

보양환오탕에 의한 비특이적 세포독성 T 세포 활성 증강

하종천 · 김영현 · 우원홍¹ · 남상윤*

전주대학교 자연과학부

¹원광대학교 한의과대학 병리학교실

Promotion of Nonspecific Cytotoxic T Lymphocyte Activity by Bo-yang-hwan-oh-tang

Jong-Cheon Ha, Young-Hyun Kim, Won-Hong Woo¹ and Sang-Yun Nam*

Department of Microbiology, School of Natural Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

¹Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – To explore the possible cancer therapeutic application of “Bo-yang-hwan-oh-tang” (BH), a herbal medicinal recipe used for improvement of blood stasis, we have examined its direct cytotoxicity against tumor cell, and induction of cytotoxic activity of lymphocytes. Water extract of BH alone did not exhibit direct cytotoxicity to Yac-1 target cells even with high concentrations (10 mg/ml). By exposure for 3 days, BH did not induce any nonspecific cytotoxic activity of mouse spleen cells, either, when assessed in a 4 hr ⁵¹Cr-release assay. However, when BH was added during CD3-stimulation of non-adherent spleen cells, non-specific CTL activity was markedly promoted in a dose-dependent manner. In contrast, BH did not alter activated NK cell activity following IL-2 stimulation. These data suggest that BH does not induce but upregulates non-specific CTL effector function and that activated NK cell does not respond to BH. For elucidation of the mechanism underlying this function of BH, time kinetic study for IL-2 production using ELISA was undertaken. IL-2 production following CD3 stimulation was significantly augmented and higher level of IL-2 is sustained over 3 days in the culture medium by BH treatment. Moreover, addition of exogenous IL-2 during CD3 stimulation resulted in a similar level of cytotoxicity between control and BH-treated culture. These data indicate that the BH-mediated upregulation of non-specific CTL activity is contributed by augmentation of IL-2 production. Our data imply the possible application of BH for combination therapy of cancer with non-specific activator.

Key words – Bo-yang-hwan-oh-tang (BH), cytotoxic T lymphocytes, CD3 stimulation, interleukin 2 (IL-2).

보양환오탕(補陽還五湯, 이하 BH로 약함)은 왕¹⁾의 “의임개착”에 처음 수록된 이래 주로 기허 혈어로 인한 중풍 반신불수의 치료에 활용되어 왔으며²⁻⁷⁾ 최근에는 허혈성 뇌혈관 질환 뿐만 아니라 협심증, 심근경색, 다발성 신경염, 혈전성 정맥염 등의 질환에도 응용되고 있다.⁸⁻¹³⁾ 활혈어지제는 혈액순환의 불완전

또는 혈전 형성으로 이해되고 있는 어혈의 치료제이며, 보양환오탕은 이에 속하는 처방 중의 하나이다. 실험적 연구 결과에 의하면 보양환오탕은 가토(家兔)의 혈압하강,¹⁴⁾ 실험적 혈전,¹⁵⁾ 내독소로 유발된 백서(白鼠)의 혈전증,¹⁶⁾ Mongolian Gerbil 전뇌의 가역적 국소빈혈(ischemia),¹⁷⁾ 혈압 및 국소 뇌혈유량,¹⁸⁾ LPS와 PMA에 의해 손상된 신경교세포의 활성¹⁹⁾ 등에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다.

