

補中益氣湯加味가 새끼 생쥐의 免疫能에 미치는 影響

朴志修* · 金允姬** · 柳同烈***

*大田大學校 韓醫科 大學院 小兒科 專攻

**大田大學校 韓醫科大學 小兒科

***大田大學校 韓醫科大學

Effect of Bojung-Ikgi-Tang-Gami(BITG) on Immune Response in the Young Mice

Jee-Su Park · Yun-Hee Kim · Dong-Youl Yoo

**Dept. of Oriental Medicine Graduate School, DaeJeon University

The purpose of this research was to investigate the effects of BITG on immune response in the young mice. BITG (500mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days to the young BALB/C (4 wks old) mice. The administration of BITG enhanced the cell viability of splenocytes, but did not affect that of thymocytes. In vitro system, BITG decreased the cell viability of thymocytes and splenocytes at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The administration of BITG did not affect DNA fragmentation of thymocytes, but decreased that of splenocytes. The administration of BITG increased the population of Thy1+ cell and CD4+CD8- cell in splenocytes. In addition, BITG decreased the production of NO and increased the lucigenin chemiluminescence from peritoneal macrophages.

These results suggest that BITG enhances the specific-immune and nonspecific-immune response via increase of cell viability in splenocytes and of phagocytic activity in peritoneal macrophages.

I. 緒論

小兒은 身體的으로는 臟腑肌肉이 形成되었다고는 하나, 아직 軟弱할 뿐 아니라 특히 精神 生理作用이 전혀 完備되지 못하여 疾病에 대한 抵抗力이 弱하고 寒溫을 스스로 調節할 수 없으며 飲食 節制를 잘 못하므로 밖으로는 六淫의 侵入을 당하고 안으로는 飲食 損傷을 받기 쉬워 脾肺疾患에 쉽게 罹患된다¹⁾.

이런 特徵은 예전에 비해 營養狀態와 發育狀態가 훨씬 좋아진 現代에 이르러서도 오히려 免疫疾患이 늘어나고, 易受感冒, 食欲不振 等의 原因未詳의 免疫低下를 나타내는 小兒가 늘어나는 것으로 보아 現在에도 重要視 되어야 할 小兒의 生理特徵이 아닐 수 없다.

그러므로 小兒의 疾患에 대한 治療 및 豫防에 있어서 脾肺機能을 補해주는 것은 免疫能을 높이는 데 중요한 의의가 있음을 알 수 있다.

補中益氣湯²⁾은 金元四大家 중의 한 사람인 補土派 李東垣의 代表的인 處方으로, 甘溫除熱하는 效能이 있어 體質이 氣虛하여 感冒를 자주 앓거나 또는 氣虛外感으로 發熱不退하고 身倦多汗한 症狀에 應用되고 있으며 脾虛氣弱과 飲食勞倦 및 內傷寒熱의 證을 治療한 약으로 여기에 五味子와 麥門冬을 加하면 '味麥益氣湯' 으로 補中益氣湯보다 心虛가 甚한 境遇나 여름철의 咳嗽나 長期 感氣 또는 注夏症에 쓰이는 處方으로써 免疫力を 增強시키는 效能이 原方보다 더욱 뛰어나다고³⁾ 사려된 바 본 실험에 응용하게 되었다.

最近 補中益氣湯에 대한 實驗的 研究로는 朴⁴⁾이 cyclosporin A 로 免疫抑制된 흰쥐의 肝 및 腎 損傷에 미치는 影響을, 閔⁵⁾이 紫外線 照射로 抑制된 細胞性 및 體液性 免疫機能의 恢復에 미치

는 影響을, 金⁶⁾ 등이 補中益氣湯이 Lymphocyte 와 CD4 + T Cell에 미치는 影響을 研究한 바 있으며, 小兒의 免疫에 관한 研究를 살펴보면, 丁⁷⁾의 補兒湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 金⁸⁾의 鹿補散의 呼吸器疾患 豫防效果에 관한 研究, 宋 等⁹⁾의 地榆湯加枳實이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響 等を 통해 免疫增強效果에 대해 報告한 적이 있다.

이에 본 實驗에서는 補中益氣湯加味가 어린 생쥐의 免疫能에 미치는 影響을 알아보기 위해 特異 免疫에 重要的 役割을 하고 있는 thymocytes와 splenocytes의 增殖能, apoptosis, subpopulation과 非 特異免疫에 重要的 役割을 하고 있는 macrophage 의 phagocytic activity를 測定한 結果 若干의 知見을 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

II. 實驗

1. 材料 및 動物

1) 藥材

本 實驗에 使用한 補中益氣湯의 處方은 東醫寶鑑¹⁰⁾에 遵하였으며, 藥材는 大田大學校 韓方病院에서 求入하여 使用하였다. 한 貼의 內容과 用量은 다음과 같다.(Table 1)

2) 動物

本 實驗에 使用한 어린 생쥐는 3 週令 BALB/C 수컷을 大韓實驗動物에서 購入하여, 溫度 20±2 oC, 濕度 50±5%, dark/light 12時間의 條件下에서 1 週日 以上 實驗室에 適應시킨 후 4週정도 되었을 때 實驗에 使用하였으며, 固形飼料과 물을 자유롭게 攝取하도록 하였다.

