

加味補中益氣湯이  
생쥐의 免疫反應에 미치는 影響

대전대학교 한의과대학 부인과학교실

송종석, 신선미, 김수민, 김의일, 이정은, 유동열

**ABSTRACT**

Effect of *Kamibojoongikkitang* on Immune Response in C57BL/6 Mice

Song Jong-Sek, Shin Sun-Mi, Kim Soo-Min,  
Kim Eui-Il, Lee Jung-Eun, Yoo Dong-Youl

Dept. of Ob & Gyn, College of Oriental Medicine, Daejeon University

**Purpose** : The purpose of this research was to investigate the effects of *Kamibojoongikkitang* (KBT) on the immune cells in C57BL/6 mice.

**Methods** : KBT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days.

**Results** : KBT decreased the cell viability of thymocytes in vivo and in vitro system and decreased the cell viability of splenocytes in vivo, but increased the viability of splenocytes in vitro system. In addition, KBT did not affect the population of helper T (Th) cells and cytotoxic T (Tc) cells in thymocytes and decreased the population of T- and B-lymphocytes and the population of Th and Tc cells in splenocytes. Furthermore, KBT did not affect the production of  $\gamma$ -interferon and interleukin-4 in splenocytes. KBT increased the production of nitric oxide in vivo but decreased the production of nitric oxide in vitro system. KBT enhanced the phagocytic activity of peritoneal macrophages in vivo, but decreased the phagocytic activity in vitro.

**Conclusion** : KBT has an inhibitory action on the specific immune response via decrease of the cell viability of thymocytes and splenocytes and has a potent action on the non-specific immunity via increase of phagocytic activity of peritoneal macrophages.

**Key words** : *Kamibojoongikkitang*, Immune Response, C57BL/6 Mice

## I. 緒 論

補中益氣湯은 A.D.1232年 元代 李<sup>1)</sup>의 《東垣十種醫書》에 처음 收錄된 處方으로 一切의 清陽下陷, 中氣不足하여서 오는 諸證을 治療 目的으로 立方되었는데, 脾胃中의 清氣를 끌어서 陽道와 諸經을 運行하게하며 升陽補氣하는 故로 陰脫, 陰挺, 陰痛, 月經先期에 活用되어왔다<sup>2-10)</sup>. 加味補中益氣湯은 本方에 補血, 滋陰, 補肝腎, 生精血하는 熟地黃과 鹿角膠를 加한<sup>11)</sup> 처방이다.

陰脫이란 多産, 産後 營養攝取不足, 出産時 會陰破裂, 虛老 등의 原因으로 下腹部의 筋肉과 靱帶가 너무 늘어나서 子宮이 정상위치에서 離脫하는 것을 말하며 子宮下垂 혹은 子宮脫이라고도 한다<sup>12)</sup>.

韓醫學에서 《諸病源候論》<sup>13)</sup>에 “陰挺出下脫”이라 하여 陰脫에 대하여 최초로 表現하였으며, 方<sup>14)</sup>은 “生腸不收”, “子宮不收”로, 李等<sup>3,4)</sup>은 “陰中挺出”로, 康等<sup>5,15,16)</sup>은 “陰瘻”로, 羅等<sup>17,18)</sup>은 “陰挺”이라 하여 多樣하게 表現하였다. 陰挺 陰脫의 原因은 크게 氣虛, 腎虛, 濕熱下注로 구분할 수 있으며<sup>19)</sup>, 治法은 《婦人良方大全》<sup>20)</sup>에 “或因胞絡損傷 或因子臟虛冷 或因分娩用力所致”라 하여 升補元氣를 爲主로 하여야 한다고 하였다.

補氣란 補正氣의 意味로 《素問》<sup>21)</sup> 『刺法論』에 “正氣存內 邪不可干”, 『評熱病論』에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하고, 《靈樞》<sup>22)</sup> 『百病始生篇』에 “風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人”이라하여 正氣는 邪氣에 대한 相對的 用語로 人體生命活動力의 總稱으로 볼 수 있으며, 疾病의 成立過程 中에서 生體의 抵抗性에 關여하는 것으로 매우 重視되고 있음을 알 수 있다.

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 識別하는 機構로써 外部로부터 侵入하는 各種 微生物, 同種의 組織, 體內에 생긴 不必要한 產物들과 特異하게 反應하여 抗體를 만들고 이것을 排除하여 그 個體의 正常狀態와 恒常性(homeostasis)을 유지하는 現象<sup>23,24)</sup>으로, 韓醫學에서 疾病의 發生 및 轉變過程을 元氣, 眞氣, 宗氣, 衛氣를 包括하는 正氣와 六淫의 外邪 및 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 發病因子間에 消·長·進·退의 過程으로 說明<sup>25,26)</sup>하고 있는 것과 연관지어 생각할 수 있다<sup>27,28)</sup>. 治療에 있어서 補氣, 補血, 補陰, 補陽하는 藥材의 投與는 人體의 抗病力을 調節하여 免疫力 增進의 次元에서, 活血祛瘀, 祛風濕痰, 清熱解毒시키는 藥材의 投與는 免疫平衡을 破壞하는 所因을 排除하여 免疫平衡에 到達하는 次元에서 意味가 있는 것으로 보고되고 있는 바<sup>28,29)</sup>, 加味補中益氣湯은 人體의 抗病力을 增進시킬 수 있는 處方임을 알 수 있다.