*교신저자 : Fax : 063-220-2326

한의학적으로는 질병의 치료를 위하여, 사기가 중하면 거사를 위주로 정기가 허하면 보허를 위주로 처방하게 되는데 지금까지의 암 관련 연구에 있어서도 부정거사 및 활혈거어 방법이 응용되어 비교적 높은 치료 효과를 보이고 있으며, 특히 활혈화어 약물은 면역세포의 기능에 영향을 주어 세포성 면역과 체액성 면역을 증강시키는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.^{20,22)} 그러나 보양환오탕에 대한 암 관련 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 이들의 항종양 면역기능의 조절작용도 밝혀져 있지 않다. 이에 저자들은 보양환오탕이 직접적으로 암세포의 증식에 어떤 영향을 줄 수 있는지를 관찰하고 또한 면역세포들의 기능조절을 통한 생체의 항종양 면역반응에 어떤 역할을 할 수 있는지를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 - 본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 3-5주 된 C57BL/6 생쥐를 다블 science에서 구입하였으며, 항온 항습 장치 내에서 사육하면서 6-8주된 생쥐를 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - IMDM 세포배양액, 항생제(penicillin, streptomycin, Fungizone) 및 trypan blue는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서, 우태혈청은 Biowhittaker Molecular Applications(Rockland, ME, USA)에서, 2-mercaptoethanol, 3,3',5,5-tetramethylbenzidine은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. IL-2 ELISA에 사용된 항체는 Bio-source International Inc.사(Camarillo, CA., USA)에서 구입하여 사용하였다. 생쥐는 항온항습장치(대중기기, 서울) 내에서 유지시키며 사용하였고, 세포독성 검사시 감마방사능의 측정에는 1217 Clinigamma 감마방사능 측정기(LKB-Wallac, Sweden)를, 세포의 세척을 위해서는 UNION 32R 원심분리기(한일주식회사, 서울)를, ELISA시 흡광도 측정에는 microplate reader (Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA)를 각각 사용하였다. 검액의 조제 후 건조를 위해서는 rotary vacuum evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

세포 배양액 - 본 실험에 사용되어진 기본 배양액은 IMDM을 사용하였고 여기에 항생제(100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml Fungi-

Table I. Composition of BH

한약명	생약명	중량(g)
황기	Astragali Radix	60.00
당귀	Angelicae Gigantis Radix	8.00
적작약	Paeoniae Radix rubra	6.00
친궁	Cnidii Rhizoma	4.00
도인	Persicae Semen	4.00
홍화	Carthami Flos	4.00
지룡	Lumbricus	4.00
total amount		90.00

zone), 5×10^5 M의 2-mercaptoethanol (2ME), 10%의 우태혈청(fetal bovine serum; FBS)을 넣은 완전 배양액을 사용하였다.

Cytokine 및 항체 - 사람 rIL-2(5×10^5 /mg protein)는 생명과학연구소로부터 분양받아 사용하였다. 항 CD3 항체는 pristane을 nude mice에 주입한 다음, 2주 후에 5×10^5 개의 145-2C11 하이브리도마 세포를 주입하고, 1-2주일 후에 복수를 채취하여 얻었다.

약제 - 본 실험에 사용한 보양환오탕의 처방내용은 의임개착¹⁾에 의거하였고, 약제는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1첩의 내용과 분량은 Table I와 같다.

검액의 조제 - 보양환오탕 4첩 분량인 360 g을 증류수 2,000 ml와 함께 3,000 ml 환저 플라스크에서 2시간 동안 가열 추출하고 여과지로 여과한 다음 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 얻은 상청액을 감압 농축하고 동결건조기로 건조하여 64.7 g수득율, 18%의 시료를 얻었으며, 시료는 증류수에 100 mg/ml의 농도로 용해시켜 사용하였다.

비장세포의 준비 - 생쥐로부터 비장을 얻은 다음 단일 세포 부유액으로 유리시키고, 멸균 증류수에 9초 동안 노출시키는 저장액 충격 방법으로 적혈구를 파괴시킨 후 인산염 완충액(PBS)으로 세척하였다. trypan blue를 이용하여 생존 세포의 수를 측정하고 세포 배양액으로는 IMDM 기본 배양액에 5×10^5 M의 2-ME와 10%의 FBS를 넣은 완전 배양액을 사용하였다.

작동 세포의 준비 - CTL의 유도를 위해서는 비장 세포를 사용하여 1×10^6 cells/ml의 세포농도에서 항 CD3 항체로 활성화시켜 사용하였고 여기에 적정농도의 BH를 첨가하였다. 항 CD3 항체와 BH가 첨가된 작동세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일 동안 배양하였다.

NK 세포의 활성화를 위해서는 비장세포를 플라스틱 배양접시에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 방치한 후에 부작세포를 제거한 다음 부착되지 않은 세포를 수거하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 nylon column에 1시간 동안 추가로 부착시켰다. 비부착성 세포를 수거하여 IL-2 및 약제가 첨가된 세포배양액에 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4일 동안 배양하였다. IL-2는 0.5-20 ng/ml 농도로 사용하였고 BH는 10~1000 µg/ml을 첨가하였다.

