

전사인자의 핵 전이 억제를 통한 영계출감탕의 면역 억제 효과

홍철희 · 김남권 · 이수형 · 두인선 · 황충연 *

The Immunosuppressive Effect of Younggaechulgam-tang through Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor

Chul-hee Hong · Nam-kwen Kim · Soo-hyeong Lee · In-sun Du · Chung-yeon Hwang

Younggaechulgam-tang has been used for treating skin diseases. In this study, I investigated the immunosuppressive effect of Younggaechul-tang in the human T cell line MOLT-4 cells. MOLT-4 cells were stimulated with the phytohemagglutinin (PHA) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + A23187. The secretion appeared to be greater when cells were stimulated with PHA than with PMA + A23187. Younggaechulgam-tang had no affect proliferation stimulated by PHA. I showed that IL-2 secretion and expression by PHA stimulated MOLT-4 cells were inhibited by Younggaechugam-tang treatment. Maximal inhibition rate of IL-2, TNF- α secretion was 80% and 30%, respectively. Younggaechulgam-tang also inhibited nuclear translocation of p65 subunit of nuclear factor- κ B and nuclear factor of activated T cells (NFAT). In conclusion, these results suggest that Younggaechulgam-tang may contribute to the immunosuppressive oriental drug clinically.

서론

苓桂朮甘湯은 漢代(AD 219) 張景岳의 《金匱要略》에 “病痰飲者 當以溫藥和之, 心下有痰飲 胸脇支滿 目眩 苓桂朮甘湯主之¹⁾”라고 처음 收錄된 以來 많은 醫家들에 의해 胸有痰飲과 短氣를 治療하는 處方으로 인식되었다²⁾. 이후 苓桂朮甘湯은 溫陽化陰, 健脾利水하는 효능으로 鼻噴嚏, 喘息, 氣管支炎, 腎臟炎, 心悸, 慢性腎

* 원광대학교 안이비인후피부과학교실

炎, 皮膚疾患에 應用되어 왔다³⁻⁷⁾.

T세포의 활성화는 면역 담당 세포 표면 분자의 세포간 상호작용과 관련한 복잡한 과정으로, 항원 제공 세포에서 주조직적합복합체 항원과 T 세포 항원 수용체 (TcR)의 결합은 TcR의 신호전달을 자극하여 T 세포 활성화와 사이토카인 (cytokines) 분비를 유도한다²⁸⁾. 이 과정동안 T 세포는 IL-2 수용체와의 상호작용에 의해 T세포의 증식을 촉진하는 성장인자 IL-2를 발현하고, 그것은 또한 IL-2의 활성을 조절한다. 전사인자 NFAT는 IL-2 발현에서 중요한 역할을 한다. 칼시놀린 기질 중 하나인 NFATc는 그 nuclear counter part인 NFATn과 일단 결합한 후 Oct-1, NFkB, AP-1과 마찬가지로 IL-2 promoter/enhancer에 작용하며, transcription factor 들이 결합하여 IL-2 유전자의 전사를 조절한다^{29,30)}. T 세포 활성화에서 NFAT의 관련성 증명은 효과를 증강시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역억제제 개발에 접근할 수 있는 분자적인 기초를 제공한다³¹⁾.

Cyclosporin (CsA), FK506, glucocorticosteroids는 강력한 면역억제제로 장기 이식, 다양한 염증성 질환, 자가면역 질환의 치료에 사용되고 있고, 최근에는 피부질환에도 사용되고 있어 그 사용 범위가 광범해지고 있다³²⁻³⁷⁾. 그러나 이런 면역억제제는 임상에서 많은 부작용을 수반한다³⁸⁾.

蒼桂朮甘湯에 대해 金⁶⁶⁾은 '蒼桂朮甘湯 煎湯液이 心臟 및 腎臟의 機能에 미치는 影響', 金⁶⁷⁾은 '영계출감탕의 간독성에 미치는 영향', 朴⁶⁸⁾은 '영계출감탕의 신기능에 미치는 영향'을 연구하였다. 전사인자에 대해 朴⁶⁹⁾은 '카제인 전사조절부위와 결합하는 자궁조직 전사인자의 특성', 鄭⁷⁰⁾은 'NF-kB Family

Transcription Factors'를 연구하였다.

저자는 영계출감탕이 활성화된 T 세포에서 IL-2분비와 발현, 세포증식에 미치는 영향과 전사인자 NFATc1과 NFkB의 발현에서의 효과를 조사하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 시료의 제조

실험에 사용된 약재는 시중 건재약방에서 규격품을 구입, 정선하여 사용하였다. 복령 (Hoelen) 12g, 계지 (Cinnamormi Ramulus) 9g, 백출 (Atractylodis Rhizoma alba) 6g, 감초 (Glycyrrhizae Radix) 6g을 약탕기에 넣고 800 ml의 증류수를 부은 후 약 3시간 가량 달여 여과하였다. 여과액은 freeze dryer를 이용하여 동결건조 한 후 -20℃에 보관하였다 (Table 1).

2) 시약

RPMI 1640 medium은 Gibco BRL (Grand Island, NY USA)로부터, phytohemagglutinin (PHA)는 Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, UK)로부터, CsA, PMA, avidin-peroxidase, 2,2'-azido-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 기타 다른 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. Anti-human TNF-α/IL-2 antibody (Ab),

Table 1. Prescription of Younggaechulgam-tang.

한약명	생약명	중량(g)
복령	Hoelen	12
계지	Cinnamormi Ramulus	9
백출	Atractylodis Rhizoma alba	6
감초	Glycyrrhizae Radix	6
총량		33

biotinylated anti-human TNF- α /IL-2 Ab, and recombinant human TNF- α /IL-2는 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입했다. NFATc1, NF κ B (p65) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입했다.

3) 세포 배양

인간 T 세포주인 MOLT-4 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 方法

1) MTT assay

세포의 생존 능력을 관찰하기 위하여 MTT assay를 실행하였다. 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 들어간 RPMI 1640에 3X10⁵이 되는 세포를 96 well plate에 plating 한 다음 37°C에서 20시간 동안 배양하였다. 배양된 배지를 버리고 난 다음 신선한 배지를 넣었다. MTT (10 μ l/well : 5 μ g/ml)를 첨가하고 4시간동안 다시 배양한 다음 DMSO 100 μ l로 MTT를 녹인 다음 540nm에서 ELISA reader로 분석했다.

