRBC.

Sample II : group of Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

Sample III : group of Sagunjatang-Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

* : Statistically significant value by the analysis of variance procedure (* : P<0.05)

Fig. 4. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the lymphocyte in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.



3. 脛骨內 骨髓淋巴球數

脛骨內的骨髓를 취하여骨髓淋巴球를測定한結果正常群이 37.50 ± 3.96(125 × 10⁴ cells/each), 對照群이 63.50 ± 2.79(125 × 10⁴ cells/each)로 나타났으며, 四君子湯投與群은 77.67 ± 4.23(125 × 10⁴ cells/each), 四物湯投與群은 68.50 ± 5.05(125 × 10⁴ cells/each)로 對照群에 比하여 增加하였고, 混合投與群은 62.50 ± 4.48(125 × 10⁴ cells/each)로 나타났다. 이는 統計學的 有意水準 0.05에서 全體實驗群間에 有意性 있는 差異를 나타냈으며(p<0.01), 對照群과 實驗群의 比較에서 對照群에 比하여 四君子湯投與群이 有意한 差異를 나타냈으나, 四物湯投與群과 混合投與群은 有意한 差異가 없었다(Table V,

Fig. 5).

Table V. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the lymphocyte in tibial bone marrow of rats. Rats were injected i.v. with 2mg /kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.

Group	No. of animals	lymphocyte (125×10 ⁴ cells/ea)	Duncan grouping
Normal	6	37.50 ± 3.96 ^{a)}	C ^{b)}
Control	6	63.50 ± 2.79	B
Sample I	6	77.67 ± 4.23	A
Sample II	6	68.50 ± 5.05	AB
Sample III	6	62.50 ± 4.48	B
F-value		12.80 [*]	

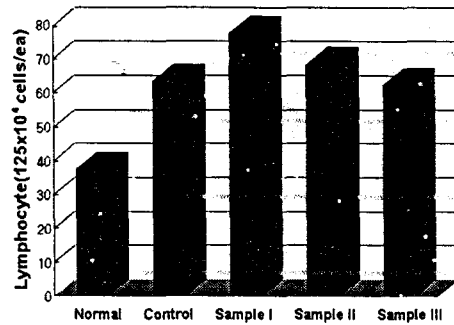
a) Mean ± standard error

b) The same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by duncan test

Normal : untreated group.
 Control : group of MTX administrated and sensitization with SRBC.
 Sample I : group of Sagunjatang and MTX administered and sensitization with SRBC.
 Sample II : group of Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.
 Sample III : group of Sagunjatang-Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

* : Statistically significant value by the analysis of variance procedure (* : P<0.01)

Fig. 5. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the lymphocyte in tibial bone marrow of rats. Rats were injected i.v. with 2mg /kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.



4. 接觸性 皮膚過敏反應

接觸性 皮膚過敏反應에 對한 效果를 觀察하기 위하여 耳廓腫脹程度를 測定한 結果 正常群은 0.23±0.03(mm), 對照群은 0.31±0.04(mm)로 나타났고, 四君子湯投與群은 0.22±0.04(mm), 四物湯投與群은 0.30±0.06(mm), 混合投與群은 0.25±0.03(mm)으로 나타났다.

이는 統計學的 有意水準 0.05에서 全體實驗群間에 有意性있는 差異를 찾아볼 수 없었다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the contact hypersensitivity to DNFB in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.

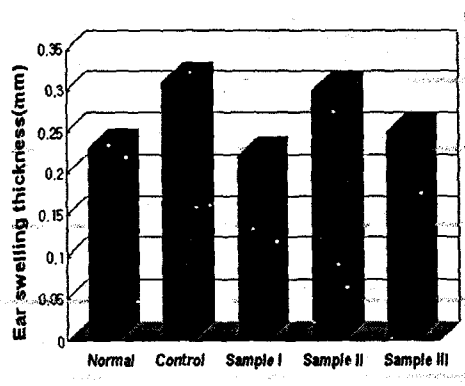
Group	No. of animals	Ear Swelling thickness(mm)	Duncan grouping
Normal	6	0.23 ± 0.03 ^{a)}	A ^{b)}
Control	6	0.31 ± 0.04	A
Sample I	6	0.22 ± 0.04	A
Sample II	6	0.30 ± 0.06	A
Sample III	6	0.25 ± 0.03	A
F-value		1.19	

a) Mean ± standard error

b) The same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by duncan test

- Normal : untreated group.
- Control : group of sensitization with DNFB after MTX administered and sensitization with SRBC.
- Sample I : group of sensitization with DNFB after Sagunjatang and MTX administered and sensitization with SRBC.
- Sample II : group of sensitization with DNFB after Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.
- Sample III : group of sensitization with DNFB after Sagunjatang-Samultang and MTX administered and sensitization with SRBC.