Table 1. The Composition of Bojung-Ikgi-Tang-Gami(BITG) Extracts

韓藥名	生藥名	重量(g)
麥門冬	Liriopsis Tuber	8
黃芪	Astragalus Radix	6
人蔘	Ginseng Radix Alba	4
白朮	Atractylodes Rhizoma Alba	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
五味子	Schizandrae Fructus	4
當歸(身)	Angelicae gigantis Radix	2
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	2
柴胡	Bupleuri Radix	1
升麻	Cimicifugae Rhizoma	1
Total		36

3) 試藥 및 器具

3-1) 試藥

試藥은 Dulbecco's modified eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS), Interferon- γ (IFN- γ), lucigenin, MTT, propidium iodide, zymosan, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine \cdot 2HCl은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co., FITC-conjugated E. coli particle은 Molecular Probes Co. Griess 試藥, thi-glycollate, Concanavalin A(Con A), PI buffer, propidium iodine, trypan blue 등을 使用하였으며, 기타 試藥은 cell culture用 및 1級 試藥을 使用하였다.

3-2) 器具

culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO2 incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) rotary vacuum evaporator (Buchi 461, Switzerland), freeze dryer (FDU-540, Eylea, USA) 등을 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

BITG 3貼을 蒸溜水 1,000 ml로 3時間 동안 2回 加熱 抽出한 後, 濾過하여 餘液을 rotary vacuum evaporator로 濃縮한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末 34.2 g을 얻었으며 動物實驗 때에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였다.

2) Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 分離

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 分離는 Wysocki¹¹⁾ 및 Mizel¹²⁾ 등의 方法을 利用하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 BITG 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與한 다음 8일째 생쥐를 頸椎脫骨하여 屠殺하였다. 摘出した 胸線 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 滅菌된 stainless mesh로 濾過하여 細胞浮游液을 얻은 후, DPBS-A로 2回 洗滌한 다음 1,500 rpm에서 10分間 遠心分離하여, thymocytes 및 splenocytes 浮游液으로 하였다.

Macrophage의 分離는 BITG 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與 하였다. 藥物 投與 4일째 mouse 腹腔에 3% thioglycollate 2 ml를 注入하고, 8일째 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 다음, 腹腔에 cold

PBS 10 ml를 넣어 腹腔細胞를 收集하였다. 收集한 細胞를 4 oC에서 1,300 rpm으로 10分間 遠心分離하고 RPMI 培地로 2회 洗滌後, 直徑 120 mm petri dish에 分株하여 CO2 incubator에서 培養시키고 2 時間 後에 附着되지 않은 細胞를 除去한 다음, 附着한 macrophage를 cell scraper로 分離하여 使用하였다.

생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 使用하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 添加하여 使用하였다.

3) Thymocytes 및 splenocytes의 增殖能 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 BITG의 影響은 MTT法으로 測定하였다. 本 實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann¹³⁾이 開發하여 Kotnik 等¹⁴⁾이 變形시킨 方法으로, 96-well plate의 各 well에 分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 RPMI 1640 배지로 稀釋하고 96-well plate에 1 x 10⁷ cells/ml 濃度로 분주하여 thymocytes는 Con A 5 µg/ml를, splenocytes는 LPS 10 µg/ml를 添加한 후, 37 °C의 CO2 incubator에서 48시간 培養한 다음 培養 終了 4時間 前에 MTT 試藥을 加하였다. 培養 終了時 0.1N-HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 µl를 各 well에 添加하고 遮光狀態에서 18 時間 더 培養한 後 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader로 570 nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다. In vitro 實驗에서는 分離한 thymocytes 및 splenocytes 1 x 10⁷ cells/ml에 BITG 1, 10 및 100 µg/ml를 各 加하고 48 시간 배양한 후 同一한 方法으로 細胞生存率을 測定하였다.

4) Thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes에 PI buffer (0.1% Na-citrate + 0.2% Triton X-100)에 溶解시킨 propidium iodide (10 µg/ml) 20 µl를 넣어 氷冷하에서 30 分間 染色한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 測定하였다¹⁵⁾.

5) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 染色하여 4 oC에서 30 分間 反應시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 測定하였다¹⁶⁾.

6) 腹腔 macrophage로부터 Nitric Oxide(NO) 生成量 測定

分離한 macrophage를 24 well plate에 well당 2 x 10⁶ cells을 분주한 후 macrophage로부터 生成되는 NO의 양을 Griess法¹⁷⁾으로 測定하였다. 各 well에 LPS 1 µg/ml와 IFN-γ 25 units/ml를 添加하여 24 時間 培養한 후, 培養液 100 µl와 Griess 試藥 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthyl-enediamine 2HCl + 2.5 % H3PO4) 100 µl를 混合하여 96 well module에 넣고, 37 oC에서 10分間 放置한 後 570 nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成한 NaNO2의 檢량선에 의해 NO2-의 濃度를 換算하였다.

7) 腹腔 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophage를 2 x 10⁶ cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 浮游시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 製造는 10 ml의 DPBS-A에 溶解한 후, 濾過 滅菌하여 -20 °C에서 保管하면서 使用하였다(stock solution). Lucigenin stock solution 은 使用하기 직전에 DME 배지에 1/10로 稀釋하여 使用하였다. Chemiluminescence 測定은 luminometer를 利用하여 37 °C에서 測定하였다^{18,19}. 測定용 microplate(white)의 각 well에 準備된 macrophage 浮游液 50 μl와 lucigenin 溶液 50 μl 및 zymosan 溶液 30 μl를 添加하여 最終 volume이 200 μl가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence(CL) 양을 測定하였다.

In vitro 實驗에서는 分離한 macrophages에 BITG 1, 10 및 100 μg/ml를 각각 加하고 同一한 方法으로 lucigenin CL 양을 測定하였다.

8) 腹腔 macrophage의 貪食作用에 의한 engulfment 測定

FITC-conjugated E. coli particle을 HBSS에 1 mg/ml 濃度로 懸濁시켜 sonification한 후 使用하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250 μg/ml 濃度로 溶解하여 使用하였다. 分離한 macrophage를 RPMI 1640 배지로 1 x 10⁵ cells/ml 되도록 調整한 후, 100 μl를 96 well에 분주하고 E. coli 懸濁液 25 μl를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 培養液을 除去하고 extracellular fluorescence를 抑制하기 위해 trypan blue 100 μl를 添加하여 inverted fluoromicroscope로 觀察하였다²⁰.

