

補中益氣湯이 Lymphocyte와 CD4+ T cell에 미치는 影響

金美志* · 金璋顯**

*東國大學校 韓醫科大學 小兒科專攻

**東國大學校 韓醫科大學

ABSTRACT

Effects of *Bojungikkintang* on the immunosuppression induced by methotrexate in rats.

Mi-Ji, Kim · Jang-Hyun Kim*

*Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine,
Dongguk University, Seoul, Korea

Introduction

The effects of *Bojungikkintang* on the immunosuppression induced by methotrexate in rats were investigated in this experiment. The multiple parameters of immunity assessed in each rats includes the rate of body weight loss, weight changes in thymus, spleen and axillary lymphnode. The number of lymphocyte and CD4+ T cell count in blood, thymus, spleen and axillary lymphnode were also measured.

Methodology

Male Sprague-Dawley rats were chosen as an experiment object and were divided into 3 groups by a random selection. Each group consisted

6 rats. The normal group didn't receive any treatment. The control group was administered methotrexate for 4 days. The sample group was administered with both *Bojungkitang* and methotrexate for 4 days. The dosage of medication was 2cc/day, 1cc given at 10AM and another 1cc given at 5PM.

Results

The rate of body weight loss was significantly decreased in the sample group. The weight of thymus was significantly increased in the sample group while the weight of spleen did not show much increase.

Blood CD4⁺ T cell count, thymus lymphocyte count, thymus CD4⁺ T cell count, spleen lymphocyte count, spleen CD4⁺ T cell count and axillary lymph node CD4⁺ T cell count were significantly increased in the sample group while blood lymphocyte count and axillary lymphnode lymphocyte count did not show much increase.

Conclusion

As one can witness from the above results, administration of *Bojungkitang* played potent role in increasing immune system among the rats treated with methotrexate which induces immunosuppression. Overall increase of lymphocyte count and CD4⁺ T cell count in the sample group with *Bojungkitang* effectively proves its ability to boost the immune system.

I. 緒論

現代의 疾病觀은 疾病現狀을 복잡다양한 육안수준에서, 보다 단순한 수준인 분자수준에서 통일적으로 理解하려는 시점에 이르렀고 이와 關聯된 대표적인 분야 중 하나가 免疫反應에 關여하는 細胞들에 關한 지견이다⁹⁾. 免疫의 개념은 초기에는 거의 傳染病의 영역에서 使用되었으나, 오늘날에는 免疫

能力이 個體의 統合性을 維持하는 기전이란 認識下에 內分泌學, 遺傳學, 腫瘍 生物學 그리고 그 밖의 수많은 疾病의 生物學에 適用되고 있다^{9, 10, 12)}.

韓醫學에서도 人體의 臟腑組織間이나 人體와 外界環境間의 平衡狀態가 破壞됨으로써 疾病이 發生한다고 보고 있으며 이는 人體의 抗病能力과 正常的인 臟腑機能 및 物質的 基礎를 가리키는 “正氣”와 各種 發病要因들을 가리키는 “邪氣”가 人體 內에서 相爭하

기 때문인 것으로 說明하였다²⁾. 특히 正氣는 外部로부터 침입하는 微生物, 同種의 組織이나 體內에서 생긴 불필요한 產物 등과 特異하게 反應하여 抗體를 만들며 이것을 排除하여 그 個體의 恒常성을 維持하고자 하는 免疫의 의미와 相通한다.

이러한 正氣의 生成은 脾, 肺, 腎 三臟과 關聯이 있으며²⁾, 특히 脾胃는 後天之本이며 臟腑氣血의 生化之源이라 하여 正氣 生成의 後天的인 根源이 되며³⁰⁾, “脾爲之衛”, “四季脾旺不受邪”라 하여 邪氣의 侵入에 대한 人體 防禦機能의 중요한 役割을 遂行한다고 하였다^{28, 36)}. 따라서 脾胃氣의 虛弱은 正氣 生成과 人體 防禦機能의 低下를 招來하여 正常的인 免疫反應을 기대할 수 없으며, 이 때 調補脾胃 升陽益氣의 대표적인 處方인 補中益氣湯이 低下된 免疫機能을 恢復시켜줄 것으로 생각된다.