세포독성 측정 - 세포독성은 4시간 ⁵¹Cr 방출법을 사용하였다. 표적세포는 Yac-1 세포를 사용하였고 표적세포는(2×10⁶ cells) 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1.5시간동안 ⁵¹Cr 100 µci를 처리하였다. 5% FBS/RPMI로 네 번 세척하고 10% FBS/TMDM에 부유시킨 다음 작동세포 대 표적세포의 비율을 40:1, 10:1로 96 well U-bottom plate에 가하였다. 이를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 상층액을 100 µl를 취하여 감마방사능 측정기로 유리방사능을 분석하였다. 자연유리량(spontaneous release; SR)은 작동세포 부유액 대신 동량의 배양액을 가하여 측정하였고 최대유리량(maximum release; MR)은 1% Triton X-100 용액을 가하여 측정하였다. 세포독성의 값은 다음 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{cytotoxicity}(\%) = \frac{[(\text{experimental} - \text{spontaneous}) / (\text{maximum} - \text{spontaneous})] \times 100}$$

효소결합면역흡착검사법(ELISA assay) - 항 생쥐 IL-2 흡착 항체를 coating buffer를 사용하여 4°C에서 하룻밤 ELISA plate의 well 표면에 흡착시키고 blocking buffer를 첨가한 다음 실온에서 2시간 배양 후 세척액으로 4회 반복하여 세척하였다. 각 well에 시료를 첨가한 다음 실온에서 1.5시간 동안 배양한 후 다시 4회 반복하여 세척하였다. 검출 항체를 첨가하여 1시간 동안 배양하고 세척한 다음 streptavidin-HRP를 첨가하여 45분 동안 배양하였다. 다시 4회 세척한 후 기질 용액인 3,3',5,5-tetramethylbenzidine(TMB)을 첨가한 후 30분 동안 반응시키고 stop solution으로 반응을 정지 시켰다. 각 well의 흡광도는 microplate-reader로 450 nm에서 측정하였다.

통계처리 - 실험결과는 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 paired *t*-test를 실시하여 P<0.05를 기준으로 하여 유의성 존재 여부를 판정하였다.

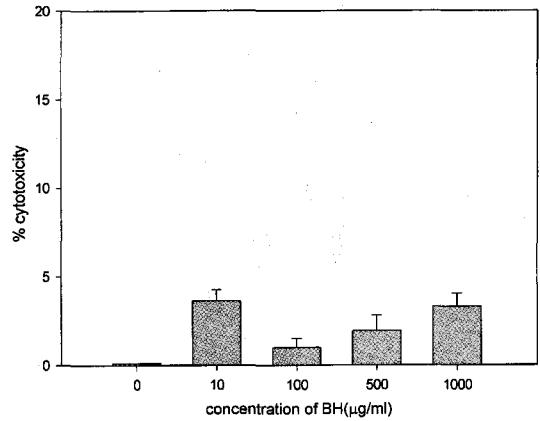


Fig. 1. Cytotoxicity of Bo-yang-hwan-oh-tang against Yac-1. Cytotoxic activity was assessed in a ⁵¹Cr-release assay. Labeled target cells were exposed to BH for 4 hrs. The results are the mean±S.E. of triplicate determinations.

결과 및 고찰

1. 보양환오탕의 암세포 세포독성

보양환오탕(BH)의 암세포에 대한 직접적인 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위해서 Yac-1 세포주를 이용하여 ⁵¹Cr release를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 10, 100, 500, 1000 µg/ml의 농도로 BH에 노출시켰을 때 세포독성은 5% 미만으로 암세포에 대한 BH의 직접적인 세포독성은 관찰되지 않았다. 즉, BH는 암세포에 직접적인 세포독성을 통해서는 어떤 항암작용도 나타낼 수 없음을 알 수 있었다.

