

加味歸脾湯이 생쥐에 Immobilization Stress  
負荷後 血中 Corticosterone과 Histamine  
含量 및 免疫能 變化에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실  
위석, 이승준, 유심근

ABSTRACT

**Effects of *Kamikwibitang* on Serum Levels of Corticosterone and Histamine and Immune Response after Immobilization Stress in Mice**

Seok Wi, Seung-Jun Lee, Sim-Keun Yoo

Department of Oriental Obstetric and Gynecology,  
College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this research was to investigate the effects of *Kamikwibitang* water extract (KKT) on immobilization stress in C57BL/6J mice.

KKT decreased the serum level of histamine and corticosterone increased by immobilization stress. In addition, KKT decreased the cell viability of thymocytes and enhanced the cell viability of splenocytes decreased by immobilization stress. Also, KKT decreased the viability of thymocytes and splenocytes *in vitro*. KKT decreased DNA fragmentation of splenocytes increased by immobilization stress. KKT decreased the population of thymic CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells increased by immobilization stress, and did not affect the population of B220<sup>+</sup> cells and the population of Thy1<sup>+</sup> cells changed by immobilization stress and enhanced the population of splenic CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells increased by immobilization stress. KKT enhanced the production of  $\gamma$ -interferon and did not affect the production of interleukin-2 and interleukin-4 decreased by immobilization stress. Also, KKT decreased the phagocytic activity and the level of nitric oxide decreased by immobilization stress.

These results indicate that KKT may be useful for the prevention and treatment of stress *via* suppression of serum histamine and corticosterone level and enhancement of specific-immune response.

**Key words :** *Kamikwibitang* (KKT), *immobilization stress*, *thymocytes*, *splenocytes*, *immune response*

## I. 緒 論

歸脾湯은宋代嚴<sup>1)</sup>의《濟生方》에 최초로 收載된 處方으로, “治思慮過度 勞傷心脾 健忘 怔忡”이라 하여 思慮過度로 心脾를 傷하여 發生한 健忘, 怔忡을 治療한다고 하였다.

加味歸脾湯은 薛<sup>2)</sup>의 歸脾湯에 疏肝解鬱시키는 效能으로 肝氣鬱結을 다스리는 要藥인 柴胡<sup>3)</sup>와 逆氣를 泄하여 膽火의 鬱을 舒하는 梔子<sup>4)</sup>를 加味한 處方으로, 肝脾鬱怒로 血이 傷하여 月經不通한 境遇<sup>5)</sup>와 平素 情緒가 不暢하거나 憂思鬱怒로 肝氣鬱結하고 疏泄이 失常하여 肝脾不和한 境遇에 活用한다고 하였다<sup>6)</sup>.

肝의 疏泄機能은 情緒活動과 關聯이 있어서 大怒 혹은 情緒의 過度한 抑鬱 등의 精神刺戟으로 疏泄機能이 失調되면 肝氣鬱結의 病變이 나타나고, 木克土하면 肝脾不和하여 肝脾鬱怒 등의 病變이 나타나게 된다<sup>7,9)</sup>. 이는 肝의 疏泄機能이 stress와 密接한 關聯이 있다는 것을 意味하는 것이다. 따라서 加味歸脾湯은 stress에 의해 發生하는 여러 症狀에 效果가 있을 것으로 思料된다.

Stress는 個體 內部的 여러 hormone 등의 變化를 招來하여 免疫機能을 抑制하는 등 免疫系와 密接한 相關關係가 있다고 알려져 있다<sup>10-13)</sup>.

Stress와 免疫反應에 관한 韓醫學的 實驗研究로는 尹 등<sup>14)</sup>의 養心湯이 스트레스와 免疫機能에 미치는 影響과 權 등<sup>15)</sup>의 越鞠丸合補中益氣湯이 免疫機能에 미치는 影響 등이 있으며, 이 등<sup>16)</sup>은 香附子八物湯이 免疫機能 抑制 沮止作用이 있고, 홍 등<sup>17)</sup>은 逍遙散이 histamine과 corticosterone의 量을 抑制하고 免疫能을 恢復시킨다고 報告하였으나 加味歸脾湯이 immobilization stress에 의한 histamine과 corticosterone 함량 및 免疫系에 미치는 影響에

관한 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 思慮過度로 因한 心脾血虛와 全身症狀 및 神經精神疾患에 廣範圍하게 應用되어 온 歸脾湯에, 柴胡와 梔子を 加味한 加味歸脾湯이 stress에 의해 發生하는 諸般 症狀의 豫防과 治療에 效果가 있을 것으로 思料되어, 생쥐에 加味歸脾湯을 經口 投與한 후 immobilization stress를 加하고 血中 histamine 및 corticosterone 量과 immune system의 變化를 觀察하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### 1) 實驗動物

本 實驗에 使用한 mouse는 C57BL/6J계 수컷 18±2 g을 대한실험동물(주)에서 購入하여 溫度 20±3 °C, 濕度 50±5%, dark/light 12 시간의 條件下에서 1週日 以上 實驗室에 適應시킨 후 使用하였으며, 固形飼料과 물을 자유스럽게 攝取하도록 하였다.

#### 2) 試藥 및 器具

實驗에 使用한 試藥은 phospho-cellulose powder, orthophthal aldehyde는 Wako Co., histamine · 2HCl, corticosterone, Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), propidium iodide, penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Co., mouse γ-IFN immunoassay kit, mouse interferon-2(IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon sei-yaku Co. 등을 使用하였으며, 其他 試藥은

cell culture용 및 1급 試藥을 使用하였다. 使用器具는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator(Vision scientific Co.), inverted microscope(Nikon Co.), freeze dry apparatus(Ilsin Co.), flow cytometer(Coulter EPICS-XL), spectrofluorometer (Kotron Co.) 등을 使用하였다

## 2. 實驗方法

### 1) 檢液의 調劑

본 實驗에 使用한 加味歸脾湯의 構成은 《東醫寶鑑》<sup>18)</sup>에 準하였으며, 藥材들은 圓光大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 購入한 후 良質의 것을 精選하여 使用하였고 그 內容과 分量은 다음과 같다.