補中益氣湯은 李³²⁾의 脾胃論에 최초로 收錄되어 飲食失節이나 寒溫不適으로 脾胃가 傷한 경우와 喜怒憂恐이나 勞役過度로 元氣가 耗損된 경우 陰火가 上衝함으로써 氣高而喘하고 身熱而煩하며 脈洪大하고 頭痛이 있거나 嘔渴不止하고 皮膚가 不任風寒하여 寒熱하는 症狀에 使用되었다. 그 후 많은 醫家들에 의해서 自汗, 瘡瘍, 瘡痢, 感冒風寒, 出血 등 脾胃不足 혹은 中氣下陷의 諸症狀에 활용되고 있다^{1, 5, 8, 14, 16, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 37)}.

補中益氣湯에 관한 實驗的 研究로는 朴¹⁹⁾이 cyclosporin A로 免疫抑制된 흰쥐의 肝 및 腎損傷에 미치는 影響

을, 閔¹⁸⁾이 紫外線 照射로 抑制된 細胞性 및 體液性 免疫機能의 恢復에 미치는 影響을, 李²³⁾가 cisplatin으로 誘發된 體重減少와 血液變化에 미치는 影響을, 金 등^{17, 25, 26)}이 S-180 腹水癌細胞로 誘發시킨 생쥐의 抗癌 및 免疫反應에 미치는 影響을 報告한 바 있으나, 補中益氣湯의 投與가 血液 및 淋巴組織의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率에 미치는 影響을 報告한 적은 없었다.

이에 著者는 methotrexate로 免疫能力을 低下시킨 흰쥐에 補中益氣湯을 함께 投與하여 體重減少率과 血液, 脾臟, 胸線, 兩側 腋窩 淋巴節의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率 및 이들의 重量을 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

動物은 體重 200±10g의 Sprague-Dawley系 흰쥐 수컷을 使用하였으며, 固形飼料과 물을 充分히 供給하면서 實驗室 環境에서 2週 以上 適應시킨 후 健康이 良好한 것을 選擇하여 使用하였다.

2) 藥材

藥材는 東國大學校 附屬韓方病院에서 購入하였으며, 使用된 補中益氣湯¹⁶⁾

의 處方內容과 1貼 分量은 다음과 같다.

藥 物	生藥名	重 量
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	5.62g
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	3.75g
白 朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	3.75g
甘 草	<i>Glycyrrhiza e Radix Angelicae</i>	3.75g
黨 歸 身	<i>gigantis Radix Aurantii</i>	1.87g
陳 皮	<i>nobilis Pericarpium</i>	1.87g
升 麻(酒 洗)	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	1.12g
柴 胡(酒 洗)	<i>Bupleuri Radix</i>	1.12g
總 量		22.85g

3) 試藥 및 器機

試藥으로는 methotrexate(MTX ; Sigma, U.S.A.), Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt(EDTA ; Sekisui medical, 日本), limphoprep(Nycomed Pharma As, Norway), phosphate buffered saline (PBS), RPMI 1640 medium(GIBCO, U.S.A), trypan blue(ACROS, U.S. A.), antibiotic antimycotic solution(GIBCO, U.S.A.), FITC Anti-Rat CD4+ Monoclonal Antibody(Cedarlane, Canada), propidium i

odine (Sigma, U.S.A.), 클로로포름(덕산, 한국) 등을 사용하였고, 器機로는 螢光顯微鏡(Axio skop, Germany), 스테인칠망(청계상공사, 한국), 5ml주사기용에 맞는 얇이 볼록한 경구투약기(zonde ; 명진기업, 한국) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

補中益氣湯 材料 6貼 分量(137.10g)을 蒸溜水 2,000cc로 3時間 煎湯하여 찌꺼기를 버리고 남은 藥液 600cc를 감압농축기(rotary evaporator)로 濃縮하여 200cc의 檢液을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 實驗群 分類 및 檢液 投與

動物은 아무 처치를 하지 않은 正常群, MTX를 投與한 對照群, 補中益氣湯과 MTX를 混合投與한 實驗群으로 區分하여 한 群에 6마리씩 配定하였다.

對照群은 methotrexate를 1mg/kg으로 조정하여 生理食鹽水 1cc에 0.2mg을 稀釋하여 使用하였으며, 1回 1cc씩 午前 10時와 午後 5時 하루 2回 4日間 經口投與하였다.

實驗群은 對照群과 同一한 方法으로 MTX를 投與하면서, 調製한 補中益氣湯 檢液을 1回 1cc씩 MTX 投與직후 經口投與하였다.