2) IL-2, TNF- α 분비의 측정

MOLT-4세포의 배양액 내에 분비된 IL-2, TNF- α 의 측정은 Scuderi 등⁴⁰⁾이 기술한 방법에 준하여 약간 변형된 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 실시하였다. 즉 anti-human IL-2, TNF- α , capture 단클론 항체를 96-well plate에 1 μ g/ml로 코팅하고 4°C에서 12시간 방치하였다. 코팅 후 비 특이적 결합부위를 막기 위하여 2% bovine serum albumin (BSA)를 함유한 phosphate-buffered saline (PBS)로 구성된 blocking buffer를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척 후 재조합 사람 IL-2, TNF- α 표준액과 각 검체의 배양 상등액을 각 well에 100 μ l씩 부가하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 0.05% tween 20을 함유한 PBS로 4회 세척 후 biotinylated anti-human IL-2, TNF- α 는 1% BSA를 함유한 PBS를 이용하여 0.05 μ g/ml 농도로 희석한 후 well에 처리하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 washing buffer로 7회 세척한 후 avidin-conjugated enzyme을 2.5 μ g/ml 농도로 각 well에 처리한 다음 37°C에서 30분 방치한 후 7회 세척하였다. ABTS 기질액을 각 well에 100 μ l씩 가하여 10 분간 발색을 유도한 다음 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 IL-2, TNF- α 의 양을 측정하였다.

3) RT-PCR analysis

Total RNA는 Easy-blue를 사용하여 사람 T 세포주인 MOLT-4 세포로부터 분리하였다. IL-2 primer는 5' TCA ACT CCT GCC ACA ATG T3'; 5' AGT CCC TGG GTC TTA AGT GAA 3' 이고 β -actin(5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA3'; 5' GTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC3')로 하였다. PCR을 위한 annealing 온도는 60°C, IL-2와 β -actin의 증폭된 단편 크기는 각각 328bp, 661bp이었다. 생성물은 1.5% agrose gel에 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

4) 핵단백질의 분리

핵추출물은 세포를 harvest하여 1 ml의 차가운 PBS로 세포를 씻은 다음, 400 μ l buffer A (10mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)를 넣어 vortex한 다음 15,000 x g로 원심분리하였다. 침전된 핵은 차가운 saline buffer (50 mM HEPES/KOH, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10% glycerol, pH 7.9)로 resuspension한 다음 vortex하고 원심 분리하여 상층액 (nuclear extract)을 얻어 단백질을 정량하였다.

5) IL-2, NF κ B (p65), NFATc1의 Western Blotting

MOLT-4 세포내 IL-2, NF κ B (p65), NFATc1의 단백질 발현 수준을 Western Blotting 방법으로 분석하기 위하여 RIPA(-) lysis buffer (PBS 중 1% triton, 1% deoxycholate 및 0.1% Na₃N 함유)로 세포를

잔 다음 단백질을 얻어 BCA 용액으로 정량하였다. 100 μ g의 단백질을 전기영동한 후 nitrocellulose paper에 전이하고 10% skim milk로 1시간 동안 blocking시켰다. PBS-T (PBS에 0.1% tween 20 함유)로 씻어낸 후, TNF- α 항체를 1시간동안 처리하였다. PBS-T로 씻어낸 후, 2차 항체를 30분간 처리하고 ECL detection 용액으로 확인하였다.

6) 통계학적 분석

실험결과는 mean \pm SE로 표시하였으며 ANOVA-Tukey 분석을 실시하여 실시하여 유의성을 검증하였다.

實驗 結果

1. PHA와 PMA+A23187 자극에 의한 IL-2와 TNF- α 의 분비

특정 자극에 의해 T 세포로부터 IL-2 등의 사이토카인이 분비된다^{40,41}). 저자는 사람 T 세포주인 MOLT-4 세포에 PHA 또는 PMA + Inomycin을 자극하고 24시간 후 상층액에서 IL-2와 TNF- α 양을 ELISA 방법으로 측정하였다. IL-2는 media, PMA+A23187, PHA 자극

에서 각각 0.198 ± 0.009 , 0.239 ± 0.007 , $0.418 \pm 0.089^*$ ng/ml 씩 분비되었다. TNF- α 는 각각 211 ± 14 , 447 ± 98 , $682 \pm 150^*$ pg/ml 씩 분비되었다. IL-2와 TNF- α 의 분비는 PMA + A23187로 자극한 경우에서 보다 PHA 자극에서 더 많이 분비되는 것을 관찰하였다 (Fig. 1, 2).

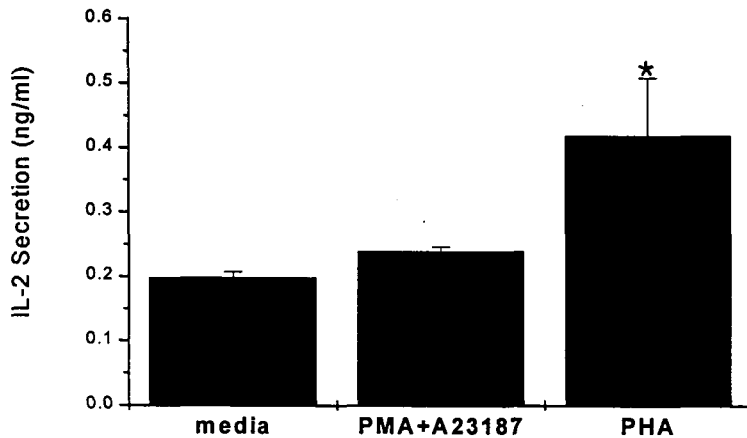


Fig. 1. IL-2 secretion in PHA or PMA + A23187-activated MOLT-4 T cells. Secretion of IL-2 into the cell culture medium by Molt-4 cells stimulated for 24 h with PHA (10 μ g/ml) or PMA+ A23187 (PMA, 20 ng/ml; A23187, 1 μ M) was measured by ELISA. Data are mean \pm SE (N=6). *P<0.05; significantly different from the saline value.

