

龍肉調胃湯 경구투여가 노화 흰쥐의 면역활성에 미치는 영향

이한얼 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질의학과

Abstract

The Effect of Oral Administration of Yongyukjowi-tang on the Immune Activity in Aged Rat

Han-Eol Lee, Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University.

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effect of oral administration of Yongyukjowi-tang(YJT) on the immune activity in aged Sprague-Dawley rat(SD rat).

Methods

SD rats were divided into three groups: Yongyukjowi-tang groups(YJT groups), distilled water groups(control groups) and Vitamin C groups(positive control groups) which were administered an oral dose(1 ml/1day) to 6, 48 and 68 weeks old SD rats for four weeks.

After four weeks, the number of total leukocyte, CD3+, CD4+, CD8+, and the level of cytokine (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ) were measured in spleen tissue of each SD rats.

Results and Conclusions

- 1) The number of total leukocyte significantly increased in 52 weeks old YJT group and 72 weeks old YJT group in comparison with those of the control group.
- 2) The number of CD3+ cell significantly increased in 72 weeks old YJT group in comparison with those of the control group and the positive control group.
- 3) The number of CD8+ cell significantly increased in 52 weeks old YJT group in comparison with those of the control group.
- 4) The level of IL-2 significantly increased in 72 weeks old YJT group in comparison with those of the control group and the positive control group.
- 5) The level of IL-4 significantly increased in 52 weeks old YJT group in comparison with those of the positive control group.

These results suggest that oral administration of YJT has an effect on increase of immune activity in aged rat.

Key Words: Yongyukjowi-tang, Immune activity, Immune cell, Cytokine, Aged Rat

I. 緒論

우리나라는 65세 이상의 인구 구성비가 향후 2015년에는 12.9%, 2020년에는 15.6%로 예측되고 있어 지속적인 노인인구의 증가와 함께 수명연장 및 건강한 삶에 대한 관심이 더욱 높아질 것으로 보인다¹.

노화란 연령과 관련된 변화 중 생물학적 요인에 기인된 변화로서 신체와 행동에서의 연령과 관련된 감퇴나 저하를 의미한다. 인간은 연령증가와 함께 노화하지 않을 수 없고 노화의 끝은 곧 죽음을 의미하기 때문에, 최근 노화의 원리 및 노화를 막는 방법 등에 대한 관심이 증대되고 있다².

사상의학적 수명과 노화의 개념은 인생과정에서 명맥(命脈)의 변화와 생식충보지도(生息充補之道)의 변화를 의미하고, 수명의 장단을 결정짓는 요인들인 주색재권(酒色財權)과 심욕(心慾)과 지행(知行), 공경(恭敬)과 태만(怠慢), 조양(調養)과 병변(病變), 조병(調病) 등의 의미를 통해 체질적 양생과 항노화의 의미를 설명할 수 있다³.

현재까지 노화를 초래하는 기전이나 과정에 대한 명확한 규명은 없으나 노화를 일으키는 원인이나 유관학설은 여러 가지가 있으며 그 중 면역이론이 점차 주목을 받고 있다. 면역기능은 외계에서 체내로 침입하는 세균, 바이러스, 독성 물질 등에 대하여 방어하는 기능으로 생명유지 기능에 매우 중요하다. 면역이론이란 노화가 진행되면서 면역기능에 이상이 생겨 기능적 노화가 진행된다는 이론이다. 즉, 나이가 들면 면역 기관에서 생산하는 항체의 양이 감소하여 면역 방어 능력이 감소하며, 다른 한편으로는 외계물질 뿐 아니라 면역 인식 장애에 의한 자가 항체의 생산이 증가되어 자신의 몸을 스스로 파괴하게 되어 노화가 더욱 촉진된다는 학설이다⁴.

용육조위탕(龍肉調胃湯; Yongyukjowi-tang; YJT)은 태음인(太陰人)에게 오래 병을 앓고 난 뒤에 조리(調理)를 위하여 사용하는 처방⁵으로 태음인의 편소지장(偏小之臟)인 폐(肺)의 기능을 도와주고 보명지주(保命之主)인 호산지기(呼散之氣)를 확충하는데

도움이 되므로 태음인의 양생 및 질병예방에 효과가 있을 것으로 생각하며 아울러 면역력 증가와 노화방지에도 일정한 효과가 있을 것으로 기대된다.

최근 항노화에 대한 국내외의 연구로는 항노화 호르몬요법^{6,7}, 비타민요법^{8,9}, 열량제한요법¹⁰, 한약복합처방의 항노화 효과¹¹⁻¹³, 약침 요법^{14,15} 등의 활발한 연구가 진행되고 있다. 그러나 노화 및 면역작용에 관련된 YJT에 대한 연구는 미흡한 실정으로 임상시험뿐 아니라 자연 노화된 동물을 이용하여 면역활성을 알아본 연구도 없었다.

이에 저자는 임상연구 시행 전 기초연구로서 YJT가 노화 흰쥐의 면역활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6주령, 48주령 및 68주령의 Sprague-Dawley rat(SD rat)에 4주간 YJT 종류 추출액을 경구투여한 후, 같은 조건의 각 주령의 SD rat에 distilled water를 경구 투여한 대조군(distilled water group; DW group)과 Vitamin C를 경구 투여한 양성대조군(Vitamin C group; Vit.C group)과의 여러 가지 면역 관련 검사의 결과를 비교·분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 동물

동물은 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)에서 5주령과 24주령의 웅성 SD rat을 공급받아 사용하였다. 5주령 동물은 구입 후 1주일간 실험실 환경에 적응시켜 6주령이 된 후 실험에 사용하였다. 24주령 동물은 두 군으로 나누어, 한 군은 48주령, 나머지는 68주령이 될 때까지 실험실에서 사육한 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 실험 당일까지 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하고, 실험실은 실온(22±2°C)을 유지하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회규정¹⁶을 준수하여 시행하였다.

Table 1. The Compositions of Yongyukjowi-tang(YJT)

Herbs	Habitat	Pharmacognostic name(Scientific name)	Dose(g)
龍眼肉	China	Longanae arillus(Euphoria longana)	40
乾栗	Korea	Castanae semen(Castanea crenata)	20
栝子仁	China	Biotae semen(Thuja orientalis)	8
麥門冬	Korea	Liriopis tuber(Liriope platyphylla)	8
Total			76

2) 약재

본 실험에 사용된 YJT의 약재들은 D대학교 한방병원 약제실의 검수를 받아 구입하여 이용하였다. YJT의 약재들은 정량하여, 사용하기 전에 증류수에 세척하였다. YJT의 구성은 다음과 같다(Table 1).