2. 보양환오탕의 T림프구의 세포독성의 유도

BH가 직접적으로는 암세포를 파괴할 수 없으나, 면역세포를 통하여 항종양 작용을 나타낼 수 있을 것으로 생각되어, 먼저 림프구의 비특이적 세포독성을 유도하는지를 알아보았다. 정상 생쥐 비장에서 분리한 세포(1×10⁶ cells/ml)를 완전배양액에 부유시킨 후 10, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 BH를 가하여 3일 동안 배양하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 BH에 노출시킨 림프구도 대조군의 세포들과 마찬가지로 암세포를 파괴하지 못하였다. 위의 결과들을 종합해 보면 BH는 직접적으로 암세포에 대한 독성을 나타내지도 못할 뿐만 아니라, 종양면역반응에 중요한 림프구의 세포독성을 유도하는 작용도 나타내지 못함을 알 수 있다.

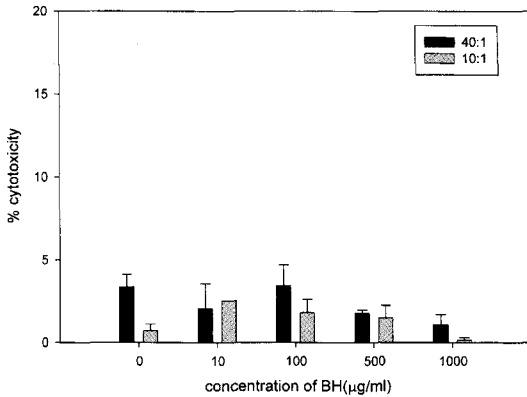


Fig. 2. Effect of Bo-yang-hwan-oh-tang on naive T cell cytotoxicity. Non-adherent spleen cells were incubated for 3 days in the absence or presence of BH and assessed for their cytotoxicity against Yac-1 target cells at E/T ratios of 40:1, 10:1 in a 4 hr ⁵¹Cr-release assay. The results are the mean ± S.E. of triplicate determinations.

3. 보양환오탕이 항 CD3 항체 자극된 세포의 비 특이적 세포독성에 미치는 영향

BH가 직접적으로 림프구의 세포독성을 유도하지는 못하지만 항종양 면역반응의 과정에서 그 활성을 증진시킬 수도 있다는 가설하에 이를 확인하였다. 항 CD3 항체에 의해 활성화된 림프구는 암세포에 대한 비특이적 세포독성을 나타내며, CD3는 T림프구의 표면에만 존재하므로 이는 비특이적 세포독성 T림프구 (CTL)의 작용이라고 할 수 있다.³²⁻³⁵ 적정농도의 항 CD3 항체의 사용은 약제의 효과가 나타나지 않을 수 있기 때문에, 본 연구에서는 저 농도의 항 CD3 항체로 유도한 T세포를 작동세포로 사용하였다. 비장에서 분리한 세포(1×10⁶ cells/ml)를 저 농도의 항 CD3 항체와 BH를 4, 20, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 가하여 3일 동안 배양시킨 후 trypan blue를 사용하여 살아있는 세포수를 측정하고 다음 4시간 ⁵¹Cr 방출법으로 세포독성 검사를 실시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 BH를 농도별로 처리하였을 때 농도에 의존하여 뚜렷하게 T세포의 비 특이적 세포독성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고 500 µg/ml 농도에서 세포독성 증가가 가장 높았다(P<0.05). 또한 여러 가지 농도의 항 CD3 항체로 실험한 결과 오히려 저농도의 항체 사용에서 BH의 효과가 뚜렷함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 BH가 암세포에 대한 세포독성이나 직접적으로 T세포의 세포독성을 유도시키는 작용을 못하지만 저농도의 항 CD3 항체로 활성화된

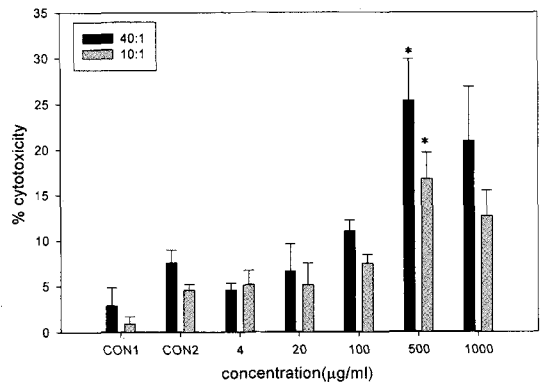


Fig. 3. Effect of Bo-yang-hwan-oh-tang on non-specific CTL activity. Non-adherent spleen cells (1×10⁶ cells/ml) were activated with soluble anti-CD3 (1/800 dilution of 2C11 ascite) in the absence or presence of BH for 3 days. CON1, medium alone; CON2, anti-CD3 alone. *P<0.05 (vs CON2).

