

清上補下湯이 Naive CD4+ T cell의 활성화에 미치는 영향

박영식 · 배현수 · 홍무창 · 신민규*

경희대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Chungsangboha-tang on Activity of Naive CD4+ T cell

Young Sik Park, Hyun Su Bae, Moo Chang Hong, Min Kyu Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

CSBHT is known to improve immunological response in mice and humans. In this study, CSBHT effect was examined in the context of CD4+ T cells' survival and TCR/CD3 induced activation responses. Spleen cells from 8 week BALB/c mice were cultured in CSBHT containing medium without activation for 24, 48 hr. The MTS assay and revealed that CSBHT did not stimulate spleen lymphocytes as mitogen. Spleen lymphocytes were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48hr. Flow cytometry revealed that activity of T cell decreased with CSBHT concentration. CD4+ T cells were isolated and cultured in CSBHT containing medium for 48 hr. CSBHT did not affect survival of sorted CD4+ T cells without any involvement of APC. In order to evaluate the direct effect of CSBHT on helper T cells's proliferative capacity prior to activation, CD4+ T cells are isolated after 24hr of culture in CSBHT containing medium and activated with and without anti-CD3e/anti-CD28 activation for 48hr. A higher level of CD69 was observed in 1µg/ml of CSBHT treatment than control using flow cytometry. But low CD69 expression was observed in 5µg/ml of CSBHT treatment. Expression of mRNA for cytokines in CD4+ T cell revealed that IL-2 expression was increased in 1µg/ml. The expression of IL-2Rα, INF-γ were increased with concentration. On the other hand mRNA of IL-4 was decreased in dose dependent manner. Results suggest that CSBHT may be desirable for CD4+ T cell's activity in immune responses. Further more, CSBHT may relatively activate Th1 and inactivate Th2.

Key words : Chungsangboha-tang(清上補下湯), CD4+ T cell, Th1 response, Th2 resopnse. IL-2, IL-2Rα, IL-4, INF-γ.

서론

한의학에서 면역의 저하는 곧 질병이 생기는 원인으로 正氣의 虛弱이라고 하였다. 질병은 인체의 정상적인 생명활동과 인체의 외부환경간의 조화상태가 파괴될 때 邪氣의 침입에 기인한다. 正氣는 외부의 이물질에 대하여 인체의 내적 환경을 유지하기 위한 면역반응과 상관성 있게 작용하므로 正氣를 도와 邪氣를 제거하는 '扶正祛邪의 治法'이 치료와 예방에 활용되어 왔다. 한의학에서 正氣는 腎精을 바탕으로 한다. 腎의 현대적 해석으로 腎은 뇌하수체와 신상선피질 축까지도 포함하여 부신피질호르몬까지도 포괄시키고 있다. 沈¹⁾은 "補腎藥으로 신경내분비와 면역 균형을 유지하는데 강력한 조절작용과 老化를 완화시키는 작용이 있다"고 강조한 바 있다. 또한 최근의 연구에서 許²⁾는 "精이 腎에

저장되면 先天之精으로 자연면역을 나타내고 後天之精은 腎에 저장되어 있다가 외부로부터 邪氣가 침입하면 곧 正氣(衛氣)로 전환되어 邪氣에 맞서므로 腎藏精은 면역과 관련된다"고 하였다. 따라서 한의학적인 면역의 개념은 腎의 역할로 설명될 수 있다.

한편 서양의학에서 밝혀진 면역체계는 T cell이 큰 역할을 하게 된다. Naive CD4+ T cell은 APC (antigen presenting cell)의 MHC (major histocompatibility complex) I 혹은 MHCII와 결합하여 Th1 림프구와 Th2 림프구로 분화되며 이들 두 림프구는 상호 길항작용에 의해 면역체계를 유지한다. 즉 알려지 과민반응의 중요매개인 Ig-E의 생성은 IL-4를 반드시 필요로 하는데 이 IL-4를 분비하는 Th2 림프구는 Naive CD4+ T cell이 IL-4 존재 하에 allergen과 반응하였을 때 분화되고 이때 Ig-E생성을 방해하는 요소인 INF-γ를 분비하는 Th1림프구의 발달이 저하되어 길항작용을 유지하게 된다. 이 중 Th1림프구는 면역반응 후 수일 안에 시작되는 지연성 과민반응, 결핵균이나 바이러스 작용에 대한 방어 작용 증양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 림프구는 면역반응 후 즉시형 과민반응, 기관지천식과 같은 알려지성 질환에 대한

* 교신저자 : 신민규, 서울 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

E-mail : shinmk@khu.ac.kr Tel : 02-961-0323

· 접수: 2002/06/17 · 수정: 2002/07/25 · 채택 : 2002/08/07

방어작용에 관여한다. 腎을 도와서 호흡기 질환을 치료하는 전형적인 扶正祛邪의 治法으로 淸上補下湯 처방이 활용된다. 淸上補下湯은 龔이 創方한 처방으로 壽世保元³⁾에 수록되어 있는데, 水氣와 眞陰을 補하는 補腎藥의 代表方인 六味地黃湯에 淸熱 潤肺 祛痰시키는 여러 가지 藥物들로 구성되어 있다. 주로 呼吸機能不足 및 痰으로 인한 哮喘證에 활용할 수 있고, 노화나 체력의 저하로 인한 면역감소로 발생하는 慢性呼吸器疾患 치료에 사용하고 있다.^{4,6)} 지금까지 淸上補下湯에 대한 연구는 O₃ 및 CCl₄로 인한 肺損傷에 미치는 영향⁷⁾, 肺浮腫과 祛痰 및 전해질 개선效果⁸⁾, 대기오염 물질중의 하나인 SO₂에 의한 損傷肺에 미치는 영향⁹⁾, 燥熱한 空氣로 呼吸器 損傷에 미치는 영향¹⁰⁾, 권¹¹⁾, 박¹²⁾이 臨床的인 效能을 관찰보고 하였다. 그리고 한약물이 allergy 반응에 미치는 영향에 대한 연구들은 김¹⁰⁻¹²⁾ 등이 있다. 이들은 대부분 주위환경에 의한 肺 損傷시 淸上補下湯의 치료효능에 대해 언급하고 있으며 淸上補下湯의 면역에 관한 부분에는 실험이 많이 되어 있지 않다.

