

少陰人 升陽益氣湯의 免疫調節作用

유창렬* · 송정모*

Abstract

Immunoregulatory Action of Soeumin *Seungyangikkitang*

Ryu Chang-ryeol · Song Jeong-mo

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Woosuk Univ.

The purpose of this research was to investigate the effects of Seungyangikkitang (SIT) on the immune cells in BALB/c mice. SIT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. SIT enhanced the proliferation of thymocytes, but decreased the proliferation of splenocytes. SIT enhanced the subpopulation of cytotoxic T cells in thymocytes and helper T cells in splenocytes, but did not affect the subpopulation of B220/Thy1 cells. SIT enhanced the production of γ -interferon and interleukin-2 in thymocytes, splenocytes and serum, but did not affect the production of interleukin-4. SIT suppressed the production of nitric oxide, but enhanced the lucigenin chemiluminescence and the engulfment of FITC-conjugated E. coli particles in peritoneal macrophages.

These results suggest that SIT has a potent activity on the specific immunity via the cytokine secretion of Th1 cells and the non-specific immunity via the phagocytic activity of macrophages in vivo.

Key words : Seungyangikkitang, cytokine, phagocytic, immunity

I. 緒 論

升陽益氣湯은 「東醫壽世保元」에 처음으로 수록되었으며 少陰人 亡陽證에 升陽益氣의 方法에 의하여 치료하는 처방으로 제시되었다¹⁾. 기존 韓醫學에서는 亡陽을 陽氣가 虛脫하여 나타나는 病理的 徵候로 본 것을 李濟馬는 陰陽升降의 失調로 인해 陽이 上升하지 못하고 도리어 下降함으로써 나타난다고 인식하여 升陽益氣의 方法을 提示한 것이다²⁾.

升陽益氣湯은 少陰人 腎受熱表熱病의 亡陽初·中證의 適用方이며, 桂枝湯과 補中益氣湯의 方意가 복

합된 處方으로서^{3,4)}, 金⁵⁾은 陽虛證에 대한 회복효과가 있다고 보고한 바 있다. 이러한 陽虛는 소음인의 체질적 특징으로, 이의 해결을 위해 '陽暖之氣가 保命之主'라는 것을 전제로 하여 少陰人 表病證에 溫補升陽함으로써 陰陽升降의 불균형상태를 조절하여 회복시킨다고 하였다^{5,6)}.

陽虛는 面色蒼白, 身疲乏力, 自汗, 懶言, 音低, 納食不化, 畏寒怕冷, 四肢厥冷, 小便清長, 大便溏薄, 下利清穀, 舌質淡白, 脈虛遲或沈弱 등의 증상을 나타내는 증후군으로서, 이로 인해 同化作用의 감약, 腦의 興奮性 저하, 에너지대사의 저하, 循環不良, 免疫

* 우석대학교 한의과대학 사상체질과

교신저자: 송정모 (주소)전주시 완산구 중화산동 2-5 우석대학교 부속한방병원 전화)063-220-8600 E-Mail)soo-dang@hanmail.net

能力의 저하가 나타나게 된다^{7,8)}.

최근 陽虛에 대한 研究로는 升陽益氣湯과 八物君子湯³⁾, 十全大補湯⁶⁾, 升陽益氣附子湯과 官桂附子理中湯⁹⁾, 補中益氣湯^{10,11)}, 香砂養胃湯¹²⁾ 등의 方劑에 대한 보고가, 免疫反應에 대한 研究로는 補中益氣湯¹³⁻¹⁷⁾, 四君子湯과 四物湯^{18,19)}, 八物湯^{18,20)}, 十全大補湯^{13,21,22)} 등의 方劑에 대한 보고가 있는 바, 이를 통해 補氣 또는 補血하는 補益方들이 陽虛를 回復시키고 免疫機能의 效果를 增強시킨다는 것을 알 수 있다.

升陽益氣湯의 처방 구성에 참고된 것으로 보이는 桂枝湯은 『傷寒論』²³⁾에서 太陽傷風表虛證에 응용되며, 후세방 補中益氣湯은 氣虛로 인한 中氣下陷과 脾不統血 등에 응용되는 처방이다⁸⁾. 이는 升陽益氣湯이 소음인 表病證의 正氣와 邪氣가 싸우는 상태에서 나타나는 免疫反應에 일정한 영향을 줄 수 있음을 시사해준다.

또한 元²⁴⁾과 朴²⁵⁾에 의하면 少陰人 補中益氣湯은 短氣, 失血眩暈, 自汗, 盜汗 등의 氣血虛로 인한 병증 뿐만 아니라 頭痛, 斑疹, 倒飽, 夢遺, 上消, 五淋, 腰痛 등에도 응용되어지고 있는바, 이와 유사한 方意를 갖는 升陽益氣湯은 亡陽證 뿐 아니라 일반 雜病에도 널리 응용할 수 있어서 일정한 免疫調節作用이 있을 것으로 사료된다.