補氣劑의 免疫에 關한 實驗的 研究로 林<sup>30)</sup>은 四君子湯이 家兔의 生體活性和 免疫性을 增加시킴을, 黃<sup>31)</sup>은 十全大補湯 加鹿茸이 생쥐의 免疫機能을 向上시킴을, 朴<sup>32)</sup>은 歸脾湯과 歸脾湯加味湯이 생쥐의 過敏反應 및 免疫細胞의 調節機能에 效果가 있음을, 徐<sup>33)</sup>는 加味補虛湯이 생쥐의 免疫調節作用을 向上시킴을 報告하였으나, 補中益氣湯에 補血, 補精, 補肝腎하는 熟地黃과 鹿角膠를 加한 加味補中益氣湯의 免疫調節에 關한 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 本 實驗에서 加味補中益氣湯의 免疫調節作用을 觀察하고자, 生體에서 免疫系를 調節하는 重要한 細胞인 thymocytes, splenocytes 및 macrophages에 대한 作用을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하고자 한다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

本 實驗에 使用한 생쥐는 8 週令 C57BL/6계 수컷을 大韓實驗動物에서 購入하여, 溫度 20 ± 2°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 後 使用하였으며, 固形飼料과 물을 자유스럽게 攝取하도록 하였다.

#### 2) 試藥

實驗에 使用한 試藥은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin, streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), concanavalin A (Con A), lipopolysaccharide (LPS),  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN), lucigenin, MTT, zymosan, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, HEPES, sulfanilamide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., mouse  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) immunoassay kit, mouse interleukin-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 seiyaku Co., FITC-conjugated *E. coli* particle은 Molecular Probes Co. 등을 使用하였으며, 기타 試藥은 cell culture用 및 1級 試藥을 使用하였다.

### 2. 方法

#### 1) 檢液의 調劑

本 實驗에 使用한 藥材들은 大田大學 校 附屬 韓方病院에서 購入하여 精選하

여 使用하였고, 1 첩의 內容과 分量은 다음과 같다.

# 加味補中益氣湯(KamiBojoongikkiTang: KBT)의 構成

韓藥名	生 藥 名	重量(g)
黃芪	Astragali Radix	15
甘草(炙)	Glycyrrhizae Radix	5
人 蔘	Ginseng Radix Alba	10
當 歸	Angelicae gigantis Radix	10
陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	6
升 麻	Cimicifugae Rhizoma	3
柴 胡	Bupleuri Radix	3
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	10
熟地黃	Rehmanniae Radix Vapratum	10
鹿角膠	Cervi Cornus Colla	10
Total		82

處方 3 貼 分量을 蒸溜水 2,000 ml로 2 회 加熱 抽出한 後, 濾過하여 餘液을 rotary evaporator로 濃縮한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末 72.8 g (수득을 29.6%)을 얻어(以下 KBT라 稱함), 動物實驗 時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였다.

#### 2) Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 分離

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 分離는 Wysocki<sup>34)</sup> 및 Mizel<sup>35)</sup> 등의 方法을 利用하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 KBT 500 mg/kg을 1 일 1 회씩 7 일간 경구투여한 다음 8 일째 생쥐를 頸椎脫骨하여 屠殺하였다. 摘出した 胸線 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 滅菌된 stainless mesh로 濾

過하여 細胞浮游液을 얻은 후, DPBS-A 로 2 회 洗滌한 다음(1,500 rpm에서 10 분간 遠心分離), thymocytes 및 splenocytes 浮游液으로 하였다.

Macrophage의 分離는 KBT 500 mg/kg을 1 일 1 회씩 7 일간 經口投與하였다. 藥物 投與 4 일째 mouse 腹腔에 3% thioglycollate 2 ml를 注入하고, 8 일째 頸椎脫骨하여 屠殺시킨 다음, 腹腔에 cold PBS 10 ml를 넣어 腹腔細胞를 收集하였다. 收集한 細胞를 4°C에서 1,300 rpm으로 10 분간 遠心分離하고 RPMI 培地로 2회 洗滌後, 直徑 120 mm petri dish에 分株하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養시키고 2 시간 後에 附着되지 않은 細胞를 除去한 다음, 附着한 macrophage를 cell scraper로 分離하여 使用하였다. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 培地를 使用하였으며, 培地에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 添加하여 使用하였다.

### 3) Thymocytes 및 splenocytes의 增殖能 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 KBT의 影響은 MTT法으로 測定하였다. 本 實驗에 使用한 MTT法은 Mosmann<sup>36)</sup>이 開發하여 Kotnik 等<sup>37)</sup>이 變形시킨 方法으로, 96-well plate의 各 well에 分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 RPMI 1640 培地로 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml 濃度로 稀釋하여 96-well plate에 100 µl씩 分株한 다음 thymocytes는 concanavalin A (Con A) 5 µg/ml를, splenocytes는 Con A 5 µg/ml 또는 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml를 添加한 후, 37°C의

CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 培養한 다음 培養 終了 4時間 前에 MTT 試藥을 加하였다. 培養 終了時 0.1N-HCl에 溶解시킨 10% SDS 100 µl를 各 well에 添加하고 遮光狀態에서 18 시간 더 培養한 後 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader 로 570 nm에서 測定하여 對照群의 吸光度에 대한 實驗群의 吸光度를 百分率로 換算하여 計算하였다. *In vitro* 實驗에서는 分離한 thymocytes 및 splenocytes 1 × 10<sup>7</sup> cells/ml에 KBT 1, 10 및 100 µg/ml를 各 加하고 48 시간 培養한 後 同一한 方法으로 細胞生存率을 測定하였다.