#### # 加味歸脾湯(KKT)의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
龍眼肉	Longanae Arillus	4
酸棗仁(炒)	Zizyphi Spinosi Semen	4
遠志	Polygalae Radix	4
人蔘	Ginseng Radix Alba	4
黃芪	Astragali Radix	4
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4
白茯苓	Hoelen Alba	4
木香	Saussureae Radix	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.2
柴胡	Bupleuri Radix	4
梔子	Gardeniae Fructus	4
生薑	Zingiberis Rhizoma	5
大棗	Zizyphi Fructus	2
Total		50.2

處方 3貼 分量을 증류수 2,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 濾過하여 여과액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 加味歸脾湯 분말 41.5g(이하 KKT라 함)을

얻어, 동물실험 시에는 생리식염수에 溶解시켜 使用하였다.

### 2) Immobilization stress 부하

생쥐 1群을 5마리로 하여 normal군(正常群) 및 control군(stress 부하군)에는 생리식염수만을, 實驗群에는 KKT 500 mg/kg을 經口로 1회 투여하고 1시간 후에 생쥐를 플라스틱 원통에 넣어 움직이지 못하게 하여 15시간 동안 immobilization stress 를 가한 후 즉시 도살하였다(Fig. 1). 또한 반복투여 실험에서는 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 經口投與한 후 同一한 實驗을 실시하였다.



Fig. 1. Experimental condition of immobilization stress mice for 15 hours.

### 3) 혈청 중 histamine 함량 측정

Immobilization stress 를 가한 생쥐를 斷頭하여 얻은 혈액을 원심분리(3,000 rpm, 10 mins)하여 혈청을 얻었다. 혈청 1 ml당 0.4N-HClO<sub>4</sub> 2.5 ml를 가하여 단백질을 제거한 후 격렬하게 진탕하고 원심분리(3,000 rpm, 5 mins)하여 상층액을 분리하였다. 미리 활성화시킨 phospho-cellulose powder를 3 × 0.6 cm column에 충전한 후 0.03M-phosphate buffer 와 0.06M-phosphate buffer로 차례로 세척한 다음 물로 세척하고 0.1M-borate buffer를 histamine 용출용매로 사용하여 용출시켰다. 용출액 3 ml에 orthophthal aldehyde 0.2 ml를 가하여 spectrofluorometer(excitation: 350 nm, e-

mission: 444 nm)로 형광을 측정하여 표준 histamine 검량선에 의해 정량하였다<sup>19)</sup>.

#### 4) 혈청 중 corticosterone 함량 측정

동일한 방법으로 얻은 혈청 중 corticosterone 함량은 Zenker 등의 방법<sup>20)</sup>에 準하였다. 즉 혈청 0.3ml에 증류수 0.7ml를 넣어 혼합하고 chloroform 10ml를 가하여 15초 이상 격렬하게 진탕한 다음 원심분리(2,500 rpm, 5 mins)하여 상층액을 제거하였다. 다시 chloroform층을 0.1N-NaOH 용액 1 ml로 세척한 다음 원심분리 후 상층액을 분리 제거하였다. 세척한 chloroform층 9 ml에 형광시액(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 50% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 2.4 : 1) 3 ml를 가한 다음 15초 이상 격렬하게 진탕하였다. 원심분리(2,500 rpm, 5 mins)한 후, 상층의 chloroform층을 완전히 제거하고 잔류액을 2시간 동안 발색시킨 후 spectrofluorometer(excitation: 470 nm, emission: 520 nm)로 형광을 측정하여 표준 corticosterone 검량선에 의해 정량하였다

#### 5) 세포분리

Immobilization stress를 가한 생쥐의 흉선 및 비장을 분리하여 세포현탁액을 Wysocki<sup>21)</sup> 및 Mizel<sup>22)</sup> 등의 방법을 이용하여 조제하였다. 즉 생쥐를 경추탈골하여 도살한 후, 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음(1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다.

Macrophage의 분리는 stress를 가하기 3일 전에 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하여 실험하였다. 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키

고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

#### 6) Thymocytes 및 splenocytes의 증식능 측정

Thymocytes 및 splenocytes의 증식능 측정은 Mosmann<sup>23)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>24)</sup>이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 즉, 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100 µl (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml)를 접종하고 thymocytes에는 concanavalin A(Con A)를, splenocytes에는 lipopoly-saccharide (LPS) 10 µg/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT 용액 20 µl를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100 µl를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 환산하였다. In vitro 실험에서는 KKT 1, 10 및 100 µg/ml를 각각 처리하고 48시간 배양한 후 동일한 실험을 실시하여 세포생존율을 측정하였다.

#### 7) Thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes에 PI buffer(0.1% Na-citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 µg/ml) 20 µl를 넣어 방냉하에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 측정하였다<sup>25)</sup>.

8) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 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 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer[excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>26)</sup>.

9) Cytokines 측정

Thymocytes 및 splenocytes 배양액 중 cytokines의 측정은 분리한 흉선 및 비장으로부터 세포를 각각 분리하여,  $2 \times 10^7$  cells/ml로 조제한 다음 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(2,500 rpm, 2분, 4 °C)한 다음, 상등액 50  $\mu$ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines의 양을 측정하였다. 즉 sample 50  $\mu$ l에 assay diluent 50  $\mu$ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100  $\mu$ l를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100  $\mu$ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100  $\mu$ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다<sup>27)</sup>.

10) 복강 macrophages의 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 macrophage를  $5 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 DME(without phenol red, 0.34 g/L

NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 °C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다<sup>28,29)</sup>. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50  $\mu$ l와 lucigenin 용액 50  $\mu$ l 및 zymosan 용액 30  $\mu$ l를 첨가하여 최종 volume이 200  $\mu$ l가 되도록 한 후, 37 °C에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

11) 복강 macrophages의 탐식작용에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated *E. coli* particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250  $\mu$ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml 되도록 조정한 후, 100  $\mu$ l를 96 well에 분주하고 *E. coli* 현탁액 25  $\mu$ l를 가하여 1시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100  $\mu$ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다<sup>30)</sup>.