Fig. 6. Effect of Sagunjatang and Samultang administration on the contact hypersensitivity to DNFB in rats. Rats were injected i.v. with 2mg/kg of Methotrexate on days 9, 11 after sensitization with SRBC on 5th day.



5. 胸腺組織 淋巴細胞의 形態變化

胸腺組織의 淋巴球 密集度를 確認하기 위하여 組織切片을 染色하여 撮影한 結果는 다음과 같다(Fig. 7-1,2,3,4,5).

正常群은 胸腺 小葉의 分離가 뚜렷하고 小葉안의 髓質과 皮質의 윤곽도 判別하기 쉽다. 皮質部分에는 많은 胸腺 淋巴細胞들이 모여 있고, 細胞間質이 있다. 髓質部分에는 비교적 희박한 細胞密度를 나타내고, 染色정도가 皮質의 淋巴細胞와 다르다.

對照群은 胸腺 小葉의 分離는 비교적 뚜렷하나 皮質部分에는 많은 胸腺

淋巴細胞들이 密集되어 있지 않고 散在되어 있다. 細胞間質도 뚜렷하지 않다. 髓質部分은 불분명한 경계와 正常群과 비슷한 密度를 나타내고 있다.

四君子湯投與群은 胸腺 小葉의 分離는 비교적 뚜렷하지 못하며, 皮質과 髓質의 경계는 비교적 분명하다. 皮質部分에는 胸腺 淋巴細胞들이 모여 있고 密集도가 높다. 皮質의 전체 넓이가 肉眼 觀察로 正常群보다 좁고 한 쪽으로 치우쳐져 있다.

四物湯投與群은 胸腺 小葉의 分離는 비교적 뚜렷하나 皮質과 髓質部의 경계가 불분명하며 특징이 뚜렷하지 않다. 皮質의 密度가 희박하다.

混合投與群은 胸腺 小葉의 分離는 비교적 뚜렷하지 않고, 皮質과 髓質의 경계가 불분명하며, 皮質과 髓質의 특징이 뚜렷하지 않지만 皮質의 密度는 높다.

Legends of Figures

Fig 7-1. Microscopic findings in the frozen section from untreated rat thymus. H-E staining. ($\times 40$) Medulla and cortex are clearly observed. The latter is more deeply stained due to its abundance of thymocytes.

Fig 7-2. Microscopic findings in the frozen section from rat thymus 2weeks after secondary injection of MTX. Rat was sensitized with SRBC on 5th day. H-E staining. (\times

40) Medulla and cortex are not distinct. Thymocytes are scattered over the outer cortex.

Fig 7-3. Microscopic findings in the frozen section from rat thymus 2weeks after secondary injection of MTX. Rat was sensitized with SRBC on 5th day and administered Sagunjatang for 18 days. H-E staining. ($\times 40$) Medulla and cortex are clearly observed. Thymocytes are concentrated in the outer cortex.

Fig 7-4. Microscopic findings in the frozen section from rat thymus 2weeks after secondary injection of MTX. Rat was sensitized with SRBC on 5th day and administered Samultang for 18 days. H-E staining. ($\times 40$) Medulla and cortex are not distinct. Thymocytes are scattered over the outer cortex.

Fig 7-5. Microscopic findings in the frozen section from rat thymus 2weeks after secondary injection of MTX. Rat was sensitized with SRBC on 5th day and administered Samultang-Sagunjatang for 18 days. H-E staining. ($\times 40$) Medulla and cortex are not distinct. Thymocytes are concentrated in the outer cortex.