이에 著者は 少陰人 升陽益氣湯의 免疫調節作用을 관찰하기 위해, 生體에서 免疫系를 조절하는 중요한 細胞인 胸腺세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 작용을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

본 실험에 사용한 생쥐는 생후 8주 된 BALB/c계 수컷을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20±2℃, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건 하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였다.

2) 試藥 및 器具

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS), γ -interferon (γ -IFN), lucigenin, MTT, zymosan, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 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 seiyaku Co., FITC-conjugated *E. coli* K-12 bio-particles는 Molecular probes Co. 제품 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture-용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO2 incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

本 실험에 사용한 處方은 『東醫壽世保元』²⁶⁾에 收載된 少陰人 升陽益氣湯으로, 사용한 藥材들은 又石大學校 附屬 韓方病院에서 구입, 精選하여 사용하였고 그 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Soeumin Seungyangikkitang(SIT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
人 蔘	Ginseng Radix Alba	8
桂 枝	Cinnamomi Ramulus	8
白芍藥	Paeoniae Radix	8
黃 耆	Astragali Radix	8
白何首烏	Cynanchi Wolidi Radix	4
肉 桂	Cinnamomi Cortex Spissus	4
當 歸	Angelicae Gigantis Radix	4
甘 草	Glycyrrhizae Radix	4
生 薑	Zingiberis Rhizoma	4
大 棗	Zizyphi Fructus	4
合 計		56

상기 처방 2첩 분량을 증류수 2,000ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 22.5 g (수득율 20.8%)을 얻어 (이하 SIT라 칭함), 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

2) 胸線細胞, 脾臟細胞 및 大食細胞 분리

생쥐의 흉선세포 및 비장세포 분리는 Wysocki²⁷⁾ 및 Mizel²⁸⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 SIT 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 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 10분간 원심분리), 흉선세포 및 비장세포 부유액으로 하였다.

대식세포의 분리는 SIT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 약물 투여 4일째 mouse 복강에 3% thioglycollate 2ml를 注入하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후, 직경 120mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 대식세포를 cell scraper로 분리하여 사용하였다. 생쥐 흉선세포, 비장세포 및 대식세포는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

3) 胸線細胞 및 脾臟細胞의 增殖能 測定

분리한 흉선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 SIT의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann²⁹⁾이 개발하여 Kotnik등³⁰⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1.2x10⁶ cells/ml 농도로 분주하여 흉선세포는 concanavalin A(Con A) 5µg/ml를, 비장세포는 lipopolysacch-aride(LPS) 10µg/ml를 첨가한 후, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음 배양종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료

시 0.1N HCl에 용해시킨 10% SDS 100µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

4) 胸線細胞, 脾臟細胞의 subpopulation 측정

분리한 흉선세포 및 비장세포를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 세포의 개체수는 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B 세포의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488nm, emission; 525nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다³¹⁾.

5) Cytokines 測定

생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SIT 500mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 동일한 방법으로 흉선세포 및 비장세포를 분리하여 2 x 10⁷ cells/ml로 조제하여 96 well plate에 200µl 씩 분주한 후, 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500rpm, 2분, 4 °C) 한 다음, 상등액 50µl를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다.

혈청 중 cytokines를 측정할 때는 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SIT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐의 심장에서부터 혈액을 채취하여 원심분리한 후 혈청을 분리하여, 혈청 50µl를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 즉 sample 50µl에 assay diluent 5 µl를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100µl를 가하여 실온에서 2시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100µl를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100µl를 가하여 450nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환

산하였다.

6) 腹腔 大食細胞로 부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 대식세포를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells을 분주한 후 대식세포로 부터 생성되는 nitric oxide(NO)의 양을 Griess법³²⁾으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100 μ l와 Griess 시약 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치한 후 570nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO₂의 농도를 환산하였다.

7) 腹腔 大食細胞의 食食能 측정

분리한 대식세포를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Lucigenin 용액의 제조는 10ml의 DPBS-A에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용하기 직전에 DME 배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 측정하였다^{33,34)}. 측정용 microplate(white)의 각 well에 준비된 대식세포 부유액 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l 및 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 최종 volume이 200 μ l가 되도록한 후 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 전처리한 후 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

8) 腹腔 大食細胞의 食食作用에 의한 engulfment 측정

FITC-conjugated E. coli particles을 HBSS에 현탁시켜 sonification한 후 사용하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250 μ g/ml 농도로 용해하여 사용하였다. 분리한 대식세포를 RPMI1640 배지로 1×10^5 cells/ml 되도록 조정한 후, 100 μ l를 96 well에 분주한 다음, E. coli particles을 HBSS 용액으로 1mg/ml 되게 조제한 현탁액 25 μ l를 가하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue

100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다.³⁵⁾

9) 통계처리

모든 실험 결과들은 mean $\pm$ SE로 나타내었고 통계 처리는 student t-test를 실시하여 P<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

III. 實驗 結果

1. 升陽益氣湯 (SIT)이 胸線細胞 및 脾臟細胞의 增殖에 미치는 效果

대조군의 흉선세포에 T 임파구 mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 68.2 $\pm$ 1.6%로 감소하였으며, SIT를 투여하고 분리한 흉선세포에 Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 116.5 $\pm$ 2.4%로, Con A를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 85.1 $\pm$ 2.8%로 대조군에 비해 증가하였다(Table I).