3) 採血 및 lymphocyte 分離

클로로포름으로 麻醉하고 心臟穿刺하여 얻은 血液을 EDTA가 들어있는 병에 넣어 잘 섞어서 凝固를 防止한 뒤 同量의 PBS를 섞은 후, limphoprep(1.077±0.0001g/ml)를 添加하여 25分동안 2,000rpm에서 遠心分離하여 上層을 버리고, 中間에 하얗게 浮遊해 있는 lymphocyte를 分離하였다. 分離된 lymphocyte를 PBS에 浮遊시켜서 220G에서 10分間 2回 遠心洗滌한 후 RPMI 1640 medium에 浮遊시키고, 光學顯微鏡을 利用하여 trypan blue exclusion으로 細胞數를 측정하였다³⁸⁾.

4) 體重減少率 測定

MTX와 補中益氣湯 投與에 의한 몸무게의 變化는 다음과 같은 方法으로 計算하였다.

$$\text{체중 감소율(\%)} =$$

$$\frac{\text{실험 전 체중} - \text{약물 처치 후 체중}}{\text{실험 전 체중}} \times 100$$

5) 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 무게 測定

心臟採血 後 無菌狀態에서 흰쥐의 胸線, 脾臟 그리고 兩側 腋窩 淋巴節을 摘出하여 2ml PBS가 들어있는 petri dish에 올려놓고 0점 調節을 한 뒤, 各 組織을 petri dish 위에 얹어 무게를 測定하였다.

6) 各 組織에서의 lymphocyte 分離

위에서 摘出した 各 組織을 antibiotic antimycotic solution(No. 600-524 0)으로 洗滌한 후 PBS가 들어있는 petri dish에서 작은 解剖가위로 잘게 자른 후 멸균된 유리막대로 조심스럽게 문질러 各 組織細胞를 浮遊시키고, 스테인철망(mesh No. 100)에 여과하여 組織片과 遊離되지 않은 細胞덩어리를 제거하여 浮遊液을 만들었다. 이 浮遊液을 25分동안 2,000rpm에서 遠心分離하여 가라앉힌 뒤 上層液을 버리고, 다시 2ml PBS를 加하고 limphoprep(1.077±0.0001g/ml)를 添加하여 25分동안 2,000rpm에서 遠心 分離하여 上層을 버리고, 中間에 하얗게 浮遊해 있는 lymphocyte層을 分離했다. 分離된 lymphocyte를 PBS에 浮遊시켜서 2,000rpm에서 10分間 2回 遠心洗滌한 후 RPMI 1640 medium에 浮遊시키고, trypan blue exclusion으로 細胞數를 측정하였다³⁸⁾.

7) 血液 및 組織 淋巴球의 CD4+ T細胞率 測定

RPMI 1640에 浮遊시킨 各 lymphocyte를 media A(pH 7.2 PBS+5% normal serum of host species+2M sodium azide)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 細胞를 再浮遊시키고, 시험관에 細胞 浮遊液 50 μ l씩 넣어서 시험관마다 1×10^6 개의 細胞가 存在하게 했다. 各 시험관에 FITC Anti-Rat CD4+ Monoclonal Antibody를 0.5 μ g씩 加하고 vorte

x mixer로 잘 섞는다. 이 혼합액을 빛이 차단되도록 알루미늄호일로 씌우고 4℃에서 30分間 培養한 뒤, 4℃에서 PBS로 2回 洗滌하고, 50 μ l의 ice cold media B(pH 7.2 PBS+0.5% Bovine serum albumin+2M sodium azide)에서 cell pellet을 再浮遊시켰다. 0.5mg/ml의 농도로 PBS에 propidium iodine을 녹여 그 中 15 μ l를 적당한 시험관에 옮기고, mounting fluid 한 방울을 떨어뜨린 뒤 잘 섞어 標本을 만든 뒤, 螢光顯微鏡으로 觀察하였다. 細胞數를 測定하고 光學視野에서 200個 以上の 細胞를 測定하고 나서 螢光視野에서 螢光이 發色된 細胞數를 測定한 뒤 百分率을 구하였다³⁸⁾.

8) 統計處理

各 群의 統計處理는 SAS(statistical analysis system)를 이용하였으며, 먼저 分散比(F-value)를 計算하여 群間 比較여부를 결정하고⁴⁾, 유의수준 95% ($\alpha=0.05$)에서 Duncan 多衆比較分散分析法으로 群間比較하였다.

III. 成績

1. 體重減少率에 미치는 效果

體重減少率은 正常群은 $-0.003 \pm 0.07\%$, 對照群은 $22.22 \pm 0.58\%$, 實驗群은 $5.94 \pm 1.29\%$ 로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別 比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差

異가 認定되었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of *Bojungikkitang* Administration on the Rate of Body Weight Loss in Rats.