2. 방법

1) 약물

본 실험에서 수행한 증류법은 대한약침학회를 통하여 얻은 수행방법¹⁷⁾을 이용하였다. YJT 약재(76 g)를 세척 후 분쇄기로 분쇄하여 1 L의 증류수를 가하고 shaker를 이용하여 3시간동안 진탕을 실시한 다음 여과지로 여과한다. 증류는 impellar에 반응조 하부와 반응조 상부조를 설치하고 그 위에 냉각관(환류, 증류)과 분액 여두를 설치한다. YJT 전탕액을 반응조 하부에 넣고, 105°C에서 예열한다. 당약이 끓기 시작하면 추출온도 107°C에 맞춘 뒤, 3시간동안 전탕을 실시한다. 이때 냉각수(4°C)가 환류냉각관에서 흐르는지 확인한다. 시간의 경과에 따라 설정온도 범위(전탕 온도 105°C)에서 전탕되고, 충분히 끓은 약재의 온도가 높아지고(추출온도 107°C), 냉각수 순환위치가 바뀔에 따라 반응조 내부에서만 순환하던 기체가 냉각수에 의해 액체화되어, 증류액이 분액여두로 한 방울씩 받아진다. Table 1의 한 첩 기준으로 YJT 증류액 240 ml을 얻었다. 추출이 끝나고 1 L bottle에 받아들인 증류액은 무기염류를 침강시키기 위해서 하루 동안 냉장 보관한다. 하루 동안 냉장 보관된 YJT 증류 추출액은 filtering을 실시하고, 멸균된 bottle에 넣어 냉장 보관한다.

2) 세포독성 측정

(1) 간세포 분리

52주령 수컷 SD rat의 간장 조직을 사용하였다. Rat을 ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시킨다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FBS)와 cRPlagenase type IV(300 u/ml)를 넣고 37°C에서 90 분간 incubation 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 분리가 잘 되도록 한다. 간 조직을 HBSS를 사용하여 mesh에서 갈아준다. 이렇게 얻어진 시료를 원심 분리하여 획득한 세포는 RBC를 완전히 제거하여, 실질세포를 이용하여 실험을 수행하였다.

(2) 간세포의 배양 및 세포독성 측정

분리된 간세포의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 24 well plate에 5×10⁵ cells/well로 세포를 분주하고, RPMI-1640 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 µg/ml)과 YJT 증류를 실시하여 얻어진 약물을 각각 100%, 50%, 25%, 10%의 농도별로 처리하고, 72시간 동안 세포를 배양한다. 68시간 후에, MTT solution (1 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 µl씩 분주하고 4시간 동안 37°C에서 배양한다. 4시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 µl씩 버리고, solubilizing solution을 100 µl씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical densities로 확인한다.

3) 실험군 설정

각각 10주령, 52주령, 72주령의 SD rat을 각 주령마다 대조군(DW), Vitamin C 대조군(Vit.C), YJT 증류액 투여군(YJT)으로 나누어 모두 9군으로 무작위로 분류하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

- (1) 10주령, 52주령 및 72주령 대조군(DW) : 6주령, 48주령 및 68주령의 SD rat에 매일 증류수를 1 ml씩 4주간 경구투여한 군
- (2) 10주령, 52주령 및 72주령 vitamin C 대조군 (Vit.C) : 6주령, 48주령 및 68주령의 SD rat에 매일 1% vitamin C를 1 ml씩 4주간 경구투여한 군
- (3) 10주령, 52주령 및 72주령 YJT 증류액 투여군 (YJT) : 6주령, 48주령 및 68주령의 SD rat에게 매일 YJT 증류액 원액을 1 ml씩 4주간 경구투여한 군

4) 몸무게 및 비장 무게 측정

실험 종료 후, 실험동물의 몸무게와 비장 무게를 측정하였다. 이를 이용하여 spleen index(체중에 대한 비장 무게 비율)를 계산하였다.

$$Spleen\ Index = \frac{\text{비장 무게 (g)}}{\text{실험동물체중 (g)}} \times 100$$

5) 면역 활성 측정

(1) Cytometry

각 실험군에 대한 경구투여가 끝나면, HBSS를 관류하여 혈액을 제거한 후, 비장 조직을 적출한다. 적출된 비장 조직은 RBC를 제거하고, leukocyte만을 분리한다. 분리된 leukocyte는 MACS를 이용하여 CD3+, CD4+, CD8+ 세포를 분리한 후, 계수한다.

(2) Cytokine analysis

① Stimulation with ConA

분리된 leukocyte는 항원에 대해 활성화를 나타내기 위하여, 50 ug/ml의 농도로 ConA를 처리하여 48시간 동안 37°C에서 배양한다.

② Cytokine detection by ELISA

Leukocyte를 ConA 처리한 후 cell culter supernatant를 사용하여 ELISA로 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 함량을 측정한다.

6) 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 Kruskal-Wallis test를 사용하였고, Mann-Whitney test로 실험군 간 비교를 시행하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95% 이상($p < 0.05$) 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 結果

1) Total leukocytes

약물 투여에 따른 비장 내 총 leukocytes 수의 변화를 관찰하였다. 52주령에서는 Vit.C군 및 YJT군의 비장 leukocyte 수가 DW군에 비하여 유의하게 증가하였고, 72주령에서는 YJT군의 비장 leukocyte 수가 DW군과 Vit.C군에 비하여 유의하게 증가하였다(Figure 1).

2) CD3+ cell

약물 투여에 따른 비장조직 내 CD3+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 10주령과 72주령에서 DW군 및 Vit.C군에 비하여 YJT군의 CD3+ cell의 수가 유의하게 높은 것으로 나타났다(Figure 2).

3) CD4+ cell

약물 투여에 따른 비장조직 내 CD4+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 모든 주령에서 약물투여에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다.

4) CD8+ cell

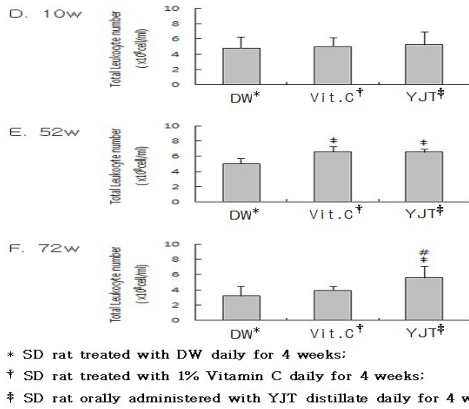


Figure 1. Effect of YJT on the number of total leukocyte in rat spleen

Rats in the DW, Vit.C and YJT group were treated with DW, 1% Vitamin C and Yongyukjowi-tang(YJT) distillate respectively, once a day for 4 weeks. After the animals were sacrificed, spleen was removed and the number of total leukocyte was analysed. Values represent mean ± SD (n=5)

‡ : p<0.05 compared to DW group by Kruskal-Wallis test.
 # : p<0.05 compared to Vit.C group by Kruskal-Wallis test

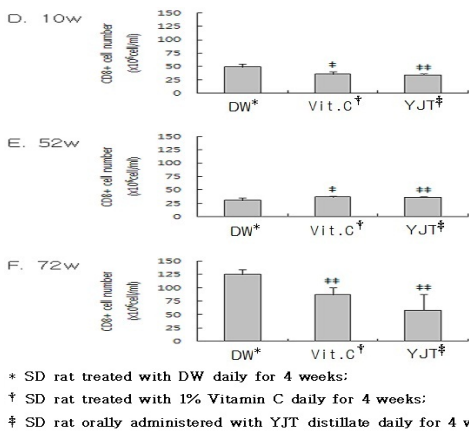


Figure 3. Effect of YJT on the number of CD8+ cell in rat spleen.