Table 1. Effect of Seungyangikkitang (SIT) on the proliferation of murine thymocytes

Samples	Cell Proliferation (%)	
	Treated of Concanavalin A	Non-treated of Concanavalin A
Control	100.0 $\pm$ 1.2	68.2 $\pm$ 1.6
SIT	116.5 $\pm$ 2.4*	85.1 $\pm$ 2.8*

SIT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice.

*, Significantly different from control group (p<0.01).

대조군의 비장세포에 B 임파구 mitogen인 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 77.5 $\pm$ 3.1%로 감소하였으며, SIT를 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 88.6 $\pm$ 2.1%로, LPS를 처리하지 않았을 때 세포생존율은 66.7 $\pm$ 1.4%로 대조군에 비해 감소하였다 Table II).

Table II. Effect of SIT on the proliferation of murine splenocytes

Samples	Cell Proliferation (%)	
	Treated of Lipopolysaccharide	Non-treated of Lipopolysaccharide
Control	100.0±1.8	77.5±3.1
SIT	88.6±2.1*	66.7±1.4*

SIT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1.2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide. The data represents the mean±SE of 5 mice.

*, Significantly different from control group ($p < 0.05$).

2. SIT가 胸線細胞 및 脾臟細胞의 subpopulation 에 미치는 效果

대조군의 흉선세포중 CD4 single positive(CD4⁺) 세포는 12.2±0.4% 이었으며, CD8 single positive(CD8⁺) 세포는 3.1±0.2%이었다. SIT를 투여하고 분리한 생쥐 흉선세포의 CD4⁺ 세포는 13.2±1.1%로 對照群과 큰 차이가 없었으나, CD8⁺ 세포는 4.3±0.3%로 對照群에 비해 증가하였다(Table III).

Table III. Effect of SIT on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Control	12.2±0.4	3.1±0.2
SIT	13.2±1.1	4.3±0.3*

SIT (500mg/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.

*, Significantly different from control group ($p < 0.05$).

대조군의 비장세포중 B220 positive 세포(B220⁺)는 38.4±2.7%이었으며, Thy1 positive 세포(Thy1⁺)는 25.3±2.4% 이었다. SIT를 투여하고 분리한 생쥐 비장세포중 B220⁺ 세포는 37.7±2.9%로 Thy1⁺ 세포는 22.7±1.5%로 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 비장 T 임파구중 대조군의 CD4⁺ 세포는 13.3±1.2%, CD8⁺ 세포는 3.4±0.2%이었으나, SIT를 투여하고 분리한 생쥐 비장의 T 임파구 중 CD4⁺ 세포는

16.6±1.1%로 대조군에 비해 증가하였으며, CD8⁺ 세포는 4.3±0.3%로 대조군과 별 차이가 없었다(Table IV, Fig. 1).

Table IV. Effect of SIT on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Cell Subpopulation (%)			
	B220+	Thy1+	CD4+	CD8+
Control	38.4±2.7	25.3±2.4	13.3±1.2	3.4±0.2
SIT	37.7±2.9	22.7±1.5	16.6±1.1*	4.3±0.3

SIT (500mg/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 ($p < 0.05$).

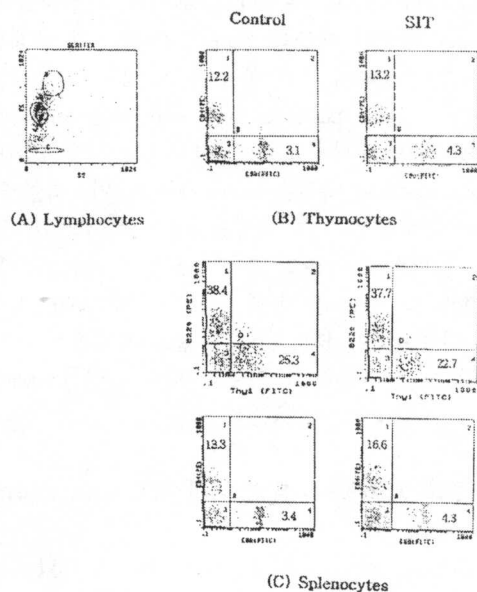


Fig.1 Cytofluorometric pattern of lymphocytes subpopulation in SIT-administered mice.

3. SIT이 胸線細胞 및 脾臟細胞의 Cytokines 分泌에 미치는 效果

대조군의 흉선세포 중 γ -interferon 및 interleukin-2

의 양은 각각 69.5 ± 4.5 및 313.4 ± 6.8 pg/ml 이었으나, SIT를 투여한 군은 126.6 ± 7.2 및 346.0 ± 5.9 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 297.6 ± 6.3 pg/ml 이었으며, SIT을 투여한 군은 297.0 ± 9.5 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table V).