Group	No. of animal	Rate of Body Weight Loss(%)	Duncan grouping
Normal	6	$-0.003 \pm 0.07^{1)}$	C ²⁾
Control	6	22.22 ± 0.58	A
Sample	6	5.94 ± 1.29	B
F-value		196.99	

1) Mean \pm standard error of 6 rats

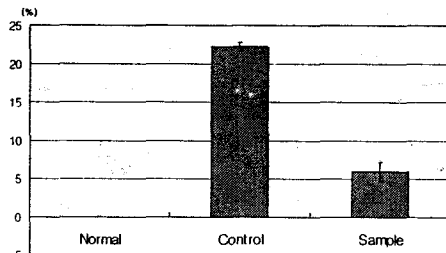
2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test

Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Fig. 1. Effect of *Bojungikkitang* administration on the rate of body weight loss in rats.



Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

2. 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 무게

胸線의 무게는 正常群은 0.490 ± 0.044 g, 對照群은 0.217 ± 0.019 g, 實驗群은 0.328 ± 0.009 g으로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다(Table II, Fig. 2).

脾臟의 무게는 正常群은 0.110 ± 0.015 g, 對照群은 0.062 ± 0.007 g, 實驗群은 0.092 ± 0.005 g으로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 없었다(Table II, Fig. 2).

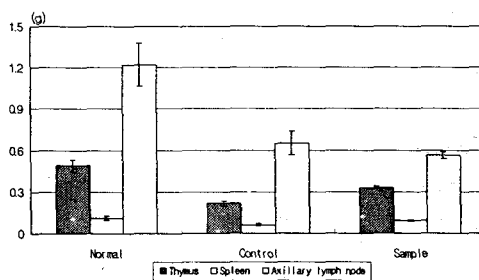
兩側 腋窩 淋巴節의 무게는 正常群은 1.223 ± 0.157 g, 對照群은 0.650 ± 0.087 g, 實驗群은 0.563 ± 0.026 g으로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 없었다(Table II, Fig. 2).

Table II. Effects of *Bojungikkitang* Administration on the Weight of Thymus, Spleen and Axillary Lymphnode in Rats.

- 1) Mean \pm standard error of 6 rats
 - 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
- Normal : Untreated group.
Control : MTX administered group.
Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Group	Thymus (g)	Duncan grouping	Spleen (g)	Duncan grouping	Axillary Lymph node (g)	Duncan grouping
Normal	0.490 ± 0.044	A	0.110 ± 0.015	A	$1.223 \pm 0.157^{2)}$	A ²⁾
Control	0.217 ± 0.019	C	0.062 ± 0.007	B	0.650 ± 0.087	B
Sample	0.328 ± 0.009	B	0.092 ± 0.005	AB	0.563 ± 0.026	B
F-value	23.60		5.85		11.77	

Fig. 2. Effects of *Bojungikkitang* administration on the weight of thymus, spleen and axillary lymphnode in rats.



Normal : Untreated group.
Control : MTX administered group.
Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

3. 血中 lymphocyte 數

血中 lymphocyte 數는 正常群은 $163.00 \pm 17.03 (\times 10^5)$ cells/ml, 對照群은 $72.17 \pm 5.11 (\times 10^5)$ cells/ml, 實驗群은 $100.17 \pm 2.50 (\times 10^5)$ cells/ml로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 없었다 (Table III, Fig. 3).

Table III. Effect of *Bojungikkitang* Administration on the Number of Lymphocyte in Blood of Rats.

Group	No. of animal	Lymphocytes in Blood ($\times 10^5$)/ml	Duncan grouping
Normal	6	$163.00 \pm 17.03^{1)}$	A ²⁾
Control	6	72.17 ± 5.11	B
Sample	6	100.17 ± 2.50	B
F-value		20.13	

1) Mean \pm standard error of 6 rats
 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha = 0.05$

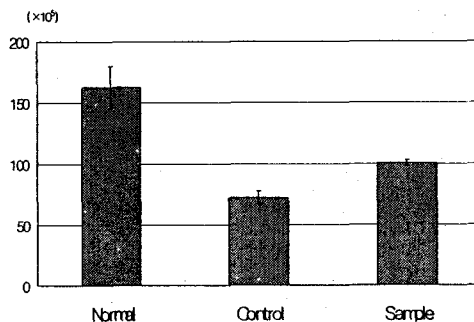
level by Duncan test

Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Fig. 3. Effect of *Bojungikkitang* administration on the number of lymphocyte in blood of rats.



Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

4. 血中 CD4+ T細胞率

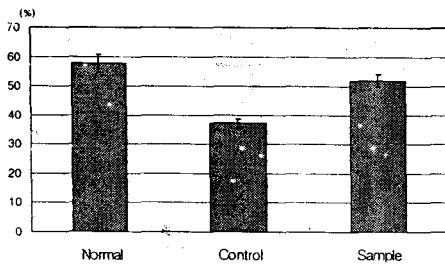
血中 CD4+ T細胞率은 正常群은 $57.67 \pm 2.99\%$, 對照群은 $37.17 \pm 1.42\%$, 實驗群은 $51.83 \pm 2.15\%$ 로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다 (Table IV, Fig. 4).

Table IV. Effect of *Bojungikkintang* Administration on Blood CD4+ T Cell Count of Rats.

Group	No. of animal	CD4+ T cell (%)	Duncan grouping
Normal	6	57.67±2.99 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	37.17±1.42	B
Sample	6	51.83±2.15	A
F-value		21.50	

1) Mean ± standard error of 6 rats
 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

Fig. 4: Effect of *Bojungikkintang* administration on blood CD4+ T cell count of rats.



Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

5. 胸線에서의 lymphocyte 數

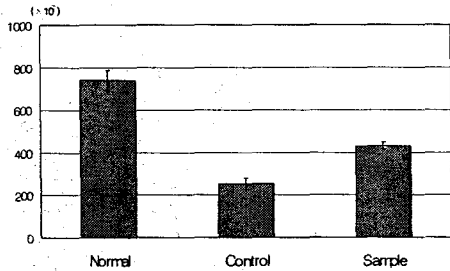
胸線에서의 lymphocyte 數는 正常群은 $739.53 \pm 46.41 (\times 10^7)$ cells, 對照群은 $252.83 \pm 28.18 (\times 10^7)$ cells, 實驗群은 $431.00 \pm 15.84 (\times 10^7)$ cells로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다 (Table V, Fig. 5).

Table V. Effect of *Bojungikkintang* Administration on the Number of Lymphocyte in Thymus of Rats.

Group	No. of animal	Lymphocytes in Thymus ($\times 10^7$)	Duncan grouping
Normal	6	739.53±46.41 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	252.83±28.18	C
Sample	6	431.00±15.84	B
F-value		56.86	

1) Mean ± standard error of 6 rats
 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

Fig. 5. Effect of *Bojungikkitang* administration on the number of lymphocyte in thymus of rats.



Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Group	No. of animal	CD4+ T cell (%)	Duncan grouping
Normal	6	57.17 ± 1.49 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	47.17 ± 1.33	B
Sample	6	53.50 ± 2.14	A
F-value		8.96	

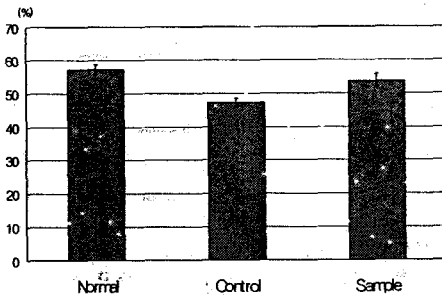
1) Mean ± standard error of 6 rats
 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

6. 胸線에서의 CD4+ T細胞率

胸線에서의 CD4+ T細胞率は 正常群은 57.17 ± 1.49%, 對照群은 47.17 ± 1.33%, 實驗群은 53.50 ± 2.14%로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別 比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다(Table VI, Fig. 6).

Table VI. Effect of *Bojungikkitang* Administration on Thymus CD4+ T Cell Count of Rats.

Fig. 6. Effect of *Bojungikkitang* administration on thymus CD4+ T cell count of rats.



Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

7. 脾臟에서의 lymphocyte 數

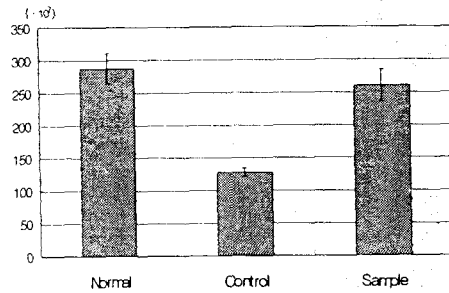
脾臟에서의 lymphocyte 數는 正常群은 $287.33 \pm 22.75 (\times 10^7)$ cells, 對照群은 $128.33 \pm 6.21 (\times 10^7)$ cells, 實驗群은 $260.33 \pm 24.30 (\times 10^7)$ cells로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다(Table VII, Fig. 7).

Table VII. Effect of *Bojungikkitang* Administration on the Number of Lymphocyte in Spleen of Rats.