Rats in the DW, Vit.C and YJT group were treated with DW, 1% Vitamin C and Yongyukjowi-tang(YJT) distillate respectively, once a day for 4 weeks. After the animals were sacrificed, spleen was removed and separate the CD8+ cells in spleen were counted by MACS. Values represent mean ± SD (n=5)

‡ ‡ : p<0.01, ‡ : p<0.05 compared to DW group by Kruskal-Wallis test.

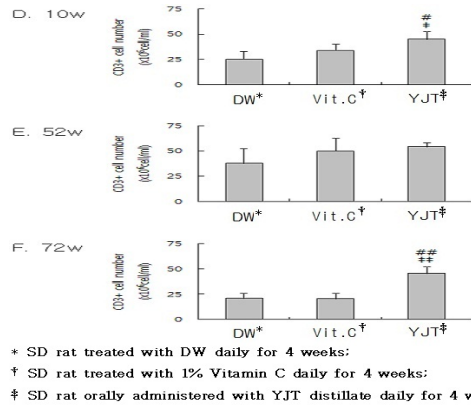


Figure 2. Effect of YJT on the number of CD3+ cells in rat spleen.

Rats in the DW, Vit.C and YJT group were treated with DW, 1% Vitamin C and Yongyukjowi-tang(YJT) distillate respectively, once a day for 4 weeks. After the animals were sacrificed, spleen was removed and the CD3+ cells in spleen were counted by MACS. Values represent mean ± SD (n=5)

‡ ‡ : p<0.01, ‡ : p<0.05 compared to DW group by Kruskal-Wallis test.
 ## : p<0.01, # : p<0.05 compared to Vit.C group by Kruskal-Wallis test.

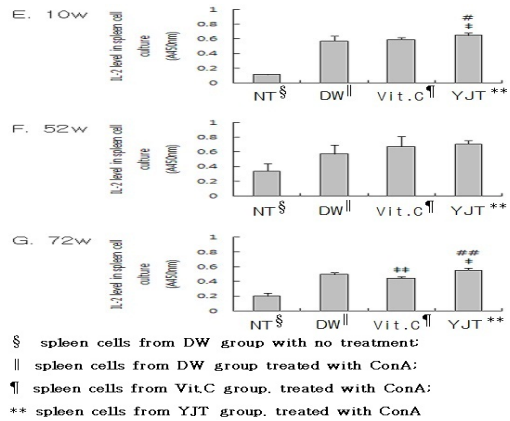


Figure 4. Effect of YJT on IL-2 level in rat spleen cell culture sup..

Rats in the DW, Vit.C and YJT group were treated with DW, 1% Vitamin C and Yongyukjowi-tang(YJT) distillate respectively, once a day for 4 weeks. After the animals were sacrificed, spleen was removed and the cells were incubated under the treatment with ConA. After 48 hours, cell culture was harvested and level of interleukin-2(IL-2) was analysed by ELISA. Values represent mean ± SD (n=5)

‡ ‡ : p<0.01, ‡ : p<0.05 compared to DW by Kruskal-Wallis test.
 ## : p<0.01, # : p<0.05 compared to Vit.C group by Kruskal-Wallis test.

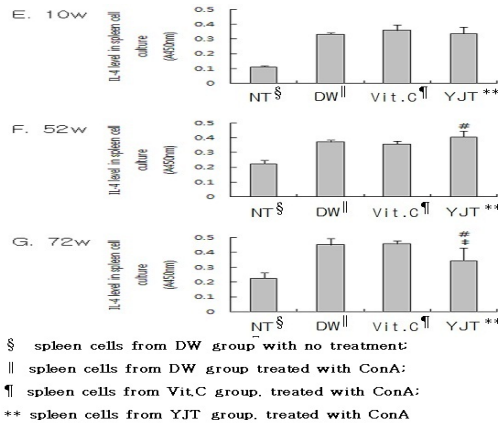


Figure 5. Effect of YJT on IL-4 level in rat spleen cell culture sup..

Rats in the DW, Vit.C and YJT group were treated with DW, 1% Vitamin C and Yongyukjowi-tang(YJT) distillate respectively, once a day for 4 weeks. After the animals were sacrificed, spleen was removed and the cells were incubated under the treatment with ConA. After 48 hours, cell culture was harvested and level of interleukin-4(IL-4) was analysed by ELISA. Values represent mean ± SD (n=5)

‡ : p<0.05 compared to DW group by Kruskal-Wallis test.

: p<0.05 compared to Vit.C group by Kruskal-Wallis test.

약물 투여에 따른 비장조직 내 CD8+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 10주령과 72주령에서 Vit.C군 및 YJT군의 CD8+ cell 수가 DW군에 비하여 유의하게 감소하였다. 52주령에서는 Vit.C군과 YJT군의 CD8+ cell 수가 DW군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다 (Figure 3).

5) IL-2

약물투여에 따른 IL-2 농도의 차이를 분석한 결과, 10주령과 72주령에서 YJT군의 IL-2 농도가 DW군 및 Vit.C군에 비하여 유의하게 높았고, 72주령에서는 Vit.C군의 IL-2 농도가 DW군에 비하여 유의하게 낮았다(Figure 4).

6) IL-4

약물투여에 따른 IL-4 농도의 차이를 분석한 결과, 52주령에서 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-4 농도가 유의하게 높았으며, 72주령에서는 DW군과 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-4 농도가 유의하게 낮았다

(Figure 5).

7) IL-10

약물투여에 따른 비장 IL-10 농도 차이를 분석한 결과, 10주령에서 DW군과 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-10 농도가 유의하게 낮았다.

8) IFN-γ

약물투여에 따른 IFN-γ 농도의 차이를 분석한 결과, 10주령에서 DW군과 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IFN-γ 농도가 유의하게 낮은 것으로 나타났다.