12) 복강 macrophages의 nitric oxide 측정

분리한 macrophages를 24 well plate에 well 당  $2 \times 10^6$  cells을 분주한 후 macrophages로부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess 법<sup>31)</sup>으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 48시간 배양한 후, 배양액 100  $\mu$ l와 Griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylethylenediamine

2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100 μl를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10분간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO<sub>2</sub>의 농도를 환산하였다.

13) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계처리는 student t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

### III. 實驗結果

1. 혈청 중 histamine 함량에 미치는 효과

Table I. Effect of KKT on the concentration of serum histamine in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Histamine (ng/ ml)
Normal	Saline	62.8 ±3.1
Control	Saline	90.7 ±4.5 *
KKT	500 (1 day)	87.5 ±3.2
KKT	500 (7 days)	76.8 ±3.6 #

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The serum histamine was determined with fluorospectrophotometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

2. 혈청 중 corticosterone 함량에 미치는 효과

Table II. Effect of KKT on the concentration of serum corticosterone in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Corticosterone (ng/ ml)
Normal	Saline	343.7 ±18.9
Control	Saline	537.8 ±22.6 *
KKT	500 (1 day)	513.4 ±19.8
KKT	500 (7 days)	427.6 ±21.5 #

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The serum corticosterone was determined with fluorospectrophotometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

3. Thymocytes 및 splenocytes의 증식능에 미치는 효과

Table III. Effect of KKT on the cell viability of thymocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
		Con A-nontreated	Con A-treated
Normal	Saline	100.0 ±1.3	120.4 ±1.5
Control	Saline	62.5 ±1.5 *	79.4 ±1.5 *
KKT	500 (1 day)	60.2 ±1.8	76.5 ±1.7
KKT	500 (7 days)	54.8 ±1.4 #	70.3 ±1.7 #

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The separated thymocytes (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A. The data represents the mean ±SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

Table VI. Effect of KKT on the cell viability of splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
		LPS-nontreated	LPS-treated
Normal	Saline	100.0±1.4	147.6±2.1
Control	Saline	85.7±1.1 <sup>*</sup>	131.8±1.4 <sup>*</sup>
KKT	500 (1 day)	105.6±1.2 <sup>#</sup>	159.3±2.3 <sup>#</sup>
KKT	500 (7 days)	123.2±1.0 <sup>#</sup>	179.5±2.1 <sup>#</sup>

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide. The data represents the mean±SE of 5 mice. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). <sup>#</sup>; Significantly different from control group ( $p<0.001$ ).

Table V. Effect of KKT on the cell viability of murine thymocytes *in vitro*

Samples	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
		Con A-nontreated	Con A-treated
Control	-	100.0±1.4	128.3±1.3
KKT	1	100.2±1.3	127.9±1.1
KKT	10	97.7±1.2	125.4±1.3
KKT	100	91.2±1.0 <sup>*</sup>	118.6±1.2 <sup>*</sup>

The separated thymocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI1640 media mixed with KKT and an activating mitogen of concanavalin A. The data represents the mean±SE of 4 experiments. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group( $p<0.01$ ).

Table VI. Effect of KKT on the cell viability of murine splenocytes *in vitro*

Samples	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
		LPS-nontreated	LPS-treated
Control	-	100.0±1.2	142.8±1.6
KKT	1	99.8±0.9	140.6±1.5
KKT	10	92.1±1.0 <sup>*</sup>	133.2±1.3 <sup>*</sup>
KKT	100	85.4±1.2 <sup>**</sup>	126.6±1.4 <sup>**</sup>

The separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI1640 media mixed with KKT and an activating mitogen of lipopolysaccharide. The data represents the mean±SE of 4 experiments. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group ( $p<0.01$ , <sup>\*\*</sup>;  $p<0.001$ ).

#### 4. Thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation 에 미치는 효과

Table VII. Effect of KKT on DNA fragmentation of thymocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	DNA fragmentation (%)
Normal	Saline	5.7±0.3
Control	Saline	11.8±0.6 <sup>*</sup>
KKT	500 (1 day)	10.7±0.5
KKT	500 (7 days)	10.2±0.6

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. 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. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group( $p<0.001$ ).

Table VIII. Effect of KKT on DNA fragmentation of splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	DNA fragmentation (%)
Normal	Saline	7.2±0.3
Control	Saline	12.8±0.5 *
KKT	500 (1 day)	12.1±0.4
KKT	500 (7 days)	10.2±0.4 #

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. 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 normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

5. Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 에 미치는 효과

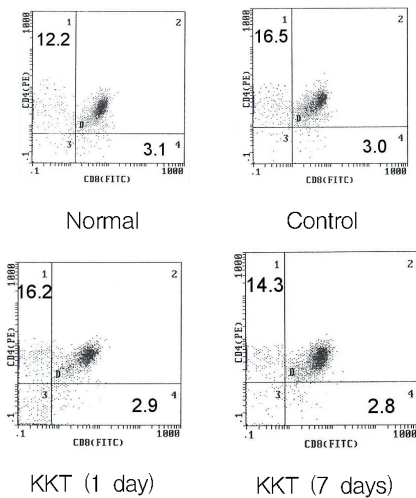


Fig. 2. Cytofluorometric pattern of thymocytes subpopulation change in immobilization stress mice for 15 hours

Table IX. Effect of KKT on subpopulation of thymocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Subpopulation (%)	
		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
Normal	Saline	12.2±0.3	3.1±0.2
Control	Saline	16.5±0.5 *	3.0±0.2
KKT	500 (1 day)	16.2±0.3	2.9±0.1
KKT	500 (7 days)	14.3±0.4 #	2.8±0.2