Group	No. of animal	No. of Lymphocytes in Spleen ($\times 10^7$ cells)	Duncan grouping
Normal	6	$287.33 \pm 22.75^{1)}$	A ²⁾
Control	6	128.33 ± 6.21	B
Sample	6	260.33 ± 24.30	A
F-value		18.94	

- 1) Mean \pm standard error of 6 rats
 - 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
- Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Fig. 7. Effect of *Bojungikkitang* administration on the number of lymphocyte in spleen of rats.



- Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

8. 脾臟에서의 CD4+ T細胞率

脾臟에서의 CD4+ T細胞率은 正常群은 $49.83 \pm 1.70\%$, 對照群은 $41.33 \pm 2.87\%$, 實驗群은 $55.17 \pm 1.64\%$ 로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다(Table VIII, Fig. 8).

Table VIII. Effect of *Bojungikkitang* Administration on Spleen CD4+ T Cell Count of Rats.

Group	No. of animal	CD4+ T cell (%)	Duncan grouping
Normal	6	49.83±1.70 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	41.33±2.87	B
Sample	6	55.17±1.64	A
F-value		10.56	

- 1) Mean ± standard error of 6 rats
- 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$

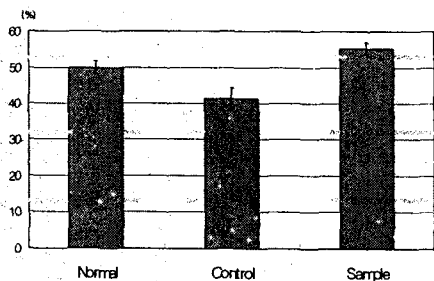
level by Duncan test

Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

Fig. 8. Effect of *Bojungikkintang* administration on spleen CD4+ T cell count of rats.



Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

9. 腋窩 淋巴節에서의 lymphocyte 數

腋窩 淋巴節에서의 lymphocyte 數는 正常群은 $91.98 \pm 2.29 (\times 10^5)$ cells, 對照群은 $46.62 \pm 3.42 (\times 10^5)$ cells, 實驗群은 $56.30 \pm 3.85 (\times 10^5)$ cells로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 없었다 (Table IX, Fig. 9).

Table IX. Effect of *Bojungikkintang* Administration on the Number of Lymphocyte in Axillary Lymphnode of Rats.

Group	No. of animal	Lymphocytes in Axillary Lymphnode ($\times 10^5$ cells)	Duncan grouping
Normal	6	91.98±2.29 ¹⁾	A ¹⁾
Control	6	46.62±3.42	B
Sample	6	56.30±3.85	B
F-value		53.91	

- 1) Mean ± standard error of 6 rats
- 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$

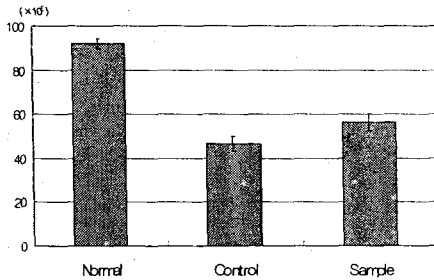
level by Duncan test

Normal : Untreated group.

Control : MTX administered group.

Sample : MTX plus *Bojungikkintang* administered group.

Fig. 9. Effect of *Bojungikkitang* administration on the number of lymphocyte in axillary lymphnode of rats.



Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

Group	No. of animal	CD4+ T cell (%)	Duncan grouping
Normal	6	53.50 ± 2.29 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	41.00 ± 2.46	B
Sample	6	50.00 ± 0.73	A
F-value		10.53	

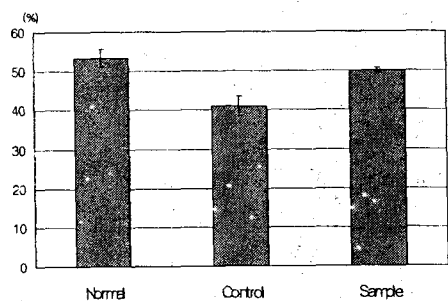
1) Mean ± standard error of 6 rats
 2) The same letter is not significantly different at the $\alpha=0.05$ level by Duncan test
 Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

10. 腋窩 淋巴節에서의 CD4+ T細胞率

腋窩 淋巴節에서의 CD4+ T細胞率は 正常群은 53.50 ± 2.29%, 對照群은 41.00 ± 2.46%, 實驗群은 50.00 ± 0.73%로 나타났으며, Duncan 多衆檢定法에 의한 個別 比較에서 對照群에 比하여 實驗群에서 有意한 差異가 認定되었다 (Table X, Fig. 10).