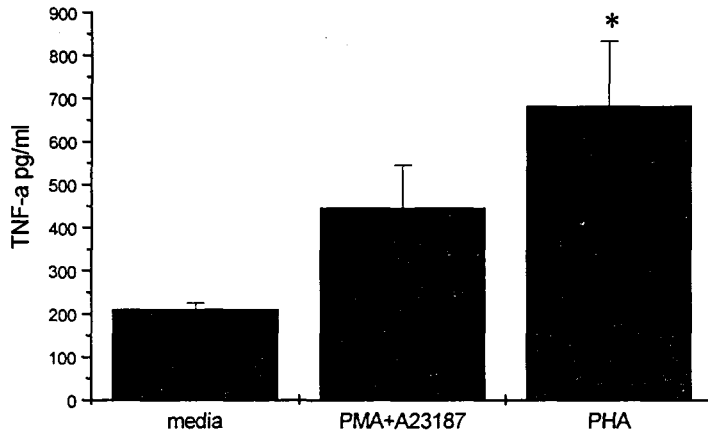


Fig. 2. TNF- α secretion in PHA or PMA + A23187-activated MOLT-4 T cells. Secretion of TNF- α into the cell culture medium by Molt-4 cells stimulated for 24 h with PHA (10 μ g/ml) or PMA+ A23187 (PMA, 20 ng/ml; A23187, 1 μ M) was measured by ELISA. Data are mean \pm SE (N=6). *P<0.05: significantly different from the saline value.

2. 영계출감탕의 PHA 자극에 의한 MOLT-4 세포에서 IL-2, TNF- α 분비 억제 효과

PHA에 의해 자극된 MOLT-4 세포로부터 영계출감탕의 IL-2, TNF- α 분비 조절 효과를 분석하기 위하여, MOLT-4 세포 자극 30분전에 다양한 농도 (0.01-1g/L)의 영계출감탕을 처리하였다. 면역억제제 CsA를 positive 대조군으로 사용하여 같은 조건에서 측정하였다.

배양액 중 분비된 IL-2 단백질을 ELISA 방법으로 측정한 결과 0.01g/L에서는 42.0%, 0.1g/L에서는 69.7%, 1g/L에서는 82.5%로 농도 의존적으로 억제하였다 (Table 2). TNF- α 의 경우 IL-2보다 낮았지만 영계출감탕 1g/L에서 30%정도 억제되었다. 영계출감탕이 MOLT-4 세포의 증식 억제에도 영향을 미치는가를 조사하였으나 영향이 없었다 (data not shown).

Table 2. Inhibitory effect of Younggaechugam-tang on the secretion of PHA-stimulated IL-2, TNF- α in MOLT-4 T cells

Treatment	Concentration mg/ml	Inhibition (%)	
		IL-2	TNF- α
Saline	-		
CsA	0.2	87.6 \pm 3.4*	80.3 \pm 1.3*
영계출감탕	0.01	42.0 \pm 1.7	-
	0.1	69.7 \pm 4.5*	29.1 \pm 0.8
	1	82.5 \pm 1.4*	30.7 \pm 4.7*

PHA-stimulated MOLT-4 cells (3×10^5) were incubated for 24 h in the absence or presence of Younggaechulgam-tang. IL-2 and TNF- α secreted into the medium are presented as the mean \pm SEM of three independent experiments. *P<0.05: significantly different from the saline value.

3. MOLT-4 세포에서 IL-2 발현에 있어서 영계출감탕의 효과

영계출감탕이 PHA에 의해 자극된 MOLT-4 세포로부터 IL-2 발현에 미치는 효과를 RT-PCR과 western blotting 방법으로 조사하였다. Fig. 3에 나타난 것처럼 자극하지 않은 MOLT-4 세포는 IL-2 mRNA가 거의 발현되지 않았다. 대조적으로 PHA에 의해 자극된

MOLT-4 세포는 IL-2 mRNA 발현이 증가하였다. 반면에 영계출감탕과 CsA 처리군은 IL-2 mRNA 발현이 억제되었다 (Fig. 3).

IL-2 mRNA 합성의 억제는 western blotting에서 보여준 것처럼 IL-2 단백질 발현 억제와 같은 양상의 결과를 보여줬다 (Fig. 4).

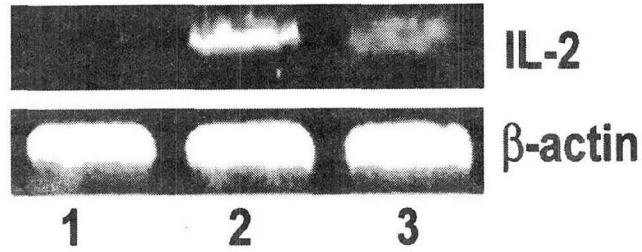


Fig. 3. Inhibition of IL-2 expression by Younggaechulgam-tang. Molt-4 cells were pretreated with Younggaechulgam-tang for 30 min then stimulated with PHA (10 μ g/ml) for 24 h. Total RNA was isolated and analyzed using a RT-PCR for expression of IL-2 mRNA. Lane 1, control; Lane 2, PHA; Lane 3, PHA plus Younggaechulgam-tang (1 mg/ml).]

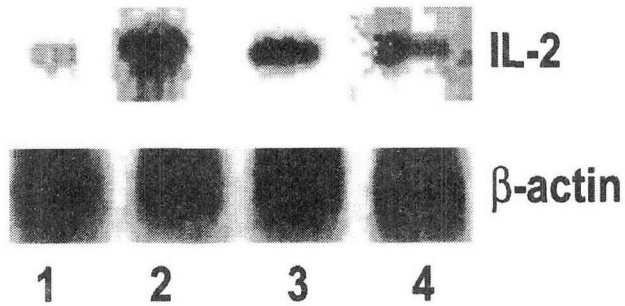


Fig. 4. Inhibition of IL-2 expression by Younggaechulgam-tang. MOLT-4 cells were pretreated with Younggaechulgam-tang for 30 min and then stimulated with PHA (10 μ g/ml) for 18 h. IL-2 protein expression was also analyzed by western blotting. Lane 1, control; Lane 2, PHA; Lane 3, PHA plus CsA (0.2 mg/ml); Lane 4, PHA plus Younggaechulgam-tang (1 mg/ml).

4. NFκB/Rel A와 NFATc1의 translocation에 서 영계출감탕의 억제 효과

IL-2 유전자 전사는 NFκB, NFAT와 같은 transcription factors 의존적이다. 이러한 transcription factor의 활성화는 TcR과 다른 costimulatory receptor에 의해 조절되는 칼슘 의존적 또는 비 의존적인 신호전달경로에 의해 이루어진다. PHA도 어느 정도 이런 경로를 반

복한다. 영계출감탕이 이러한 신호전달에 영향을 주는지 더 잘 이해하기 위해, PHA로 자극된 MOLT-4 세포에서 영계출감탕이 IL-2 transcription factor에 미치는 효과를 조사하였다. 영계출감탕은 NFκB/Rel A, NFAT 모두 핵 이동을 억제하였다. (Fig. 5).