대조군의 비장세포 중 γ -interferon 및 interleukin-2의 양은 각각 442.8 ± 12.2 , 354.3 ± 10.8 pg/ml 이었으나 SIT를 투여한 군은 511.8 ± 9.7 , 548.5 ± 12.5 pg/ml로 대조군에 비해 모두 증가하였다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 191.1 ± 8.7 pg/ml 이었으며, SIT을 투여한 군은 201.5 ± 10.3 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table VI).

Table V. Effect of SIT on the production of cytokines in murine thymocytes

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	69.5 ± 4.5	313.4 ± 6.8	297.6 ± 6.3
SIT	$126.6 \pm 7.2^{**}$	$346.0 \pm 5.9^*$	297.0 ± 9.5

SIT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 h in RPMI1640 media. The secretion of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice.

Significantly different from control group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.001$).

Table VI. Effect of SIT on the production of cytokines in murine splenocytes

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	442.8 ± 12.2	354.3 ± 10.8	191.1 ± 8.7
SIT	$511.8 \pm 9.7^*$	$548.5 \pm 12.5^{**}$	201.5 ± 10.3

SIT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 h in RPMI1640 media. The secretion of cytokines was determined in supernatants of cultures with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice.

Significantly different from control group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

4. SIT가 血清 中 Cytokines의 分泌에 미치는 效果

대조군의 혈청 중 γ -interferon 및 interleukin -2의 양은 40.3 ± 4.3 및 45.6 ± 2.8 pg/ml 이었으나, SIT를 투여한 군은 75.4 ± 5.1 및 68.1 ± 4.8 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 65.2 ± 5.1 pg/ml 이었으며, SIT을 투여한 군은 58.5 ± 5.3 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table VII).

Table VII. Effect of SIT on the production of cytokines in mice serum

Samples	Production of Cytokine (pg/ml)		
	γ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	40.3 ± 4.3	45.6 ± 2.8	65.2 ± 5.1
SIT	$75.4 \pm 5.1^{**}$	$68.1 \pm 4.8^*$	58.5 ± 5.3

SIT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the production of cytokines was determined in separated serum with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice.

Significantly different from control group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

5. SIT가 腹腔 大食細胞로 부터 nitric oxide의 生成에 미치는 效果

대조군의 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 nitric oxide(NO) 생성량은 24 시간 후에 $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하면 NO 생성량은 $12.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로 증가하였다. SIT를 투여하고 분리한 대식세포에 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 $7.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 감소하였다 (Table VIII).

Table VIII. The production of nitric oxide from peritoneal macrophages in SIT-administered mice.

Samples	Nitric oxide(μM)
Control	12.1 ± 0.1
SIT	$7.5 \pm 0.3^*$

SIT (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 RPMI1640 media in the presence LPS and γ -interferon.

*; Significantly different from control group ($p < 0.001$).

6. SIT가 腹腔 大食細胞의 食食能에 미치는 効果

Chemiluminescence(CL)은 탐식작용이 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. 대조군의 대식세포로부터 생성되는 CL의 양 보다 SIT를 투여하고 분리한 대식세포에서 생성되는 CL 양이 현저히 증가하였다(Fig.2). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles의 탐식도 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig.3). 이는 SIT가 대식세포의 탐식능을 증가시키고 있음을 시사하는 것이다.

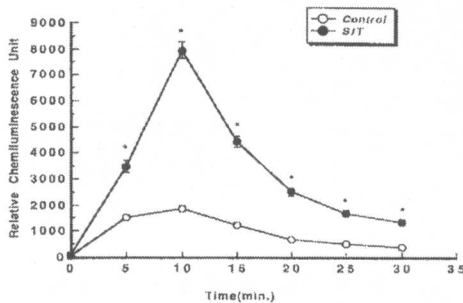


Fig.2. Effect of SIT on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages.

SIT(500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and then 3% thioglycollate was injected i.p. at 4th day.

Peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) obtained after 2 h adherence period were cultured in DME media (with pheol red) containing opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 30 min. Other procedures were described as detailed in the materials and method section. Each point represents the mean $\pm$ SE of 5 mice.

*; Significantly different from control group ($P < 0.001$)

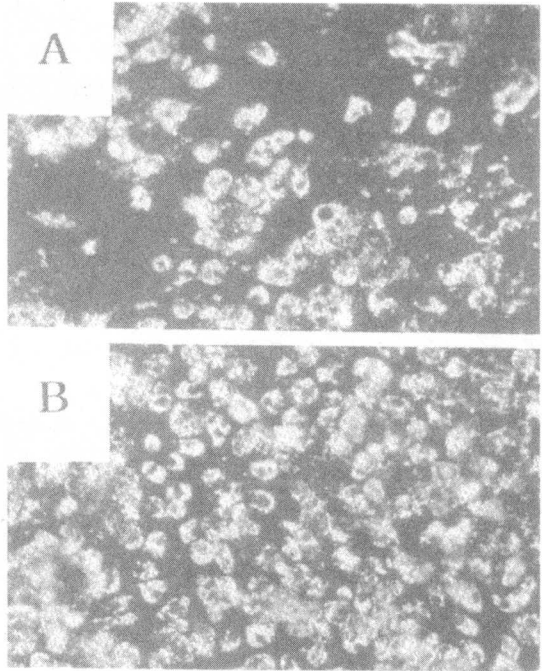


Fig.3. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from SIT-administered mice.