IV. 考 察

노화란 개체의 진행적이고 예측이 가능하며 피할 수 없는 진화 및 성숙이 사망할 때까지 지속하는 생물학적 과정이다. 생리학적인 의미에서의 정상적인 노화는 기관계의 예비력 및 항상성 조절이 지속적으로

침식되는 것을 말하며 항상성 유지의 최대한계는 대개 고령에 나타나지만 결국 임계점에 달하여 최소한의 침해도 극복하지 못하고 상대적으로 단기에 걸쳐 사망에 이르게 된다¹⁸.

사상의학의 창시자인 이제마(李濟馬)는 인간의 수명에 대하여 『東醫壽世保元四象草本卷』 「病變第二統」¹⁹에서 “太陽人財權酒色 凡百內傷外觸皆損肝 故太陽人以肝臟剩削爲命脈長短...”라 하여 명맥의 장단(長短)이 편소지장의 잉삭(剩削)에 따라 결정된다고 하였다. 또한 “太陽人 肝臟十分圖全而與肺相敵者 極完境人也, 一半虧缺而與肺讓倍者 極壞境人也 過此則死, 以此推之 太陽人肝臟部一半爲命脈實數 他臟倣此”라 하여 생명을 유지하는 편소지장의 남아있는 기운의 정도를 명맥실수(命脈實數)라 정의하였다. 이 명맥실수가 줄어들어 절반 이하가 되면 죽는다고 하여 질병과 건강의 상태뿐 아니라 수명까지도 명맥실수에 따라 달라질 수 있다고 설명하였다²⁰.

현재 거론되고 있는 노화이론들을 분류하면 분자 수준의 노화 이론으로 유전자 이론, 유전변이 이론, 프로그램 이론이 있고, 세포 수준의 노화 이론으로 산화기 이론, 교차연결 이론(결체조직 이론), 마모 이론이 있으며, 기관계통 수준의 이론으로 신경내분비 조절 이론, 면역 이론이 있다²¹.

그 중 면역이론은 노화과정이 면역계의 기능변화를 의미한다고 주장하는 이론이다. 척추동물 대부분은 나이에 따라 면역세포가 점차 다양화되다가 신체와 조직 간의 자가 조절 기전이 점진적으로 퇴화한다. 이 자동적인 퇴화 현상에 의하여 자신의 정상세포가 이물로 인식되고 면역계에 의하여 공격을 받는다. 또한, 항체세포의 감시기능도 손상된다. 인간 역시 노화에 의해 면역계가 퇴화하는데, 면역계의 노화에 주로 영향을 미치는 현상은 흉선의 퇴화다. 흉선은 40대가 되면 거의 흔적만 남고 퇴화하며 림프양 물질은 감소하고 위축되고, 림프양 조직내에 혈장세포가 증가한다. 흉선의 퇴화로 순환 중인 흉선 호르몬의 수준이 감소하여 자기 세포와 이물질을 구분하는 기능이 떨

어지고, T세포와 B세포의 협동작용을 요구하는 동종 항원 반응이 감소한다. 한편으로는, 불필요한 면역반응을 일으켜 과알부민혈증과 항체 양성 반응이 나타나기도 한다. 결과적으로 노년에 이르면 면역이 감퇴하여 감염, 자가면역, 암 발생률이 증가한다²¹.

사상인 중에 간대폐소(肝大肺小)한 태음인은 간(肝)의 흡취지기(吸聚之氣)가 왕성(旺盛)하고 폐의 호산지기가 부족(不足)하여 간은 울열(鬱熱)이 생기기 쉽고, 폐는 허한(虛寒)하기 쉬운 체질적 특성을 가지고 있다²². 따라서 태음인의 질병 예방 및 수명 연장을 위해서는 편소지장인 폐의 기능을 도와주고 보명지주인 호산지기를 확충하여 명맥실수의 감소를 줄여야 할 것으로 생각한다.

YJT는 『東醫四象新編』⁵에 소개된 태음인 경험방으로 오래 병을 앓거나 큰 병을 앓고 난 뒤에 조리(調理)를 위하여 사용하는 처방이다. 이 처방은 용안육(龍眼肉), 건율(乾栗), 백자인(栝子仁), 맥문동(麥門冬)으로 구성되어 있으며 태음인 허로(虛勞), 기타 소모성질환, 피로허약자에게 통치방으로 쓰인다²².

이 처방구성 약물 중 용안육은 “龍眼味甘, 歸脾益智, 健忘怔忡, 聰明廣記”하고 “龍眼肉 開皮毛”한다 하여 심비양허(心脾兩虛), 경계실면(驚悸失眠), 기혈부족(氣血不足), 체허력약(體虛力弱) 등에 응용한다고 하였고, 건율은 “栗子酸溫, 益氣厚腸, 補腎耐飢, 略煨尤良”하고 “乾栗 開肺之胃氣而消食進食”한다 하여 반위설사(反胃泄瀉), 요각연약(腰脚軟弱), 토늑변혈(吐衄便血), 금창(金瘡), 절상종통(折傷腫痛), 나력(癰癤) 등에 응용한다고 하였다. 또한 백자인은 “栝子味甘, 補心益氣, 斂汗扶虛, 更除驚悸”한다 하여 허번불면(虛煩不眠), 경계정충(驚悸怔忡), 장조변비(腸燥便秘) 등에 응용한다고 하였고, 맥문동은 “麥門甘寒, 解渴祛煩, 補心清肺, 虛熱自安”하고 “麥門冬 補肺和肺”한다 하여 조해담점(燥咳痰粘), 노수객혈(勞嗽咯血), 진상구갈(津傷口渴), 장조변비(腸燥便秘), 심번실면(心煩失眠) 등에 응용한다고 하였다^{23,24}. 이와 같이 YJT는 4가지 폐약(肺藥(태음인약)의 보폐(補肺)·화

폐(和肺)·윤폐(開肺) 등의 효능을 통하여 태음인의 편소지장인 폐의 기능을 도와주고 보명지주인 호산지기를 확충하는 작용이 있어 명맥실수의 감소를 줄이고 건강유지와 수명연장 효과가 있을 것으로 기대된다. 또한 YJT는 병을 치료한 후 허약해진 신체를 조리하여 신체기능을 회복하고 평소 체질적 특성으로 자주 발생하는 소병(素病)이 발생하지 않도록 치료 및 예방하는데 쓰이며, 특히 만성질환이나 소모성질환, 노인과 같은 허약자에게 다용하는 약이므로 허약자가 평소에 본 처방을 복용하여 조리하면 소병 및 질병을 예방할 수 있을 것으로 사료되며, 이를 바탕으로 노인의 소병 치료 및 질병 예방을 면역활성 증가를 통한 건강유지라는 관점으로 접근해 보았다.