Table X. Effect of *Bojungikkitang* Administration on Axillary Lymphnode of CD4+ T Cell Count of Rats.

Fig. 10. Effect of *Bojungikkitang* administration on axillary lymphnode CD4+ T cell count of rats.



Normal : Untreated group.
 Control : MTX administered group.
 Sample : MTX plus *Bojungikkitang* administered group.

IV. 考察

人體 內에서 어떤 要因으로 因하여 異物의 侵入이나 變異細胞가 發生하면 生體防禦機構 즉 免疫系가 關與하여 異物은 물론 새로이 發生된 變異細胞를 非自己로 認識하여 處理하는 能力을 發揮함으로써 個體의 恒常性を 維持하려는 現象을 免疫이라 하는데^{12, 13)}, 과거에는 기생충이나 미생물의 侵入에 대처하는 저항수단 정도로 理解되었으나 근래에는 醫學全般에 걸쳐 關聯되어 있으며, 장차 疾病의 克復은 免疫機能의 保全과 促進을 통해 이루어질 可能性이 크다^{9, 10, 13)}.

韓醫學에서는 臟腑, 經絡, 營衛, 氣血의 正常적인 生理機能을 포함한 人體 內의 모든 抗病力을 뜻하는 正氣의 概念이, 個體의 恒常性を 維持하고자 하는 免疫의 正常機能과 類似하다고 하겠다^{2, 3)}. 이러한 正氣의 生成은 腎中의 精氣와 水穀之氣 및 自然界로부터 吸入되는 清氣 등이 充分해야 하고 이와 함께 肺, 脾, 腎 三臟의 機能이 正常的이어야 하는데²⁾, 특히 脾胃와 關聯하여 「素問·平人氣象論篇」³⁰⁾에 사람은 일반적으로 胃에서 氣를 받으니 胃는 사람의 常氣이며 胃氣가 없으면 죽는다고 하였고, 李³²⁾는 胃氣之本의 虛弱은 곧 脾胃之氣가 損傷된 것이므로 인해 元氣가 充足되지 못하면 諸病이 發生한다고 하여 脾胃가 正氣生成의 後天的인 根源이며 脾胃虛弱은 疾病 發生의 原因이 됨을 강조하였다.

또한 「靈樞·五癆津液別篇」²⁸⁾에 “脾爲之衛”라 하고, 張³⁶⁾이 “四季脾旺不受邪”라 한 것은 脾胃가 邪氣의 侵入에 대한 人體의 防禦機能에 關聯되어 있으며 脾胃가 健實하면 邪氣의 침입을 받지 않는다고 하였다. 따라서 正氣生成의 後天之本인 脾胃를 補益함으로써 疾病에 대한 防禦能力과 免疫機能이 增強될 것으로 생각되며, 調補脾胃 益氣升陽의 代表的 處方인 補中益氣湯은 低下된 免疫機能을 恢復시킬 것으로 推定된다.

補中益氣湯은 李³²⁾의 脾胃論에 最初로 收錄되어 불규칙한 食生活이나 극심한 氣候變化로 脾胃가 損傷되거나 精神的 갈등, 과도한 勞役 등으로 元氣가 耗損되어 陰火가 上衝함으로써 숨이 차고 身熱이 나면서 煩燥하며 脈洪大하고 頭痛이 있으며 혹은 渴症이 계속되고 皮膚가 風寒을 이기지 못하여 寒熱하는 症狀에 使用되었다. 現代에는 慢性 胃腸炎, 慢性 氣管支炎, 慢性 肝炎, 眼瞼下垂, 胃下垂, 子宮下垂, 機能性子宮出血, 重症筋無力症 등의 慢性疾患과 各種 虛弱性 疾患 등에 應用되고 있다^{1, 5, 7, 8, 37)}.

補中益氣湯의 免疫에 관한 實驗的 研究로는 朴¹⁹⁾이 cyclosporin A로 免疫抑制된 흰쥐의 血清 AST, ALT, bile acid, BUN, creatinine 含量의 增加를 減少시키며 SOD의 活性을 增加시킨다고 하였고, 閔¹⁸⁾이 紫外線 照射로 抑制된 NK細胞의 活性을 恢復시킨다고 하였으며, 金 등^{17, 25, 26)}은 S-180 腹水癌細胞를 移植한 생쥐의 수명을 연장시키며, cyclophosphamide의 多量投與로

인한 GOT, GPT, BUN, creatinine 含量的 增加를 抑制시키고¹⁷⁾, 血清抗體價, 淋巴球 增殖反應, IL-2의 生成能 및 自然殺害細胞의 活性度を 增加시키며²⁵⁾, 香砂六君子湯과의 併用投與가 lymphocyte 數 및 胸線, 림프절, 脾臟 등의 T細胞 分布를 增加시킨다고 報告한 바 있으나²⁶⁾, 補中益氣湯이 人體의 免疫能力 指標인 lymphocyte와 CD4+ T細胞에 關聯된 研究 報告는 없었다.