9) 統計處理

모든 實驗 結果들은 mean±SE로 나타내었고 統計處理는 student's t-test를 實施하여 p<0.05를 基準으로 有意性 與否를 判定하였다.

III. 實驗成績

1. Thymocytes의 增殖에 미치는 効果

1) In vivo 實驗

對照群의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 細胞生存率은 148.0±2.3%로 增加하였으며, BITG를 投與하고 分離한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率은 97.7±1.9%, Con A를 처리하였을 때의 細胞生存率은 142.5±2.4%로 對照群과 別 差異가 없었다 (Table 2).

Table 2. Effect of the administration of BITG on the cell viability of mitogen treated-thymocytes in BALB/c mice

Samples	Cell viability (%)	
	Con A- nontreated group	Con A- treated group
Control	100.0±1.8	148.0±2.3
BITG	97.7±1.9	142.5±2.4

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1 x 10⁷ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with Con A, an activating mitogen. The data represents the mean±SE of 5 mice.

2) In vitro 實驗

對照群의 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, BITG 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 102.5 \pm 1.4%, 97.7 \pm 1.3% 및 82.6 \pm 1.0%로 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었으며, Con A를 처리하였을 때 對照群의 細胞生存率은 132.2 \pm 2.2%로 增加하였으며, BITG 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 137.3 \pm 2.8%, 128.6 \pm 2.2% 및 109.1 \pm 2.3%로 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度 以下에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었다 (Table 3).

Table 3. Effect of BITG on the cell viability of mitogen treated-thymocytes in vitro

Samples	Dose (mg/kg, per orally)	Cell viability (%)	
		Con-A- nontreated group	Con-A- treated group
Control	-	100.0 \pm 2.1	132.2 \pm 2.2
BITG	1	102.5 \pm 1.4	137.3 \pm 2.8
BITG	10	97.7 \pm 1.3	128.6 \pm 2.2
BITG	100	82.6 \pm 1.0**	109.1 \pm 2.3**

The separated thymocytes (1 x 10⁷ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with BITG (1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$). The data represents the mean \pm SE of 4 experiments.

*: Significantly different from control group (p<0.001).

2. Splenocytes의 增殖에 미치는 效果

1) In vivo 實驗

對照群의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때의 細胞生存率

은 147.2 \pm 1.8%로 增加하였으며, BITG를 投與하고 分離한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率은 109.1 \pm 1.5%, LPS를 처리하였을 때의 細胞生存率은 158.3 \pm 2.1%로 對照群에 비해 增加하였다 (Table 4).

Table 4. Effect of the administration of BITG on the cell viability of mitogen treated-splenocytes in mice

Samples	Cell Viability (%)	
	LPS- nontreated group	LPS- treated group
Control	100.0 \pm 2.1	147.2 \pm 1.8
BITG	109.1 \pm 1.5*	158.3 \pm 2.1*

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1 x 10⁷ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI 1640 media mixed with LPS, an activating mitogen. The data represents the mean \pm SE of 5 mice.

*: Significantly different from control group (p<0.01).

2) In vitro 實驗

對照群의 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, BITG 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 98.2 \pm 2.4%, 91.7 \pm 1.1% 및 74.4 \pm 2.5%로 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었으며, LPS를 처리하였을 때 對照群의 細胞生存率은 140.3 \pm 2.3%로 增加하였으며, BITG 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하였을 때의 細胞生存率은 138.2 \pm 1.8%, 128.9 \pm 2.4% 및 116.7 \pm 2.8%로 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었다 (Table 5).

Table 5. Effect of BITG on the cell viability of mitogen treated-splenocytes in vitro

Samples	Dose (mg/kg, per orally)	Cell viability (%)	
		LPS-nontreated group	LPS-treated group
Control	-	100.0±1.5	140.3±2.3
BITG	1	98.2±2.4	138.2±1.8
BITG	10	91.7±1.1*	128.9±2.4*
BITG	100	74.4±2.5**	116.7±2.8**

The separated splenocytes (1 x 10⁷ cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with BITG (1, 10 and 100 µg/ml). The data represents the mean±SE of 4 experiments.

: Significantly different from control group (: p<0.01, **: p<0.001).

3. Thymocytes의 DNA fragmentation 에 미치는 効果

對照群의 thymocytes 중 DNA fragmentation은 19.3±1.5% 이었으며, BITG를 投與하고 分離한 thymocytes 중 DNA fragmentation은 17.8±2.1%로 對照群과 別 差異가 없었다 (Table 6).

Table 6. Effect of the administration of BITG on DNA fragmentation of murine thymocytes

Samples	DNA fragmentation (%)
Control	19.3±1.5
BITG	17.8±2.1

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice.

4. Splenocytes의 DNA fragmentation 에 미치는 効果

對照群의 splenocytes 중 DNA fragmentation은 22.2±2.4% 이었으며, BITG를 投與하고 分離한 splenocytes 중 DNA fragmentation은 13.4±2.2%로 對照群에 비해 減少하였다 (Table 7).

Table 7. Effect of the administration of BITG on DNA fragmentation of murine splenocytes

Samples	DNA fragmentation (%)
Control	22.2±2.4
BITG	13.4±2.2*

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice.

*: Significantly different from control group (p<0.05).

5. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 効果

對照群의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4+) 細胞는 12.1±0.4% 이었으며, CD8 single positive(CD8+) 세포는 3.2±0.2%이었다. BITG를 投與하고 分離한 생쥐 thymocytes의 CD4+ 細胞는 11.8±0.3%로, CD8+ 세포는 2.9±0.2%로 對照群과 別 差異가 없었다 (Table 8).

Table 8. Effect of the administration of BITG on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Thymocytes subpopulation (%)	
	CD4+CD8- cell	CD4-CD8+ cell
Control	12.1±0.4	3.2±0.2
BITG	11.8±0.3	2.9±0.2

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 oC. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice.

Table 9. Effect of the administration of BITG on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Splenocytes subpopulation (%)			
	B220+	Thy1+	CD4+CD8-	CD4-CD8+
Control	31.2±2.8	20.2±1.5	13.7±1.2	4.5±1.2
BITG	32.4±2.2	25.5±1.3*	17.4±1.4*	4.8±1.3

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 oC. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice.

*: Significantly different from control group (p<0.05).

6. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

對照群의 splenocytes 중 B220 positive(B220+) 세포는 31.2±2.8% 이었으며, Thy1 positive(Thy1+) 세포는 20.2±1.5% 이었다.

BITG를 投與하고 分離한 생쥐 splenocytes 중 B220+ 세포는 32.4±2.2%로 Thy1+ 세포는 25.5±1.3%로 對照群에 비해 Thy1+ 세포의 population이 增加하였다. Splenic T-lymphocytes 중 對照群의 CD4+ 세포는 13.7±1.2%, CD8+ 세포는 4.5±1.2% 이었으나, BITG를 投與하고 分離한 생쥐 splenic T-lymphocytes 중 CD4+ 세포는 17.4±1.4%, CD8+ 세포는 4.8±1.3%로 CD4+ 세포의 population이 對照群에 비해 增加되었다 (Table 9).

Table 10. Effect of the administration of BITG on the production of NO from murine peritoneal macrophages

Samples	NO Production (µM)	
	IFN-γ + LPS (-)	IFN-γ + LPS (+)
Control	1.5±0.2	14.8±1.3
BITG	1.0±0.3	9.3±1.8*

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days, and peritoneal macrophages obtained after 2 hr in RPMI1640 medium with LPS and IFN-γ. The production of NO was determined with a Griess reagent. The data represents the mean±SE of 5 mice.

*: Significantly different from control group (p<0.05).

IFN-γ + LPS (-): interferon-γ and LPS non-treated group.

IFN-γ + LPS (+): interferon-γ and LPS treated group.

7. 腹腔 macrophage로 부터 NO의 生成에 미치는 효과

對照群의 macrophage에 LPS와 IFN-γ을 處理하지 않았을 때 NO 生成量은 24 時間 後에 1.5±0.2 µM 이었으며, LPS와 IFN-γ을 處理하였을 때 NO

生成量은 $14.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 로 增加하였다. BITG를 投與하고 分離한 macrophage에 LPS와 IFN- γ 을 處理하지 않았을 때 NO 生成量은 $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로, LPS와 IFN- γ 을 處理하였을 때 $9.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$ 로 對照群에 비해 減少하였다(Table 10).

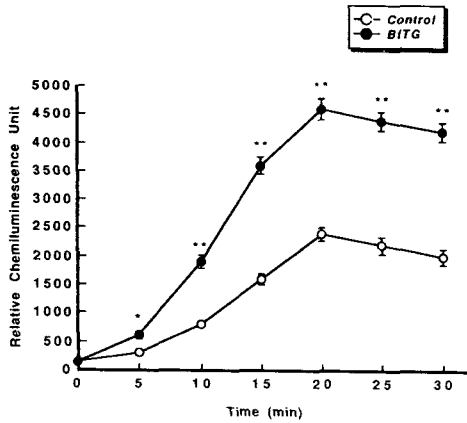


Fig 1. Effect of the administration of BITG on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages.

BITG (500 mg/kg) was administered per orally once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice.

; Significantly different from control group (; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

8. 腹腔 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 效果

對照群의 macrophages로부터 생성되는 CL의 양 보다 BITG를 投與하고 分離한 macrophages에서

생성되는 CL 양이 현저히 增加하였다 (Fig. 1). 또한 FITC-conjugated E. coli particle의 탐식도 增加됨을 관찰하였다 (Fig. 2).

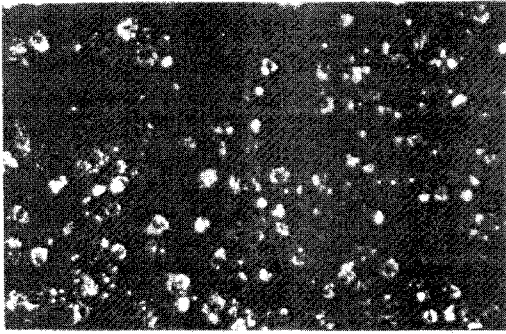
In vitro 實驗에서는 BITG 1, 10 및 100 μM 처리시 CL의 양이 濃度の존적으로 減少하였다 (Fig. 3).

IV. 考 察

補中益氣湯²¹⁻²³은 金元四大家 중의 한 사람인 補土派 李東垣의 代表的인 處方으로 東垣曰 內經에 損者益之 勞者溫之라 하여 본 處方을 立方하였으며 飮食勞倦과 脾虛氣弱 및 內傷寒熱의 證을 治療하였다.