기존에 노화 및 면역에 관한 YJT의 연구는 많지 않았고, 다만 구성 약물이 용안육의 항산화 및 항암효과에 대한 연구²⁵, 백자인의 뇌세포독성에 대한 보호 효과에 관한 연구²⁶, 맥문동의 친식모델 내의 싸이토카인에 미치는 영향에 대한 연구²⁷ 등이 있었다.

최근 한의학에서 면역에 대한 연구로는 복합처방^{28,29} 및 단미제^{30,31}, 약침³², 전침³³ 등이 면역조절에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 면역에 관련된 YJT에 대한 연구는 미흡한 실정이며 더욱이 자연 노화시킨 흰 쥐를 이용하여 면역활성을 알아보는 연구는 미흡하였다.

이에 저자는 YJT가 노화 흰쥐의 면역활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Murphy³⁴ 등의 연구를 기초로 6주령의 SD rat을 성장기, 52주령의 SD rat을 노화기, 68주령의 SD rat을 말기노화기로 설정한 다음, 각 주령의 SD rat에 4주간 YJT 증류 추출액을 경구 투여한 실험군과, distilled water를 경구 투여한 대조군(DW)과 Vitamin C를 경구 투여한 양성대조군(Vit C)의 비장 조직을 적출하여 total leukocyte와 CD3+, CD4+, CD8+의 세포수를 측정하고, cytokine 중 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 함량을 측정한 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

면역활성을 측정하기 위하여 leukocyte의 cytometry와 cytokine analysis 실험을 하였다.

첫 번째로, cytometry 실험은 각 실험군(DW군, Vit.C군, YJT군)에 대한 경구투여가 끝난 시점에서, 비장 조직을 적출한 후 leukocyte만을 분리하여 total leukocyte수와 MACS를 이용하여 분리한 CD3+, CD4+, CD8+ 세포수를 계수하였다.

생체내에서 일어나는 면역반응은 항원이 면역계 림프구에 인식 되어지는 방법에 따라 항체매개면역반응과 세포성매개면역반응(Cell-mediated immunity or cellular immunity)으로 나눌 수 있다. 항체매개면역반응은 항원자극을 받은 B-cell이 항체를 생성하고 생성된 항체가 항원과 특이반응 하는 것이며 세포성매개면역반응은 항원감염세포와 특이 반응을 한 T-cell이 생성한 cytokine이 대식세포, 자연세포독성세포 등을 활성화하여 표적세포를 파괴하는 면역반응을 말한다³⁵.

실험동물에서 취한 비장 조직의 총 leukocytes 수를 측정한 결과, Vit.C군에서 52주령의 비장 leukocytes 수가 10주령에 비하여 유의하게 증가하였고, 72주령의 비장 leukocytes 수는 52주령에 비하여 유의하게 감소하였다.

약물 투여에 따른 비장 내 총 leukocytes 수의 변화를 관찰하였을 때 10주령에서는 YJT투여에 따른 비장 leukocyte 수의 변화는 나타나지 않았고, 52주령에서는 Vit.C군 및 YJT군의 비장 leukocyte 수가 DW군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 72주령에서는 YJT군의 비장 leukocyte 수가 DW군 및 Vit.C군에 비하여 유의하게 증가하였다. 이것은 노화기로 설정한 52주령 흰쥐에서 Vit.C와 YJT가 림프구증가에 일정한 작용이 있음을 나타내고 있으며, 특히 YJT군은 52주령 뿐만 아니라 말기 노화기로 설정한 72주령 흰쥐의 림프구 형성에도 대조군으로 설정한 DW군 및 Vit.C군보다 유의한 작용이 있는 것으로 보여 노화기의 YJT의 림프구 증식 작용이 Vit.C보다 뛰어남을 시사한다고 볼 수 있다.

CD3+ cell은 T세포 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 맡고 있어 T세포의 표지자로 이용되는데³⁶, 약물 투여에 따른 비장조직 내

CD3+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 10주령과 72주령에서 DW군 및 Vit.C군에 비하여 YJT군의 CD3+ cell의 수가 유의하게 높은 것으로 나타났다. 이것은 말기노화기에 면역물질인 CD3+가 대조군에 비하여 유의하게 증가된 소견으로 증류수와 Vit.C에 비하여 YJT가 T세포 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하는 기능의 증가 효과가 뛰어남을 나타내고 있다.

약물 투여에 따른 비장조직 내 CD4+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 모든 주령에서 약물투여에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다. B림프구의 항체 생산 및 포식세포의 미생물 파괴에 도움을 주는³⁷ CD4+ T세포의 면역작용에는 YJT의 작용이 거의 없는 것으로 나타났다.

약물 투여에 따른 비장조직 내 CD8+ cell 수의 변화를 분석한 결과, 10주령과 72주령에서 Vit.C군 및 YJT군의 CD8+ cell 수가 DW군에 비하여 유의하게 감소하였고, 52주령에서는 Vit.C군과 YJT군의 CD8+ cell 수가 DW군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다. CD8+ T림프구는 세포내 미생물을 지니고 있는 세포들을 죽이기 때문에 세포독성 T림프구(cytotoxic T-lymphocytes, CTLs)로 불리는데³⁵, 이결과는 흰쥐의 노화기에서 Vit.C와 YJT가 모두 세포독성 T림프구의 활성 작용에 일정한 효과가 있음을 시사하는 것으로 보이며, YJT가 Vit.C보다 더욱 높은 유의성을 나타내고 있어 CD8+ cell 활성화에는 YJT가 보다 효과적이라 생각한다. 그러나 염증반응을 일으킨 생쥐에 Vit.C를 투여하였을 때 항염증반응 및 세포매개면역반응의 증가효과가 있음을 보고한 노 등³⁸ 연구에서도 비타민C의 면역작용 증가효과를 확인할 수 있었으므로 Vit.C의 면역활성 작용에 대한 추가연구 및 활용도 필요할 것으로 사료된다.

두 번째로 cytokine analysis 실험은, 각 실험군(DW군, Vit.C군, YJT군)의 분리된 leukocyte에 항원에 대한 활성화를 나타내기 위하여, 50 ug/ml의 농도로 ConA를 처리하고 48시간 동안 37°C에서 배양한 후, cell culter supernatant를 사용하여 ELISA로 면역반응과 관

련된 여러 cytokine(IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ)의 함량을 측정하여 분석하였다. 그런데 cytokine analysis에서는 항원에 대한 활성화를 알아보기 위해 ConA 처리한 각 실험군(DW군, Vit.C군, YJT군) 외에 면역활성이 일어나지 않은 정상상태의 cytokine 수치를 비교, 분석하기 위하여 6주령, 48주령 및 68주령의 SD rat에 매일 1 ml의 증류수를 4주간 경구투여한 DW군에 ConA를 처리하지 않은 No treatment group(NT군)을 추가 설정하여 실험하였다.