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

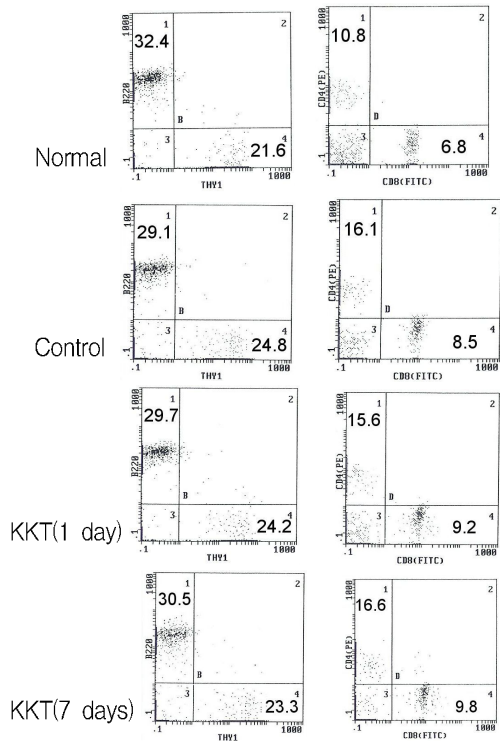


Fig. 3. Cytofluorometric pattern of splenocytes subpopulation change in immobilization stress mice for 15 hours



Table X. Effect of KKT on subpopulation of splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Subpopulation (%)			
		B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Normal	Saline	32.4±1.0	21.6±0.7	10.8±0.6	6.8±0.5
Control	Saline	29.1±0.6 <sup>*</sup>	24.8±0.8 <sup>*</sup>	16.1±0.5 <sup>***</sup>	8.5±0.4 <sup>**</sup>
KKT	500(1 day)	29.7±1.0	24.2±1.1	15.6±0.3	9.2±0.4
KKT	500(7 days)	30.5±0.8	23.3±0.6	16.6±0.4	9.8±0.3 <sup>#</sup>

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. 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 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ±SE of 5 mice. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group (<sup>\*</sup>; p<0.05, <sup>\*\*</sup>; p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>; p<0.001). <sup>#</sup>; Significantly different from control group (p<0.05).

6. Cytokines 분비에 미치는 효과

Table XI. Effect of KKT on the production of  $\gamma$ -interferon from splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose(mg/kg)	$\gamma$ -interferon (pg/ml)
Normal	Saline	467.8±18.4
Control	Saline	311.5±21.9 <sup>*</sup>
KKT	500 (1 day)	335.6±18.5
KKT	500 (7 days)	415.7±20.4 <sup>#</sup>

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The production of  $\gamma$ -interferon was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean ±SE of 5 mice. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group (p<0.001). <sup>#</sup>; Significantly different from control group (p<0.05).

Table XII. Effect of KKT on the production of interleukin-2 from splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose(mg/kg)	Interleukin-2 (pg/ml)
Normal	Saline	256.2±16.3
Control	Saline	135.7±18.4 <sup>*</sup>
KKT	500 (1 day)	142.1±17.6
KKT	500 (7 days)	153.7±16.9

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The production of interleukin-2 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean ±SE of 5 mice. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group (p<0.001).

Table XIII. Effect of KKT on the production of interleukin-4 from splenocytes in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose(mg/kg)	Interleukin-4(pg/ml)
Normal	Saline	135.4±10.7
Control	Saline	81.8±8.5 <sup>*</sup>
KKT	500 (1 day)	85.3±8.7
KKT	500 (7 days)	90.7±8.2

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. The production of interleukin-4 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean ±SE of 5 mice. <sup>\*</sup>; Significantly different from normal group (p<0.001).

7. 복강 macrophages의 lucigenin chemiluminescence에 미치는 효과

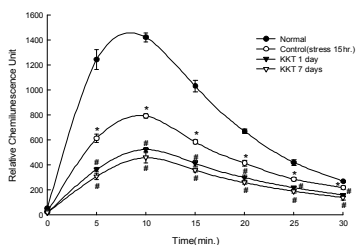


Fig. 4. Effect of KKT on lucigenin chemiluminescence in immobilization stress mice for 15 hours.

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and the separated peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 mins with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$ SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group ( $p < 0.001$ ). #; Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

Table XIV. Effect of KKT on lucigenin chemiluminescence in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose(mg/kg)	Relative Luminescence Unit (RLU)
Normal	Saline	$1.81 \times 10^6$
Control	Saline	$1.07 \times 10^6$
KKT	500 (1 day)	$7.34 \times 10^5$
KKT	500 (7 days)	$7.12 \times 10^5$

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and the separated peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 mins with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$ SE of 5 mice.

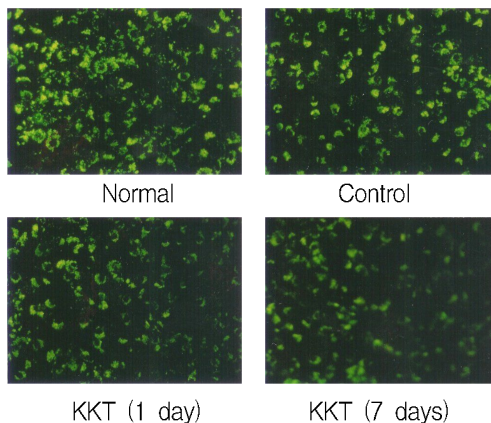


Fig. 5. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from KKT-administered mice.

Inverted fluoromicroscope photomicrographs ( $\times 100$ ) showing uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in normal, control (stress group) and peritoneal macrophages obtained from KKT-administered mice.

8. 복강 macrophages의 nitric oxide 생성에 미치는 효과

Table XV. Effect of KKT on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in immobilization stress mice for 15 hours

Samples	Dose (mg/kg)	Nitric oxide ( $\mu$ M)	
		$\gamma$ -IFN + LPS non-treated	$\gamma$ -IFN + LPS treated
Normal	Saline	$6.8 \pm 0.2$	$85.8 \pm 3.5$
Control	Saline	$3.3 \pm 0.1^*$	$60.7 \pm 2.4^*$
KKT	500 (1 day)	$2.8 \pm 0.1^\#$	$43.4 \pm 5.0^\#$
KKT	500 (7 days)	$2.5 \pm 0.1^{\#\#}$	$24.7 \pm 2.4^{\#\#}$

KKT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 1 day and 7 days, and mice were treated by immobilization stress for 15 hrs. 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI1640 media in the absence or presence LPS and  $\gamma$ -interferon. The data represents the mean  $\pm$ SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group ( $p < 0.001$ ). #; Significantly different from control group (#;  $p < 0.01$ , ##;  $p < 0.001$ ).