### 4) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各 RPMI 1640 培地로 3 회 洗滌하였다. 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 二重染色하여 4°C에서 30 분간 反應시킨 後, flow cytometer [excitation: 488 nm, emission: 525 nm (FITC), 575 nm (PE)]로 subpopulation을 測定하였다<sup>38)</sup>.

### 5) 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide 生成量 測定

分離한 macrophage를 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml로 調劑하여 24-well plate에 1 ml씩 分株한 後 macrophage로부터 生成되는 nitric oxide (NO)의 量을 Griess法<sup>39)</sup>으로 測定하였다. 各 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 添加하여 24 시간 培養한 後, 培養液 100 µl와 Griess

試藥 (1 % sulfanilamide + 0.1 % N-naphthylenediamine 2HCl + 2.5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu$ l를 혼합하여 96-well module에 넣고, 37°C에서 10 분간 放置한 後, 570 nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成한 NaNO<sub>2</sub>의 檢量線에 의해 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 濃度を 換算하였다.

6) 腹腔 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophage를 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 浮遊시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 調劑는 10 ml의 DPBS-A에 溶解한 後, 濾過 滅菌하여 -20°C에서 保管하면서 使用하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 使用하기 直前に DME 培地에 1/10로 稀釋하여 使用하였다.

Chemiluminescence 測定은 luminometer를 利用하여 37°C에서 測定하였다<sup>40,41</sup>).

測定用 96-well plate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 浮遊液 50  $\mu$ l와 lucigenin 溶液 50  $\mu$ l 및 zymosan 溶液 30  $\mu$ l를 添加하여 最終 volume이 200  $\mu$ l가 되도록 한 후 37°C에서 15 분간 前處理한 後 5 분 間隔으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 量을 測定하였다.

*In vitro* 實驗에서는 分離한 macrophages에 KBT 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml를 각각 加하고 同一한 方法으로 lucigenin chemiluminescence 量을 測定하였다.

7) 腹腔 macrophage의 貪食作用에 의한 engulfment 測定

FITC-conjugated *E. coli* particle을

HBSS에 1 mg/ml 濃度로 懸탁시켜 sonification한 후 使用하였으며, trypan blue는 citrate buffer (pH 4.4)에 250  $\mu$ g/ml 濃度로 溶解하여 使用하였다. 分離한 macrophage를 RPMI 1640 培地로 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml 되도록 調整한 後, 100  $\mu$ l를 96-well plate에 分株하고 *E. coli* 懸濁液 25  $\mu$ l를 加하여 1 시간 동안 培養한 다음 培養液을 除去하고 extracellular fluorescence를 抑制하기 위해 trypan blue 100  $\mu$ l를 添加하여 inverted fluoromicroscope로 觀察하였다<sup>42</sup>).

8) 統計處理

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

### III. 實驗 成績

1. 加味補中益氣湯 (KBT)이 thymocytes 및 splenocytes의 增殖에 미치는 效果

對照群의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, Con A를 處理하였을 때의 細胞生存率은 110.8  $\pm$  1.2%로 增加하였으며, KBT를 投與하고 分離한 thymocytes에 Con A를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率은 94.1  $\pm$  0.7%로, Con A를 處理하였을 때 細胞生存率은 101.0  $\pm$  1.9%로 對照群에 비해 減少하였다 (Table 1-1).

對照群의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopoly-saccharide (LPS)를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, LPS를 處理하였을

때 細胞生存率은  $146.5 \pm 2.8\%$ 로 增加하였으며, KBT를 投與하고 分離한 splenocytes에 LPS를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率은  $83.6 \pm 1.1\%$ 로, LPS를 處理하였을 때 細胞生存率은  $129.5 \pm 1.4\%$ 로 對照群에 비해 減少하였다 (Table 1-2).

對照群의 splenocytes에 concanavalin A (Con A)를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, Con A를 處理하였을 때의 細胞生存率은  $171.4 \pm 2.1\%$ 로 增加하였으며, KBT를 投與하고 分離한 splenocytes에 Con A를 處理하였을 때 細胞生存率은  $161.3 \pm 1.8\%$ 로 對照群에 비해 減少하였다 (Table 1-3).

Table 1-1. Effect of the administration of *Kamibojoongikkitang* water extract (KBT) on the cell viability of concanavalin A treated-thymocytes in C57BL/6 mice

Samples	Cell Viability (%)	
	Non-treated of Concanavalin A	Treated of Concanavalin A
Control	$100.0 \pm 1.2$	$110.8 \pm 1.2$
KBT	$94.1 \pm 0.7^*$	$101.0 \pm 1.9^*$

Table 1-2. Effect of the administration of KBT on the cell viability of lipopolysaccharide treated-splenocytes in C57BL/6 mice

Samples	Cell Viability (%)	
	Non-treated of lipopolysaccharide	Treated of lipopolysaccharide
Control	$100.0 \pm 1.5$	$146.5 \pm 2.8$
KBT	$83.6 \pm 1.1^*$	$129.5 \pm 1.4^*$

Table 1-3. Effect of the administration of KBT on the cell viability of concanavalin A treated-splenocytes in C57BL/6 mice

Samples	Cell Viability (%)
Control	$100.0 \pm 1.8$
Con A	$171.4 \pm 2.1$
KBT	$161.3 \pm 1.8^*$

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated thymocytes (Table 1-1), splenocytes (Table 1-2, 1-3) ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A. (Table 1-1, 1-3), lipopolysaccharide (Table 1-2). The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$  (Table 1-1, 1-2),  $p < 0.05$  (Table 1-3)).