Inverted fluoromicroscope photomicrographs (200X) showing uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in control (A), and peritoneal macrophages obtained from SIT-administered mice (B).

IV. 考 察

사상의학에서는 질병을 順證과 逆證으로 분류하여 기존의 證治醫學과 시각의 차이를 보이고 있는데, 『傷寒論』에서는 邪氣의 侵入 정도에 따라 順逆을 나누고 있지만, 사상의학에서는 正氣의 損傷 정도에 따라 病의 淺深과 順逆을 판단하고 있다³⁷⁾. 이 正氣는 保命之主라고 표현되고 있으며, 질병의 치료에 있어서 이 保命之主의 보호에 모든 치료의 초점을 맞추고 있는 것을 볼 수 있다.

少陰人은 전체적으로 中心勢力이 아래에 있어 陰化되기 쉬우므로 陽暖之氣가 保命之主라는 것을 바탕으로 升降概念을 운용한다. 즉, 表病證에 있어서 腎大脾小한 臟腑의 특징으로 脾局의 陽氣가 寒邪에 억눌린 바가 되어, 腎局의 陽氣가 그 寒邪의 저항을

받아 不能直升하여 脾局에 連接하지 못하여 나타나는 鬱狂證과 亡陽證 모두 상승하지 못하는 陽氣를 어떻게 상승시키느냐에 따라, 다시 말하면 陰化된 기운을 어떻게 陽化시키느냐에 주안점을 두고 기본 방향이 정해진다. 그래서 鬱狂證의 無汗은 陽氣常存한데 營衛陰陽만의 不和한 때문이니 調和營衛하면 되나 亡陽證의 有汗은 陽氣不足으로 인한 津液外脫이므로 治本하기 위하여 陽氣上升을 목표로 升陽益氣法을 구사한다²⁾.

亡陽證을 기존 한의학에서는 과다한 汗出으로 인한 精氣와 津液의 外脫 현상으로 보았다. 亡陽證의 병리인식에 있어서 '汗多亡陽'으로 표현하였고³⁸⁾, 汗出不止나 吐瀉過極 등의 원인으로 인하여 陽氣가 돌연 衰竭하면 大汗이 淋漓하고 畏寒, 手足冷, 呼吸微弱, 面色蒼白, 脈微欲絕 등의 증상이 나타난다³⁹⁾. 이에 대하여 李濟는 陰陽의 정상적인 升降運動 失調로 인한 津液의 外脫, 즉 陽이 上升하지 못하고 도리어 下降하는 것으로 인식하였다⁴⁰⁾.

소음인의 표병에서 亡陽證이 鬱狂證과 다른 점은 汗出이 있다는 것인데, 땀이 계속하여 많이 나오면 이것은 陽이 虛脫 상태로 빠진 것을 의미하는바, 鬱狂證보다는 亡陽證이 훨씬 陽暖之氣, 즉 保命之主의 손상이 심한 것으로 규정하고 있다³⁷⁾.

이러한 亡陽證의 치료에 있어서 初證에는 桂枝湯에 固表止汗의 효능을 가진 黃芪를 가미한 黃芪桂枝湯을 사용하고, 中證에는 升陽益氣시켜 陽氣의 虛脫을 방지하는 의미로 升陽益氣湯, 補中益氣湯 등을 사용하며, 末證에는 附子和 肉桂를 사용하여 脾氣가 絕하는 것을 방지한다³⁾.

升陽益氣湯은 『東醫壽世保元』에 처음으로 收錄된 이래 여러 文獻에 기재되었으며^{24,25,41-43)}, 少陰人 腎受熱表熱病의 亡陽初·中證을 치료할 목적으로 만들어진 處方이다. 朱⁴⁾는 升陽益氣湯을 補中益氣湯에서 비롯된 처방으로 보았으며, 또한 金³⁾과 朱⁴⁾는 方劑 구성상 桂枝湯과 補中益氣湯의 方意가 복합된 처방으로 보았다. 이러한 升陽益氣湯은 止汗固表 升陽하는 효능이 있으며, 主治證으로 元²⁴⁾은 傷寒陽明病 亡陽, 短氣, 失血眩暈, 小兒 顛陷 등에, 朴²⁵⁾은 自汗, 盜汗과 小兒의 毛髮과 齒牙 發生에 응용하였다.

『傷寒論』³⁸⁾에서 桂枝湯은 太陽病 傷風證을 主治하며 頭痛, 發熱, 汗出, 惡風, 脈浮數 등을 목표로

하고 있고, 그 작용은 滋陰和陽하여 調和營衛하고 解肌發汗하는데 있다²³⁾. 少陰人 新定處方 中 桂枝湯 連系方으로 金³⁾은 川芎桂枝湯, 黃芪桂枝湯, 升陽益氣湯, 升陽益氣附子湯, 黃芪桂枝附子湯, 人蔘桂枝附子湯, 人蔘官桂附子湯 등을 열거했다.