CTL의 암세포에 대한 세포독성을 현저히 증가시킴을 보여준다.

4. 보양환오탕이 IL-2로 자극된 세포의 비 특이적 세포독성에 미치는 영향

항종양 면역반응에서는 T세포뿐만 아니라 NK 세포 또한 비특이적인 세포독성을 나타낸다.²⁸⁾ 따라서 BH가 NK 세포에도 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 1차적으로 부착 세포를 제거한 다음 nylon wool column을 사용하여 다시 부착세포를 제거한 세포를 사용하였다. 분리한 세포에 Fig. 2에서 저 농도의 항 CD3 항체를 사용한 것과 같이 저 농도의 IL-2를 사용하여 NK 세포를 활성화시켰고 여기에 BH를 4, 20, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 가하여 4일 동안 배양하였다. 이 실험에서는 순수 분리한 NK 세포를 사용하지는 않았으나, 휴지상태에서 T세포는 IL-2에 반응하지 않으나, NK 세포는 IL-2에 대해 반응함이 이미 알려져 있으므로,²⁷⁻²⁹⁾ IL-2만으로 자극시킨 세포에서 나타나는 세포독성은 NK 세포의 세포독성으로 간주할 수 있을 것으로 생각된다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 활성화 NK 세포의 세포독성은 BH에 의해서 증가되지 않았을 뿐만 아니라 또한 고농도(500, 1000 µg/ml)의 BH를 처리하였을 때에는 오히려 대조군보다 세포독성이 저하되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 BH가 항종양 면역반응에 중요한 역할을 하는 T 세포의 세포독성에는 영향을 미치지 않지만 NK 세포에는

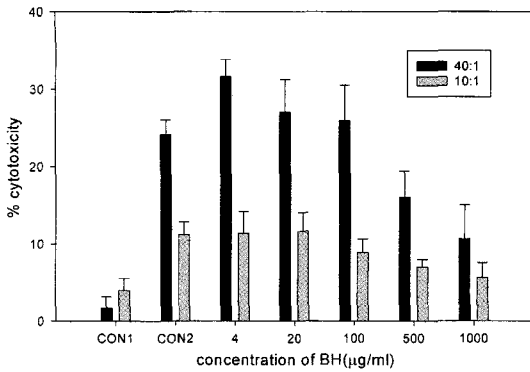


Fig. 4. Effect of Bo-yang-hwan-oh-tang on activated NK cell activity. Non-adherent spleen cells were incubated with IL-2 (0.5 ng/ml) and BH for 4 days and assessed for their cytotoxic activity against Yac-1 target cells at E/T ratios of 40:1, 10:1 in a ⁵¹Cr-release assay. The results are the mean ± S.E. of three separate experiments. CON1, medium alone; CON2, IL-2 alone.

영향을 미치지 못한다는 것을 보여주며, BH의 세포 독성 증가 작용이 T세포에 대하여 제한적임을 알 수 있었다.

5. 보양환오탕이 IL-2 생산에 미치는 영향

이상의 실험에서 BH는 CD3 자극에 의해 활성화한 림프구의 비특이적 세포독성을 증가시킨다는 것을 확인할 수가 있었다. 이에 BH의 CTL 세포독성의 증강 작용이 이에 관련되어 있는 사이토카인인 IL-2의 생산을 증가시킴으로써 나타나는 결과인 것으로 판단되어, IL-2의 생산을 조사하였다. 생쥐 비장세포를 Fig. 3에서의 방법과 같이 배양하였으며 1일, 2일, 및 3일째 배양상청액을 얻은 다음 효소면역흡착법으로 IL-2의 양을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조군 및 BH(500 µg/ml)만을 첨가한 경우에는 3일 동안 IL-2의 생산은 검출되지 않았다. 항 CD3 항체만을 가한 경우, 1일, 2일째에 각각 378, 97 pg/ml의 IL-2가 검출되었고, 3일째에는 평균 22 pg/ml의 IL-2가 검출되었으나, 3회 실험중 1회만 검출되었을 뿐 2회는 검출되지 않았다. 반면에, 항 CD3 항체와 함께 BH를 가한 경우에는 1일, 2일 및 3일째에 각각 438, 355 및 63 pg/ml의 IL-2가 검출되어, 2일째에는 BH에 의해 IL-2생산이 유의하게 증가되었다(P<0.05). 3일째의 생산도 BH 첨가 후 현저히 높았으나 시료간의 오차 때문에 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과로 보아 항 CD3 항체 자극시 생쥐 비장세포가