本 方은 足太陰陽明藥으로서 肺는 氣의 根本이니 黃芪를 爲君하여 補肺固表하였고, 脾는 肺의 母로서 人蔘과 甘草로서 補脾益氣하고 和中瀉火하므로 爲臣하였으며, 白朮은 燥濕強脾하고, 當歸는 和血養陰하므로 佐藥으로 삼고, 升麻는 升陽明清氣하고, 柴胡는 升少陽清氣하므로 使藥으로 하였다. 陳皮를 加하여 浮游之痰을 治하고 氣를 通하게 하였다. 또한 生薑의 辛溫과 大棗의 甘溫으로 營衛를 調和하여 脾胃를 健運케 하므로 痰理를 開하여 津液을 諸虛不足한 症狀에 이르게 한다. 따라서 그 效能은 元氣를 補하고, 脾胃를 養하고, 下陷된 清氣를 升提하고, 內傷을 治하며, 人體의 免疫 機能을 增強시켜 疾病에 대한 抗病力을 強化시키는 것으로 볼 수 있다.^{2,22,24}

A



B

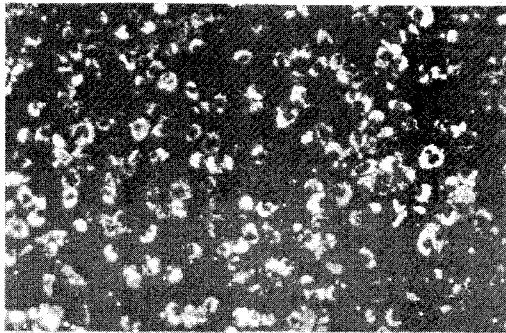


Fig 2. Photomicrographs of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from BITG-administered mice. Photographs (taken at 200 \times magnification) showing the uptake of FITC-conjugated *E. coli* particles in control (A) and BITG-administered mice (B). The macrophages were observed with an inverted fluoromicroscope.

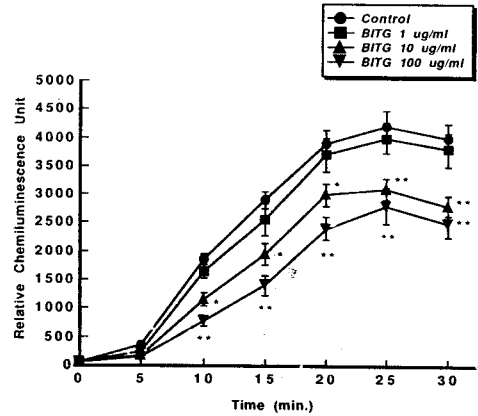


Fig 3. Effect of BITG on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages in vitro.

The cells (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with BITG (1, 10 and 100 μ g/ml). The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean \pm SE of 3 experiments.

; Significantly different from control group (; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$)

實驗에 사용된 五味子와 麥門冬을 加味한 補中益氣湯의 처방은 '味麥益氣湯'이라 하기도 하며, 補中益氣湯보다 心虛가 甚한 境遇나 여름철의 咳嗽나 長期 感氣, 또는 注夏症에 쓰이는 處方으로 免疫力을 增強시키는 效能이 原方보다 더욱 뛰어나다고 하는데 특히 麥門冬은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하여 天의 春生의 氣를 품고 地의 稼穡의 甘味를 得하여 人蔘과 配合하여 肺陰을 養하고 肺氣를 補하며 生脈하기도 한다 하였으며^{25,26)} 五味子は 斂肺滋腎, 生津收汗하여 肺虛喘咳를 收斂하여 止咳平喘하며 精氣가 耗損하거나 氣精이 모두 傷한 症狀에 쓰는데 地의 陰氣와 天의 陽氣를 兼

하고 生하였다^{25,26)}. 또한 揚²⁶⁾은 “五味子が 元氣를 收하고 降下의 不足을 治하는 것이 補中益氣湯이 昇出하지 못하는 것을 能히 治하는 것과 같이 正反對가 된다.”고 하였다.

그러므로 補中益氣湯加味는 生津止渴하며 陰陽을 平補하는 作用을 強化시킬 뿐더러 小兒의 發散上昇이 過度하게 미치는 憂慮를 적게 하고, 人蔘의 副作用을 적게하며 生津止渴의 作用을 더욱 強化시키는 重要な 役割을 한다고 사려된다.

最近 補中益氣湯에 대한 實驗的 研究로는 朴⁴⁾이 cyclosporin A 로 免疫抑制된 흰쥐의 肝 및 腎 損傷에 미치는 影響을, 閔⁵⁾이 紫外線 照射로 抑制된 細胞性 및 體液性 免疫機能의 恢復에 미치는 影響을, 李²⁷⁾가 cisplatin으로 誘發된 體重減少와 血液變化에 미치는 影響을, 金 等^{28,29,30)}이 S-180 腹水 癌細胞로 誘發시킨 생쥐의 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響을, 金⁶⁾ 등이 補中益氣湯이 Lymphocyte 와 CD4+ T Cell에 미치는 影響을 研究한 바 있으며, 免疫에 관한 研究로는 丁⁷⁾의 補兒湯이 免疫反應에 미치는 實驗的 研究, 金⁸⁾의 鹿補散의 呼吸器 疾患 豫防效果에 관한 研究, 裴³¹⁾의 小兒補血湯, 加味小兒補血湯 및 加減小兒補血湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 李³²⁾의 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 抗알레르기과 免疫反應에 미치는 影響, 朴³³⁾의 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, 宋 等⁹⁾의 地榆湯加枳實이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響 等을 통해 免疫增強效果에 대해 報告한 적이 있다.

韓醫學 文獻 중 最初로 免疫이란 單語가 提示된 것은 18세기 《免疫類方》에서 비로소 始作되었지만³⁴⁾. 古代 《內經》에서부터 邪氣에 對抗하는 人體의 本來要所에 대한 存在를 認識하였으며 그것을 正氣, 眞氣, 元氣 또는 原氣라 이름하였는

데, 그 概念에는 現代醫學에서 이야기하는 免疫의 概念이 포함되어 있음을 알 수 있다.