*In vitro* 實驗에서 對照群의 thymocytes에 Con A를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, KBT 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 處理하였을 때의 細胞生存率은  $98.6 \pm 1.1\%$ ,  $97.4 \pm 0.7\%$  및  $92.6 \pm 0.4\%$ 로 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었다. Con A를 處理하였을 때 對照群의 細胞生存率은  $114.5 \pm 0.9\%$ 로 增加하였으며, KBT 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 處理하였을 때의 細胞生存率은  $112.3 \pm 1.4\%$ ,  $110.9 \pm 0.8\%$  및  $102.2 \pm 1.1\%$ 로 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 減少되었다 (Table 2-1).

對照群의 splenocytes에 LPS를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때, KBT 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 處理하였을 때의 細胞生存率은  $102.0 \pm 1.6\%$ ,  $106.3 \pm 1.5\%$  및  $111.5 \pm$

1.4%로 10 µg/ml 이상의 농도에서 對照群에 비해 細胞生存率이 增加되었다. LPS를 處理하였을 때 對照群의 細胞生存率은 158.7 ± 1.5%로 增加하였으며, KBT 1, 10 및 100 µg/ml를 각각 處理하

였을 때의 細胞生存率은 159.6 ± 1.3%, 166.5 ± 1.4% 및 172.5 ± 1.6%로 10 µg/ml 이상의 농도에서 對照群에 비해 細胞生存率이 增加되었다 (Table 2-2).

Table 2-1. Effect of KBT on the cell viability of concanavalin A treated-thymocytes *in vitro*

Samples	Dose (µg/ml)	Cell viability (%)	
		Non-treated of Concanavalin A	Treated of Concanavalin A
Control	-	100.0 ± 0.7	114.5 ± 0.9
KBT	1	98.6 ± 1.1	112.3 ± 1.4
KBT	10	97.4 ± 0.7*	110.9 ± 0.8*
KBT	100	92.6 ± 0.4**	102.2 ± 1.1**

Table 2-2. Effect of KBT on the cell viability of lipopolysaccharide treated-splenocytes *in vitro*

Samples	Dose (µg/ml)	Cell viability (%)	
		Non-treated of lipopolysaccharide	Treated of lipopolysaccharide
Control	-	100.0 ± 0.8	158.7 ± 1.5
KBT	1	102.0 ± 1.6	159.6 ± 1.3
KBT	10	106.3 ± 1.5*	166.5 ± 1.4*
KBT	100	111.5 ± 1.4**	172.5 ± 1.6**

The separated thymocytes (Table 2-1), splenocytes (Table 2-2) ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with KBT (1, 10 and 100 µg/ml). The data represents the mean ± SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group (: p<0.01, \*\*: p<0.001).

## 2. KBT가 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation에 미치는 效果

對照群의 thymocytes 中 CD4 single positive (CD4<sup>+</sup>) 細胞는 11.7 ± 0.3% 이었으며, CD8 single positive (CD8<sup>+</sup>) 細胞는

2.9 ± 0.3% 이었다. KBT를 投與하고 分離한 생쥐 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 11.6 ± 0.3%로, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.2 ± 0.2%로 對照群과 별 差異가 없었다 (Table 3).

Table 3. Effect of KBT on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	11.7 ± 0.3	2.9 ± 0.3
KBT	11.6 ± 0.3	3.2 ± 0.2

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

對照群의 splenocytes 中 B220 positive 세포(B220<sup>+</sup>)는 32.3 ± 1.0% 이었으며, Thy1 positive (Thy1<sup>+</sup>) 細胞는 23.9 ± 0.6% 이었다. KBT를 投與하고 分離한 생쥐 splenocytes 中 B220<sup>+</sup> 細胞는 24.4 ± 1.5%로, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 16.0 ± 1.6%로 對照群에 비해 減少하였다. Splenic T-lymphocytes 中 對照群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 14.8 ± 1.5%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 7.5 ± 0.2% 이었으며, KBT를 投與하고 分離한 생쥐 splenic T-lymphocytes 中 CD4<sup>+</sup> 細胞는 12.9 ± 0.7%로 對照群과 別 差異가 없었으나, CD8<sup>+</sup> 細胞는 6.2 ± 0.3%로 對照群에 비해 減少하였다 (Table 4).

Table 4. Effect of KBT on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Control	32.3 ± 1.0	23.9 ± 0.6	14.8 ± 1.5	7.5 ± 0.2
KBT	24.4 ± 1.5 <sup>**</sup>	16.0 ± 1.6 <sup>***</sup>	12.9 ± 0.7	6.2 ± 0.3 <sup>*</sup>

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

### 3. KBT가 腹腔 macrophage로 부터 nitric oxide의 生成에 미치는 效果

對照群의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하지 않았을 때 nitric oxide(NO) 生成量은 24 시간 후에 1.4 ± 0.3  $\mu$ M 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하면 NO 生成量은 12.3 ± 0.6  $\mu$ M로 增

加하였다. KBT를 投與하고 分離한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하지 않았을 때 NO 生成量은 1.5 ± 0.2  $\mu$ M로 對照群에 비해 別 差異가 없었으나, LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하였을 때 NO 生成量은 16.6 ± 0.8  $\mu$ M로 對照群에 비해 增加하였다 (Table 5).



Table 5. The production of nitric oxide from peritoneal macrophages in KBT-administered mice.