이에 저자는 면역개념이 韓醫學의 腎機能의 역할과 관련되는지를 확인하고자 cytotoxic T cell이나 helper T cell로서 면역능력평가를 행하고, 동시에 慢性呼吸器疾患에 많이 쓰이는 淸上補下湯이 Th1 cell을 선택적으로 활성화시키고 Th2 cell을 선택적으로 억제시키는지를 확인하고자 본 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 신타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며 음용수는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

Table 1. Contents of CSBHT(Chungsangboha-tang)

藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	Rehmannia Radix vaporata	4
山藥	Discorea Radix	4
山茱萸	Corni Fructus	4
白茯苓	Hoelen	4
牡丹皮	Mountain Cortex Radicis	4
澤瀉	Alismatis Radix	4
五味子	Maximowicziae Fructus	3
枳實	Ponciri Fructus	3
麥門冬	Liriopsis Tuber	3
天門冬	Asparagi Radix	3
貝母	Fritillariae roylei Bulbus	3
桔梗	Platycodi Radix	3
黃連	Coptidis Rhizoma	3
杏仁	Ansu Semen	3
半夏	Pinelliae Rhizoma	3
瓜蒌仁	Tricosanthis semen	3
黃芩	Scutellariae Radix	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
	Total amount	59

2. 시료의 제조

본 실험에 사용된 淸上補下湯의 處方構成은 壽世保元³⁾에 근거하였으며, 약재는 한국생약협회로부터 구입하여 엄선하고 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 각 약재는 Table 1 에 표기된 비율로 혼합하여 총 1180g을 분말한 후 sonicator (Branson, USA)를 이용하여 70% 에탄올로 추출하고 상층액은 수집한 후 침전물을 다시 80%, 90%, 100% 에탄올에서 같은 방법으로 추출하였다. 전체 상층액을 모아 60℃에서 감압농축 후 동결건조하여 39.70g(yield: 3.36%)의 분말 시료를 얻었다. 이렇게 회수된 청상보하탕 ethanol 건조추출물 약 120mg을 정밀히 달아 test tube에 넣고 methanol(HPLC reagent, J.T. Baker사, USA) 및 정제수(18M Ω 이상의 3차 증류수) 4ml를 정확히 넣어 녹인 후 0.45 μ m syringe filter(PVDF, Waters)를 통과시켜서 검액으로 사용하였다.

3. 시료의 지표물질 분석

청상보하탕의 지표물질 분석은 청상보하탕을 구성하고 있는 속시황(5-HMF, Aldrich Chemicals Co. LTD. USA, 이하 Aldrich), 산약(allantoin, Aldrich), 산수유(loganin, Wako Pure Chemical Industries Co. LTD. Japan, 이하 Wako), 목단피(paeonol, Wako), 텍사, 백복령(eburicoric acid), 오미자(schizandrin, Wako), 지실(poncirin, Fluka Chemie, Germany, 이하 Fluka), 맥문동, 천문동, 패도, 길경(paltycodin D), 황연(berberine, Sigma Chemical Co. Germany, 이하 Sigma), 행인(amygdalin), 반하(homogentisic acid, Fluka), 과루인, 황금(baicalin, Aldrich), 감초(glycyrrhizic acid, Sigma) 등 중에서 현재 시판하고 있는 것들을 우선 분석하였다(단, 팔호 안의 지표물질은 보건복지부의 표준화연구에 의한 것임). 이들은 지표물질의 분석조건에 따라 일정량을 정확히 취하여 methanol 및 정제수 5ml에 녹였다. 녹인 표준액은 각 지표물질의 분석 조건에 따라 일정하게 희석한 후 표준 HPLC chromatogram을 얻고 각 peak의 면적을 측정하여 농도와 면적 사이의 상관관계를 최소자승법에 의해 구하였다.

본 연구에서 사용된 HPLC는 Waters Breeze System (717+ Autosampler, 2487 dual λ absorbance detector, 1525 binary HPLC Pump, Waters Co., Milford, USA)을 사용하였고, data 처리는 Waters Breeze System (Ver. 3.20, Waters Co., Milford, USA)을 사용하였다. HPLC의 분석조건은 다음과 같다.

- Column : Symmetry®C18 5 μ m (ODS, 4.6 \times 150mm)
- Mobile phase :
 paeonol ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 35 : 65 (v/v)
 5-HMF, allantoin ; acetonitrile : water = 5 : 95 (v/v)
 baicalin ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 30 : 70 (v/v)
 berberine ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 15 : 85 (v/v)
 poncirin ; methanol : water(within 2% acetic acid) = 30 : 70 \Rightarrow 50 : 50 (v/v)

- (0 to 25min), 50 : 50 (v/v) (25 to 30 min)
 homogentistic acid ; methanol : water(within 2% acetic acid) = 15 : 85 (v/v)
 loganin ; methanol : water = 30 : 70 (v/v)
 - UV Detector : allantoin·betaine(210nm), paeonol(274nm), 5-HMF(254nm), homoentistic acid·glycyrrhizic acid (254nm), poncirin(313nm), baicalin(280nm), berberine(345nm), loganin (240nm)
 - Flow rate : 1ml/min
 - Sample injection : 10 μ l(cf., poncirin : 20 μ l)
 - Temperature : Room temperature

이때, 청상보하탕의 각 구성항약재에 대한 지표물질의 정량은 검액(청상보하탕 alcohol 추출물)의 peak 면적을 표준액의 peak 면적으로 나눈 후, 여기에 표준액(표준 지표물질)의 양(mg)을 곱해서 산출하였으며, 3회 반복 시험 후, 평균값을 취하여 계산하였다.

4. Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), FITC-conjugated anti-CD69 (clone:H1.2F3), PE-conjugated anti-CD4 (L3T4, clone:GK1.5) (Pharmingen, BD Biosciences, U.S.A.), Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads(Miltenyi Biotec, U.S.A.) 등의 antibody가 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined FBS (Hyclone, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies, USA) 10mM HEPES (Gibco BRL, Life Technologies, USA), 11mM sodium bicarbonate (Sigma, USA)가 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies, USA)를 사용하였다.

5. 비장 임파구 준비

적절한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (Falcon, BD Biosciences, USA)로 걸러낸다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 3ml PharM Lyse (Pharmingen, BD Bioscience, USA)를 넣고 5분간 반응시킨다. 반응액에 7ml의 media를 첨가한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 부유액을 제거한다. 남은 cell pellet은 1ml의 media로 suspension 한 후 trypan blue로 staining하여 세포수를 측정한다.