## V. 考 察

歸脾湯은 宋代 嚴<sup>1)</sup>의 《濟生方》에 最初로 收載된 處方으로, 思慮過度로 心脾를 傷하여 發生한 健忘, 怔忡을 治療한다고 하였다. 白朮 茯神 黃芪 龍眼肉 酸棗仁炒 各 一兩, 人蔘 木香 各 五錢, 甘草炙 各 二錢半, 生薑 五片, 大棗 一枚로 구성되어 不眠健忘, 驚悸盜汗, 發熱, 體倦食少, 心悸怔忡 등 主로 心脾血虛로 因한 諸般症狀 및 精神症狀에 廣範圍하게 應用되어 왔다.

加味歸脾湯은 薛<sup>2)</sup>의 歸脾湯에 肝氣鬱結을 다스리는 要藥인 柴胡<sup>3)</sup>와 逆氣를 泄하여 膽火의 鬱을 舒하는 梔子<sup>4)</sup>를 加味한 處方으로, 肝脾鬱怒로 因한 血傷不通을 다스린다고 하였다.

氣病이 發하면 가벼운 氣鬱에서 卒中症까지 多様な 症狀을 發하는 바, 그 原因은 主로 精神의 要因과 寒冷暑濕 등 外氣의 變化에 起因된다<sup>32-34)</sup>. 즉, 感情이나 外氣의 變化가 하나의 stress로 作用하는데 이에 대한 反應으로 生體的 氣의 變化現象이 나타나며 七氣 또는 九氣라는 氣의 循環不調現象으로 發顯되는데, 이는 精神作用 및 外氣의 變化狀態가 脈管 및 內部 支配神經인 自律神經의 緊張과 弛緩現象으로 歸結됨을 하나의 症候로 본 것이다<sup>40,41)</sup>.

Stress學說은 Claude Bernard의 生體的 內的環境의 恒常性(homeostasis) 理論을 基礎로 하여 W.B. Cannon의 生體調節機構에 關한 原則(stress에 대한 epinephrine 反應)을 背景으로 하여 나타났으며<sup>40)</sup>, stress는 1935년 H. Selye에 依해서 처음으로 醫學에 導入되었다<sup>36)</sup>.

最近에는 stress가 corticosteroid를 增加시켜 免疫抑制作用을 나타낼 뿐만 아니라 lymphocytes 및 macrophages의 活性에도 影響을 주

어 免疫系를 變化시키는데, 免疫系에 대한 stress의 影響은 glucocorticoid에 의해 mediate 될 뿐만 아니라 histamine, vassopressin, catecholamine, serotonin, CRF, ACTH, endogenous opioids 및 pituitary hormone 등에 의해서도 매개 된다고 알려져 있다<sup>37,38)</sup>.

最近 stress와 免疫機能의 關係에 關한 研究가 활발하게 이루어지고 있지만, 加味歸脾湯이 immobilization stress에 의한 histamine 및 corticosterone 함량과 免疫系에 미치는 影響에 關한 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 加味歸脾湯이 stress에 의해 發生하는 諸般 症狀의 豫防 및 治療에 效果가 있을 것으로 思料되어 加味歸脾湯의 stress에 대한 保護作用을 알아보고자, 생쥐에 加味歸脾湯을 經口 投與한 후 immobilization stress를 加하고 血中 histamine 및 corticosterone 量의 變化, 그리고 thymocytes와 splenocytes의 增殖能, DNA fragmentation, subpopulation에 미치는 效果, cytokine 분비에 미치는 效果, 복강 macrophages의 lucigenin chemiluminescence와 nitric oxide 生成에 미치는 效果 등 immune system의 變化를 觀察하였다.

Stress에 露出되면 生體的 生理的인 反應에 커다란 變化가 나타나는데, 심한 運動이나 肉體的 束縛 및 cold-stress와 같은 강한 stress는 thymocytes의 apoptosis를 誘導하여 thymus의 萎縮을 일으키고,<sup>39)</sup> T-cell subpopulation의 變化를 일으킨다고 알려져 있다<sup>40)</sup>. 또한, 이러한 stress에 의한 免疫能의 抑制는 corticosterone 및 catecholamine과 같은 hormone 含量을 增加시켜 免疫能을 抑制하는 것으로 報告되었다<sup>41,42)</sup>.

Stress는 同一한 stress라도 주어지는 時間 및 使用한 쥐의 strain에 따라 免疫系에 미치는 影響에 差異가 있다고 알려져 있다<sup>43,44)</sup>. 따라서 本 實驗에서는 immobilization stress의

負荷時間을 15시간으로 하였으며, KKT 投與 방법은 1일 및 7일 投與하여 반복투여 효과를 觀察하였다. 또한 使用한 생쥐는 免疫系에 敏感한 反應을 나타내는 C57BL/6을 使用하였다.

생쥐에 immobilization stress를 15시간 負荷하였을 때 serum histamine양은 normal군에 비해 增加하였으며, KKT 1일 投與하였을 때 serum histamine양은 control군에 비해 별 差異가 없었으나, 7일 投與하였을 때는 有意하게( $p < 0.05$ ) 減少하였다(Table I). 이러한 結果는 Nagata 등의 報告<sup>45)</sup>와도 同一한 結果이며, KKT가 histamine의 分泌를 抑制하여 stress에 影響을 주고 있음을 意味하는 것이다.