Samples	Nitric oxide( $\mu\text{M}$ )	
	Non-treated of LPS and $\gamma$ -IFN	Treated of LPS and $\gamma$ -IFN
Control	1.4 $\pm$ 0.3	12.3 $\pm$ 0.6
KBT	1.5 $\pm$ 0.2	16.6 $\pm$ 0.8*

KBT (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs. adherence period were cultured in RPMI 1640 media in the presence LPS and  $\gamma$ -interferon. \*Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

*In vitro* 實驗에서 KBT 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 處理하고 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하지 않았을 때 NO 生成량은 1.7  $\pm$  0.2, 1.8  $\pm$  0.3 및 1.9  $\pm$  0.2  $\mu\text{M}$ 로, LPS와

$\gamma$ -IFN을 處理하였을 때 NO 生成량은 11.4  $\pm$  0.4, 9.8  $\pm$  0.3 및 9.2  $\pm$  0.5  $\mu\text{M}$ 로 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の 濃度에서 對照群에 비해 減少하였다 (Table 6).

Table 6. Effect of KBT on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages *in vitro*

Samples	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Nitric oxide ( $\mu\text{M}$ )	
		Non-treated of LPS and $\gamma$ -IFN	Treated of LPS and $\gamma$ -IFN
Control	-	1.4 $\pm$ 0.3	12.3 $\pm$ 0.6
KBT	1	1.7 $\pm$ 0.2	11.4 $\pm$ 0.4
KBT	10	1.8 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.3*
KBT	100	1.9 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.5**

The separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI 1640 media mixed with KBT (1, 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ). The data represents the mean $\pm$ SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group (:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

4. KBT가 腹腔 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 效果

Chemiluminescence (CL)은 phagocytosis가 進行되는 동안 生成되는 oxygen radical에 의해 發生되며, lucigenin에 의해 增加되는 것으로 알려져 있다<sup>43)</sup>. 對照群의 macrophages로부터 生成되는 CL 量은  $5.8 \times 10^6$  RLU 이었으며,

KBT를 投與하고 分離한 macrophages에서 生成되는 CL 量은  $7.0 \times 10^6$  RLU로 增加하였다 (Fig. 1).

또한 FITC-conjugated *E. coli* particle의 貪食도 對照群에 비해 增加됨을 觀察하였다 (Fig. 2). 이는 KBT가 macrophage의 phagocytic activity를 增加시키고 있음을 示唆하는 것이다.

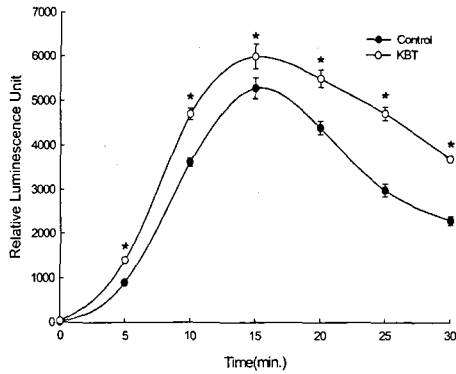
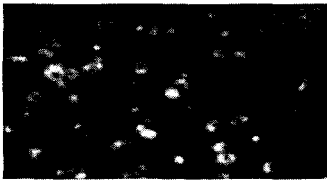


Fig. 1. Effect of the administration of KBT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group (:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ ).

A



B

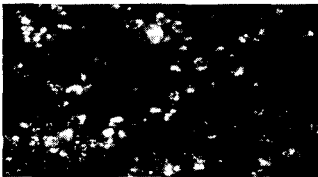


Fig. 2. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages

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

*In vitro* 實驗에서 對照群의 macrophages로부터 生成되는 CL 量은  $1.32 \times 10^7$  RLU 이었으며 KBT를 1, 10 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 處理하였을 때 macrophages에서 生成되는 CL 量은  $1.07 \times 10^7$ ,  $1.05 \times 10^7$  및  $1.00 \times 10^7$  RLU로 1  $\mu\text{g/ml}$  以上の 濃度에서 對照群에 비해 減少하였다 (Fig. 3).

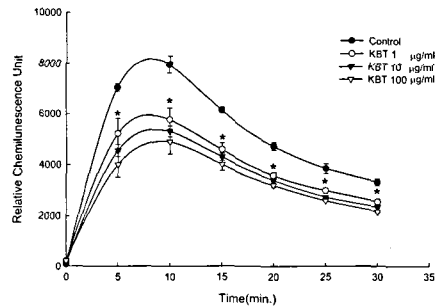


Fig. 3. Effect of KBT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages *in vitro*. The cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan 2h after was cultured with KBT (1, 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ). The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group ( $p < 0.001$ ).

## IV. 考 察

補中益氣湯은 A.D.1232年 元代 李<sup>1)</sup>의 《東垣十種醫書》에 처음으로 收錄된 處方으로 一切의 清陽下陷, 中氣不足하여 오는 諸證을 目的으로 立方되었는데, 脾胃中の 清氣를 끌어서 陽道와 諸經을 運行하게하며 升陽補氣하는 故로 陰脫, 陰挺에 活用되어왔다<sup>2-10)</sup>. 加味補中益氣湯은 本方에 補血, 滋陰, 補肝腎, 生精血하는 熟地黃과 鹿角膠를 加한<sup>11)</sup> 處方이다.

子宮下垂 혹은 子宮脫이란 下腹部의 筋肉과 韌帶가 너무 늘어나서 생기는 것으로 韓醫學에서는 子宮下垂에 대한 表現이 다양한데, 《諸病源候論》<sup>13)</sup>에서 最初로 “陰挺出 下脫”로 表現되고 있으며, 方<sup>14)</sup>은 “生腸不收”, “子宮不收”로, 李 等<sup>3,4)</sup>은 “陰中挺出”로, 康 等<sup>5,15,16)</sup>은 “陰瘻”로, 羅 等<sup>17,18)</sup>은 “陰挺”이라고 表現하였다.