文獻的 資料를 考察하여보면 《素問·上古天真論》에 “眞氣從之 精神內守 病安從來”라하여³⁵⁾ 眞氣가 안을 지키면 病이 생기지 않음을 이야기 하였고, 《素問·刺法論》에 “余聞五疫之疾 皆相染易 無問大小 病狀相似 不施治療 如何可得 不相移易者. 岐伯曰 不相染者 正氣存內 邪不可干 避其毒氣”라하여³⁵⁾ 正氣가 안에 있으면 邪氣가 侵犯할 수 없으므로 毒氣를 避할 수 있다고 말하였다. 또 《素問·平熱病論》에서는 “邪氣所湊 其氣必虛.”³⁵⁾, 《靈樞·口問》에서는 “邪之所在 皆爲不足.”이라하여³⁶⁾ 正氣의 虛弱이 疾病의 發生의 根源이 된다 하였다.

《素問·通評虛實論》에서는 “邪氣成則實 正氣奪則虛.”라 하여 正氣와 邪氣의 勢力均衡을 통하여 虛實이 分別됨을 말하였고³⁵⁾, 《素問·三部九候論》에서는 “調其氣之虛實 實即瀉之 虛即補之.”라 하여³⁵⁾ 虛實에 따른補瀉의 治療原則을 말하였다.

종합적으로 邪氣는 外部로부터 侵入하는 要素를 한꺼번에 指稱하여 말한 것이고, 正氣는 眞氣, 元氣로서, 外部의 邪氣로부터 防禦, 抵抗하는 일을 하는 身體要所로 解釋할 수 있으며³⁴⁾, 病이 생기기 전에 豫防 하는 것과, 病이 이미 생긴 후 治療하는 것 모두 扶正과 祛邪로 표현되는데, 扶正이란 免疫體系를 튼튼히 하는 것으로 益胃氣, 補元氣, 養血氣, 益肺氣, 健脾氣, 補腎氣, 等이고, 祛邪란 이미 侵犯한 原因을 除去하는 것으로 祛散風邪, 清熱解毒, 活血化瘀, 滌痰化濁 等으로 解釋할 수 있다³⁴⁾.

서양의학적으로 면역이란 생체가 자기와 비자기를 식별하는 기구로써 외부로부터 침입하는 각종 미생물, 동종의 조직, 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들고 이것을

배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이며, 면역반응이란 비자기를 항원으로 인식하고 특이하게 항체를 생산하여 이에 대처하고 처리하는 연쇄적인 반응을 말한다^{7,24,37}).

생체의 면역반응은 macrophage가 관련된 비특이적인 선천성 면역 (non-specific immunity)과 T 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적인 후천적 면역 (specific immunity)의 두가지로 분류되며, 그 중 후천성 면역는 면역의 실체로써 세균에 대한 항체를 생산하는 B-lymphocyte의 체액성 면역반응과 바이러스, 결핵균, 진균에 대한 감각 세포와 Cytokine을 생산하는 T-lymphocyte의 세포성 면역반응으로 나누어 진다^{7,24,37}).

이를 한의학에서의 正氣와 邪氣와의 상관관계로 살펴보면 邪氣는 바이러스나 각종 세균 등의 항원을 의미하며, 正氣란 면역체계를 담당하는 림프구, 보체, 단백질, 식세포 등의 항체를 의미한다고 할 수 있다³⁷).

本 實驗에서는 어린 쥐의 면역반응에 미치는 BITG의 영향을 관찰하기 위해, 어린 생쥐 (4주령)에 BITG를 경구로 投與하고 면역능의 변화를 관찰하였다.

In vivo 實驗에서 BITG를 投與하고 分離한 thymocytes의 생존율은 T-lymphocyte mitogen인 Con A를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 對照群에 비해 별 差異가 없었으나, splenocytes의 細胞生存率은 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 對照群에 비해 增加되었다.

In vitro 實驗에서 thymocytes는 BITG 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서, splenocytes는 BITG 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 細胞生存率이 減少하였다. 이는 BITG가 생체에 投與되었을 때 細胞에 直接 作用하기 보다는 間接的인 徑路를 통하여 splenocytes의 細胞生

存率을 增加시킴으로써, 生體의 免疫能을 增強시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

一般的으로 生體內 細胞死는 necrosis로 일어나는 것은 극히 一部分이고, 大部分의 細胞는 apoptosis에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다^{38,39}). BITG를 投與하고 分離한 thymocyte 및 splenocyte의 DNA fragmentation을 測定한 결과, BITG는 thymocyte의 DNA fragmentation에는 影響을 주지 않았으나, splenocyte의 DNA fragmentation은 對照群에 비해 減少되었다. 이는 BITG가 splenocytes의 apoptosis를 抑制하고 있음을 意味하는 것이며, BITG 投與에 의해 splenocyte의 細胞生存率이 增加된 現狀이 BITG에 의해 splenocyte의 apoptosis가 抑制되어 나타난 結果라고 推定되나 자세한 기전은 추후 研究되어야 할 課題이다.

Thymocytes는 thymus의 皮質 및 髓質에서 增殖 및 分化過程을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 分化되며, 分化된 Th1 細胞는 IFN- γ 및 IL-2를, Th2 細胞는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 分泌하여 다른 T 細胞, B 細胞 및 macrophage의 增殖과 分化를 促進하며, cytotoxic T 細胞는 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 活性化시키는 것으로 알려져 있다⁴⁰).