생쥐에 immobilization stress를 15시간 負荷하였을 때 serum corticosterone양은 normal군에 비해 增加하였으며, KKT 1일 投與하였을 때는 serum corticosterone양에 影響을 주지 않았으나, 7일 投與하였을 때는 serum corticosterone양은 control군에 비해 有意하게( $p < 0.05$ ) 減少하였다(Table II). 本 實驗에서 KKT 투여시 corticosterone의 分泌가 減少하였다는 結果는 KKT가 serum histamine의 分泌를 抑制하여 corticosterone의 分泌를 抑制한 것이 아닌가 推定된다.

Stress가 特異的 免疫反應에 미치는 影響을 살펴보기 위해 생쥐 thymus로부터 분리한 thymocytes 및 spleen으로부터 분리한 splenocytes의 細胞生存率을 測定하였다. Thymocytes의 生存率은 stress를 15시간 負荷한 control군은 con A를 처리하거나 처리하지 않았을 경우 모두 normal군에 비해 細胞生存率이 減少하였으며, KKT를 1일 投與하였을 때는 control군과 별 差異가 없었으나 7일 投與하고 stress를 15시간 負荷하였을 때는 細胞生存率이 control군에 비해 有意하게( $p < 0.05$ ) 減少하였다(Table III). 이는 KKT가 stress에 의해 減少되는 thymocytes의 細胞生存率을 더욱 減

少시켜 thymocytes에 의해 주도되는 細胞性 免疫能을 抑制시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

Splenocytes의 生存率은 stress를 15시간 負荷한 control군은 LPS를 처리하거나 처리하지 않았을 경우 모두 normal군에 비해 細胞生存率이 減少하였으나, KKT를 1일 및 7일 投與하고 stress를 15시간 負荷하였을 때는 모두 細胞生存率이 control군에 비해 有意하게( $p < 0.001$ ) 增加하였다(Table IV). 이는 KKT가 stress에 의해 減少되는 splenocytes의 細胞生存率을 增加시켜 splenocytes에 의해 주도되는 細胞性 免疫能을 增加시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 이러한 結果는, Lysle의 報告<sup>46)</sup>와 같이, 쥐의 種에 따른 差異인지 아니면 stress를 負荷하는 方法에 差異가 있기 때문인지는 더욱 研究되어야 할 課題이다.

KKT에 의해 變化되는 thymocytes 및 splenocytes의 生存率 變化가 KKT에 의한 直接作用인가를 확인하기 위해 *in vitro* 실험계를 이용하여 實驗하였다. Thymocytes에 KKT 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 處理하였을 때 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度에서 細胞生存率이 대조군에 비해 有意하게( $p < 0.01$ ) 減少하였으며(Table V), splenocytes에 處理하였을 때는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 濃度에서 細胞生存率이 대조군에 비해 減少하였다(Table VI). 이 結果는 KKT가 thymocytes에는 直接作用을 통하여 細胞生存率을 減少시키고 있으며, splenocytes에는 間接作用을 통하여 細胞生存率을 增加시키고 있음을 意味하는 것이다.

Stress에 의해 減少되는 thymocytes 및 splenocytes의 生存率이 이들 細胞의 apoptosis에 의해 야기된 것인가를 확인하기 위해 DNA fragmentation을 測定하였다. 15시간 stress를 負荷하였을 때는 thymocytes의 DNA fragmentation이 normal군에 비해 增加하였으며, KKT를 1일 및 7일 投與하였을 때 control군에 비해 별 差異가 없었다(Table VII). 이 結

果는 stress가 負荷되었을 때 thymocytes의 生存率 減少에 apoptosis 기전이 일부 關與하고 있음을 시사하는 것이며, Morishita의 報告<sup>39)</sup>와도 同一한 結果이다. KKT가 thymocytes의 apoptosis에 影響을 미치지 못하였다는 것은 KKT가 thymocytes의 生存率 減少에 apoptosis가 아닌 다른 經路를 통하여 作用하고 있음을 시사하는 것이다.

15시간 stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 DNA fragmentation이 normal군에 비해 增加하였으며, KKT를 1일 投與하였을 때 control군에 비해 splenocytes의 DNA fragmentation에 별 差異가 없었으나, 7일 投與하였을 때는 splenocytes의 DNA fragmentation이 有意하게( $p < 0.05$ ) 減少하였다(Table VIII). 이 結果는 stress가 負荷되었을 때 splenocytes의 生存率 減少에 apoptosis 기전이 일부 關與하고 있음을 시사하는 것이며, KKT가 splenocytes의 apoptosis를 抑制하여 細胞生存率을 增加시키고 있음을 시사하는 것이다.

Stress는 免疫細胞의 subpopulation에 多樣한 變化를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>47)</sup>. 따라서 本 實驗에서는 stress에 의한 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 변화에 미치는 KKT의 影響을 觀察하고자 實驗하였다.

Stress를 15시간 負荷하였을 때 thymocytes의  $CD4^+CD8^-$  cell의 population이 normal군에 비해 增加하였으나,  $CD4^-CD8^+$  cell의 population은 變化가 없었다. KKT를 1일 投與하였을 때  $CD4^+CD8^-$  cell 및  $CD4^-CD8^+$  cell의 population이 control군에 비해 별 差異가 없었으나, 7일 投與하였을 때는  $CD4^+CD8^-$  cell의 population이 control군에 비해 減少하였다(Fig. 2, Table IX). 이는 stress에 의해 增加되는 thymocytes의  $CD4^+CD8^-$  cell의 population을 KKT가 恢復시킬 수 있음을 意味하는 것이다.