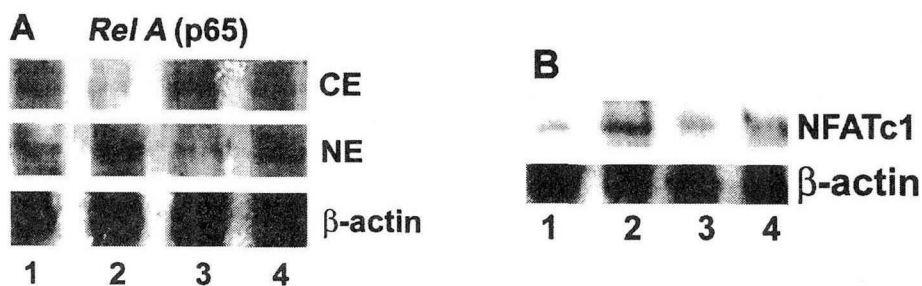


Figure 5. Inhibition of nuclear translocation of Rel A (A) and NFATc1 (B) by Younggaechulgam-tang. MOLT-4 cells were stimulated with PHA for 3 h at 37°C. Some cultures were stimulated in the presence of 0.2mg/ml CsA, 1 mg/ml Younggaechulgam-tang. Following the 3 h incubation, nuclear proteins extracted as described previously.

고찰

苓桂朮甘湯은 漢代(AD 219) 張景岳의 《金匱要略》에 “病痰飲者 當以溫藥和之, 心下有痰飲 胸脇支滿 目眩 苓桂朮甘湯主之¹⁾”라고 처음 收錄된 以來 痰飲을 治療하는 處方으로 應用되어 왔다.

痰飲이란 體內的 過多한 水分이 一部分에 停聚하여 生成된 穢濁한 膠液性 水毒으로서 一種의 非生理的인 分泌物을 意味한다⁷⁾. 仲景의 金匱要略에서 처음으로 痰飲·溢飲·懸飲·支飲 등으로 說明하여 痰飲을 最初로 始作하였다⁸⁾. 張介賓(景岳)의 景岳全書에서는 痰과 飲을 具體的으로 區分하여, 飲은 水液之屬으로 清澈하고 水穀之餘가 停積不行하여 腸胃에 停滯되어 嘔吐清水, 胸腹膨滿, 吞酸噯腐, 漉漉有聲 등의 症狀을 나타내는 것이고, 痰은 本이 氣血津液인데 化失其正하여 痰을 이루게 되어 無處不到한다고 하였다^{9,10)}. 痰이라는 것은 津液이 열을 받아서 생긴 것이다. 열이 혼증을 받아 津液이 걸쭉하게 흐려진 것이다. 飲이란 마신 물이 잘 퍼지지 못해서 생긴 것이고, 痰은 화가 혼증하여 생긴 것이다²⁾. 內經에서는 濕氣가 流行하는 時期의 季節·氣候環境에 따라 外因이 作用하여 痰·飲病이 發生하고 皮膚가 枯魚之鱗과 같은 것도 水邪가 體內部에 溢飲하여 밖으로 보인 것이라고 하였다¹¹⁾.

朱^{12,13)}는 南陽活人書에 “中脘有痰 亦令人憎寒發熱 惡風自汗 胸膈痞塞 有類傷寒, 但頭不痛 項不強爲異耳”라고 하였고 또한 李¹⁴⁾는 炎症의 初期症狀은 頭痛 發熱 등으로 外感表證과 類似하고, 오래 되면 潮熱 咳嗽夜重 등으로 內傷陰火症과 類似하고, 痰飲이 流注하면 肢節疼痛하

여 風證과 類似하나, 痰證은 胸滿 食減 肌色如故 脈滑하되 不均不定한 것이라 하여 임상상의 유용한 感別진단법을 출한 것을 볼 수 있다.

痰의 根源이 脾腎에도 있다고 하여 “痰之本 水也 原于腎하고, 痰之動濕也 主于脾한다¹¹⁾.”라고 했다. 李¹⁴⁾는 痰은 胞絡에 潛伏했다가 嗽를 따라 氣管支로부터 나오는 것이고, 涎은 脾元(脾臟의 根源)에 潛伏했다가 口角으로부터 나오는 것이고, 飲은 胃腑에서 생겼다가 食道를 通해 吐出되는 것이다라고 했다. 痰飲의 成因에 對하여 戴(戴思恭 : 訂治要訣) 嚴(嚴用和 : 濟生方) 등은 氣의 順行이 阻害되면 津液도 따라서 流通이 안되고 멎쳐서 痰이 되거나, 水飲이 胸部에 停滯하여 痰이 된다고 하였다.

痰飲은 現代醫學的으로는 水分代謝의 失調나 血管透過性的 增大, 혹은 각종 炎症 등에 수반되어 體內에 貯溜된 異常水液으로써 胸水, 腹水, 胃腸管內的 水分貯溜, 氣道內的 分泌物, 浮腫, 淋巴腺腫瘍 등이 痰飲의 範疇에 屬한다^{15,16)}. 最近에는 慢性氣管支炎 胸肋膜炎 肺炎 등 呼吸器疾患, 慢性胃炎, 胃潰瘍, 胃下垂, 初期胃炎 등 消化器疾患, 心肺性浮腫 心囊水腫 高血壓 心內膜炎 狹心症 心筋梗塞 등 循環器疾患과 內分泌疾患 등에도 痰飲을 治療하는 藥物이 應用되고 있다¹⁵⁾. 虞¹⁷⁾ 李¹⁴⁾ 槽¹⁸⁾ 周¹⁹⁾ 王²⁰⁾ 등은 痰飲의 症狀을 口腔 및 咽喉科症狀(口燥, 咽乾, 口糜舌爛等), 鼻 및 耳科症狀(鼻塞 또는 鼻聞焦臭, 噴嚏連發, 耳鳴), 呼吸器系統症狀(勞瘵, 喘嗽, 肺癰, 呼吸難任, 噴嚏連發) 등과 聯關시켰다. 痰飲은 咳嗽時에 排出되는 痰液 則 喀痰(Sputum)으로, 西醫學에서는 顯微鏡所見으로 疾病을 診斷하는데, 顯微鏡으로 觀察하면 痰液屬에는 粘液絲와 粘液球, 血球-白血球 및 白膿球, 病細胞, 彈力纖維, 肺組織小片과 纖維性凝

固物, 脂肪結晶, 胞蟲, 肺二口蟲, 細菌-結核桿菌 등을 볼 수 있다²¹⁾. 現代에 와서는 外感과 飮食傷으로 因한 脾肺腎의 功能失調로 痰飲이 産出되는 것으로 說明하고 있다^{22,23)}.