對照群의 thymocytes 중 Th (CD4+) 細胞는 12.1%, Tc (CD8+) 細胞는 3.2%로 正常 생쥐 胸線에서 CD4+CD8- 細胞는 약 12%, CD4-CD8+ 細胞는 약 3%로 報告된 內容과 비슷한 結果를 나타내었으며⁴¹), BITG 投與시 11.8% 및 2.9%로 對照群과 別 差異가 없었다.

對照群의 splenocytes 中 B220+ 細胞는 31.2%, Thy1+ 細胞는 20.2% 이었으나, BITG를 投與하였을 때는 B220+ 細胞는 32.4%, Thy1+ 細胞는 25.5%로 Thy1+ 細胞의 population이 對照群에 비

해 增加되었다. 對照群의 splenic T-lymphocytes 중 CD4+CD8- 細胞는 13.7%, CD4-CD8+ 細胞는 4.5% 이었으나, BITG를 投與하였을 때 CD4+CD8- 細胞는 17.4%, CD4-CD8+ 細胞는 4.8%로 CD4+CD8- 細胞의 population이 對照群에 비해 增加하였다. 이 결과는 BITG가 thymocytes의 subpopulation에는 影響을 주지 않으나, splenocytes의 subpopulation에는 影響을 주고 있음을 시사하는 것이다. 또한, BITG 投與에 의해 splenocytes 중 Th1+ 細胞의 population이 增加하였다는 것은 splenocyte의 T 細胞의 population이 增加되었음을 意味하는 것이고, CD4+CD8- 細胞의 population이 增加하였다는 것은, T 細胞 중 주로 Th 細胞의 population이 增加되었음을 意味하는 것이다. Th 細胞는 Th1 및 Th2 細胞로 分化되어 다양한 cytokine들을 分泌하기 때문에 BITG가 Th 細胞 중 어느 쪽을 活性化하는 지에 대한 자세한 기전은 추후 研究되어야 할 것이다.

NO는 T-lymphocyte가 生成하는 cytokine을 調節하며, in vivo에서 T-lymphocyte의 生命을 調節하는 因子 중 하나로 알려져 있다⁴²⁾. 또한 NO는 heper T 細胞의 增殖을 抑制하며²⁰⁾, 自己 免疫系를 抑制하는 것으로 報告되었다⁴³⁾.

本 實驗에서 腹腔 macrophages로부터 NO 生成에 미치는 BITG의 影響을 觀察한 결과, BITG를 投與시 對照群에 비해 NO 生成이 減少하였다. BITG 投與에 의한 Th 細胞의 population이 增加된 결과가 NO 生成이 抑制되어 나타난 결과인지, 本 實驗의 結果만으로 斷定하기는 어렵지만, NO가 Th 細胞의 增殖을 抑制한다는 Okkuda 等²⁰⁾의 報告와 比較하였을 때, BITG 投與에 의한 Th 細胞의 population 增加에, BITG 投與에 의한 NO 生成의 抑制가 一部 關與하고 있을 것이라 推定된다.

外部로부터 異物質이 侵入하게 되면 生體는 自

己防禦를 위해 macrophages가 活性化되어 phagocytosis가 促進된다. 이러한 phagocytosis는 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. phagocytosis는 免疫의인 側面에서 重要하지만, 傷處治癒 課程에서도 매우 重要하다.

本 實驗에서 macrophages의 phagocytic activity를 測定하는데 CL을 測定하는 方法을 利用하였다. 이 方法의 原理는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 生成하는데, 이때 生成된 oxygen radical과 lucigenin이 反應하여 lucigenin chemiluminescence를 發生하는 것을 測定함으로써 phagocytic activity가 進行되는 것을 確認하는 것이다^{44,45)} Macrophage로부터 生成되는 CL을 測定한 결과 BITG 投與에 의해 CL 量이 顯著히 增加하였으며, FITC-conjugated E. coli particle의 貪食도 增加하였다.

한편, in vitro 實驗에서는 BITG에 의해 CL이 濃度 依存的으로 減少하였다. 이는 BITG가 macrophage의 phagocytic activity를 間接적으로 增加시키고 있음을 意味하는 것이다.

NO는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 形成을 抑制하는 것으로 알려져 있다⁴⁶⁾. 本 實驗에서 BITG가 NO 生成을 抑制하고, phagocytic activity를 增加시켰다는 결과는, BITG가 NO를 경유하여 macrophages의 phagocytic activity를 增加시키고 있음을 시사하는 것이다. 또한, 이 結果는 BITG가 非特異的 免疫反應을 增加시킬 수 있음을 意味하는 것이다.

以上の 實驗결과 補中益氣湯加味는 새끼 생쥐에 經口로 投與되었을 때, splenocytes의 apoptosis를 抑制하여 splenocytes의 增殖을 促進하며, splenocytes의 Th 細胞의 population을 增加시켜 特異的 免疫反應을 增加시키고, 腹腔 macrophages의 phagocytic activity를 增加시켜 非特異的 免疫反應

을 增加함으로써 免疫能을 調節하는 湯劑라 사료 된다.

V. 結 論

補中益氣湯加味が 새끼 생쥐의 免疫機能에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. thymocytes의 細胞生存率은 In vivo 實驗에서는 變化가 없으나, In vitro 實驗에서는 BITG 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度에서 減少하였다.

2. splenocytes의 細胞生存率은 In vivo 實驗에서는 增加하였으며, In vitro 實驗에서는 BITG 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 濃度에서 減少하였다.

3. thymocytes의 DNA fragmentation은 變化가 없었으나, splenocytes의 DNA fragmentation은 減少하였다.

4. thymocytes 중 CD4+CD8- 細胞 및 CD4-CD8+ 細胞의 population은 變化가 없었으나, splenocytes 중 Thy1+ 細胞 및 CD4+CD8- 細胞의 population은 增加하였다.

5. 腹腔 macrophage로부터 NO의 生成을 抑制하였다.