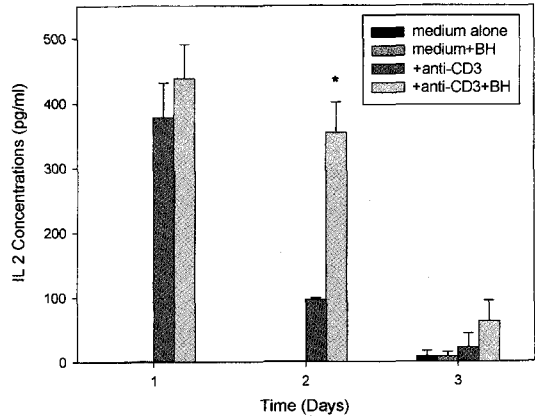


Fig. 5. Effect of Bo-yang-hwan-oh-tang on IL-2 production by spleen cells. Non-adherent spleen cells were activated with soluble anti-CD3 for 3 days and BH was added at the final concentration of 500 µg/ml. IL 2 level in the harvested supernatant was determined by ELISA. The results are the mean ± S.E. of three separate experiments. *P<0.05(vs anti-CD3).

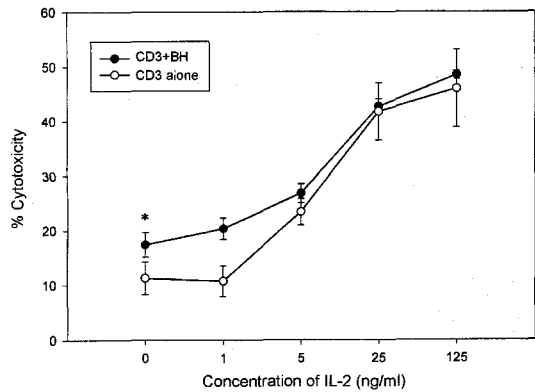


Fig. 6. Effect of addition of exogenous IL 2 on Bo-yang-hwan-oh-tang-mediated augmentation of CTL activity. IL 2 was added at 1, 5, 27, 134 ng/ml in the absence and presence of BH (500 µg/ml) while non-adherent spleen cells were activated with anti-CD3 for 3 days. E/T ratio is 40:1. The results are the means ± S.E. of three separate experiments. * P<0.05 (vs anti-CD3 alone)

1일 후 많은 양의 IL-2를 생산하고 2일 이후부터 급격히 감소함을 알 수 있으며, BH에 의해 많은 양의 IL-2 생산이 배양 2일 후까지도 계속되고, 어느 정도로는 3일 후까지도 지속됨을 확인할 수 있었다.

6. 보양환오탕에 의한 IL-2 생산 증가가 비특이적 CTL 세포독성에 미치는 영향

상기 실험에서 BH가 CD3 자극배양시 T림프구의

IL-2 생산을 증가시켜 준다는 사실을 확인하였으므로 이러한 작용이 비특이적 CTL 세포독성의 증강의 결과를 초래하는지를 확인하기 위하여 IL-2를 첨가하면서 비특이적 CTL을 유도하여 세포독성을 비교하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 IL-2를 가하지 않은 조건에서는 BH 첨가군이 대조군 보다 유의하게 높은 세포독성을 나타내며, 5 ng/ml IL-2를 외부에서 가해 준 경우, 대조군의 세포독성과 BH(500 µg/ml)를 가진 세포의 세포독성이 거의 유사한 정도로 나타났다. 즉, IL-2가 높은 농도로 존재하는 경우 BH의 세포독성 증강작용이 거의 나타나지 않는다는 것은 BH에 의한 세포독성의 증가가 IL-2에 의하여 매개됨을 보여주는 결과라고 할 수 있다.