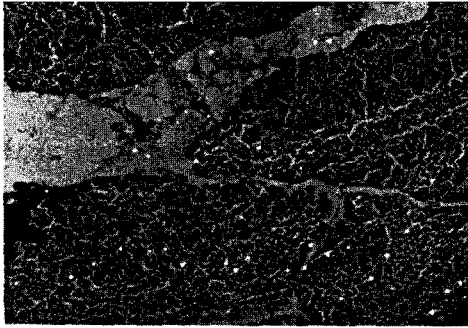


Fig. 7-1

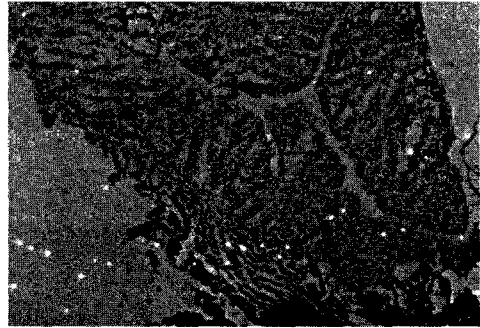


Fig. 7-4



Fig. 7-2

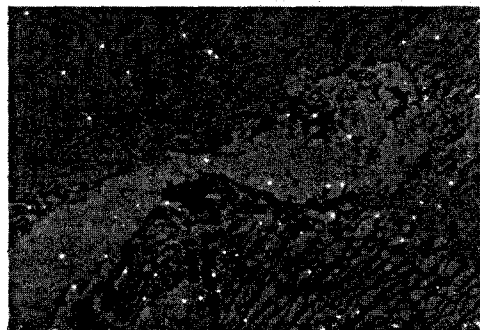


Fig. 7-5

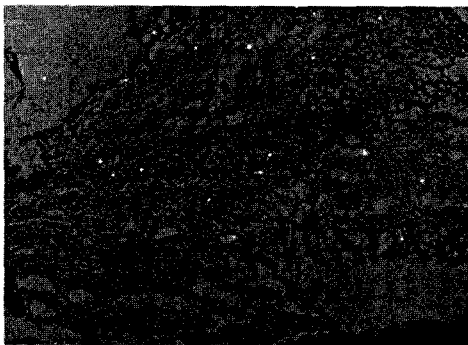


Fig. 7-3

6. 蛋白質電氣泳動像 (SDS-PAGE)

IgG는 50kD의 Heavy chain 2個와 25kD의 Light chain 2個로 構成되어 있는데, 이를 β -mercaptoethanol로 處理하면 H鎖와 L鎖의 斷片이 分離된다. SDS-PAGE의 展開像에서 Heavy chain과 Light chain에 該當하는 50kD와 25kD 附近에 생긴 band를 살펴보면 다음과 같다(Fig. 8).

全實驗群에서 25kD 附近에 생긴 band의 面積이 넓은 것으로 나타났으나, 實驗群間의 有意한 差異는 없었다.

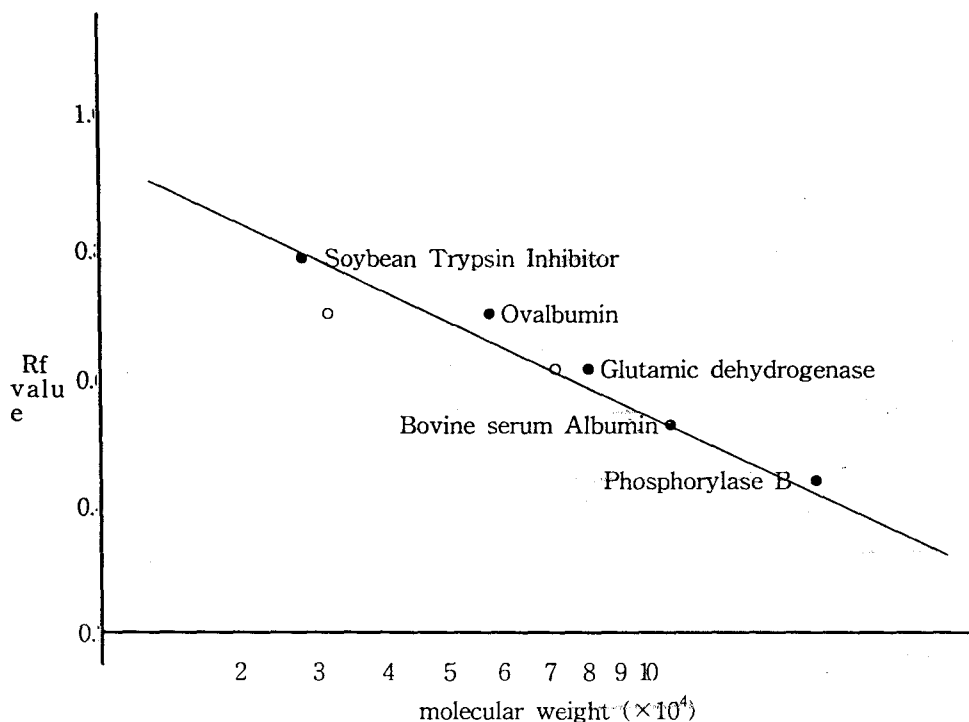


Fig. 8. Molecular weight on SDS-PAGE.

- : size marker
- : fragment of IgG

IV. 考察

‘疾病’을 生物學的 過程의 病的 變化하는 規定에 局限하여 본다면 ‘疾病’의 本體는 細胞의 微細構造와 微細機能의 變化로서 說明된다. 그러므로 疾病의 克服은 장차 遺傳子의 照明, 免疫機能의 保全과 促進을 통해 이루어질 가능성이 크다고 보여진다³⁵⁾.