6. CD4+ T cell 분리

비장임파구 1 \times 10⁷cells/90 μ l 농도당 10 μ l의 magnetic cell sorting CD4(L3T4) microbeads를 첨가하여 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 반응한다. 1,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 5ml의 media로 washing한다. 남은 cell pellet에 1 \times 10⁸/500 μ l의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension한다. Ls separation column (Miltenyi Biotec, U.S.A.)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec, U.S.A.)에 장치한 후 3ml의 기포가 없는 buffer

(PBS with 2mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 헹구어 내고 세포부유액을 column안으로 주입한다. Media가 column을 통하여 빠져나가면 다시 3ml의 buffer로 column을 3번 헹구어 낸다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5ml의 buffer를 넣고 plunger를 서서히 눌러서 CD4+ T cell을 elution한다.

7. 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극받지 않은 비장 임파구의 생존률을 측정하기 위해 CellTiter 96 TM Aqueous One solution cell proliferation assay (Promega, U.S.A.)의 protocol를 이용하되 2 \times 10⁵ cells/200 μ l의 농도로 flat bottomed 96-well plate에 seeding한다. Spleen total cell에서는 清上補下湯 추출물을 0, 1, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 첨가하고 10 μ g/ml ConA (concanavaninA, Sigma, USA)로 stimulation한다. CD4+ T cell에서는 清上補下湯 추출물을 0, 1, 2, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 첨가하고 10 μ g/ml anti-CD3e가 coating된 plate에서 2 μ g/ml anti-CD28로 costimulation한다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator (Nuair, USA)에서 배양한다.

8. CD4+ T cell의 CD69 발현 측정

24-well plates에 1 \times 10⁶cells/ml의 농도로 세포를 seeding하고 48시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. Mitogen에 의한 세포자극은 생존율 및 증식능 측정에서와 같은 방법을 사용하고 첨가된 清上補下湯 추출물은 spleen total cell에서는 0, 10, 100 μ g/ml, CD4+ T cell에서는 0, 1, 5 μ g/ml의 농도로 첨가한다. 세포를 harvest하기 위하여 1,000rpm에서 3분간 원심분리한 후 cell pellet을 cold wash buffer (PBS/0.1% NaN₃/1% FBS)에 resuspension한다. 여기에 FITC-conjugated anti-CD69 antibody와 PE-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 40분 동안 incubation하였다. cold wash buffer로 2번 washing한 후 FACScan(Becton Dickinson, BD biosciences, USA)으로 분석한다.

9. RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

Flow cytometry에서와 같은 조건으로 72시간동안 배양한 CD4+ T cell의 상층액을 제거한 후 PBS로 washing하고 Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)을 이용하여 total RNA를 분리하되 제조회사의 방법에 준한다. Total RNA는 spectrophotometry (DU-520, Beckmann, USA)를 이용하여 정량한다. M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)와 oligo-dT (Gibco BRL, Life Technologies, U.S.A.)를 이용하여 2 μ g의 total RNA로 ss cDNA 합성한다. 합성된 cDNA를 template로 사용하여 IL-2, IL-2R α , IL-4, INF- γ 유전자를 quantitative PCR한다. 이때 linear range를 확인하기 위하여 cDNA는 1/2 희석한 것을 같이 사용하고 housekeeping gene인 GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 internal control로 사용한다. PCR에 사용된 primer (Genotech co. Korea)의 sequence와 증폭된 amplicon의 길이는 Table 2와 같다. PCR 반응액의 조성은 2 μ l

10×PCR buffer, 0.2μl each sense, antisense primer, 0.5μl 10mM dNTPs, 0.4μl 5U/μl Ampligold Taq polymerase (PE Biosystems, USA), 적정농도로 희석된 1μl template cDNA에 3차 증류수로 최종 volume이 20μl가 되도록 한다. Gene에 따른 PCR 조건은 Table 3 와 같다. 각 PCR product는 8μl씩 2% agarose gel에서 130V조건에서 20분간 전기영동하고 ethidium bromide로 stain하여 Gel-Doc system (Photodoc system, Bio-Rad co. USA)으로 scan하며 band intensity는 Quantity one (Bio-Rad co. USA) software를 이용하여 측정한다.

Table 2. Sequences of primer Used for Quantative RT-PCR

gene	oligonucleotide sequence	amplicon length (bp)
GAPDH	sense: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3' antisense: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	236
IL-2	sense: 5'-GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3' antisense: 5'-GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'	501
IL-4	sense: 5'-TCT TTC TCG AAT GTA CCA GG-3' antisense: 5'-CAT GGT GGC TCA GTA CTA CG-3'	401
IFN-γ	sense: 5'-CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3' antisense: 5'-GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'	308
IL-2Rα	sense: 5'-GGG GCA GGA AGT CTC ACT CTC GGG A-3' antisense: 5'-GAA CTC CTG GAG CAG CAA CTG-3'	427

Table 3. Conditions of PCR amplification.

genes	denaturation	Loop			extension	cycles
		denaturation	annealing temperature	extension		
GAPDH	95°C / 10min	94°C / 30sec	60°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 5min	24
IL-2	95°C / 10min	94°C / 30sec	60°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 5min	30
IL-4	95°C / 10min	94°C / 30sec	60°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 5min	24
IFN-γ	95°C / 10min	94°C / 30sec	60°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 5min	30
IL-2Rα	95°C / 10min	94°C / 30sec	60°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 5min	24

결 과

1. 각 시료의 지표물질에 대한 표준액의 검량선 작성 및 HPLC 정량분석

Table 4. The Quantitative analysis of Standard materials of CSBHT. (Unit : mg/CSBHT ex. 1g)

한약재	지표물질	함량(mg)
숙지황	5-HMF	0.27 ± 0.029(0.027%)
산약	allantoin	3.14 ± 0.402(0.31%)
산수유	loganin	5.01 ± 0.038(0.50%)
목단피	paeonol	0.83 ± 0.077(0.083%)
지실	poncirin	24.03 ± 0.051(2.40%)
황연	berberine	4.68 ± 0.019(0.47%)
황금	baicalin	8.03 ± 0.033(0.80%)
반하	homogentisic acid	57.66 ± 6.240 (5.77%)
오미자	schizandrin	0.90 ± 0.353(0.09%)
감초	glycyrrhizic acid	2.98 ± 0.019(0.29%)

청상보하탕의 각 구성한약재의 지표물질인 5-HMF, allantoin, loganin, paeonol, 등을 HPLC 분석하여 선형회귀분석을 실시한 결과, R2값이 0.9939 이상으로 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다. 지표물질 각각의 standard calibration curve 및 시료의 각 지표물질 peak curve 는 생략하였다.