이상의 결과는 BH가 비특이적 자극제에 의한 암의 면역치료에 복합치료제로 사용될 수 있음을 시사한다.

결 론

항암제로서의 응용가능성을 확인하기 위해 한방에서 활혈어지제로 사용하는 보양환오탕에 대하여 항종양 면역작용을 조사하였다. 보양환오탕은 암세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았으며, 생쥐 림프구의 세포독성도 유도하지 못하였다. 그러나 보양환오탕은 저 농도의 항 CD3 항체로 활성화시킨 T세포의 비특이적 세포독성을 농도에 의존적으로 증가시켰으며 500 µg/ml 농도에서 가장 현저한 증가를 보였다. 그러나 IL-2에 의해 활성화한 NK 세포에 대해서는 유사한 효과를 나타내지 못하였다. BH 매개 세포독성 증가의 기전을 확인하고자 IL-2 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, *in vitro*에서 CD3 자극에 의한 T 림프구의 IL-2 생산을 증가시키거나 장시간 지속시켰다. 또한 IL-2의 첨가를 통해 대조군과 BH 처리군의 세포독성이 유사하게 나타남으로써 BH가 IL-2 생산의 증가를 통하여 T림프구의 비특이적 세포독성을 높이는 것으로 판단되며, 이 처방이 비특이적 자극제와 복합적으로 암의 면역치료에 사용될 수 있음을 시사하였다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(HMP-99-O-01-0003)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 왕칭임(1994) 醫林改錯, pp. 84-86. 醫聖堂, 서울.
- 宗全和 編(1995) 中醫方劑通釋(卷四), pp. 76-82. 河北科學技術出版社, 河北.
- 上海中醫學院編(1983) 方劑學, pp. 178-179. 商務印書館, 香港.
- 鄭津牟(1986) 中醫處方解說·臨床·應用, pp. 170-171. 癸丑文化社, 서울.
- 高慶通(1985) 補氣活血法爲主治療腦血栓形成36例小結, 新中醫, 17(6): 28-29.
- 陳偉, 路一平(1993) 方劑學, pp. 336-337. 醫聖堂, 서울.
- 東醫科學院(1993) 東醫處方大全4, p. 2270. 驪江出版社, 서울.
- 許芝泉(1982) 補陽還五湯治療中風的教訓, 上海中醫藥雜誌, 6: 31.
- 毛書琴, 白洁, 張孝儒(1997) 補陽還五湯治療椎基底動脈短暫缺血性眩暈30例, 中國中西醫結合雜誌, 17(9): 559-560.
- 鐘家宝(1997) 補陽還五湯加減治療糖尿病併發血管病驗案兩則, 上海中醫藥雜誌, 4: 20.
- 劉亦選(1986) 活血化瘀辨治常見心臟病, 新中醫, 18(8): 53-54.
- 呂長青(1991) 補陽還五湯新用, 23(6): 42-44. 新中醫.
- 叶長青, 蔡傳洋(1996) 補陽還五湯加減治療血栓性深靜脈炎63例, 浙江中醫雜誌, 31(8): 366.
- 文炳淳(1984) 補陽還五湯煎湯液이 家兔의 血壓下降에 미치는 影響, 圓光大學校大學院.
- 卓宜洙(1990) 補陽還五湯이 實驗的 血栓에 미치는 影響, 東國大學校 大學院.
- 金聖勳(1993) 補陽還五湯과 加味補陽還五湯이 Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響, 大田大學校 大學院.
- 崔恩禎(1999) Mongolian Gerbil의 Reversible fore-brain ischemia 모델에 미치는 補陽還五湯의 효과, 東國大學校 大學院.
- 金楠容(1999) 補陽還五湯이 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院.
- 鄭用堉(1999) 補陽還五湯이 LPS와 PMA에 의해 損傷된 神經膠細胞에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院.
- 문 구, 김병주, 전병훈, 원진희, 문석재(1997) 扶正抗癌湯의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究 대한동의병리학회지 11(2): 16-25.
- 노훈정(1995) 消積補中丸의 抗腫瘍效果에 관한 實驗的 研究. 원광대학교 대학원.
- 김태영, 김대근, 전병훈, 정우열, 우원홍(2001) 활혈 화어약물의 항암활성에 대한 연구, 동의생리병리학회지 15(2): 356-360.
- Krummel, M. F., Heath, W. R. and Allison, J. (1999)