사이토카인(cytokine)은 면역반응에 관여하는 세포들이 분비하는 단백질로써 세포간 반응매개체로 작용된다. 단핵구(대식세포)에서 분비되는 모노카인(monokine), 활성화된 림프구(Th)에서 분비되는 림포카인(lymphokine), 사이토카인을 총칭하는 인터루킨(interleukin ; IL)이 있으며 인터루킨은 동일물질의 특성에 따라 번호로 부여한다. 사이토카인은 특이적 면역 및 비특이적 면역(자연면역)에 관련된 세포에서 분비되며 면역반응과 염증반응을 매개하고 조절하며 제한적으로 생성된다. 개별 cytokine은 다양한 세포에서 분비되며 사이토카인은 다양한 세포에 작용되는 다면발현성(pleiotropy), cytokine이 서로 유사한 작용을 가지는 중복성(redundancy), 다른 cytokine의 분비를 연쇄적으로 증강시키거나 억제시키는 연쇄반응(cascade), 또한 서로 같이 작용하여 그 효과가 감소되는 길항작용(antagonism)과 증가되는 상승작용(synergy), 분비가 일시적으로 일어나고 곧 자연히 사라져버리는 자가제한성(self limited event)등의 특징을 통하여 면역반응을 조절한다. 사이토카인의 반응세포에 따른 작용을 보면, 사이토카인을 분비하는 동일세포에 반응하는 autocrine작용, 주변세포에서 분비한 사이토카인에 반응하는 paracrine작용, 먼 거리에 떨어져 있는 세포에서 분비되어 혈액순환 등을 통해 이동해온 사이토카인에 반응하는 endocrine작용이 있다³⁵.

세포 독성을 나타내는 T림프구를 상당기간 성장 유지시킬 수 있고, 자연살해세포(natural killer cell, NK cell), lymphocyte-activated killer(LAK)세포, B세포성장인자, 단구계열세포의 자극인자 등의 활성을 보이는³⁹

IL-2의 농도를 확인하였다. NT군에서는 10주령에 비하여 52주령 및 72주령에서 IL-2의 농도가 유의하게 높았고, 52주령에 비하여 72주령에서 IL-2의 농도가 유의하게 낮았다. DW군에서는 주령의 증가에 따른 IL-2 농도 변화가 나타나지 않았다. Vit.C군과 YJT군에서는 72주령에서 10주령 및 52주령에 비하여 IL-2의 농도가 유의하게 낮았다. 이것은 IL-2의 농도가 성장기에서 노화기로 가면서 증가하였다가 말기 노화기에는 감소하는 경향이 있음을 나타내며 이것은 T세포 성장과 자연살해세포 등의 활성을 나타내는 면역능력이 노화기까지 증가하다가 말기노화기에는 감소함을 시사한다고 볼 수 있다.

약물투여에 따른 IL-2 농도의 차이를 분석한 결과, 72주령에서 YJT군의 IL-2 농도가 DW군과 Vit.C군에 비하여 유의하게 높았다. 이것은 YJT이 흰쥐의 말기 노화기에 Vit.C보다 세포 독성을 나타내는 T세포를 성장시키고 자연살해세포, B세포 성장인자 등에 활성 작용을 일으키는 면역작용에 일정한 효과가 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

다음으로, T, B세포의 증식 및 활성화자로의 작용과, naive T세포를 Th2세포로 분화자극하고 성장시키는 작용을 하는³⁵ IL-4의 농도를 확인하였다. NT군에서는 10주령에 비하여 52주령 및 72주령 모두에서 IL-4의 농도가 유의하게 높았다. DW군과 Vit.C군에서는, 72주령에서 10주령 및 52주령에 비하여 IL-4의 농도가 유의하게 높았다. YJT군에서는 주령의 증가에 따른 IL-4 농도의 차이가 나타나지 않았다. 이것은 면역활성을 주지 않았을 때 IL-4 농도가 성장기보다 노화기 및 말기노화기에 증가되어 있는 소견을 나타내며 흰쥐는 고령이 되어도 IL-4의 활성이 감소되지 않은 경향이 있음을 시사한다고 볼 수 있으나 추가적인 연구를 통하여 확인이 필요할 것으로 사료된다.

약물투여에 따른 IL-4 농도의 차이를 분석한 결과, 52주령에서 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-4 농도가 유의하게 높았으며, 72주령에서는 DW군과 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-4 농도가 유의하게 낮았다. 이 결과는 YJT이 노화기로 설정한 52주령 흰쥐에서는

양성대조군인 Vit.C군보다 IL-4 농도의 증가 효과를 보여 T세포와 B세포의 증식 및 활성화자로의 작용이 더욱 증가되어 있음을 나타내고 있다. 그러나 말기 노화기로 설정한 72주령에는 오히려 대조군보다 감소하는 결과를 보여주고 있어 그 원인에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

T-cell(Th), 활성 대식세포 등에서 주로 생성되며 Th1의 싸이토카인(IL-2, INF- γ) 생성억제 및 대식세포의 MHC class II 단백질 발현을 억제하여 싸이토카인 생성억제인자(cytokine synthesis inhibitory factor ; CSIF)라고 하는^{35,39} IL-10의 농도를 확인하였다. 약물투여에 따른 비장 IL-10 농도 차이를 분석한 결과, 10주령에서 DW군과 Vit.C군에 비하여 YJT군의 IL-10 농도가 유의하게 낮았다. 이것은 성장기 흰쥐에서 YJT이 대조군에 비하여 IL-10의 싸이토카인(IL-2, INF- γ) 생성억제작용을 감소시켜 성장기의 면역활성에 일정한 작용이 있는 것으로 보인다.

Interferon- γ (IFN- γ)는 산에 불안정한 인터페론인 II형 인터페론으로서 산에 안정된 인터페론인 I형 인터페론과는 구분되며 I형 인터페론은 α 와 β 가 포함된다. INF- γ 의 생성은 T세포와 NK세포가 마이토젠, 항체 혹은 항원에 의해서 자극을 받음으로서 나타난다. 세포내 과립계통에 머무는 세균제거에 관련이 있으며 비특이면역(자연면역), 특이면역 모두에서 관련이 있다. INF- γ 는 MHC항원 발현, 대식세포활성화, NK세포 활성화, IgG 아이소타입의 조절, 항바이러스 활성화, nitric oxide synthase(NOS) 유도 등에 관여하며 또한 Th1세포의 분화작용 및 호중구 및 혈관내피세포 활성화기능도 있다³⁵.