6. 腹腔 macrophage로부터 lucigenin CL이 顯著히 增加하였다.

7. In vitro 實驗에서 腹腔 macrophages에 濃度依存的으로 lucigenin CL이 減少하였다.

以上の 實驗결과 補中益氣湯加味는 새끼 생쥐에 경구로 投與되었을 때, 特異的 免疫反應 및 非特異的 免疫反應을 增加시켜 免疫能을 調節하는 湯劑라 사료된다.

參 考 文 獻

1. 丁奎萬 編: 동의소아과학, 서울, 행림출판, pp.34-35, 1988.
2. 李尙仁 外: 방제학, 서울, 영림사, pp.168-169, 1994.
3. 申載庸: 方藥合編解說, 서울, 成輔社, pp.33-35, 1989.
4. 朴宰賢: 補中益氣湯이 Cyclosporin A를 投與한 小鼠의 肝 및 腎損傷에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 45(1), pp.451-466, 1994.
5. 閔勇泰: 補中益氣湯의 投與가 紫外線 照射로 低下된 小鼠의 免疫 機能의 恢復에 미치는 影響, 大韓韓醫學會 方劑分科學會誌, 2(1), pp.107-129, 1991.
6. 金美志 外: 補中益氣湯이 Lymphocyte와 CD4+ T 細胞에 미치는 影響, 大韓韓方小兒科學會誌, 12(1), pp.211-230, 1998.
7. 丁奎萬: 알레르기과 韓方, 서울, 第一路, p.394, 1996.
8. 金聖洙: 鹿補散의 呼吸器疾患 豫防效果에 관한 研究, 경희대학교 대학원, 1989.
9. 宋瑛石: 地榆湯加 枳實이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓韓方小兒科學會誌, 6(1), pp.15-29, 1992.
10. 許浚: 東醫寶鑑 雜病篇, 大星文化社, 서울, p.196, 1992.
11. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for

- lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844-2848, 1978.
12. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol., 120, 1497-1503, 1979.
13. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65, 55-63, 1983.
14. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods, 129, 23-30, 1990.
15. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods, 139, 1497-1503, 1991.
16. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994.
17. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.: Killing of Plasmodium faciparum in vitro by NO derivatives. Infect. Immunity, 59(9), 3280-3283, 1991.
18. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.: Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J. Immunol. Methods, 174, 259-268, 1994.
19. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.: Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods, 112, 163-168, 1988.
20. Okkuda, Y., Sakada, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T.: NO induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. Immunology Letters, 52, 135-142, 1996.
21. 윤용갑 : 東醫 方劑와 處方解說. 서울. 醫聖堂. pp.299-309, 1998.
22. 진위 외: 方劑學, 서울 醫聖堂, pp.196-200, 1993.
23. 李 외: 方劑學, 癸丑文化社, pp.38-39, 1984.
24. 강재훈 외 : 補中益氣湯이 면역細胞 배양에 미치는 影響, 동의생리학회지14(1), p.29, 1999.
25. 康秉秀 外 編 本草學. 永林社, 서울, p.589, pp.622-623, 1994.
26. 申佶求: 申氏本草學, 壽文社, 서울, p.113, pp.183-188, 1988.
27. 李永宇: 四君子湯, 四物湯, 十全大補湯 및 補中益氣湯이 cisplatin 投與로 誘發된 體重減少와 血液變化에 미치는 影響, 원광대학교대학원, 1991.
28. 金秀鍊: 補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 의한 副作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 8(1), pp.119-136, 1993.
29. 韓晟圭: 補中益氣湯, 手帖散 및 補中益氣湯合手帖散의 抗癌과 免疫調節作用에 관한 實驗的研究. 경희대학교대학원, 1995.
30. 洪律憲: 補中益氣湯과 香砂六君子湯의 併用投與가 S-180 腹水癌細胞를 接種한 생쥐의 細胞性 免疫에 미치는 影響, 동국대학교대학원, 1994.
31. 裴廷燁: 小兒補血湯, 加味小兒補血湯 및 加減小兒補血湯이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影

- 響, 경희대학교 대학원, 1989.
32. 李東炫: 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 항알레르기과 免疫反應에 미치는 影響, 경희대학교 대학원, 1990.
33. 朴恩貞: 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, pp.17-18, 1990.
34. 李秉烈: 四君子湯 및 四物湯藥針이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 博士學位論文集 p.1, 1996.
35. 作者未詳: 黃帝內經素問校釋, 山東中醫學院 河北醫學院 校釋, 一中社 서울, p.5, 292, 377, 436, 1325, 1980.
36. 楊維傑編: 黃帝內經靈樞解釋, 一中社. 서울, p.262, 1991.
37. 姜재훈, 홍무창: 補中益氣湯이 免疫 細胞 培養에 미치는 影響, 東醫生理學會誌. Vol14(1), p.29, 1999.
38. Alles, A.K.: Apoptosis. A general comment. FASEB. J., 5, 2127-2128, 1991.
39. Willie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R.: Cell death: The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 68, 251-306, 1980.
40. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology. 53, 59, 1993.
41. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.
42. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W.: Overproduction of NO in cytokine-mediated and septic shock. J. Natl. Cancer Inst., 84(11), 828-831, 1992.
43. Albina, J.E., Abate, J.A. and Henry, W.L.: NO production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. J. Immunol., 147(1), 144-148, 1991.
44. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in tumoricidal dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun., 45, 1-8, 1984.
45. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and Johnston, Jr. R. B.: Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. J. Leucocyte Biol. 41. 450-455, 1987.
46. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M., Kim, J.D. and Kim, S.H.: NO inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. Kor. J. Immunol. 18, 635-644, 1996.