補中益氣湯은 李東垣에 의해 創方된 처방으로 四肢無力, 倦怠乏力, 眩暈, 少氣懶言, 自汗, 喘急, 舌淡紅苔白, 脈虛無力한 中氣下陷證과 婦人의 月經週期 短縮이나 過多月經, 皮下出血이 나타나는 脾不統血證, 또는 氣虛發熱證 등에 응용된다^{7,8)}.

『東醫壽世保元』의 少陰人 補中益氣湯은 亡陽證의 初·中證에 升陽益氣湯과 함께 적용되는 처방으로²⁾, 임상에서 일반 雜病 질환에도 폭넓게 응용되고 있다^{24,25,42-44)}.

이상에서 본 桂枝湯과 補中益氣湯의 方意가 복합된 처방개념으로 볼 때 升陽益氣湯은 狹義의 亡陽證 개념에서 더 나아가 일반 雜病에도 널리 應用될 수 있을 것으로 생각된다.

少陰人은 陽虛하기 쉬우므로 이로 인한 機能衰退와 外邪에 대한 抵抗力 減退는 免疫機能低下의 상태로 나타날 수 있다³⁾.

韓醫學에서 免疫에 대한 개념은 『素問·刺法論』⁴⁵⁾에 “正氣存內 邪不可干”, 『素問·上古天真論』⁴⁶⁾의 “眞氣從之 精神內守 病安從來”, 『素問·平熱病論』⁴⁷⁾에 “邪之所湊 其氣必虛”라고 하여 질병의 성립 과정 중 正氣가 왕성하면 邪氣가 침입하지 못하고 正氣가 허약하면 邪氣가 침입하여 발병한다고 하였고, 『素問·瘧論』⁴⁸⁾에서는 “衛氣之所在 與 邪氣相合而病發”이라 하여 衛氣를 外邪에 대해 抵抗하는 氣로 인식한 데서 드러난다. 여기에서 正氣와 衛氣는 생명활동의 원동력으로서 생체 방어기구의 역할을 담당하는 기본적인 물질이라 볼 수 있으며, 邪氣는 인체의 내외환경에 존재하는 각종 發病因子를 총칭한 것으로 六淫, 飮食, 勞倦, 七情 등을 의미한다고 볼 수 있다⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

免疫이란 생체가 自己와 非自己를 식별, 非自己를 제거함으로써 자신을 보호하는 것을 의미하는 것으로, 면역세포가 항원에 특이한 반응을 나타내어 內因性 및 外因性 이물질(항원)에 대한 감시와 방어를 통하여 개체의 恒常性을 유지하는 현상을 말한다⁴⁹⁻⁵¹⁾. 이러한 면역반응은 T 및 B 임파구가 관련된

特異的 免疫反應과 대식세포가 관련된 非特異的 免疫反應으로 대별되는데, 특이적 면역반응은 세포성 면역반응과 체액성 면역반응으로 구분되고, 비특이적 면역반응은 염증반응과 탐식작용으로 구분된다. 세포성 면역반응은 T림파구에 의해 이루어 지는 것으로 세포가 행동인자로 작용하여 개체를 보호하는 면역을 말하며, 체액성 면역 반응은 T 림파구의 도움을 받아 B 림파구에 의해 생산된 항체에 의해 이루어지고, 세포보다는 혈청내에 존재하여 항원과 결합하여 대식세포에 의해 탐식되게 하거나 補體에 의해 용해되기 쉽게 만드는 것으로 항체가 行動因子로 작용하여 생체를 보호하는 면역을 말한다^{49,52)}.

본 실험에서 升陽益氣湯(SIT)을 투여하였을 때 흉선세포의 세포생존율은 대조군에 비해 증가되었으나, 비장세포의 세포생존율은 감소되었다. 이는 SIT가 특이적면역반응 중 細胞性免疫能을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

흉선세포는 흉선의 皮質 및 髓質에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T 림파구(Th) 및 cytotoxic T 림파구(Tc)로 분화되며, 분화된 Th1 cell은 γ -interferon (γ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 분비하여 다른 T 세포, B 세포 및 대식세포의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 용해를 일으키며 대식세포를 활성화시킨다.⁵³⁾

대조군의 흉선세포중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 12.2%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 3.1%로 정상 생쥐 흉선에서 $CD4^+CD8^-$ cells은 약 12%, $CD4^+CD8^+$ cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며,⁵⁴⁾ SIT 투여시 흉선세포의 Tc 세포 population이 증가되었으나, Th 세포는 변화되지 않았다. 비장세포의 T 및 B 림파구의 비율은 변화되지 않았으나, 비장의 T 림파구중 Th 세포 population은 대조군에 비해 증가하였다. 이는 SIT가 흉선세포에서는 Tc 세포를 비장세포에서는 Th 세포를 활성화하여 면역반응을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