실험동물의 비장에서 얻은 leukocyte에서 위와 같은 기능을 하는 IFN- γ 의 농도를 확인하였다. NT군에서는 10주령에 비하여 52주령과 72주령에서 IFN- γ 의 농도가 유의하게 증가하였고, DW군과 Vit.C군에서는 10주령에 비하여 52주령과 72주령에서 IFN- γ 의 농도가 유의하게 감소하였다. YJT군에서는, 주령의 증가에 따라 IFN- γ 농도에 유의한 변화가 나타나지 않았다. 이것은 면역활성이 일어나지 않은 정상상태에서

의 IFN- γ 농도는 성장기때보다 노화에 증가된 소견으로 노화가 진행되면서 면역활성이 감소된다는 면역이론과는 다소 상반된 경향을 나타낸 결과이며, 추가적인 연구를 통한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구와 같이 흰쥐를 이용하여 노화와 면역조절에 미치는 영향을 알아본 연구로는 임 등²⁸의 SD rat의 항산화 및 면역조절에 대한 청심연자탕(淸心蓮子湯)의 효과를 알아보는 실험적 연구와 이 등³³의 SD rat의 항산화 및 면역조절에 대한 족삼리 전침의 효과를 알아보는 실험적 연구가 있었다. 임 등²⁸의 실험에서는 32주령의 SD rat에 8주간 청심연자탕을 경구투여한 후 면역조절효과를 알아보기 위하여 비장세포에서 cytokine중 IL-4, IL-6, IFN- γ 를 측정된 결과, IL-4와 IL-6는 32주령의 무처리군인 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고 IFN- γ 는 유의성 있게 증가된 소견을 보여 면역기능을 향상시키는 일정한 효과가 있음을 보고하였다. 또한 이 등³³의 실험에서는 32주령의 SD rat에 8주동안 주2회 간격으로 매회 15분간 좌측 족삼리에 전침 자극을 가하여 비장세포에서 cytokine중 IL-4, IL-6, IFN- γ 를 측정된 결과, IL-6은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, IFN- γ 는 유의성 있게 증가된 소견을 보여 임 등의 연구와 같이 면역기능을 향상시키는 일정한 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 임 등²⁸과 이 등³³의 연구에서는 6주령과 32주령의 SD rat을 공급받아 실험했으므로 같은 환경에서 자연적으로 성장시킨 흰쥐가 아니며 32주령의 설정도 노화기로 보기에는 어려울 것으로 보인다. 또한 임 등²⁸과 이 등³³의 연구는 항산화와 면역조절능력의 두 가지 측면을 통하여 복합처방과 경혈 전침자극의 항노화 효과를 알아본 연구로 상대적으로 면역활성에 대한 비중이 적고 검사 항목도 적었으므로 면역이론에 입각한 항노화 효과를 입증하기에는 다소 부족한 점이 있다고 생각한다. 반면에 본 연구는 24주령의 SD rat을 공급받아 같은 환경에서 48주령 및 68주령이 될 때까지 자연 노화시킨 후 실험에 사용하였으므로 노화를 연구하는 실험으로서의 타당성이 더욱 크다고 생각하며 또한 본 연구는 복합처방의 면역활성을 알아보기

위하여 림프구와 사이토카인의 여러 항목들을 분석했으므로 면역이론에 입각한 항노화 연구에 더욱 가치가 있다고 사료된다.

위의 연구결과를 종합해 보면, YJT군은 52주령과 72주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)보다 total leukocyte 수가 유의하게 증가하였고, 72주령의 흰쥐에서는 대조군(DW군)과 양성대조군(Vit.C군)보다 CD3+ cell 수가 유의하게 증가한 결과를 나타내어 T세포 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하는 기능의 증대에 일정한 작용이 있는 것으로 보인다. 또한 YJT군은 52주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)보다 CD8+ cell 수가 유의하게 증가한 소견을 보여 세포독성 T림프구의 활성 작용에 일정한 작용이 있는 것으로 사료되며, 72주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)과 양성대조군(Vit.C군)보다 IL-2 농도가 유의하게 증가한 결과를 통해 YJT 경구투여가 세포 독성을 나타내는 T세포를 성장시키고 자연살해세포, B세포 성장인자 등에 활성 작용을 일으키는 면역작용이 있음을 나타냈다. 그리고 YJT군은 52주령의 흰쥐에서 양성대조군(Vit.C군)보다 IL-4 농도가 유의하게 증가한 결과를 나타내어 T세포와 B세포의 증식 및 활성화인자로의 작용이 더욱 증가되어 있음을 시사하고 있어 YJT가 면역활성에 일정한 작용이 있음을 확인할 수 있었으며, 특히, 노화기와 말기노화기로 설정한 52주령과 72주령의 흰쥐에서 보다 유의한 차이가 있는 것으로 보아 노화기의 면역활성 증가에 의미 있는 결과로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때, YJT는 노화 흰쥐의 면역활성을 증가시키는 작용이 있는 것으로 사료되며 YJT의 활용으로 노화를 유발하는 면역기능의 저하를 억제하여 항노화와 수명연장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 본 연구는 면역활성을 일으키기 위하여 ConA를 통한 생화학적 처리를 하였고 실제 특이 질병을 유발하지 않은 한계점이 있어 여러 병태 모델에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 향후 임상에서의 다양한 활용과 작용기전에 대한 추가연구가 필요하리라 사료된다.

V. 結論

YJT가 노화 흰쥐의 면역활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 6주령, 48주령 및 68주령의 SD rat에 4주간 YJT 증류 추출액을 경구투여 한 후, 비장 조직을 적출하여 total leukocyte와 CD3+, CD4+, CD8+의 세포 수를 측정하고, cytokine 중 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 함량을 측정하여 대조군과 비교·분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. YJT군은 52주령과 72주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)보다 total leukocyte 수가 유의하게 증가하였다.
2. YJT군은 72주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)과 양성대조군(Vit.C군)보다 CD3+ cell 수가 유의하게 증가하였다.
3. YJT군은 52주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)보다 CD8+ cell 수가 유의하게 증가하였다.
4. YJT군은 72주령의 흰쥐에서 대조군(DW군)과 양성대조군(Vit.C군)보다 IL-2 농도가 유의하게 증가하였다.
5. YJT군은 52주령의 흰쥐에서 양성대조군(Vit.C군)보다 IL-4 농도가 유의하게 증가하였다.