한편, 청상보하탕 중에 포함되어있는 각각의 한약재 중 숙지황 (5-HMF), 산약 (allantoin), 산수유 (loganin), 목단피 (paeonol), 지실 (poncirin), 황연 (berberine), 황금 (baicalin), 반하 (homogentisic acid), 오미자 (schizandrin), 감초 (glycyrrhizic acid) 등에 대한 지표물질 분석 결과, Table 4. 와 같은 결과를 나타내었다.

2. 淸上補下湯 추출물이 비장 임파구의 생존에 미치는 영향

淸上補下湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하는지 확인하기 위해 淸上補下湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48시간 동안 배양하고 MTS assay를 한 결과 (Fig.1) T cell specific mitogen인 ConA로 activation하지 않은 경우는 농도별 세포생존율은 淸上補下湯 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 별다른 변화를 보이지 않음으로써 淸上補下湯 추출물이 mitogen으로서 비장임파구를 자극하지는 않는 것이 확인되었다. ConA로 activation한 경우에는 淸上補下湯 추출물의 농도에 따라 T cell 증식이 다소 저하되는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

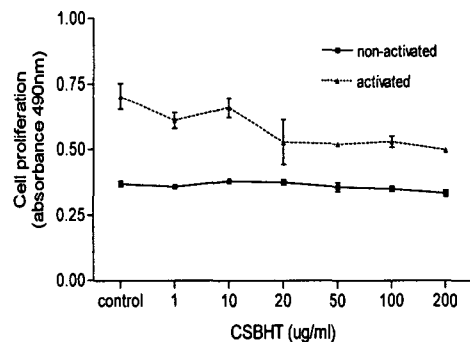
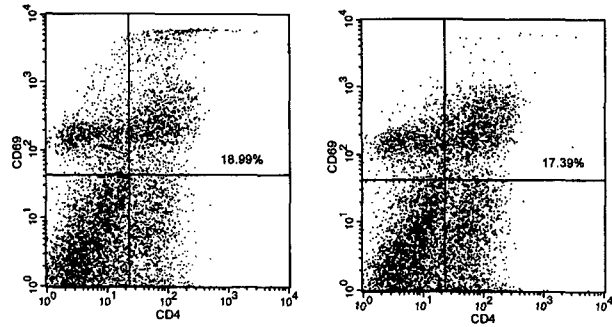


Fig.1. Proliferation of spleen lymphocytes in medium containing v arious concentration of CSBHT extract after 48hr. incubation. Mouse spleen lymphocytes were treated with ConA to activate T cell, or not. Control was culture d in medium without CSBHT. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. (standard error mean)

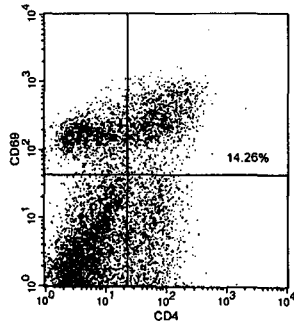
3. 淸上補下湯 추출물이 비장 임파구 중 CD4+ T cell의 구성에 미치는 영향

淸上補下湯 추출물이 전체 비장 임파구 중 CD4+ T cell의 구성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 TCR (T cell antigen receptor) specific activator인 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation한 후 early T cell activation surface maker인 CD69의 표면표식을 flow cytometry로 확인한 결과(Fig.2) 淸上補下湯 추출물 농도에 따라 T cell 활성이 저하되는 것으로 나타나 비장 임파구 중 T cell 증식능 측정결과와 일치하였다.



A. CSBHT 0 μg/ml

B. CSBHT 10 μg/ml



C. CSBHT 100 μg/ml

Fig. 2. Analysis of unsorted CD4+ T cells in medium containing various concentration of CSBHT extract after 48hr. incubation. Spleen lymphocytes were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies for 48hr. to activate CD4+ T cell. Cells were stained with FITC-conjugated anti-CD69 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A: Cells were incubated in medium without CSBHT extract as control. B: Cells were incubated in medium containing 10 μg/ml CSBHT extract. C: Cells were incubated in medium containing 100 μg/ml CSBHT extract.

4. 清上補下湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

清上補下湯 추출물이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하기 위해 CD4+ T cell을 분리한 후 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 동안 배양한 결과 (Fig.3) mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation 시켰을 때에는 저농도 (1 μg/ml)에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하다가 고농도 (5 μg/ml 이상)에서 저하되는 것으로 나타났으나 유의성은 없었다.

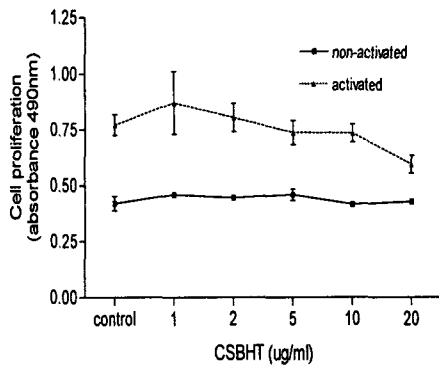
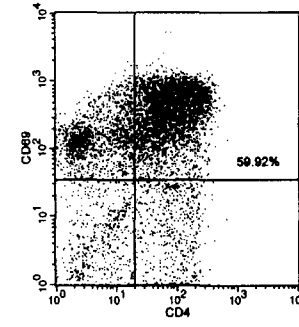


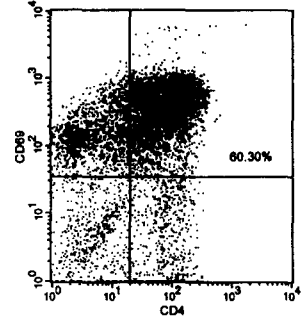
Fig.3. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of CSBHT extract after 48hr. incubation. Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Control was cultured in medium without CSBHT. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

5. 清上補下湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 CD69 발현에 미치는 영향

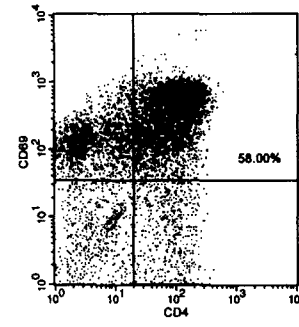
CD4+ T cell을 분리하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation하면서 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 CD69의 표면표식을 flow cytometry로 확인한 결과 (Fig.4) 1 μg/ml 농도에서는 T cell 활성이 다소 증가하다가 5 μg/ml 농도에서는 감소함으로써 T cell 증식능 측정 결과와 일치하였다.