茯苓桂枝白朮甘草湯方은 “傷寒若吐若下後心下逆滿氣上衝胸起則頭眩脈沈緊發汗則動經身爲振振搖者茯苓桂枝白朮甘草湯主之. 陽不足者補之以甘茯苓白朮生津液而益陽也. 裏氣逆者散之以辛桂枝甘草行陽散氣.”²⁴⁾라고 하였다.

茯苓은 味甘性平하고 心·脾·肺經으로 歸經한다. 약리는 이뇨 작용, 항균 작용, 소화기에 대한 작용, 강혈당 작용이다. 습을 제거하고 물을 배출시키며 脾를 유익하게 하고 胃를 조화시키며 마음을 안정시킨다. 소변이 잘 나오지 않는 증상, 水腫脹滿, 痰飲咳逆, 嘔噦, 설사, 유정, 淋濁, 경계, 건망을 치료한다. 계지는 味辛甘性溫하고 膀胱·腎·肺經으로 歸經한다. 약리는 항균 작용, 항바이러스 작용, 이뇨 작용이다. 發汗解肌, 溫經通脈하는 효능이 있다. 風寒表證, 어깨와 등, 팔다리의 마디뼈가 시큰시큰 쭈시고 아픈 병증, 胸痺痰飲, 무월경으로 인하여 생긴 癥瘕를 치료한다. 麻黃은 밖으로 발산하고 寒을 제거하며, 皮毛를 전부 깨뜨림으로 발한을 전문으로 하고, 桂枝는 위로 올라가 表邪를 제거하고 營衛를 조화시키므로 解肌한다. 白朮은 味苦甘性溫하고 肺·胃經으로 歸經한다. 藥理는 이뇨 작용, 혈당 강하 작용, 항응혈 작용, 강장 작용, 항균 작용이다. 脾胃를 보익하고 습한 것을 건조하게 하며 증초를 조화시킨다. 脾胃의 氣가 약하고 식욕이 없으며 倦怠를 느끼고 맥이 없으며 헛배가 부른 증상, 설사, 痰飲, 水腫, 황달, 濕痺, 小便不利, 頭暈, 自汗, 胎氣不安 등을 치료한다. 감초는 味甘性平이고 脾·胃·肺經으로 歸經한다. 약리는 부

신피질 호르몬양 작용, 항염증 및 항알레르기 작용, 소화계통에 대한 작용, 해독 작용, 지질 대사에 대한 작용, 진해 작용, 진통·항경련 작용, 비뇨·생식기계통에 대한 영향, 항종양 작용이다. 和中拘急, 潤肺하고 해독하며 모든 약을 조화시키는 효능이 있다. 구위 쓰면 脾胃허약, 식욕부진, 복통에 의한 便瀉, 勞倦에 의한 발열, 폐결핵에 의한 해수 심계 항진, 驚癇을 치료한다. 생것을 쓰면 목구멍이 붓고 아픈 증세, 소화성 궤양, 癰疽瘡瘍을 치료하며 약물 중독·식중독을 해독한다^{25,26)}.

五苓散을 만든 후에 苓桂朮甘湯이 만들어졌다. 五苓散證은 水飲이 下焦에 內蓄된 것으로, 小便不利, 小腹痛滿 등의 병세가 비교적 위중하여 급히 利水해야 하므로 澤瀉와 茯苓, 猪苓을 배합하여 利水하는 힘을 강화시킨 것이다. 그러나 脾陽이 不振하여 발생한 水飲內停의 증상은 五苓散證보다 비교적 완만하며 그 증상은 咳吐痰涎, 目眩心悸, 혹은 大便이 糖하는데, 이는 中焦에 濕이 阻滯한 것이므로 마땅히 健脾滲濕을 위주로 치료하고 강력한 利水작용은 필요없으므로, 五苓散에서 澤瀉, 猪苓을 제거하고, 茯苓과 白朮은 그대로 두며, 和中하는 甘草를 加하여 苓桂朮甘湯을 만든 것이다. 본 처방은 水飲內停의 증상을 치료하는데 陽虛로 인한 痰飲病에 溫性의 약으로 조화시키는 대표적인 처방이다⁴⁾.

“痰飲의 병이 있을 때는 溫藥으로써 그것을 조정한다.”라는 원칙은 苓桂朮甘湯의 입법 근거 중의 하나이다. 飲은 陰邪로써 그 성질이 응체하는데 寒을 만나게 되면 멎치게 되고 溫을 얻으면 소산되는 특징이 있다. 그러므로 본 처방에서는 茯苓은 君藥으로 健脾滲濕利水하고 祛痰化飲하며, 白朮은 臣藥으로서 健脾燥濕利

水하는데 복령과 배오되어 증초를 은리하여 담의 근원을 끊어 버리고, 桂枝는 佐藥으로 溫陽化氣함으로써 茯苓과 配伍되어 陽氣를 통하게 하고 行氣利水하며, 甘草는 使藥으로서 補中益氣和中하는데 복령과 配伍되면 감초의 甘味가 滿하게 되는 것이 아니라 오히려 滿한 것을 泄하게 한다. 이 처방은 온화하면서도 熱하지 않고 利하면서도 峻하지 않아 痰飲을 치료하는 제일의 방제로 꼽힌다. 네 가지 약을 합하면 溫陽健脾하여 그 근원을 치료하고, 祛濕化痰하여 그 表를 치료하는데 標와 本이 치료되면 痰飲이 제거되는 것이다. “胸脇支滿, 目眩”은 痰飲病의 주요 특징 증상으로써 형성되는 병리기전은 脾陽이 不振하여 水氣가 정체되어 痰飲이 되기 때문이다. 痰飲이 없으면 胸中이 깨끗해지고 清陽이 상승하게 되므로 目眩과 支滿이 모두 낫게 되는 것이다. 苓桂朮甘湯은 溫陽化痰하는 대표적인 名方이다⁴⁾.