SIT 투여시 흉선세포 배양액에 Th1 세포에서 분비되는 γ -IFN 및 IL-2는 증가하였으나, Th2 세포에서 분비되는 IL-4는 변화가 없었다. 또한 비장세포 배양액에서도 γ -IFN 및 IL-2는 증가하였으나, IL-4는

변화가 없었다. 혈청 중의 γ -IFN 및 IL-2는 증가하였으나, IL-4는 변화가 없었다. 이 결과는 SIT가 Th1 세포를 활성화하여 cytokines의 분비를 촉진함으로써 免疫能을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

Nitric oxide(NO)는 T 림파구가 생성하는 cytokine을 조절하며, in vivo에서 T 림파구의 생명을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있다⁵⁵⁾. 또한 NO는 heper T cell의 증식을 억제하며⁵⁶⁾ 자기 면역계를 억제하는 것으로 보고⁵⁷⁾되었다. 본 실험에서 SIT 투여시 대조군에 비해 NO 생성이 감소하였다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기 방어를 위해 대식세포가 활성화되어 탐식작용이 촉진된다. 이러한 탐식작용은 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. 탐식작용은 면역적인 측면에서 중요하지만, 상처치유 과정에서도 매우 중요하다. 본 실험에서 대식세포의 탐식능을 측정하는데 chemiluminescence를 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 대식세포가 particle을 탐식하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 탐식능이 진행되는 것을 확인하는 것이다.⁵⁸⁾ 대식세포로부터 생성되는 chemiluminescence (CL)를 측정한 결과 SIT 투여에 의해 CL 양이 현저히 증가하였다. 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles의 탐식작용도 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다. NO는 활성화된 대식세포의 pseudopodia 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁵⁹⁾. 본 실험에서 SIT가 NO 생성을 억제하고 탐식능을 증가시켰다는 결과는 SIT가 대식세포의 탐식능을 증가시키는데 NO가 일부 관여하고 있음을 시사하는 것이다. 이는 SIT가 非特異的 免疫反應도 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과 升陽益氣湯은 Th1 세포를 활성화하여 cytokines의 분비를 촉진함과 동시에 대식세포의 탐식작용을 촉진하여 免疫能을 증강시키는 작용이 있는 약물이라 사료된다.

V. 結 論

少陰人 升陽益氣湯(SIT)을 투여하여 면역세포인 흉선세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 작용을 관

찰한 結果는 다음과 같다.

1. 胸線細胞의 細胞生存率은 증가하였으나, 脾臟細胞의 細胞生存率은 감소하였다.
2. 흉선세포 중 Tc 세포의 비율이, 비장세포 중 Th 세포의 비율이 증가하였다.
3. 흉선세포중 γ -IFN 및 IL-2의 양은 증가하였으나, IL-4의 양은 변화하지 않았다.
4. 비장세포중 γ -IFN 및 IL-2의 양은 증가하였으나, IL-4의 양은 변화하지 않았다.
5. 혈청 중 γ -IFN 및 IL-2의 양은 증가하였으나, IL-4의 양은 변화하지 않았다.
6. 복강 대식세포로부터 nitric oxide의 생성을 억제하였다.
7. 복강 대식세포의 탐식능이 증가하였다.

이상의 실험결과 少陰人 升陽益氣湯은 Th1 세포로부터 cytokine의 분비를 촉진하여 특이적 면역반응을, 대식세포의 탐식작용을 촉진하여 비특이적 면역반응을 증강시킬 수 있는 처방이라 사료된다.

VI. 參考 文獻

1. 李壽瓊 : 「東醫壽世保元」 太少陰陽人の 「病證論」 에 관한 研究, 四象醫學會誌, 1999 ; 11(2):19.
2. 전국한의과대학사상의학교실 : 四象醫學, 서울, 集文堂, 1997 ; 148-168, 460-461.
3. 金正熙 : 少陰人 病證 및 處方에 나타난 桂枝湯의 變用에 대한 考察, 四象醫學會誌, 1999 ; 11(1):207.
4. 朱鍾天 : 少陰人 腎受熱 表熱病論의 病證 및 藥理에 대한 研究, 四象醫學會誌, 1997 ; 9(2):72-90.
5. 金鎮成 : 少陰人 八物君子湯과 升陽益氣湯이 Hydrocortisone Acetate로 誘發된 陽虛證에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌, 1988 ; 9(1):42-61.
6. 張寧根 : 少陰人 十全大補湯과 局方 十全大補湯이 陽虛病證에 미치는 影響, 四象醫學會誌, 1995 ; 7(1):281-293.
7. 金完熙·崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, 1985 ; 55-56.
8. 李常仁 : 天真處方解說, 서울, 成輔社, 1987 ;