免疫이란 “세균 또는 감염으로부터 피한다 또는 예방한다”라는 뜻이며, 病

源體나 異物과 같은 外的 因子나 變形物質, 腫瘍과 같은 內的 因子로부터 보호하려는 生體機轉을 免疫이라 한다^{1,36-38)}. 免疫系는 자기것과 자기것이 아닌 것(抗原)을 구별하여 免疫應答을 하고, 그들을 除去하고자 하며, 外部에서 侵入하는 세균이나 바이러스 또는 자기 자신의 組織에서 發生한 異常細胞(癌 細胞)등을 認識하여 除去하는 免疫監視, 그리고 免疫的 經驗을 오래 保存할 수 있는 免疫的 記憶을 修行하는 것이다³⁹⁻⁴¹⁾.

疾病의 發生은 外邪의 侵襲, 正氣의 不足, 體內 陰陽의 平衡失調로 發生하며 소위 “陰平陽秘”는 人體가 가지고 있는 恒常性으로 一種의 非特異性 防禦機能이라 할 수 있으며⁸⁾, 免疫反應은 자기것과 자기것이 아닌 것을 구별하여 자기것이 아닌 것을 排斥하고 자기를 保存하는 것으로³⁹⁻⁴²⁾ 이는 正氣와 邪氣가 反應하는 正邪抗爭으로 설명될 수 있다⁴³⁾. 免疫機能은 肺, 脾, 腎과 관계 깊으며, 實驗研究를 통해서 正氣虛한 환자의 免疫力이 低下되거나 非正常으로 나타났으므로 正氣는 人體 免疫系統의 正常機能을 포함한다고 볼 수 있다. 疾病의 治療에 있어서도 正邪의 盛衰에 따라 扶正祛邪의 原則을 적용하여 陰陽의 平衡을 調整하고 免疫機能, 疾病에 대한 防禦能力을 促進시키게 된다^{4-6,44)}. 扶正의 治療는 益氣, 健脾, 補腎 등의 治療를 포괄하여 人體의 氣血不足을 補하여 陰陽과 臟腑機能失調를 調整하여 抵抗力과 免疫機能을 增強시킨다^{8,45)}.

補氣, 補血, 補陰 및 補陽藥들은 모두 細胞 免疫이나 體液 免疫, 特異性 免疫에 대하여 상당한 促進 作用을 나타내고 있는 것으로 報告되고 있으며^{8,45)}, 細胞 免疫에 促進 效果를 더 明確하게 나타내고 있어서 重要할뿐만 아니라 T-cell을 위한 免疫 監視 能力을 행사하는 데 있어서 대단히 重要的 作用을 하고 있다⁴⁵⁾. 최근 實驗의 報告^{45,15)}에 의하면 補氣, 補血, 補陰 및 補陽의 4가지 補虛藥 중 27味에 대한 免疫指標檢査(體內 防禦機能低下의 回復 實驗, 흰쥐의 neutrophil의 食食作用,

hemolytic plaque forming cell assay)에서 모두 免疫 增強作用을 나타냈으며, 서로 다른 補虛藥間의 顯저한 差異는 發見하지 못하였다. 免疫增強 정도에 관하여 黃芪, 人蔘, 靈芝, 党參, 白朮, 靈芝, 茯苓, 薏苡仁, 大棗, 豆類 등의 補氣藥은 細胞免疫과 關連한 T-cell을 增加하고, lymphocyte transformation과 食食細胞의 機能을 增加시켰으며, 白血球를 增加시켰고, 體液性 免疫으로는 IgG와 IgA를 增加시켰다. 當歸, 鷄血藤, 阿膠, 熟地黃, 白芍藥, 桑椹子 등의 補血藥은 細胞免疫과 關連하여 T-cell와 lymphocyte transformation을 增加시키고, 白血球를 增加시키며, 體液性 免疫으로 B-cell을 增加시키고 抗體의 生存時間을 연장하는 效能이 있다고 한다.

四君子湯은 人蔘, 白朮, 茯苓, 甘草로 構成되었으며, 「和劑局方一切氣病門」²⁶⁾에서 最初로 收錄되어 “治營衛氣虛, 藏府怯弱, 心腹脹滿, 全不思食, 腸鳴泄瀉, 嘔噦吐逆”이라고 하였는데, 氣虛諸證을 治療하는 補氣의 方劑이며, 四物湯은 熟地黃, 當歸, 川芎, 白芍藥으로 構成되었으며, 「和劑局方婦人諸疾門」²⁶⁾에서 “調益營衛, 滋養氣血, 治衛任虛損, 月水不調…”라고 하였으며, 一切 血虛 및 血不和로 發生하는 諸證을 治療하는 方劑이다^{46,47)}.