본방은 眩暈과 動悸가 있을 때에 쓰이는 처방으로서, 반드시 맥이 沈해야지 浮하면 안되고, 장부에 특별한 질병이 없이 단지 체내 수분의 움직임이 원활하지 못해서 생기는 증상에 쓴다²⁷⁾.

後世諸家들은 苓桂朮甘湯加減方을 陽虛陰盛, 脾失健運, 水飲停積之痰飲病을 治療하는데 使用하였고 溫陽化氣, 健脾利水의 효능이 있고 그 症狀는 水腫, 心悸, 眩暈, 氣短, 咳嗽氣喘, 胸脇脹滿, 下痢 등의 症候를 包括한다. 現代醫學的으로 慢性氣管支炎, 心臟病水腫, 耳源性眩暈, 高血壓眩暈, 神經衰弱, 腦血管疾患, 心悸下垂, 胃下垂, 慢性腎炎, 結膜炎, acetaminophen 유발 간독성과 ANIT 유발 담즙 울체에 대하여 간기능의 개선 효과등에 쓰인다. 藥理作用은 溫化痰飲하여 健胃, 利水, 鎮靜, 強心, 鎮痛 등의

作用을 한다^{5-7,67)}.

저자는 PHA로 자극된 사람 T 세포주인 MOLT-4에서 영계출감탕의 면역억제 효과를 증명하였다. 영계출감탕은 T 세포의 성장 인자인 IL-2의 분비와 발현을 억제하였다. 또한 IL-2 유전자 전사는 NFκB, NFAT 전사 인자에 의존적인 것으로 알려져 있는데, 영계출감탕이 이러한 전사인자의 발현을 모두 억제하는 것을 확인하였다.

면역억제효과는 주로 사이토카인의 분비와 발현의 억제가 중요하나, 최근에는 T 세포의 활성화와 세포증식의 억제에 대해서도 보고되고 있다. 면역억제제는 T 세포 활성화를 강력하게 저해하는 효과를 나타내는데 T 세포와 항원제공세포 사이의 상호작용에 따라 억제 효과가 달라진다. IL-2는 mitogen 또는 alloantigen 자극에 의한 T 세포 증식에 필요한 인자이다⁴²⁾. TcR/CD3 복합체나 CD2경로를 통해 자극된 T 세포 활성화는 FK506에 의해 저해되지만 CD28을 통해 자극된 T 세포 증식 반응은 IL-2나 phorbol ester에 의한 칼슘 비의존형 T 세포 활성화처럼 FK506에 의한 영향을 받지 않는다⁴³⁾. 면역억제제의 작용 기전에 관하여 많은 연구가 보고됐는데, Emmel 등은 PHA + PMA로 자극된 Jurkat T 세포에서 NFAT 부위를 통해 CsA의 면역 억제효과가 매개된다고 보고했다⁴⁴⁾. 또한 PHA와 PMA + Inomycin에 의해 활성화된 Jurkat T 세포에서 caspase-3에 의한 IL-2 분비 조절에 대한 생화학적 기전이 연구되었고 caspase의 억제는 새로운 면역 억제 치료의 가능성을 제시하기도 하였다⁴⁰⁾. CsA, FK506, glucocorticoids, rapamycin 등의 면역억제제는 임상에서 많은 부작용을 수반한다³⁸⁾. Tacrolimus (FK 506; 상품명 Prograf) 이

약은 FK 506 binding protein(FKBP)이라고 하는 immunophilin과 결합하고 이 tacrolimus-FKBP 복합체가 칼슘 및 칼모듈린 의존성 단백질인산화 효소인 calcineurin에 결합하여 그 작용을 방해함으로써 T-세포에서의 신호변환 경로를 차단한다. 부작용은 신독성, 감염의 위험, 임파종, 당뇨병의 발생등이고 가장 흔한 부작용은 진전, 두통, 설사, 고혈압, 오심, 신기능 장애이고 Cyclosporine의 부작용은 치은 비대, 다모증, 당뇨병, 진전, 부정맥, 고지혈증, 고혈압이다⁷²⁾. CsA와 FK506의 신호전달 경로는 서로 유사하다. CsA의 calcineurin-NFAT 경로는 IL-2와 다른 사이토카인 유전자의 전사가 필요하다. IL-2는 항원 상호 작용에 의해 T 세포의 증식을 활성화시키고, 활성화된 T 림프구에 의해 합성되고 분비되는 유도성 단백질이다⁴⁵⁾. 저자는 PHA로 활성화된 T 세포의 증식과 IL-2의 분비와 발현이 영계출감탕에 의해 억제되는 것을 증명하였다. TNF- α 의 분비와 발현도 억제됨을 증명하였다. 최근에 thalidomide에 의한 T 세포와 T 세포 유래 TNF- α 의 조절에 관한 보고는, PMA+Ionophore에 의해 활성화된 MOLT-4 세포에서 thalidomide, dexamethasone에 의해 IL-2와 TNF- α 분비가 억제되었다⁴¹⁾. NFAT의 결합 자리는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, TNF- α , IFN- γ 를 포함하는 몇 가지 사이토카인 유전자 promoter 자리에서 발견됐다²⁹⁾. 다른 transcription factor 들이 다양한 종류의 세포들에 존재하는 반면 NFAT는 활성화된 lymphocyte에서만 발견된다⁴⁶⁾. IL-2 유전자 전사는 NF κ B, NFAT와 같은 전사인자의 활성화에 의존적이다. T 세포 활성에서 NFAT의 증명은 효과를 향상시키고 부작용을 줄일 수 있는 면역억제제를 개발할 수