- 36-38, 45-47, 102.
9. 全震相 : 少陰人 升陽益氣附子湯과 官桂附子理中湯이 陽虛證에 미치는 影響에 관한 實驗的 研究, 四象醫學會誌, 1989 ; 1(1):87-112.
10. 李泰浩 : 陽虛證 誘發에 의한 補中益氣湯 및 六味地黃湯의 效果, 경희대학교 대학원, 1986.
11. 安光武 : 少陰인 補中益氣湯과 後世方 補中益氣湯이 陽虛病證에 미치는 影響, 경희대학교 대학원, 1995.
12. 孫昌國 : 少陰人 香砂養胃湯이 Hydrocortisone Acetate로 誘發된 陽虛證에 미치는 影響에 대한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원, 1990.
13. 張賢鎭 : 少陽人 荊防地黃湯, 十二味地黃湯과 少陰人 補中益氣湯, 十全大補湯의 免疫反應에 관한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원, 1994.
14. 金正憲 : 補中益氣湯, 人蔘 및 黃芪藥鍼이 免疫機能低下에 미치는 影響, 경희대학교 대학원, 1999.
15. 洪律慈 : 補中益氣湯과 香砂六君子湯의 併用投與가 S-180腹水癌細胞를 接種한 생쥐의 細胞性 免疫에 미치는 影響, 동국대학교 대학원, 1994.
16. 韓晟圭 : 補中益氣湯, 手帖散 및 補中益氣湯 合手帖散의 抗癌과 免疫調節作用에 관한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원, 1995.
17. 閔勇泰 : 補中益氣湯의 投與가 紫外線 照射로 低下된 마우스의 免疫機能의 恢復에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1991.
18. 金星勳 : 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響, 경희대학교 대학원, 1987.
19. 崔允禎 : 四君子湯 및 四物湯이 Methotrexate로 誘導된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響, 동국대학교 대학원, 1997.
20. 孫宰嫻 : 八物湯이 생쥐 妊娠 末期에 免疫細胞의 Cytokines生成에 미치는 影響, 대전대학교 대학원, 2000.
21. 金在燮 : 十全大補湯 煎湯엑기스가 생쥐의 細胞性 및 體液性 免疫反應에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1984.
22. 黃忠淵 : 十全大補湯加鹿茸이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1988.

23. 蔡仁植 : 傷寒論譯註, 서울, 高文社, 1991 ; 279.
24. 元持常 : 東醫四象新編, 서울, 綜合醫苑社, 1974 ; 22, 34, 36, 54, 61.
25. 朴奭彦 : 東醫四象大典, 서울, 醫道韓國社, 1977 ; 436, 605.
26. 李濟馬 : 東醫壽世保元, 四象醫學會刊, 서울, 大星文化社, 1979.
27. wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1978 ; 75:2844.
28. 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.
29. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.*, 1983 ; 65:55.
30. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.*, 1990 ; 129:23.
31. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1994 ; 179:873.
32. Rockett, K.A., Auburn, 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.
33. 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.
34. 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.
35. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S.: A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, 1993 ; 162:1.
36. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C.: Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1984 ; 45:1.
37. 金一煥 : 少陰人 補中益氣湯과 補中益氣湯에 대한 四象醫學의 比較研究, 四象醫學會誌, 1996 ; 8(2):74.
38. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, 1993 ; 197.
39. 文潄典 等編 : 東醫病理學, 서울, 高文社, 1990 ; 129.
40. 金龍國 : 亡陽亡陰證에 대한 證治醫學과 四象醫學과의 比較 考察, 四象醫學會誌 1991 ; (3)1:79-80.
41. 朴寅商 : 東醫四象要訣, 서울, 癸丑文化社, 1975 ; 7-8.
42. 李乙浩 : 洪淳用 : 四象醫學原論, 서울, 杏林出版社, 1982 ; 228-230.
43. 李泰浩 : 東醫四象診療의 秘訣, 서울, 杏林書院, 1952 ; 216.
44. 尹吉榮 : 四象體質醫學論, 서울, 한얼문고, 1989 ; 368.
45. 楊維傑 : 黃帝內經素問譯解, 1976 ; 3, 266, 276, 712.
46. 宋驚永 : 中醫病因病機學, 北京, 人民衛生出版社, 1987 ; 64-66.
47. 陳言 : 三因及一病證方論, 北京, 人民衛生出版社, 1983 ; 19.
48. 蔡禹錫 : 免疫反應의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察, 대한한학회지, 1990 ; 11(2):54-64.
49. 서울대학교 의과대학편 : 免疫學, 서울, 서울대학교 출판부, 1989 ; 1.
50. 李淵堽 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, 1985 ; 33.
51. 鄭憲澤 外 : 免疫學入門, 서울, 高文社, 1988 ; 9-11.
52. 대한병리학회편 : 病理學, 서울, 高文社, 1990 ; 183-202.
53. 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.
54. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. Saunders Company(2ed). U.S.A., 1994 ; 177-178.
55. 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.
56. Okkuda, Y., Sakada, S., Shimaoka, M. and Yanagihara, T.: Nitric oxide induces apoptosis in

- mouse splenic T lymphocytes. *Immunology Letters*, 1996 ; 52:135.
57. 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.
58. 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.
59. 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.