Stress를 15시간 負荷하였을 때 splenocytes의  $B220^+$  cell의 population은 減少하고,  $Thy1^+$

cell의 population은 增加하였으며, KKT를 1일 및 7일 投與하였을 때  $B220^+$  및  $Thy1^+$  cell의 population이 control군에 비해 별 差異가 없었다. Stress를 15시간 負荷하였을 때 splenocytes의  $CD4^+CD8^-$  cell 및  $CD4^-CD8^+$  cell의 population이 normal군에 비해 增加하였는데 KKT를 1일 投與하였을 때  $CD4^+CD8^-$  cell 및  $CD4^-CD8^+$  cell의 population이 control군에 비해 별 差異가 없었으나, 7일 投與하였을 때는  $CD4^-CD8^+$  cell의 population이 control군에 비해 增加하였다(Fig. 3, Table X). 대조군의 thymocytes 중 Th( $CD4$  single positive cell) 세포는 12.2%, Tc( $CD8$  single positive cell) 세포는 3.1%로 normal 생쥐 胸線에서  $CD4^+CD8^-$  cells은 약 12%,  $CD4^-CD8^+$  cells은 약 3%로(Fig. 2, Table IX) 報告된 內容과 비슷한 結果를 나타내었으며<sup>48)</sup>, stress에 의해 thymocytes에서  $CD4^+CD8^-$  cell의 population이 增加하고, splenocytes에서는  $B220^+$  cell은 減少하나,  $Thy1^+$  cell의 population은 增加하며,  $CD4^+CD8^-$  cell 및  $CD4^-CD8^+$  cell의 population이 control군에 비해 增加하였다(Fig. 3, Table X). 이는 stress에 의해 thymocytes 및 splenocytes의 population에 變化가 나타나고 있음을 시사하는 것이다.

本 實驗에서 stress에 의해 splenocytes에서 分泌되는 cytokines의 變化에 미치는 KKT의 影響을 觀察하고자, stress를 15시간 負荷하였을 때 Th1 cell에서 分泌되는  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2는 分泌가 抑制되었으며(Table X, XII), Th2 cell에서 分泌되는 interleukin-4도 抑制되었다(Table XIII). KKT 500 mg/kg을 1일 投與하였을 때는 cytokines의 分泌에 별 影響을 주지 못하였으나, 7일 投與하였을 때는  $\gamma$ -interferon의 分泌는 增加하고(Table XI), interleukin-2 및 interleukin-4의 分泌는 control군에 비해 별 差異가 없었다(Table XII, XIII). 이는 15시간의 stress에 의해서 Th1 cell 및 Th2 cell의 活性이 모두 抑制됨을 意味하

는 것이며, KKT 투여에 의해 Th1 cell의 活性이 일부 恢復될 수 있음을 시사하는 것이다.

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. Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence(CL)를 測定한 結果 stress를 15시간 負荷하였을 때 CL 양이 減少하였다(Fig. 4, Table XIV).

KKT 500 mg/kg을 1일 및 7일 投與하였을 때 CL양이 control군에 비해 減少하였다(Fig. 4, Table XIV). 이 結果는 stress에 의해 減少되는 非特異的 免疫反應을 KKT가 恢復시켜 줄 수 없음을 意味하는 것이다.

Jun 등<sup>49)</sup>은 nitric oxide(NO)는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 형성을 抑制하여 phagocytosis를 減少시킨다고 報告하였다. Stress를 15시간 負荷하였을 때 macrophages로부터 分泌되는 NO 양은 減少하였으며, KKT 500 mg/kg을 1일 및 7일 投與하였을 때 NO 생성이 control군에 비해 減少하였다 (Table XV). 本 實驗에서 stress에 의해 NO 생성이 抑制되고 phagocytic activity가 抑制되었다는 것은 stress에 의한 phagocytic activity의 減少가 NO가 아닌 다른 經路에 의해 調節되고 있음을 시사하는 것이며, stress에 의해 減少된 phagocytic activity가 KKT 투여에 의해 減少되고, 또한 NO 생성이 減少된다는 實驗結果는 KKT가 macrophages가 關與하는 非特異的 免疫反應을 減少시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

以上の 實驗結果 加味歸脾湯은 immobilization stress에 의해 增加되는 histamine 및 corticosterone의 양을 抑制하고, immobilization stress에 의해 減少되는 特異的 免疫能을 일부 회복시켜 stress 해소에 應用될 수 있을 것으로 思料된다.

## V. 結 論

加味歸脾湯(KKT)을 생쥐에 經口 投與한 후 immobilization stress를 加하고 血中 histamine 및 corticosterone 量과 immune system의 變化를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Stress를 負荷하였을 때 serum histamine 및 corticosterone 양은 增加되었으나, KKT 투여에 의해 減少되었다.
2. Stress를 負荷하였을 때 thymocytes 및 splenocytes의 生存率은 減少되었으며, KKT 투여에 의해 thymocytes의 生存率은 減少하였으나, splenocytes의 生存率은 增加되었다.
3. KKT를 *in vitro* 처리하였을 때 thymocytes 및 splenocytes의 生存率은 減少되었다.
4. Stress를 負荷하였을 때 thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation은 增加되었으며, KKT 투여에 의해 thymocytes의 DNA fragmentation은 變化가 없었으나, splenocytes의 DNA fragmentation은 減少되었다.
5. Stress를 負荷하였을 때 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 세포의 population은 增加되었으나, KKT 투여에 의해 減少되었다.
6. Stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 減少하였고, Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 增加되었으며, KKT 투여에 의해 B220<sup>+</sup> 세포 및 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 變化되지 않았다. Stress를 負荷하였을 때 splenic CD4<sup>+</sup> 세포 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population은 增加되었으며, KKT 투여에 의해 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 세포의 population이 더욱 增加되

었다.

7. Stress를 負荷하였을 때  $\gamma$ -interferon, interleukin-2 및 interleukin-4의 분비가 減少되었으나, KKT 투여에 의해  $\gamma$ -interferon의 분비는 增加되었으나, interleukin-2 와 interleukin-4의 분비는 變化되지 않았다.
8. Stress를 負荷하였을 때 macrophages의 phagocytic activity는 減少되었으며, KKT 투여에 의해 더욱 減少되었다.
9. Stress를 負荷하였을 때 macrophages로부터 분비되는 nitric oxide의 양은 減少되었으며, KKT 투여에 의해 더욱 減少되었다.

以上の 實驗結果 加味歸脾湯은 immobilization stress에 의해 增加되는 histamine 및 corticosterone의 양을 抑制하고, immobilization stress에 의해 減少되는 特異的 免疫能을 일부 회복시켜 stress를 抑制하는 것으로 思料된다.