A. CSBHT 0 μg/ml



B. CSBHT 1 μg/ml



C. CSBHT 5 μg/ml

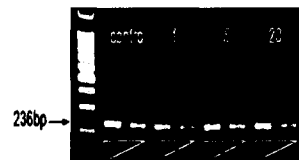
Fig.4. Analysis of activated CD4+ T cells in medium containing various concentration of CSBHT extract after 48hr. incubation. Sorted CD4+ T cells were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate CD4+ T cell for 48hr. Cells were stained with FITC-conjugated anti-CD69 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A: Cells were incubated in medium without CSBHT extract as control. B: Cells were incubated in medium containing 1 μg/ml CSBHT extract. C: Cells were incubated in medium containing 5 μg/ml CSBHT extract.

6. 清上補下湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 IL-2, IL-2R α, IL-4, INF-γ mRNA 발현에 미치는 영향

CD4+ T cell을 분리하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation하면서 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양하였다. 배양된 CD4+ T cell에서 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 각 cytokine별로 RT-PCR하고 2% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig.5 와 같다. GAPDH를 control로 사용하여 각 cytokine mRNA 발현량을 清上補下湯 추출물 투여 농도별로 비교하여 본 결과 IL-2는 1 μg/ml 농도에서만 증가되었고, IL-2R α, INF-γ는 농도에 따라 증가하다가 20 μg/ml 농도에서 감소하였고, IL-4는 농도에 따라 감소하는 경향을 보였다 (Fig.5-F,G).

A. GAPDH

B. IL-2



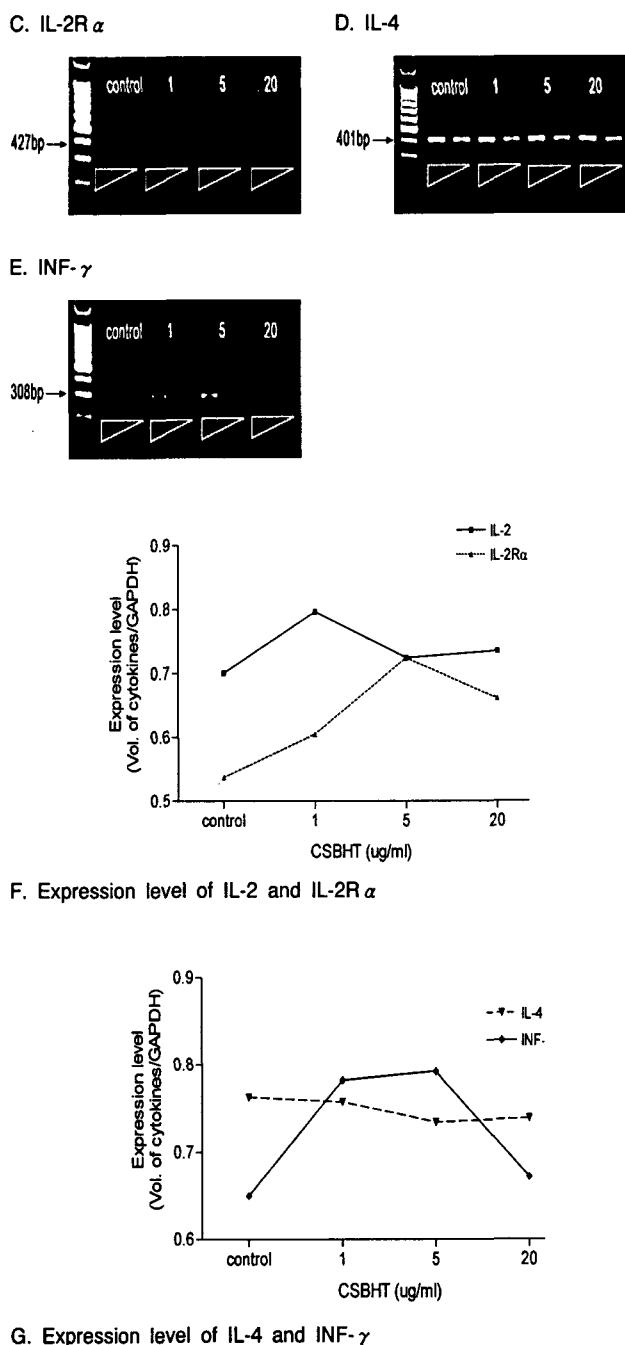


Fig.5. Expression of mRNA for cytokines in CD4+ T cell cultured in medium various concentration of CSBHT extract for 72hr. cDNAs were synthesized from mouse CD4+ T cell. A-E: Each volume of template cDNAs used in PCR amplification were serially diluted (1, 1/2) to check linear range. Each PCR products were fractionated by electroporesis on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. 1st lane of images are 100bp DNA ladder(MBI Permentas, Lithuania). GAPDH was used as a internal control. Numbers of Each images mean concentration($\mu\text{g/ml}$) of CSBHT. F,G: Expression levels of each cytokine were normalized with GAPDH of each sample. Volume of PCR amplicon was quantified by Quantity One software.

고찰

韓醫學의 면역관련 내용은 "正氣存內 邪不可干" "風雨寒熱 不得虛邪 不能獨傷人" 및 "邪之所湊 其氣必虛"¹³⁾ 등으로 표현한 바 이는 "면역은 動物이 異物質을 인식하여 그 자신의 조직에 傷