陰挺, 陰脫의 治法은 益氣升提, 益氣補腎, 清熱利濕을 원칙으로 하나, 虛者補之, 陷者舉之, 脫者固之라 하여 升補元氣의 治法이 主로 活用 되었다<sup>17)</sup>. 補元氣란 補正氣의 意味로 《素問》<sup>21)</sup> 『刺法論』에 “正氣存內 邪不可干”, 『評熱病論』에 “邪之所湊 其氣必虛”라 하고, 《靈樞》<sup>22)</sup> 『百病始生篇』에 “風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人”이라 하였는데, 여기에서 正氣는 人體의 生命活動을 維持시켜주는 基本的인 物質이라고 볼 수 있으며, 邪氣는 一切 疾病을 일으키는 所因의 總稱으로서 外界의 六淫之邪와 체내의 陰陽失調로 인한 病理狀態 그리고 痰飲, 瘀血, 食積 등과 같은 病理產物 등을 總稱하고 있다<sup>43-47)</sup>.

이러한 正氣와 邪氣의 概念은 西洋醫學의 免疫學 理論과 類似함을 알 수 있다. 즉 正氣에 대하여 尹<sup>48)</sup>은 生理的인 活動力이라 하였고, 金<sup>49)</sup>은 眞氣 혹은 元氣와 同一한 것으로 人體生命活動의 原動力이며 生命活動을 維持시켜주는 가장 基本的인 物質이라 했으며, 傅<sup>25)</sup>는 眞氣와 同一한 것으로서 人體生命活動의 基本物質이라 하였고, 蔡<sup>46)</sup>는 正氣란 眞氣나 元氣라고 불리우는데 邪氣에 대한 相對的 用語로 人體生命活動力의 總稱으로 볼 수 있으며 生理 機能上 病邪에 대해 防禦와 護衛를 하는 것이라 하였다. 免疫疾患의 治療에 있어서 補氣, 補血, 補陰, 補陽하는 藥材의 投與는 人體의 抗病力을 調節하여 免疫力 增進의 次元에서, 活血祛瘀, 祛風濕痰, 清熱解毒시키는 藥材의 投與는 免疫平衡을 破壞하는 所因을 排除하여 免疫平衡에 到達하는 次元에서 意味가 있는 것으로 보고되고 있는 바<sup>28,29)</sup>, 加味補中益氣湯은 人體의 抗病力을 增進시킬 수 있는 處方임을 알 수 있다.

KBT를 투여하고 분리한 splenocytes의 細胞生存率은 LPS를 處理하지 않았을 때나 處理하였을 때 모두 對照群에 비해 減少되었으며, Con A를 處理하였을 때도 對照群에 비해 減少하였다. 이는 KBT가 splenocytes 중 B- 및 T-lymphocytes의 細胞生存率을 減少시킴을 의미하는 것이다. 이러한 作用이 KBT 直接作用에 의한 것인가를 확인하기 위해 KBT 1, 10 및 100 µg/ml를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 10 µg/ml 이상의 濃度에서 對照群에 비해 細胞生存率이 增加하였다. 이는 KBT가 經口로 投與되었을 때 splenocytes의 細胞生

存率을 간접적으로 작용하여 抑制하고 있음을 의미하는 것이다. 이러한 結果는 KBT가 T- 및 B-lymphocytes에 의한 免疫能을 抑制시켜 細胞性免疫反應을 調節하고 있음을 시사하는 것이다.

Thymocyte는 thymus의 皮質 및 髓質에서 增殖 및 分化 過程을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 分化되며, 分化된 Th1 cell은 v-interferon (v-IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 分泌하여 다른 T 세포, B 세포 및 macrophage의 增殖과 分化를 促進하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 活性化시킨다<sup>50)</sup>.

對照群의 thymocytes 中 Th (CD4 single positive cell) 細胞는 11.7%, Tc (CD8 single positive cell) 細胞는 2.9%로 定常 생쥐 胸線에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells은 약 12%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 報告된 內容과 비슷한 結果를 나타내었으며<sup>51)</sup>, KBT 投與하고 分離한 thymocytes 中 Th 細胞의 population은 11.6%로, Tc 細胞의 population은 3.2%로 對照群과 별 差異가 없었다. Splenocytes의 B 및 T 細胞의 population은 KBT를 投與하였을 때 B 細胞의 population은 對照群에 비해 減少하였으며, T 細胞의 population도 對照群에 비해 減少하였다. 또한 splenocytes 中 Th 細胞의 population은 對照群에 비해 별 差異가 없었으나, Tc 細胞의 population은 對照群에 비해 減少하였다. 이러한 結果는 KBT가 T- 및 B-lymphocytes의 population을 減少시키고, T-lymphocytes 中 Tc 세포의 population을 減少시켜 免疫反應을 抑制