이상의 결과, YJT는 노화 흰쥐의 면역활성을 증가시키는 작용이 있으며 이를 통해 질병 예방과 항노화 효과도 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

VI. 參考文獻

1. Statistics Korea. Population projections. Statistics Korea. 2007.
2. Jang HS. Adult psychology: adult development, aging, death. Seoul:Parkyoungsa. 2006:78.
3. Yoo JH, Lee EJ, Song IB, Ko BH. A study of aging and life span in Sasang constitutional medicine. J Sasang Constitut Med. 2002;14(3):7-16.(Korean)
4. Koo BS. Anti-aging medicine. Seoul:Korea medical book. 2003:37-44.
5. Won JS. Dongyisangsinpyeon. Seoul:Jeongdam. 2002:232.
6. Morley JE, Perry HM 3rd. Androgen deficiency in aging men:role of testosterone replacement therapy. J Lab Clin Med. 2000:370-378.
7. Lee EJ, Lee D, Lee YS. Clinical experiences of testosterone replacement therapy in frail elderly patients. J Kor Geriatr Soc. 2003;7:288-294.
8. Kamel NS, Gammeack J, Cepeda O, Flaherty JH. Antioxidants and hormones as antiaging therapies: high hopes, disappointing results. Cleve Clin J Med. 2006:1049-1058.
9. Wilkins CH, Sheline YI, Roe CM, Birge SJ, Morris JC. Vitamin D deficiency is associated with low mood and a worse cognitive performance in older adults. Am J Geriatr Psychiatry. 2006;14:1032-1040.
10. Masoro EJ. Overview of caloric restriction and aging. Mech Aging Dev. 2005;126:913-922.
11. Sun TC, Ahn TW. Anti-aging effect of Sipyimigwan-jung-tang in aged rats. J Sasang Constitut Med. 2008; 20(2):98-110.(Korean)
12. Lee SY, Ahn TW. Anti-aging effect of Tae-Eumin's Nocyongdaebo-tang in aged rats. J Sasang Constitut Med. 2008;20(2):58-71.(Korean)
13. Chu CK, Kim JJ, Roh YL, Lee SH, Jeong SY, Jeong HJ, et al. Experimental research on the effect of Haeyeol-tang. Korean J. Orient. Int. Med. 2007;28(4): 671-680.(Korean)
14. Woo DS, LEE KM, Lee BH, Lim SC, Jung TY, Seo JC. The scavenging effect on nitric oxide in Carthami Flos herbal-acupuncture solution. J. of Korean Institute of Herbal-Acupuncture. 2007;10(2):25-30.(Korean)
15. Son CW, Lee KM, Lee BH, Lim SC, Jung TY, Seo JC. The scavenging effect on nitric oxide(NO) in juglandis semen herbal acupuncture solution. The Kor J. of Meridian and Acupoint. 2007;24(1):189-197. (Korean)
16. Daejeon university animal experimentation ethics com-

- mittee regulations. Available from:URL:http://www.dju.ac.kr/kor/html/subp.htm?page_code=01010800&categ=4
17. Korean pharmacopuncture institute. Herbal acupuncture therapy treatment guidelines. Seoul:Korean pharmacopuncture institue. 1999:112-137.
 18. Cho JY. Geriatric medicine. 2nd edition. Seoul:Hankook book. 2006:40-41.
 19. Kim DL. Donggeuisusebowon-sasangchogo. 1st Ed. Seoul:Jeongdam. 1999:41-46.
 20. Jeong YJ, Lee SK, Lee EJ, Koh BH, Song IB. A study of preservation of health in the 『Dongyi Bogam』 and 『Dongyi Soose Bowon Sasang Chobongyun』. J Sasang Constitut Med. 2002;14(2):25-34.(Korean)
 21. Choi YH. The elderly and health. Seoul:Hyunmoonsa. 2000:4-5, 38-45.
 22. National federation of department of sasang constitutional medicine, colleges of oriental medicine. Sasang constitutional medicine. 2nd Ed. Seoul:Jipmoondang. 2004:201, 280, 341-352, 459.
 23. Choi BI. Lee Jema Posthumous literature collection.1st Ed. Seoul:Parandl. 2002:235-237.
 24. Son YS. Sasang herbal formula collection. 1st Ed. Seoul:Donghaksa. 2003:191, 194, 200.
 25. Shon MY, Nam SH, Lee SW. Antioxidant, anticancer activities and nitric oxide production of euphoria long-ana fermented with lactic acid bacteria and bacillus subtilis. Korean J. of food preservation. 2007;14(5): 531-537.(Korean)
 26. Kim HG, Shim JS, Ju MS, Cho SH, Oh MS. Protective effects of thujae semen against neurotoxicity induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells. Kor. J. Herbology. 2008;23(3)19-25.(Korean)
 27. Lee DS, Jeong HJ, Lee HK, Jeong SK. The effects of liriopis tuber and schizandrae fructus on IL-4, IL-5 and IL-6 in asthma model. The Journal of Kyung Hee University Medical Center. 2000;16(2):170-181.(Korean)
 28. Lim JP, Ahn TW. The anti-oxidative and immune-regulatory effect of Chungsimyeonja-tang in aged rat. J Sasang Constitut Med. 2007;19(3):227-241.(Korean)
 29. Ryu CR, Song JM. Immunoregulatory action of Soeumin Seungyangikki-tang. J Sasang Constitut Med. 2001;13(3):102-113.(Korean)
 30. Kim HT, Ku SK, Lim JW, Jin TW, Lim MK, Kim JE, et al. Effects of artemisia capillaris methanol extract on CD3+, CD4+, CD8+ and TNF- α splenic cells in tumor cells inoculated mice. J. Vet. Clin. 2009;26(1): 1-7.(Korean)
 31. Han HS, Park WS, Lee YJ. Studies on the immunomodulating activity of fermented artemisiae argyi folium extract. Kor. J. Herbology. 2008;23(3):103-112. (Korean)
 32. Park KC, Park HS. The study on anti-metastasis and immune activation of carthami semen herbal acupuncture. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2006;23(6):45-60.(Korean)
 33. Lee JS, Yim YK, Kim YI. A study on anti-aging of electroacupuncture at Joksamni(ST₃₆) in rats. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2007;24(3):145-161.(Korean)
 34. Murphy MP, Rick J Th, Milgram NW, Ivy GO. A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. Neurobiology of Learning and Memory. 1995;64:181-186.
 35. Seo S. Clinical immunology. 2nd edition. Seoul:Korea medical book. 2009:121, 126-131.
 36. Kim SJ. Immunology. Seoul:Korea medical book. 1994:150-153.
 37. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. Basic Immunology 3rd Edition. Seoul:Epublish. 2009:8-10.
 38. Noh KH, Kim HG, Shin YA, Lim HJ, Mun SK, Lee YT, et al. The effects of high-dose vitamin C administration on the cell-mediated immune response in mice. Immune Network. 2003;3(3):211-218.(Korean)
 39. Mire-Sluis, A. R., R. Thorpe. Cytokines. San Diego, California:Academic Press. 1998:19-40.