- Differential coupling of second signals for cytotoxicity and proliferation in CD8+ T cell effectors: Amplification of the lytic potential by B7. *J. Immunol.* 163: 2999-3006.
24. Renard, V., Cambiaggi, A., Vely, F., Blery, M., Olcese, L., Oliero, S., Bouchet, M. and Vivier, E. (1997) Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunological Reviews.* 155: 205-221.
 25. Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R., Mason, A. T. and Mason, L. H. (1998) The Ly-49 family: Regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3⁺ cells. *J. Immunol.* 160: 1158-1165.
 26. Sayers, T. K., Brooks, A. D., Seki, N., Smyth, M. J., Yagita, H., Blazar, B. R. and Malyguine, A. M. (2000) T cell lysis of murine renal cancer : multiple signaling pathways for cell death via Fas. *J. Leukoc. Biol.* 68: 81-86.
 27. Kubota, A., Lian, R. H., Lohwasser, S., Salcedo, M. and Takei, M. (1999) IFN- γ production and cytotoxicity of IL-2-activated murine NK cells are differentially regulated by MHC class I molecules. *J. Immunol.* 163: 6488-6493.
 28. Lauwerys, B. R., Garot, N., Jean-Christophe, R. and Houssiau, F. A. (2000) Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J. Immunol.* 165: 1847-1853.
 29. Yu, T.-K., Caudell, E. G., Smith, C. and Grimm, E. A. (2000) IL-2 Activation of NK Cells: Involvement of MKK1/2/ERK but Not p38 kinase pathway. *J. Immunol.* 164: 6244-6251.
 30. Lustgarten, J., Marks, J. and Sherman, L. A. (1999) Redirecting effector T cells through their IL-2 receptors. *J. Immunol.* 162: 359-365.
 31. Lord, R. D., Macintosh, B. C., Greenberg, P. D. and Nelson, B. H. (2000) The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the *c-myc*, *bcl-2* and *bcl-x* genes through the trans-activation domain of stat 5. *J. Immunol.* 164: 2533-2541.
 32. Makrigiannis, A. P., Musgrave, B. L. and Hoskin, D. W. (1999) Differential effects of B7-1 and B7-2 on the costimulation of mouse nonspecific cytotoxic T lymphocyte development in response to anti-CD3 antibody. *J. Leukoc. Biol.* 66: 792-802.
 33. Gullo, C. A., Esser, M. T., Fuller, C. L. and Braciale, V. L. (1999) Generation of IL-2-dependent cytolytic T lymphocytes(CTLs) with altered TCR responses derived from antigen-dependent CTL clones. *J. Immunol.* 162: 6466-6472.
 34. Oregan, A. W., Hayden, J. M. and Berman, J. S. (2000) Osteopontin augments CD3-mediated interferon- γ and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* 68: 495-502.
 35. Makrigiannis, A. P., Musgrave, B. L., Haeryfar, S. M. and Hoskin, D. W. (2001) Interleukin-12 can replace CD28-dependent T-cell costimulation during nonspecific cytotoxic T lymphocyte induction by anti-CD3 antibody. *J. Leukoc. Biol.* 69: 113-122.
 36. Esser, M., Dinglasan, R., Krishnamurthy, B., Gullo, C., Gragam, M. and Braciale, V. (1997) IL-2 induces Fas ligand/Fas(CD95L/CD95) cytotoxicity in CD8+ and CD4+ T lymphocyte clones. *J. immunol.* 158: 5612-5618.
 37. Villacres, M. C. and Bergmann, C. C. (1999) Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4-deficient mice. *J. Immunol.* 162: 2663-2670.
 38. Liu, Z.-X., Govindarajan, S., Okamoto, S., and Denner, G. (2000) NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J. Immunol.* 164: 6480-6486.

(2001년 6월 26일 접수)