시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

Nitric oxide (NO)는 T-lymphocyte가 生成하는 cytokine을 調節하며, *in vivo*에서 T-lymphocyte의 生命을 調節하는 因子 中 하나로 알려져 있다<sup>52)</sup>. 또한 NO는 heper T cell의 增殖을 抑制하며<sup>53)</sup> 自己 免疫系를 抑制하는 것으로 報告<sup>54)</sup>되었다. 本 實驗에서 KBT를 投與하였을 때 對照群에 비해 NO 生成이 增加되었다. 이러한 結果가 KBT의 直接作用에 의한 것인지를 確認하고자 KBT 1, 10 및 100 µg/ml를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 對照群에 비해 NO 生成이 減少하였다. 이는 KBT가 經口로 投與되었을 때 복강 macrophages에 간접적으로 作用하여 NO 生成을 增加시키고 있음을 示唆하는 것이다. 앞의 實驗結果에서 KBT 投與에 의해 T-lymphocytes의 細胞生存率이 減少된 것이 NO 生成을 促進하여 나타난 結果인지는 追後 研究되어야 할 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 phagocytic activity가 促進된다. 이러한 phagocytosis는 macrophage 뿐만아니라 polymorphonuclear leukocyte에서도 일어난다. Phagocytosis는 免疫的인 側面에서 重要하지만, 傷處治癒 過程에서도 매우 重要하다. 本 實驗에서 macrophages의 phagocytic activity를 測定하는데 lucigenin chemiluminescence를 測定하는 方法을 利用하였다. 이 方法의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 生成하는데, 이때 生成된 oxygen radical과 lucigenin이 反應하여 lucigenin chemiluminescence를 發生하는 것을 測定함으로써 phagocytic

activity가 進行되는 것을 確認하는 것이다<sup>55)</sup>. Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence (CL) 量을 測定한 結果 KBT 投與에 의해 CL 量이 增加하였으며, FITC- conjugated *E. coli* particle의 貪食도 增加하였으나, *in vitro* 實驗에서는 CL 量이 減少되었다. 이는 KBT가 macrophage의 貪食能을 直接的으로 增加시키기보다는 生體 內에서 間接的인 經路를 통하여 貪食能을 增加시키고 있음을 示唆하는 것이다. NO는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 形成을 抑制하는 것으로 알려져 있다<sup>56)</sup>. 本 實驗에서 KBT를 투여하였을 때는 NO 生成이 促進되었다. 이러한 作用이 KBT 直接作用에 의한 것인가를 確認하기 위해 KBT 1, 10 및 100 µg/ml를 *in vitro*에서 각각 處理하였을 때 對照群에 비해 NO 生成이 減少되었다. 이는 KBT가 經口로 投與되었을 때 복강 macrophages에 間接적으로 작용하여 NO生成을 抑制하고 있음을 意味하는 것이다. KBT 投與에 의해 phagocytic activity가 增加되었다는 結果는 KBT가 macrophages의 phagocytic activity를 增加시키는데 NO 經路가 아닌 다른 經路를 통하여 作用하고 있음을 意味하는 것이다. 이는 KBT가 經口投與時 非特異的免疫反應을 增強시킬 수 있음을 示唆하는 것이다.

以上の 實驗결과 加味補中益氣湯은 經口로 投與되었을 때 thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率을 減少시켜 特異的 免疫反應을 抑制하고, macrophages로부터 phagocytic activity를 活性化시켜 非特異的 免疫反應을 增強시키는 作用이 있으므로, 氣虛로 인한 陰挺, 陰脫

에 활용될 수 있을 것으로 思料된다.

## V. 結 論

加味補中益氣湯 (KBT)이 생쥐의 免疫能에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. KBT는 thymocytes의 細胞生存率을 *in vivo* 및 *in vitro* 實驗에서 減少시켰으며, splenocytes의 細胞生存率을 *in vivo* 實驗에서는 減少시켰으나, *in vitro* 實驗에서는 增加시켰다.
2. KBT는 thymocytes 中 Th 및 Tc 細胞의 population에는 影響을 주지 않았다.
3. KBT는 splenocytes 中 B- 및 T-lymphocytes의 population을 減少시켰으며, splenocytes 中 Tc 細胞의 population을 減少시켰다.
4. KBT는 腹腔 macrophage로부터 nitric oxide의 生成은 *in vivo* 實驗에서는 增加시켰으나, *in vitro* 實驗에서는 減少시켰다.
5. KBT는 腹腔 macrophage의 phagocytic activity를 *in vivo* 實驗에서는 增加시켰으나, *in vitro* 實驗에서는 減少시켰다.

以上の 實驗결과 加味補中益氣湯은 經口로 投與되었을 때 thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率을 減少시켜 特異的 免疫反應을 抑制하고, macrophages로부터 phagocytic activity를 活性化시켜 非特異的 免疫反應을 增強시킬 수 있는 湯劑라 思料된다.