害없이 그들을 中和하고 除去하는 능력을 주는 모든 生理의기전"이라고 한 개념의 일부를 언급하고 있다고 하겠다. 생명활동의 근원을 命門에 두어 이를 元氣라고 하는 바 元陰과 元陽二氣의 분수령이 되니 元陰은 精의 生成과 生體物質의 근원이 되는 津液을 생성하는 것으로 각 장기의 津液과 血液生成을 滋養하며 또 腦髓와 生殖活動을 滋養할 精髓를 生成한다. 元陽은 생명존속의 핵심이 되는 것으로 體外的 활동은 자손을 잇기 위한 生殖活動이 되고 體內的 활동은 자기존재를 위한 再生회복과 각 臟器活動을 협조하는 것이다.¹⁴⁾ 이들 元陰과 元陽은 인체생리현상의 전반적인 것을 표현한 것으로 이들 陰陽氣의 변화가 어떻게 일어나느냐에 따라 諸現象이 나타나게 된다고 하여서 腎臟을 인체 기능이 발현하는 根本點으로 보았다.¹⁵⁾ 또한 "腎主骨 腎生骨髓"^{15,16)}라 하여 腎의 精이 성장발육을 시키는 일부분으로 精은 髓를 생산하며 髓는 骨을 기른다고 하였고^{15,17)} 朴¹⁷⁾의 "腎의 髓의 상관관계에 대한 실험적 연구"등으로 보아 체액성 면역반응은 精과 관계한다고 볼 수가 있으며, "腎主水液"이라 하여 腎의 精氣의 氣化機能을 指稱하는 바¹⁸⁾ 內經(素問·逆調論)에서 "腎者水臟 主津液"이라 하여 腎의 津液 즉 體液을 주하므로 腎機能系가 주관한다고 볼 수 있다. 沈¹⁾은 "腎은 腦下垂體와 腎上腺皮質軸까지도 포함하여 副腎皮質 호르몬까지 包括시켜서 면역기능에서의 腎의 역할에 관하여 論하면서 補腎藥으로 신경내분비와 면역 통계상 균형을 유지하는데 강력한 조절작용과 老化를 완화시키는 작용이 있다"고 하였다. 면역의 개념은 韓醫學으로 五種勢力的 臟腑概念 중 腎機能系의 역할로 설명되며 四大構成要素의¹⁴⁾으로는 精에 밀접한 관련이 있으며 精에서 氣化作用이 일어나면 機能的 發顯에 있어서 正氣나 衛氣로 發顯된다고 보여진다. 면역계는 임파구(T-cell, B-cell) 대식세포 백혈구 항체 및 림포카인등의 여러 종류의 인자로 구성되며 주로 體液性免疫과 細胞性免疫으로 분류된다. 면역반응 중 體液性免疫反應은 항원특이성 분자인 항체에 의하여 이루어지고 세포보다는 혈청내에 존재하며 이러한 항체는 T-cell의 도움을 받아 B-cell에 의하여 생산되며 면역활성세포가 骨髓의 幹細胞에 있다고 한다.¹⁹⁻²¹⁾ 細胞性免疫反應은 주로 T-cell에 의하여 이루어지며 경우에 따라서는 임파구 다형핵백혈구, 대식세포 등도 관계한다.^{20,23)} T cell은 흉선에서 나온후 APC의 MHC에 붙어 있는 항원과 접촉하느냐의 여부에 따라 기능과 수명이 정해진다.²⁴⁾ T cell은 항원의 자극을 받으면 T cell 표면의 receptor(TCR)와 CD3로 이루어진 TCR/CD3 complex가 활성화 되고²⁵⁾ lymphokine이라는 각종 세포장애인자(interleukin-2, interferon 등)를 방출하거나 또는 직접 항원을 찾아내 파괴함으로써 세포성 면역의 중심적 역할을 하며²⁶⁾ surface marker에 의하여 면역촉진 작용을 하는 helper T cell, 면역억제작용을 하는 suppressor T cell과 세포독성을 하는 cytotoxic T cell등 여러 가지 유형으로 나누어지는데 이중 helper T cell이 가장 중추적인 면역구성세포로 알려져 있다. T cell의 감소 및 결손으로 나타나는 질환은 선천성 복합면역부전, 흉선발육부전, 혈액면역계 질환, 신증, 바이러스감염 등이 있다. 항원의 자극을 받지 않은 T cell을 면역학적으로 'naive'하다고 하며 약 6개월 정도의 수명을 가진 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 면역학적으로 naive T cell이 장기간 생존하기 위해서는

self MHC II molecule과 끊임없이 접촉하는 것이 필수적이다.^{28,29)} T cell중 CD4+ T cell은 항원페티드를 결합한 class II 분자의 자극을 받으면 다양한 interleukin을 분비해 면역을 증강시키기 때문에 helper T cell이라고 부른다. CD4+ T cell은 세포표면에 그 개체만이 독특하게 가지는 구조적 적합성 단백질인 CD4를 인식하는 수용체를 가지고 있으며 보조 T cell이라고도 한다 이 세포는 항원을 인식하면 면역분비물질들을 분비하여 T cell의 생산 근거지인 clone을 자극하여 T cell 분화를 활발하게 하고 B cell을 자극하여 항체를 많이 만들어 분비하게 하는 중요한 면역능력을 발휘한다. 최근 연구에 의하면 면역능력이 떨어진 상태에서는 혈액에서 얻은 표면 CD4+ T cell의 수가 줄어들어 있다는 보고³⁰⁾가 있어 이 측정이 면역능력의 저하와 그에 따른 치료약물 및 투여 여부 치료시기를 결정하는 근거로 인정되고 있다.^{31,32)}