四君子湯과 四物湯에 關한 實驗 研究에서 金²³⁾은 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應 低下에 細胞性 및 體液性 免疫反應 低下를 회복시키는 效能이 있고, 八物湯이 가장 강하다고 하

였으며, 李 등²²⁾은 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯이 癌細胞 成長을 抑制하며 生存期間을 延長하는 效果가 있다고 하였고, 裴 등²⁰⁾은 四君子湯과 四物湯 extract가 rat의 成長에 影響을 미친다고 하였다. 또한 李 등²⁵⁾은 四君子湯이 생쥐의 體液性 및 細胞性 免疫反應을 增加시키고 免疫學的 監視에 關與하는 NK細胞들의 活性을 顯著히 增加시킨다고 하였고, 安²¹⁾은 四物湯이 抗癌劑 cyclophosphamide로 인한 肝, 腎, 骨髓의 副作用을 抑制한다고 하였으며, 申²⁴⁾은 lead acetate로 免疫抑制를 誘發한 實驗에서 各 季節別 四物湯 모두에서 遲延性 過敏反應의 足蹠腫脹指數, IgG, IgA, IgM이 有意하게 增加하였다고 하였다. 또, 四君子湯과 四物湯 모두 B-cell의 增殖反應과 PFC를 增加시키며, 四君子湯은 lymphocyte transformation을 促進시키고, rosette 형성의 作用을 活性化시키며, 四物湯의 경우도 補血作用을 발휘할 때에는 細胞免疫에 대한 促進作用이 있으며 lymphocyte transformation을 增加시킨다^{4,5)}는 報告가 있다.

免疫反應의 종류를 크게 두가지로 분류하는데, 하나는 體液性 免疫反應으로 抗體의 生成과 이를 血液과 體液內에 分泌하는 反應이며, 다른 하나는 細胞 媒介性 免疫으로 減작된 淋巴球를 生産하여 이들 細胞 表面에 있는 수용체와 抗原이 相互作用을 하게 하는 反應이다. 細胞媒介性 免疫에서는 感作된 淋巴球가 臟器移植시 拒否反應을 나타내게 하거나 virus, 細菌 및 세

균에 대하여 저항을 하게 한다. 體液性 免疫反應이나 細胞媒介性 免疫反應에 關與하는 主要細胞는 淋巴球이다. 따라서, 胸腺, 림프절, 脾臟, 骨髓 및 血液內 淋巴球 등은 免疫反應에서 매우 重要한 役割을 한다. 免疫反應에 關與하는 淋巴球는 B-cell과 T-cell로 나눌 수 있다. B-cell은 抗體를 만드는 形質細胞의 前驅細胞이며 T-cell은 細胞媒介性 免疫反應에서 中개자 役割을 한다. 大食球 또한 免疫反應에서 主役割을 하지는 않지만 免疫反應을 유도하거나 細胞媒介性 免疫反應의 發顯에 關與하고 있다^{1,4,7,35,39-41,48)}

MTX는 細胞媒介反應의 抑制劑로서 dihydrofolate reductase와 결합하여 dihydrofolic acid가 tetrahydrofolic acid로 되는 反應을 방지함으로써 deoxyribonucleic acid와 thymidylic acid의 methyl화를 抑制하고 DNA와 RNA合成을 抑制하며, 細胞毒作用으로는 骨髓를 抑制하여 白血球의 減少가 심하고 腎臟毒性이 강하다^{33,39,48-50)}.

이 實驗에서는 MTX를 尾靜脈 注射하여 흰쥐의 免疫反應을 低下시켜 四君子湯 및 四物湯이 免疫機能에 미치는 影響을 살펴보고자 血中 白血球數, 血中 淋巴球比, 脛骨內 骨髓淋巴球數, 接觸性 皮膚過敏反應, 胸腺組織 淋巴細胞의 形態變化 및 血清 電氣泳動像 등을 觀察하였다. 混合投與群은 「素問·金匱眞言論」³⁾의 “平旦至日中, 天之陽, 陽中之陽也, 日中之黃昏, 天之陽, 陽中之陰也, 合夜之鷄鳴, 天之陰, 陰中之陰也, 鷄鳴之平旦, 天之陰, 陰中之陽也”라는

理論에 근거하여 午前에는 四君子湯, 午後에는 四物湯을 投與하였다.

白血球數는 MTX 注入前에는 四君子湯投與群과 四物湯投與群이 有意한 差異가 없었으며 混合投與群은 減少하여 正常群에 가까운 양상을 보였으며, MTX 投與 2週後 白血球數 比較에서는 四君子湯投與群과 四物湯投與群이 有意하게 增加하였다.