있는 분자적인 기초 자료를 제공한다. NFAT 단백질은 NFATp, NFATc, NFAT3, NFAT4, NFAT5으로 구성되어 있다³¹⁾. NFATc는 IL-2 유전자의 trans-activation을 수반하는 것으로 알려져 있고⁴⁷⁾, 또한 칼시놀린의 endogenous substrate로서 중요하다⁴⁸⁾. NFATp, NFATc는 IL-2, IL-4 promoter를 강하게 활성화시킨다⁴⁷⁾. NFAT5를 제외한 NFAT의 isoform은 칼시놀린에 의해 활성화되고, 핵안에 존재한다. 마우스에서 NFATp, NFATc, NFAT4 유전자 불활성에 대한 연구는 NFAT가 면역 반응에서 중요한 역할을 함을 제시하였다⁴⁹⁻⁵²⁾. NFATc1의 파괴는 Th2 기능의 손상을 가져오고^{53,54)}, NFATc2의 제거는 T 세포 기능을 증가시킨다^{50-52,57)}. NFAT 단백질은 칼슘/칼모듈린 의존적 인산화효소 칼시놀린의 활성화에 의해 조절되고, 칼시놀린에 의한 NFAT의 탈인산화는 NFAT를 활성화시키고 핵으로 이동을 빠르게 촉진한다⁵⁸⁻⁶⁰⁾. 사이토카인 유전자 발현의 조절인자로 알려진 NFAT transcription factor는 T 세포 분화 조절에 중요한 역할을 한다⁴⁷⁾. NF κ B는 여러 사이토카인들 (IL-1, IL-8, G-CSF, GM-CSF), 세포 부착 단백질 (Intracellular adhesion molecule, endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1), MHC genes, 효소 (nitric oxide synthase, cyclo-oxygenase) 등을 포함하는 염증에 관여하는 많은 유전자를 조절한다. PHA로 자극된 T 세포가 영계출감탕에 의해 NFATc1 발현이 억제되었고 칼시놀린 억제제인 CsA과 같은 결과를 나타냈다. 또한 NF κ B subunit p65 발현도 억제되었다. 본 연구에서 저자는 PHA로 자극된 MOLT-4 세포에서 영계출감탕에 의해 IL-2 분비가 CsA의

억제효과와 유사함을 관찰하였다. 이러한 면역억제제는 생화학적, 유전적으로 잘 알려진 경로를 통해 T세포의 활성을 억제한다⁴³⁾. CsA, FK506, glucocorticoids, rapamycin 등에 의한 T 세포 활성의 억제는 사이토카인과 T 세포 증식을 억제한다⁶¹⁻⁶⁴⁾. 즉시형 과민 반응은 아토피성 알레르기(천식, 비염, 담마진, 습진성 피부염)나 편도선, 아데노이드 및 인체의 비염종(nasal polyp)내에 있는 비만세포에서 잘 일어나는데 모두 IgE의 증가를 보인다⁶⁵⁾. 영계출감탕은 IL-2 단백질과 mRNA 발현을 억제하였을 뿐만 아니라 NFκB, NFAT와 같은 전사인자의 활성도 억제하였다. 또한 활성화된 T 세포에서 영계출감탕에 의한 세포증식에는 영향이 없었기 때문에 영계출감탕은 CsA와 비교하여 부작용이 적고 효과는 좋은 면역억제제로서 임상적 활용이 가능할 것으로 사료된다.

결론

영계출감탕이 면역 억제 효과가 있는지의 여부를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람 T 세포주인 MOLT-4 세포에서 PHA와 PMA+A23187 자극에 의한 IL-2와 TNF-α의 분비는 PHA자극에서 더 많이 분비되었다.

2. 본방이 PHA 자극에 의한 MOLT-4 세포에서 CsA 보다는 못하지만 IL-2, TNF-α 분비를 억제하였다.

3. 본방이 PHA 자극에 의한 MOLT-4 세포에서 IL-2 mRNA 발현을 억제하였다.

4. 본방은 NFκB/Rel A, NFAT 모두 핵 이동을 억제하였다.

이상의 결과는 영계출감탕이 CsA등의 면역억제제와 비교하여 부작용이 적고 효과는 좋아서 鼻噴嚏 및 皮膚疾患등의 면역과민반응에 대해 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, p.153, 154, 391, 392, 1984.
2. 許浚 : 國譯增補 東醫寶鑑, 서울, 남산당, p.32, 99, 1992.
3. 맹용재 : 상한론 개설, 익산, 원광대학교 출판국, p.107, 1996.
4. 宋勇善 : 譯釋 中醫方劑問題, 益山, 圓光大學校 出版局, p.361, 362, 415, 518, 614, 615, 1995.
5. 김갑성외7인 : 實用 東西醫學 臨床總書, 서울, 도서출판 정담, 卷1 p.172, 2001.
6. 裴秉哲 : 標準臨床方劑學, 서울, 成輔社, p.394, 395, 1995.
7. 中山醫學院《中醫方劑選講》編寫組王 : 中醫方劑選講, 廣東, 廣東科技出版社, pp.90~96, 1983.
8. 張機 : 金匱要略, 台北, 文光圖書公司, pp.411~417, 1971.
9. 張介賓 : 景岳全書(上), 서울, 大星文化社, pp.633~647, 1988.
10. 張景岳 : 景岳全書, 台北, 治聯國風出版社, pp.530~533, 中華民國 61年.
11. 洪元植 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院出版部, p.137, 142, 147, 149, 177, 1981.

12. 朱肱 : 南陽活人書(陳夢雷·醫部全錄中), 서울, 成輔社, 卷238, p.435, 1982.
13. 朱肱 : 治人書, 서울, 成輔社, p.6, 1977.
14. 李梴 : 醫學入門(卷4), 上海, 千頃堂書局, p.4, 5, 1989.
15. 鄭遇悅 : 韓方病理學, 益山, 圓光社, pp.58~73, 1985.
16. 伊藤良外 : 漢方臨床入門, 서울, 成輔社, p.58, 59, 1985.
17. 虞博 : 醫學正傳, 서울, 醫藥社, 1973.
18. 槽英 : 醫學綱目, 年代不明.
19. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, p.88, 89, 1975.
20. 王隱石 : 許浚著 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.128, 1976.
21. 辛超群 : 中西醫診斷學·治療學大綱, 台北, 正中書局, p.17, 77, 78, 中華民國 67年.
22. 江蘇新醫院 : 中醫內科學, 北京, 江蘇科技社 pp.25~29, 1982.
23. 具本泓外四人 : 東醫內科學, 富川, 書苑堂, pp.48~53, 1985.
24. 王燕緒 外2人 : 傷寒論注釋(欽定四庫全書) 卷3, 서울, 麗江出版社, pp.734~741, 1988.
25. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 永林出版社, pp.172, 173, 175~178, 250~253, 518, 519, 1989.
26. 강순수 外1人 : 臨床配合本草學, 서울, 永林社, pp.94~97, 101~104, 450~453, 540~543, 1994.
27. 姜珠奉 : 傷寒論·四象醫學 講座, 서울, 경무출판사, p.43, 2001.
28. Chan AC, Desai DM, Weiss A. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1994;12:555-92.
29. Rothenberg EV, Ward SB. A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Sep 3;93(18):9358-65.
30. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995 Jun;7(3):333-42.
31. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakean AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 22;96(13):7214-7219.
32. Palay DA, Cluff CW, Wentworth PA, Ziegler HK. Cyclosporine inhibitS macrophage-mediated antigen presentation. *J Immunol* 1986 Jun 15;136(12):4348-53.
33. Furue M, Katz SI. The effect of cyclosporine on epidermal cells. I. Cyclosporine inhibits accessory cell functions of epidermal Langerhans cells in vitro. *J Immunol* 1988 Jun 15;140(12):4139-43.
34. Hirschberg H, Hirschberg T, Nousiainen H, Braathen LR, Jaffe E. The effects of corticosteroids on the