清上補下湯은 1615년에 저술된 巢의 壽世保元³⁾에 최초로 수록되어 있는 清上補下丸을 湯劑로 복용할 수 있도록 조제한 方劑로서 주로 上氣 喘息 咳嗽 痰涎壅盛에 이용³³⁻³⁵⁾되는데 肺 腎의 呼吸機能不足 및 痰으로 인한 哮喘症에 활용할 수 있고 실제 임상에서 慢性呼吸器疾患 치료에 사용하여 좋은 효과를 보고 있다.⁴⁶⁾ 清上補下湯은 補陰之劑의 대표방인 六味地黃湯에 補肺祛痰시키는 天門冬 麥門冬을 가하고 清肺祛痰 眞咳시키는 桔梗 杏仁을 가하고 收斂精氣 止嗽滋補하는 五味子를 가하고 清肺熱而消痰시키는 黃芩 黃連을 가하고 潤燥祛痰시키는 貝母를 가하고 行氣行血하는 枳實을 가하고 清肺熱 行氣시키는 半夏 瓜蒌仁을 가하고 調和解毒시키는 甘草를 가하였다.³⁶⁻³⁸⁾ 清上補下湯 구성약물의 氣味와 효능^{39,40)}을 살펴보면 熟地黃은 滋陰 補血하여 血虛 陰虛한 증상과 陰虛로 인한 咳嗽 喘息을 치료하며 山藥은 補脾胃 益肺腎하여 脾虛로 인한 泄瀉와 肺脾陽虛하여 痰多한 증상을 치료하며 山茱萸는 補益肝腎 澀精 斂汗하여 腎虛한 증상이나 氣血兩虛한 子宮出血 止汗에 쓰인다. 白茯苓은 利水滲濕 健脾和胃 寧心安神하여 水腫이나 痰飲 및 健脾에 사용한다. 牡丹皮는 清熱 涼血 活血去瘀하고 發熱 盜汗 自汗에 사용하고 혈압강하하는 작용도 있다. 澤瀉는 利水 滲濕 清熱하고 腎炎이나 脚氣의 水腫과 遺精 滑精 眩暈등에 사용된다. 五味子는 斂肺滋腎 生津斂汗 澀精 止瀉하여 虛汗의 호흡근단이나 咳嗽 慢性泄瀉 神經衰弱에 사용한다. 麥門冬은 潤燥生津 化痰止咳하여 潮熱의 咳嗽 熱性 疾患에 사용하고 天門冬은 滋陰潤燥 清熱化痰하여 虛熱의 咳嗽 肺痿 肺癰에 사용한다. 貝母는 潤肺化痰 清熱하여 咳嗽 上氣 肺痿 肺癰을 치료하고 瓜蒌仁은 滯熱化痰 利氣通便하여 胸痛 胸痺 便秘를 치료한다. 杏仁은 潤肺止咳 潤腸通便하여 喘息과 便秘의 常用藥이며 半夏는 除濕化痰 潤肺平喘하여 咳逆 喘 痰涎壅盛을 치료한다. 枳實은 破氣行痰 止喘하여 嘔逆咳嗽을 치료하며 桔梗은 清肺提氣 祛痰排膿하여 感冒 上氣道感染 氣管支炎 肺炎 咽喉炎 등에 사용된다. 黃芩은 清熱燥濕 寫火解毒 安胎하여 肺熱로 인한 咳嗽 임신중 下腹部痛 肝陽上亢 증상이 있을 때 사용하고 黃連도 清熱燥濕寫火解毒 및 肝胃不和로 인한 嘔吐와 濕熱로 인한 泄瀉에 사용한다. 甘草는 補脾益氣 清熱解毒 潤肺止咳하여 약성을 조화하고 健脾益氣하며 清咳 燥咳에 사용한다.

본 연구의 목적은 면역개념이 韓醫學의 腎機能의 역할과 관

련되는지 확인하고자 cytotoxic T cell과 helper T cell로서 면역능력을 평가하고 清上補下湯이 T cell에 영향을 미쳐 Th1 cell을 선택적으로 활성화시키고 Th2 cell을 억제시키는지 확인하고자 하는 것이다. 韓醫學에서 病因은 외인성 및 내인성으로 나누듯이⁴¹⁾ 면역학에서 해로운 물질은 외부에서 침입한 항원이거나 개체가 self를 제대로 인식하지 못해 생기는 내인성 물질이 된다. 인체의 精氣 腎氣의 기능 중의 하나는 이러한 개체의 병리반응을 교정하는 것도 포함될 수 있으며 본 연구에서는 精氣 腎氣를 돕는 六味地黃湯을 기본방으로 한 清上補下湯을 대상으로 하여 병리적 현상을 항상 모니터링하는 면역세포의 유지와 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 비장 임파구에 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 세포생존율을 확인한 결과 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않음으로써 清上補下湯 추출물이 mitogen으로서 비장임파구를 자극하지는 않는 것이 확인되었다. 전체 비장 임파구중 清上補下湯 추출물이 CD+ T cell의 구성에 영향을 주는지 확인하기 위해 activation 시킨 후 CD69의 표면표식을 확인한 결과 清上補下湯 추출물 투여 농도에 따라 T cell 증식능이 다소 저하된 것이 확인되었다. 清上補下湯 추출물이 주변의 APC가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell의 생존에 영향을 미치는지를 확인한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. CD4+ T cell을 분리하여 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 CD 69의 표면표식을 확인한 한 결과 清上補下湯 추출물을 1 μ g/ml 투여하였을 때 T cell 활성이 다소 증가하였다가 5 μ g/ml 일 때는 감소하는 것으로 나타났다. 한편, CD4+ T cell을 분리하여 清上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양한 후 cytokine mRNA 발현량을 RT-PCR을 통하여 확인하여 본 결과 IL-2, IL-2R α , INF- γ 는 대조군에 비하여 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며, IL-4는 감소하는 경향을 보였다. 특히 Th1이 분비하는 INF- γ 가 증가하고 Th2가 분비하는 IL-4가 감소하는 것을 볼 때 清上補下湯은 CD4+ T cell의 면역능력을 증가시키며 또한 Th1 response는 증가시키고 Th2 response는 억제하는 것으로 사료된다. 沈¹⁾이 언급한 것처럼 補腎藥은 신경내분비와 면역 통계상 균형을 유지하는데 강력한 조절작용과 老化를 완화시키는 작용이 있다고 했으며 또한 免疫의 개념은 韓醫學의 五種勢力的 臟腑概念 중 腎機能系의 역할로 설명된다¹⁹⁾고 하였으며 본 실험에서 精氣와 腎氣를 돕는 것을 기본으로 하는 清上補下湯의 실험결과로 볼 때 면역개념이 한의학적 腎氣能의 역할과 관련되는 것으로 사료된다.

결론

저자는 면역개념이 韓醫學의 腎機能의 역할과 관련되는지를 확인하고자 cytotoxic T cell이나 helper T cell로서 면역능력평가를 행하고, 동시에 慢性呼吸器疾患에 많이 쓰이는 清上補下湯이 Th1 cell을 선택적으로 활성화시키고 Th2 cell을 선택적으로 억제시키는지 확인하고자 본 연구를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

비장 임파구에 淸上補下湯 추출물을 농도별로 투여한 후 48 시간 배양하여 세포생존율을 확인한 결과 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않음으로써 淸上補下湯 추출물이 mitogen으로서 비장임파구를 자극하지는 않는 것이 확인되었다. 전체 비장 임파구중 淸上補下湯 추출물이 CD4+ T cell의 구성에 영향을 주는지 확인하기 위해 activation 시킨 후 CD69의 표면표식을 확인한 결과 淸上補下湯 추출물 투여 농도에 따라 T cell 증식능이 다소 저하된 것이 확인되었다. 淸上補下湯 추출물이 주변의 APC가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell의 생존에 영향을 미치는지를 확인한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었으며 다만 TCR specific activation을 유도하기 위하여 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 저농도에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가하다가 고농도에서는 저하되는 것으로 나타났다. CD4+ T cell을 분리하여 淸上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간 배양한 후 CD 69의 표면표식을 확인한 한 결과 淸上補下湯 추출물을 1 μ g/ml 투여하였을 때 T cell 활성이 다소 증가하였다가 5 μ g/ml 일 때는 감소하는 것으로 나타났다. CD4+ T cell을 분리하여 淸上補下湯 추출물을 농도별로 투여하고 72시간 배양한 후 cytokine mRNA 발현량을 RT-PCR을 통하여 확인하여 본 결과 IL-2, IL-2R α , INF- γ 는 대조군에 비하여 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며, IL-4는 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 淸上補下湯 추출물이 mouse CD4+ T cell의 면역능력을 증가시키는 한편 Th1 response는 증강시키고 Th2 response는 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (00-PJ9-PG1-CO02-0003)