淋巴球比는 MTX 投與前에는 有意한 差異를 보이지 않았으며, MTX 投與 2週後 淋巴球比 比較에서 四物湯投與群은 對照群에 比하여 有意한 增加를 보였다. 이는 周⁵¹⁾의 四君子湯으로 氣虛 mouse를 치료시 肝과 胸腺의 회복을 促進하였으며 다른 症狀들이 好轉되었으나 正常群에서는 無效였으며, 黃⁵²⁾의 四君子湯이 健康과 氣虛 mouse의 末梢血液 T-cell에 대한 影響을 研究한 바 氣虛群에서 四君子湯을 投與시 현저하게 T-cell이 增加하였으며, 正常群에 四君子湯을 投與시에는 影響을 주지 않았다는 結果와 比較해 보았을 때 四君子湯의 白血球數와 淋巴球比도 마찬가지로 結果를 보였다. 이는 四君子湯과 四物湯이 病態를 誘發하지 않은 正常群의 免疫反應에는 影響을 미치지 않는 것으로 思慮된다.

骨髓는 中樞免疫器官이지만 血清 Ig의 주된 根源이 밝혀지면서 末梢 免疫器官으로서도 重要한 役割을 한다^{27,41)}. 脛骨內 骨髓淋巴球數 測定에서는 對照群에 比하여 四君子湯投與群이 有意한 增加를 나타냈다.

細胞性 免疫機轉에 의한 過敏症으

로 接觸性 皮膚過敏反應은 T-cell이 주된 役割을 하며, 일종의 hapten이라 할 수 있는 DNCB(dinitrochlorobenzene)나 DNFB(dinitrofluorobenzen)을 사람이나 動物의 皮膚에 바르고 1-2주일 후에 다시 같은 장소에 바르면 24시간 이내에 發赤, 腫脹이 생긴다. 이들 hapten이 皮膚 細胞表面 蛋白과 結合하여 hapten-운반체를 形成하게 되면 랑게르한스細胞가 이를 잡아먹어 림프절 副皮質에 들어가 CD4+ T-cell에게 提供하여 T-cell을 感作시킨다. 재차 抗原에 노출되면 記憶 T-cell이 자극을 받아 分열되어 lymphokines을 遊離하여 이들이 炎症細胞를 補充하고 活性化하여 炎症 反應을 促進시키는데 48-72시간 후부터 減少하기 시작한다^{36,37,39,40-42)}. 四君子湯과 四物湯은 接觸性 過敏反應에서는 增加나 減少를 보이지 않았으며, 이와 關聯된 症狀의 改善에는 도움이 되지 않을 것으로 推定할 수 있다.

胸腺은 免疫反應에는 參與하지 않으면서 淋巴球를 生産하여 末梢血液器官으로 보내는 中樞免疫器官으로서, 皮質에는 淋巴球가 가득차 있고 髓質에는 그에 비하여 소수의 淋巴球가 上皮樣細胞에 사이에 存在하고 있다. 胸腺은 1차 免疫組織으로서 胸腺內의 淋巴球는 抗原과 직접 接觸하지 않으며 대부분 T-cell이며, 일부는 抗原의 刺戟없이 항상 分列增殖을 하고 있다^{1,32,36,37,39,41,42,53)}. 이 實驗에서 對照群에 比하여 四君子湯投與群이 有意한 差異를 나타내어 胸腺 淋巴細胞에 影響을

미치는 것으로 認定된다.

體液性 免疫機能을 評價하는 方法 中の 하나인 전기영동법은 IgG이외의 class에 관해서는 그 缺如의 대부분을 지적할 수 없는 缺點이 있다³⁹⁾. PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)는 acrylamide 용액과 persulfate용액을 혼합하면 acrylamide의 polymerization이 일어나며, TEMED(tetra methylethylene)는 이 反應을 촉매하여 신속히 polymerization이 일어나게 한다. acrylamide가 polymerization된 후 양단에 전기장을 걸면 分子크기의 差異에 따라 蛋白分子의 分割이 이루어지게 되며, 分子量을 測定할 수 있다³⁷⁾.

IgG는 태반을 통과하는 유일한 Ig으로 세균을 opsonization하며 보체계를 活性化하고, 食菌作用을 增強하며, virus 및 독소 中和作用 등이 있다^{36,37,41,42)}. IgG를 分離 檢査하기 위해 SDS-PAGE를 시행한 결과 全實驗群에서 Heavy chain과 Light chain에 해당하는 50kD과 25kD 附近에 넓은 band를 형성하여 IgG의 抗體生成이 活發했던 것으로 思慮된다.

以上の 實驗結果에서는 四君子湯投與群과 四物湯投與群은 免疫增強效果가 있다고 認定되지만, 두實驗群間의 免疫反應 比較에서 明確한 區分을 내리기는 困難하였으며, 混合投與群은 免疫增強效果를 認定하기는 어렵다고 보여진다. 따라서, 다양한 免疫反應指標의 實驗的 檢定을 통한 比較研究가 必要할 것으로 思慮된다.