□ 투 고 일 : 2004년 10월 18일

□ 심 사 일 : 2004년 11월 01일

□ 심사완료일 : 2004년 11월 08일

## 參考文獻

1. 嚴用和, 氏濟生方, 北京: 人民衛生出版社, 1984; 117.
2. 薛己, 薛氏醫案(文淵閣本 卷1), 서울: 麗江出版社, 1986; 27.
3. 辛民教, 原色 臨床本草學, 서울: 永林社, 1992; 166, 169, 172, 174-5, 221, 225, 251, 254, 279, 368, 370, 387, 538.
4. 申佶求, 申氏本草學(各論), 서울: 壽文社, 1988; 228-36.
5. 薛己, 婦人良方校注補遺, 上海: 上海科學技術出版社, 1991; 634.
6. 羅元愷, 中醫婦科學, 北京: 人民衛生出

版社, 1988; 385-92.

7. 鄭遇烈, 韓方病理學, 1988; 118-9, 133-4, 202-4, 216-7.
8. 柳道坤 등, 肝機能에 對한 東西醫學의 考察, 大韓東醫病理學會誌, 1987; 2: 61-9.
9. 金完熙, 崔達永, 臟腑辨證論治, 서울: 成輔社, 1990; 141-8.
10. 閔炳一譯, 스트레스와 免疫, 서울: 電波科學社, 1994; 23: 56-60, 73-82.
11. 강병조, 스트레스와 精神神經免疫學, 精神健康研究, 漢陽大 健康研究所, 1994; 10: 65-80.
12. Udelman, HD, Udelman, DI, Current explorations in Psychoimmunology, Amer. J. Psychotherapy, 1983; 37: 210.
13. Stein, H., Schiavi, RC., Comerino, M, Influence of brain and behavior on the immune system, Science, 1976; 191: 435.
14. 尹祥熙 등, 養心湯이 스트레스와 免疫機能에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 1996; 7(1): 49-63.
15. 權泰植 등, 越鞠丸合補中益氣湯이 電氣刺戟스트레스를 받은 mouse의 免疫機能에 미치는 影響, 東國韓醫學研究所 論文集, 2000; 9: 51-71.
16. 이승기 등, 香附子八物湯이 拘束스트레스 環위의 抗스트레스와 免疫反應에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 1997; 8(1): 81-93.
17. 홍성은 등, 逍遙散이 생쥐에 Immobilization Stress 負荷後 血中 免疫能系에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌, 2003; 16(3): 101-27.
18. 許浚, 原本 東醫寶鑑(內景篇), 서울: 大星文化社, 1992; 176, 410.
19. Endo, Y, In methods in Enzymology. Academic Press, 1983; 94-100.
20. Zenker, N, Bernstein, DE, J. Biol. Chem., 1958; 231: 695.
21. Wsocki, LJ, Sato, VL, Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978; 75: 2844.
22. Mizel, SB. et al, Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced

- by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 1979; 120: 1497.
23. Mosmann, T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. methods.* 1983; 65: 55.
  24. Kotnik, V, Fleischmann, WRJr, A simple and rapid method to determine hemopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.* 1990; 129: 23.
  25. Nicoletti, I. et al, Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods,* 1991; 139: 271.
  26. Suda, T, Nagata, S, Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.,* 1994; 179: 873-9.
  27. Eun JS et al, Regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. *Arch. Pharm. Res.,* 2000; 23(5): 531-4.
  28. Boudard, F et al, Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods,* 1994; 174: 259.
  29. Blair, AL et al, Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods,* 1988; 112: 163.
  30. Chok PW, Choon SP, Benjamin HS, A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immuno. Methods,* 1993; 162: 1.
  31. Rocket, KA et al, Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity,* 1991; 59(9): 3280.
  32. 文濬典 등, 病理學, 서울: 高文社, 1990; 57-68, 132-7.
  33. 金相孝, 東醫神經精神科學, 서울: 杏林出版, 1984; 154-5, 277-84, 336.
  34. 黃義完, 心身症, 서울: 杏林出版, 1985; 21-7.
  35. 金相泰, 視床下部 흥몬과 神經傳達物質, 서울대 精神醫學報, 1983; 7: 285.
  36. 田多井吉之介, 新版 스트레스, 大阪: 創元社, 2nd. Ed., 1983; 5, 8, 120, 188.
  37. Bugajski J, Gadek A, Central H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-histaminergic stimulation of pituitary-adrenocortical response under stress in rats. *Neuroendocrinology,* 1983; 36(6): 424-30.
  38. Mormede P, The vasopressin receptor antagonist dPTyr (Me) AVP does not prevent stress-induced ACTH and corticosterone release. *Nature,* 1983; 302(5906): 345-6.
  39. Morishita S et al, Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. *Pathophysiology.* 1997; 4: 213-9.
  40. Sridama V, Pacini F, Groot LJ, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 54: 316.
  41. Tanaka M et al, Naloxone enhances stress-induced in noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Life Sci.,* 1982; 30(19): 1663-9.
  42. Eun JS, Oh CH, Han JH, Effects of *Glycyrrhizae Radix* on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. *Kor. J. Pharmacog n.,* 1989; 20(1): 37-42.
  43. Schedlowsk, M, Schmidt RE, Stress and the immune system. *Naturwissenschaften,* 1996; 83(5): 214-20.
  44. Shanks N et al, Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice: in vivo dependence on macrophages. *Physiol. Behav.,* 1998; 65(1): 95-103.
  45. Nakano K et al, Significance of increased secretion of glucocorticoids in mice and rats injected with bacterial endotoxin. *Brain Behavior and Immunity.* 1987; 1(2): 159-72.
  46. Lysle DT, Cunnick JE, Rabin BS, Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhance



- ment of mitogenic responsiveness. *Brain Behav. Immun.* 1990; 4(4): 269-77.
47. Sudo N et al, Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation*, 1997; 4(3): 113-9.
48. Miceli MC, Parnes JR, The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 1993; 53: 59.
49. Jun, CD et al, Nitric oxide inhibits macrophage pseudopodia formation in the activated macrophages. *Kor. J. Immunol.* 1996; 18: 635-44.