참고문헌

1. 沈自尹, 腎虛與衰老的研究, 중의잡지, 10:57-59, 1987.
2. 許謹, 金完熙, 申玟圭, 免疫과 腎藏精의 相關關係에 關한 實驗的 研究. 동의생리학회지 4:83-99, 1992.
3. 龔延賢, 壽世保元, pp.146-147, 중국의학출판사, 북경, 1993.
4. 朴光恩, 淸上補下湯이 燥熱한 公기로 誘發된 實驗的 呼吸器 損傷에 미치는 영향, 경희대학교대학원 박사논문, pp.1-48, 1998.
5. 朴光恩, 許勝喆, 鄭昇紀, 李珩九, 哮喘證에 대한 淸上補下湯의 임상적 관찰, 제8회 國際東洋學術大會論文抄錄集, pp.288-289, 1995.
6. 孫鍾國, 淸上補下湯 및 淸上補下湯加鹿茸이 실험적 肺損傷에 미치는 영향, 大韓韓醫學會誌, 14(2):216-228, 1993.
7. 鄭昇紀, 淸上補下丸이 O₃ 및 CCl₄로 인한 白鼠에 미치는 영향, 경희대학교, 2(1):119-127, 1986.
8. 鄭熙才, 淸上補下湯 및 淸上補下湯 합 三子養親湯이 SO₂에 의한 흰쥐의 호흡기 손상에 미치는 영향, 경희한의대논문집,

- 20(1):90-115, 1997.
9. 權赫星, 哮喘證에 대한 임상적 관찰, 국제동양의학학술대회 발표논문집, p259, 1995.
10. 김영신, 淸肌散과 淸肌散加味方이 항알레르기과 免疫反應에 대한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 박사논문, 1990.
11. 김영대, 蘇子降氣湯 및 蘇子導痰降氣湯이 I형 및 IV형 알레기반응과 폐혈전 색전에 미치는 영향에 관한 비교연구, 경희대학교 대학원 석사논문, 1992.
12. 김윤범, 藿香正氣散과 藿香正氣散加味方이 위장관 기능 및 항알레르기에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌 13(1):9-23, 1993.
13. 河大有, 初回 항원자극을 받은 모체로부터 출산된 신생마우스의 면역학적 기억, 대한 면역학회지 8(2)101-102.
14. 尹吉榮, 東醫學方法論研究, p70, 성보사, 서울, 1983.
15. 金完熙, 臟腑生理學, pp.202-221,260. 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 서울, 1983.
16. 洪元植 編, 精校皇帝內經 素問, p.20,34. 동양의학연구소, 서울, 1981.
17. 朴聖福, 腎과 隨의 相關關係에 대한 實驗的 研究, 경희한의대 논문집 4:295-300, 1981.
18. 上海中醫學院 編, 中醫學基礎, 商務印書館, 1979.
19. 傅方, 中醫 免疫思想 及成就, 中醫雜誌, 25(11):56, 1984.
20. 李淵臺 譯, 最新免疫學, p.34, 집문당, 서울, 1985.
21. 閔昌弘, 最新衛生物學, pp.79-137, 고문사, 서울, 1978.
22. 李東炫, 防風通聖散 및 防風通聖散加味方이 항알레르기과 면역반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사논문, 1990.
23. 裴延樺, 小兒補血湯, 加味小兒補血湯 및 加減小兒補血湯이 생쥐의 면역반응에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사논문, 1989.
24. Tough DF, Sun S, Zhang X, Sprent J, Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. Immunol Rev. 170:39-47, 1999.
25. Cantrell D, T cell antigen receptor signal transduction pathways, Annu Rev Immunol. 14:259-74, 1996.
26. Akbar AN, Salmon M, Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. Immunol Today 18:72-6, 1997.
27. Vella A., Teague T. K., Ihle J., Kappler J., Murrack P., Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cell: stat6 is probably not required for the effect of IL-4, J Exp Med 186:325-30, 1997.
28. Boursalian TE, Bottomly K, survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu, J Immunol 162:3795-801, 1999.
29. Clarke S. R., Rudensky A. Y., Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4+ T cell in the absence of self peptide : MHC complexes, J Immunol. 165:2458-64, 2000.
30. 이봉기, 최인홍, 박전환, 심우남, 김형일, 이성락, 베체트 증후

- 군 환자에 있어서 세포성 면역에 관한 연구, 대한면역학회지 10(1):1-11, 1988.
31. Afzelius P, Nielsen SD, Hofmann B, Nielsen JO, The serotonin analogue buspirone increases the function of PBMC from HIV-infected individuals in vitro, Scand J Infect Dis. 29(2):117-120, 1997.
32. 조영걸, 김유겸, 조근제, 최민호, 신영오, 김능수, HIV 감염자의 CD4 세포 수 감소에 따른 기회감염병 발생을, 대한면역학회지 16:245-253, 1984.
33. 柳基遠, 診療와 優秀處方, p.130. 성보사, 서울, 1992.
34. 尹吉榮, 東醫臨床方劑學, p.326. 명보출판사, 서울, 1994.
35. 申載鏞, 方藥合編解說, pp.51-52. 성보사, 서울, 1991.
36. 李時珍, 本草綱目, pp.400,414,447,453,456,468,603,693,718,735,742,781,958,988,1188,1196, 고문사, 서울, 1993.
37. 李珩九, 鄭昇杞, 東醫肺系內科學, pp.68,187-202, 아트동방, 서울, 1996.
38. 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九, 化痰止咳平喘藥의 효능에 관한 東西醫學的 문헌고찰, 大韓韓方內科學會誌 15(2):281-289, 1995.
39. 李龍城, 經藥分類典, pp.44,47,49,50-67, 수문사, 서울, 1979.
40. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 한약임상응용, p.130,258,412,414,429,431,497,500,515,528, 성보사, 서울, 1982.
41. 文濬典, 東醫病理學, pp.23-25, 고문사, 서울, 1990.