V. 結論

四君子湯 및 四物湯이 methotrexate로 誘導된 免疫機能低下에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 흰쥐에 四君子湯과 四物湯 및 混合投與方을 18日間 經口投與하면서, 實驗 第5日째에 緬羊赤血球를 注入하여 抗原을 感作시키고, 實驗 第9日과 第11日째에 methotrexate를 2mg/kg/day 尾靜脈注射하여 免疫機能을 低下시켜 血中白血球數, 血中 淋巴球比, 脛骨內 骨髓 淋巴球數, 接觸性 皮膚過敏反應, 胸腺 組織 淋巴細胞의 形態變化 및 血清 電氣泳動像 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 藥物投與後 MTX 注入前 白血球數는 對照群에 比하여 混合投與群에서 有意性 있는 減少를 보였다.
2. MTX 投與 2週後 白血球數는 四君子湯投與群과 四物湯投與群에서 各 有意한 增加를 보였다.
3. 藥物投與後 MTX 注入前 淋巴球比는 對照群에 比하여 全實驗群에서 모두 有意한 差異가 認定되지 않았고, MTX 投與 2週後에는 四物湯投與群에서 對照群에 比하여 有意한 增加를 보였다.
4. 骨髓淋巴球數는 對照群에 比하여 四君子湯投與群이 有意한 增加를 나타내었다.

5. 接觸性 皮膚過敏反應에서는 對照群에 比하여 全實驗群에서 모두 有意한 差異가 認定되지 않았다.
6. 胸腺組織 淋巴細胞의 形態變化에서 正常群에 比하여 對照群은 皮質과 髓質의 境界가 不分明하며 皮質의 胸腺 淋巴細胞의 密度가 稀薄하게 나타났고, 對照群에 比하여 四君子湯投與群은 皮質과 髓質의 境界가 比較的 分明하고 皮質部의 胸腺 淋巴細胞들의 密集도가 높은 差異를 보였으나, 四物湯投與群과 混合投與群에서 有意한 差異는 認定되지 않았다.
7. 蛋白質電氣泳動像(SDS-PAGE)에서는 全實驗群에서 Heavy chain 과 Light chain에 해당하는 50kD과 25kD 附近에 넓은 band를 나타내어 IgG의 抗體 形成이 활발하였으나, 實驗群間의 有意한 差異는 없었다.

參 考 文 獻

1. 박재갑. 인간생명과학. 서울: 서울대학교출판부, 1993:209-225
2. 문은이 등. 당귀추출물이 면역계에 미치는 영향 II. 대한면역학회지 1991;13(1):71-77
3. 王 琦 등. 黃帝內經素問今釋. 서울: 成輔社, 1983:8, 20, 169, 412
4. 안덕균 역. 면역과 한방. 서울: 열린책들, 1994:19-21, 23-27, 67-73
5. 劉正才 尤煥文 編著. 中醫免疫. 四川省: 重慶出版社, 1983:8-10, 54-60
6. 張梓荊主編. 中西醫結合研究從書; 兒科疾病研究. 上海: 上海科學技術出版社, 1988:29-37
7. 陳奇 主編. 中藥藥理研究方法學. 北京: 人民衛生出版社, 1993:703-704, 1003, 1008
8. 韓先達. 試論中醫治則與免疫調節. 浙江中醫學院學報 1991;15(5):8-9
9. 林사비나, 李惠貞. 靈芝水鍼이 寒冷刺戟으로 低下된 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學學會誌 1992;13(1):71-84
10. 金大洙. 三種의 製法에 따른 人蔘水鍼이 methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 慶熙醫學 1989;5(1):97-105
11. 黃慶愛. 人蔘 및 鹿茸水鍼이 時間經過에 따른 免疫效果研究. 慶熙醫學 1988;4(2):150-157
12. 高炳熙. 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK 細胞 活性度에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集