- antigen presenting properties of human monocytes and endothelial cells. Clin Immunol Immunopathol 1982 Jun;23(3):577-85.
35. Furue M, Katz SI. Direct effects of glucocorticosteroids on epidermal Langerhans cells. J Invest Dermatol 1989 Mar;92(3):342-7.
36. Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Billings JK, Brown MD, Headington JT, Cooper KD, Baadsgaard O, Duell EA, Annesley TM, et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. JAMA 1986Dec 12;256(22):3110-6.
37. Jegasothy BV, Ackerman CD, Todo S, Fung JJ, Abu-Elmagd K, Starzl TE. Tacrolimus (FK 506)--a new therapeutic agent for severe recalcitrant psoriasis. Arch Dermatol 1992 Jun;128(6):781-5.
38. Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Van Thiel D, Armitage J, Jain A, McCauley J, et al. Adverse effects associated with the use of FK 506. Transplant Proc 1991 Dec;23(6):3105-8.
39. Scuderi P, Sterling KE, Lam KS, Finley PR, Ryan KJ, Ray CG, Petersen E, Slymen DJ, Salmon SE. Raised serum levels of tumour necrosis factor in parasitic infections. Lancet 1986 Dec 13;2(8520):1364-5.
40. Mukerjee N, McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK. Caspase-mediated calcineurin activation contributes to IL-2 release during T cell activation. Biochem Biophys Res Commun 2001 Aug 3;285(5):1192-9.
41. Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Ewan PW, Dearman RJ, Kimber I. Selective down-regulation of T cell- and non-T cell-derived tumour necrosis factor alpha by thalidomide: comparisons with dexamethasone. Immunol Lett 1999 Jun 1;68(2-3):325-32.
42. Tsuchida T, Sakane T. Intracellular activation signal requirements for the induction of IL-2 responsiveness in resting T cell subsets in humans. J Immunol 1988 May 15;140(10):3446-9.
43. Kay JE, Benzie CR. T lymphocyte activation through the C28 pathway is insensitive to inhibition by the immunosuppressive drug FK-506. Immunol Lett 1989 Dec;23(2):155-9.
44. Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. Science 1989 Dec 22;246(4937):1617-20.
45. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. J Immunol 1978 Jun;120(6):2027-32.

46. Furman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Molecular actions of cyclosporin A, FK506 and rapamycin. In Thomson AW, Starzl TE, eds, Immunosuppressive drugs: developments in anti-rejection therapy. London: Edward Arnold 1994 p.15-35.
47. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707-47.
48. Mukerjee N, McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK. Caspase-mediated calcineurin activation contributes to IL-2 release during T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 3;285(5):1192-9.
49. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 1996 Apr;4(4):397-405.
50. Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 1996 May 10;272(5263):892-5.
51. Kiani A, Viola JP, Lichtman AH, Rao A. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 1997 Dec;7(6):849-60.
52. Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Bommhardt U, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, Pfeffer K, Muller-Hermelink HK, Schimpl A, Serfling E. Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NFATp-deficient mice. *Eur J Immunol* 1998 Aug;28(8):2456-66.
53. Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW. The transcription factor NFATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998 Jan;8(1):115-24.
54. Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby M, Glimcher LH. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NFATc. *Immunity* 1998 Jan;8(1):125-34.
55. Oukka M, Ho IC, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 1998 Sep;9(3):295-304.
56. Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH. Inhibitory function of

- two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 1998 Nov;9(5):627-35.
57. Heyer J, Kneitz B, Schuh K, Jankevics E, Siebelt F, Schimpl A, Serfling E. Inefficient termination of antigen responses in NFATp-deficient mice. *Immunobiology* 1997 Dec;198(1-3):162-9.
58. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992 Jun 25;357(6380):695-7.
59. Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 1996 May 3;271(18):10884-91.
60. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 1997 Apr 17;386(6626):728-31.
61. Almawi WY, Assi JW, Chudzik DM, Lazarovits AI. Opposing effects of rapamycin and cyclosporin A on activation-induced Ca(2+) release. *Eur J Pharmacol* 1999 Sep 17;381(1):51-6.
62. Almawi WY, Melemedjian OK, Rieder MJ. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant* 1999 Oct;13(5):365-74.
63. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* 1990 Jan 1;144(1):251-8.
64. Salerno A, Bonanno CT, Caccamo N, Cigna D, Dominici R, Ferro C, Sireci G, Dieli F. The effect of cyclosporin A, FK506 and rapamycin on the murine contact sensitivity reaction. *Clin Exp Immunol* 1998 Apr;112(1):112-9.
65. Kurt J. Isselbacher : 해리슨내과학, 서울, 도서출판 정담, p1757, 1997.
66. 김종화 : “苓桂朮甘湯 煎湯液이 心臟 및 腎臟의 機能에 미치는 影響” 1989.
67. 김태희 외2인 : “영계출감탕의 간독성에 미치는 영향”, 생약학회지, 30(1) : pp.12~17, 1999.
68. 박승아 외2인 : “영계출감탕의 신기능에 미치는 영향”, 생약학회지, 31(3) : pp.364~372, 2000.
69. 박상규 외3인 : “카제인 전사조절부위와 결합하는 자궁조직 전사인자의 특성”, 건국자연과학연구지, 제9집(2), pp.281~288, 1998.
70. 정파진 외3인 : “NF-kB Family Transcription Factors”, *Oral Biology Research* Vol.23(1), pp.171~181, 1989.
71. 張仁圭외3名 : “痰飲의 原因·症狀·治

法에 關한 文獻的 考察“ 大韓韓醫學
會誌, 第7卷 第1號, pp.160~169, 1986.

72. 강종명 : 대한신장학회지 제18권 부록 1
호, 1999.