- 투 고 일 : 2006년 07월 28일
- 심 사 일 : 2006년 08월 01일
- 심사완료일 : 2006년 08월 09일

## 參考文獻

1. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울 : 大成文化社. 1983 : 35-37, 86-87.
2. 萬全. 萬氏婦人科. 湖北 : 湖北人民衛生出版社. 1983 : 43.
3. 李梴. 編註醫學入門. 서울 : 南山堂. 1980 : 109-110.
4. 龔廷賢. 萬病回春. 香港 : 香港宇宙出版公司. 1985 : 371, 375.
5. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1980 : 318, 621.
6. 張介賓. 景岳全書. 서울 : 翰成社. 1978 : 739.
7. 武之望. 濟陰綱目. 台北 : 旋風出版社. p.217, pp.227-230, 1972.
8. 程國彭. 醫學心悟. 香港 : 友聯出版社. pp.267-268, 1961.
9. 吳謙 등. 醫宗金鑑. 婦科心法要訣. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 110-111.
10. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울 : 정담. 2001 : 137, 287.
11. 임은미. 여성본초학. 서울 : 전국의학사. 2005 : 13, 19, 24, 27, 36, 69, 77, 180, 182, 207.
12. 이혜경 등. 여성건강간호학(하). 서울 : 현문사. 1998 : 1471-1473.
13. 巢元方. 諸病源候論. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 1129, 1223-1224.
14. 方廣. 丹溪心法附餘. 서울 : 대성문화사. 1982 : 751.
15. 康命吉. 濟衆新編. 서울 : 杏林書院. 1974 : 258-259.
16. 沈堯封. 沈氏 女科輯要. 台北 : 旋風出版社. 1977 : 550, 582.
17. 나원개 등. 실용중의부과학. 상해 : 상해과학기술출판사. 1994 : 259-261.
18. 白洪龍. 常見病症變症診治概要. 昆明 : 云南人民出版社. 1984 : 217, 454-456.
19. 柳同烈. 陰挺·陰脫에 관한 文獻的 考察. 대한한방부인과학회지. 1991 : 4(1) : 29-42.
20. 陳自明. 婦人良方大全. 서울 : 金泳出版社. 1975 : 50-51.
21. 王琦 등. 素問今釋. 貴州. 貴州人民出版社. 1981 : 103, 163, 164, 207, 412.
22. 河北中醫學院. 靈樞經校釋. 北京 : 北京人民衛生出版社. 1980 : 226.
23. 李鐘訓. 病原微生物學. 서울 : 壽文社. 1973 : 133-183.
24. 李文鎬. 內科學. 서울 : 금강출판사. 1979 : 167-168, 1989-1999.
25. 傅芳. 中醫免疫思想及成就. 新中醫. 198 : 25(11) : 55-57, 4.
26. 章育正. 虛證和實證病因的免疫狀態. 上海中醫雜誌. 1984 : 6 : 44-45.
27. 沈承沆. 中醫與免疫. 浙江中醫學院學報. 1990 : 14(2) : 6-7.
28. 嚴宗正. 正邪論新釋. 新中醫. 1984 : 25(6) : 5-6.
29. 鄭憲鐸 등. 免疫學入門. 서울 : 高文社. 1988 : 9-11, p.61, 519.
30. 林圭埸. 四君子湯-煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響. 익산 : 圓光大學校大學院 博士學位論文. 1983.
31. 黃忠淵. 十全大補湯 加 鹿茸이 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響. 익산 :

- 圓光大學校大學院 博士學位論文. 1989.
32. 朴恩靜. 歸脾湯과 歸脾湯加味方에 생쥐의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響. 익산 : 圓光大學校大學院. 博士學位論文. 1990.
33. 徐正敏. 加味補虛湯이 생쥐의 免疫調節作用에 미치는 影響. 대전 : 大田大學校大學院 博士學位論文. 2001.
34. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.. Planning for lymphocytes. A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978 : 75, 2844.
35. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L.. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.*, 1979 : 120, 1497.
36. Mosmann, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 1983 : 65, 55-63.
37. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 1990 : 129, 23.
38. Suda, T. and Nagata, S.. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1994 : 179, 873-879.
39. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A.. Killing of Plasmodium faciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 1991 : 59(9) : 3280.
40. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M.. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 1994 : 174, 259.
41. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G.. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 1988 : 112, 163.
42. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immuno. Methods*, 1993 : 162, 1.
43. 陳克正. 探仲景學說中的免疫學思想. 新中醫. 1984 : 25(11) : 6.
44. 劉正才 등. 中國免疫. 北京 : 北京出版社, 1983 : 9.
45. 趙鐘寬. 免疫에 관한 東西醫學的 考察. 동양의학 1998 : 12(1):19-23.
46. 蔡禹錫. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌, 1990 : 11(2) : 54-91.
47. 宋驚冰. 中醫病因病機學. 北京 : 人民衛生出版社. 1987 : 64-66.
48. 尹吉榮. 東醫學의 方法論. 서울 : 成輔社. 1983 : 49-52.
49. 金元熙 외. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社. 1990 : 49-54, 60-62
50. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 1993 : 53, 59.
51. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and

- Pober, J. S.  
Cellular and molecular immunology.  
Saunders  
Company. U.S.A., 1994 : 2, 177-178.
52. Kilbourn, R.G. and Griffith, O.W..  
Overproduction of nitric oxide in  
cytokine-mediated and septic shock.  
*J. Natl. Cancer Instit.*, 1992 :  
84(11) : 828-831.
53. Okkuda, Y., Sakada, S., and  
Yanagihara, T.. Nitric oxide induces  
apoptosis in mouse splenic T  
lymphocytes. *Immunolgy Letters*,  
1996 : 52, 135.
54. Albina, J.E., Abate, J.A. and  
Henry, W.L.. Nitric oxide production  
is required for murine resident  
peritoneal macrophages to suppress  
mitogen-stimulated T cell proliferation.  
*J. Immunol.*, 1991 : 147(1) : 144-148.
55. Channon, J. Y., Leslie, C. C. and  
Johnston, Jr. R. B.. Zymosan-stimulated  
production of phosphatidic acid by  
macrophages: relationship to release  
of superoxide anion and inhibition  
by agents that increase intracellular  
cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.* 1987  
: 41, 450-455.
56. Jun, C.D., Park, S.K., Kim, J.M.,  
Kim, J.D. and Kim, S.H.. Nitric  
oxide inhibits macrophage pseudopodia  
formation in the activated macrophages.  
*Kor. J. Immunol.* 1996 : 18,  
635-644.