- 1986;9:193-215
13. 吉永星, 鄭昇杞, 李珩九. 魚腥草 및 桑菊飲이 免疫機能에 미치는 影響. 大韓韓醫學學會誌 1995;16(1):295-318
14. 趙成基, 趙鍾寬. 消積白朮散의 抗癌, 免疫增強效果 및 cisplatin의 腎臟毒性抑制에 미치는 影響에 관한 研究. 大韓韓醫學學會誌 1993;14(2):281-309
15. 趙連根 등. 幾類補益藥對機體防禦機能作用的比較研究. 中醫雜誌 1990;31(4):52
16. 金永錫. 血栓症 및 高粘度血症에 대한 當歸飲과 四君子湯의 實驗的 研究. 大韓韓醫學學會誌 1993;14(1):114-128
17. 姜昌洙. 四物湯煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 影響. 圓光大學校學位論文集 1985;(5):381-398
18. 宋瑋炫. 四君子湯, 四君子湯加黃芪煎湯液이 生肌作用에 미치는 影響. 大韓韓方外關科學會誌 1989;2(1):17-30
19. 李起南 등. 四君子湯抽出液이 筋小包體의 ATPase活性에 미치는 影響에 관한 研究. 大韓韓醫學學會誌 1989;10(1):117-124
20. 裴鍾局 등. 四君子湯과 四物湯 extract 投與가 rat의 成長에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集 1978;6(1):104-111
21. 안희덕. 四物湯의 抗癌劑 副作用抑制에 관한 實驗的 研究. 大韓東醫病理學會誌 1995;9(2):341-358
22. 李永燦, 田炳薰. 巴豆를 加味한 四君子湯 및 四物湯의 抗癌效果에 대한 研究. 大韓東醫病理學會誌 1994;9:79-100
23. 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. 大韓東醫病理學會誌 1987;(2):42-59
24. 申榮京. 四物湯의 季節別 培味, 加味에 의한 생쥐의 體重變化 및 免疫機能에 미치는 影響. 大邱: 大邱韓醫科大學 大學院 碩士學位論文, 1988
25. 李南九 등. 四君子湯이 생쥐의 免疫反應 및 NK細胞의 細胞毒性에 미치는 影響. 大韓韓醫學學會誌 1989;10(2):115-122
26. 陳師文 등. 太平惠民和劑局方. 台北: 旋風出版社, 1974:115, 242
27. D.M.Wier. Handbook of experimental immunology volume 3 Application of Immunological Methods. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979:47.8-47.9, A.4.6-A4.7, A4.15-A4.16
28. H. B. Waynforth & P. A. Flecknell. Experimental and surgical technique in the RAT Second edition. San diego: U.S.A. ACADEMIC PRESS, 1992:71-73, 257-263, 303-309, 313-340
29. Jone E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren

- Strober. Current Protocols in Immunology (Volume 2). New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995:10.7.1-10.7.6.
30. D.M.Wier. Handbook of experimental immunology volume 2 cellular immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979:23.6-23.10
31. 하대유. 인삼에 대한 세포학 및 면역학적 연구(제III보). 대한면역학회지 1979;1(1):45-52
32. Tomes S. Lesson, C. Roland Lesson, Anthony A. Paparo. Text Atlas of Histology. Philldelphia: U.S.A.WB saunders company, 1988:342-360
33. 주진우, 허문수. *Vibrio furnissii* 사균백신과 정제 IgG의 면역효과에 관한 연구. 대한미생물학회지 1994;29(5):399-410
34. 안윤옥, 유근영, 박병주. 전정판 實用의학통계론. 서울: 서울대출판부, 1996:64-86
35. 李符英. 醫學概論 II. 서울: 서울대출판부, 1994:31
36. 김세중. 면역학. 서울: 고려의학, 1994:4-9, 16-17, 54-57, 270-272, 304
37. 서울대학교 의과대학 편. 면역학. 서울: 서울대출판부, 1993:1-7, 12-13, 193, 179-180, 214-217, 269
38. 홍창의, 고팡옥, 김길영. 소아과학. 서울: 대한교과서주식회사, 1993:206
39. 李淵台 譯·菊地浩吉 外 著. 最新免疫學. 서울: 集文堂, 1982:33, 198, 215-216, 478-481, 508
40. 李鍾調. 病原微生物學. 서울: 壽文社, 1992:171-186
41. 정태호. 면역학 강의. 대구: 경북대학교 출판부, 1991:2-3, 219-221
42. IVAN ROITT. ESSENTIAL IMMUNOLOGY sixth edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984:23-24, 40, 135, 211
43. 文溶典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울: 高文社, 1990:27-29, 78-80
44. 徐重明. 脾與免疫系統關係研究近況. 四川中醫 1993;(1):16-18
45. 沈自尹. 中醫藥對免疫功能影響的綜述與評析. 中國中西醫結合雜誌 1992;12(7):443-446
46. 汪昂. 原本醫方集解. 서울: 大星文化社, 1990:46, 162
47. 遼寧中醫學院, 北京中醫學院, 天津中醫學院, 南京中醫學院 主編. 方劑學. 沈陽: 遼寧科學技術出版社, 1986:75, 78
48. 서울대학교 의과대학 약리학교실 편. 약리학. 서울: 고려의학, 1994:678-679
49. 서울대학교 의과대학 편. 임상약리학. 서울: 서울대출판부, 1995:468
50. 홍사석 엮음. 이우주의 약리학 강의 제 3판. 서울: 의학문화사, 1992:646-647

51. 周夢聖. 模擬中醫氣虛動物模型的研
究. 中醫雜誌 1989;30(9):41
52. 黃柄山. 飲食失節所致的脾虛動物模
型及中藥治療觀察. 中西醫結合雜誌
1983;3(5):295
53. 신태성 외. 조직학실습. 서울: 고
문사, 1993:302-305