免疫反應에는 抗原刺戟에 의해 抗體가 만들어지는 體液性 免疫反應과 抗原刺戟을 받은 T細胞나 T細胞가 만들어낸 여러 蛋白質들에 의한 細胞性 免疫反應으로 區分된다. 體液性 免疫反應은 細菌을 둘러싸서 食菌作用을 하도록 도와주고 細菌毒素과 결합하는 抗體를 生産하여 血液 中으로 放出하는 反應으로 抗原特異的 分子인 抗體에 의해서 이루어지며 細胞보다는 血清 內에 存在하는데 이러한 抗體는 T細胞의 도움을 받아 B細胞에 의해 生産된다. 細胞性 免疫反應은 細胞 內의 增殖性 微生物을 防禦하는 減作 淋巴球를 만드는 反應으로 주로 T細胞에 의하여 이루어지며 경우에 따라서는 T細胞도 B細胞도 아닌 淋巴球, 多形核 白血球, 大食細胞 등에 의하여 이루어지기도 한다^{3, 12, 13)}.

T細胞는 免疫促進作用을 하는 helper T細胞와 免疫抑制作用을 하는 suppressor T細胞, 細胞毒性作用을 하는 cytotoxic T細胞 등으로 나뉘어진다. 이들은 구분하는 것은 세포표면의 markers로서 中樞淋巴器官인 胸線에서 CD4+ 또는 CD8+ T세포로 成熟 分化되

어 末梢血液으로 보내져 비로소 外部 抗原과 反應하게 되며, CD4+ T細胞는 주로 helper-inducer로서 機能을 수행한다^{6, 12, 13)}.

近來에 免疫機能 全般이 低下되는 免疫缺乏症候群에 관한 研究가 進行되면서 CD4+ T細胞數를 活用하여 免疫能力的 增減이나 AIDS 患者의 豫後를 判定하는데, 免疫能力이 低下된 사람이나 AIDS 患者의 機會感染에서 CD4+ T細胞가 減少되어 있다는 報告^{41, 42, 44, 47)} 등을 根據로 많은 學者들이 免疫能力 指標의 하나로서 CD4+ T細胞數 計測法을 使用하고 있다³⁹⁻⁴⁷⁾. 國內에서는 金²²⁾은 六味地黃湯이 血液, 脾臟, 淋巴節의 CD4+ T細胞數의 增加를, 鄭²¹⁾은 魚腥草藥鍼이 放射線被爆으로 誘發된 脾臟의 lymphocyte와 CD4+ T細胞의 減少 抑制를, 周²⁴⁾는 寒冷스트레스로 低下된 血中 赤血球數, 白血球數, lymphocyte 數 및 血中 CD4+ T細胞率이 쑥뜸刺戟으로 增加됨을 報告한 바 있다.

이에 著者는 補中益氣湯이 免疫反應에 미치는 效果를 알아보기 위하여 補中益氣湯과 MTX를 混合하여 投與한 후 體重減少率과 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 重量 및 血液, 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率을 測定하였다.

免疫反應을 抑制시키는 藥物로는 nitrogen mustard, cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, mitomycin, busulfan, methotrexate 등이 있으며¹²⁾, 本 實驗에서는 methotrexate(MTX)를 使用하였다. MTX는 葉산유도체로서 dihydro

folic acid가 tetrahydrofolic acid로 되는데 필수적인 dihydrofolate reductase와 결합함으로써 deoxyuridylic acid가 methyl基를 받아 DNA 합성에 필요한 thymidylic acid를 생성하는 것을 억제하여 免疫抑制作用을 하며, 細胞에서 일어나는 毒作用은 주로 胃腸管과 骨髓損傷인데 이로 인해 甚한 出血性 剝離 腸炎과 赤血球 成熟障礙, 白血球의 生成低下, 淋巴組織 內의 淋巴細胞 減少를 나타내며, 末梢血液의 현저한 顆粒球 減少를 가져온다^{7,15)}.

補中益氣湯이 MTX의 投與로 인한 體重減少에 미치는 영향을 알아보기 위하여 體重減少率을 測定한 결과 補中益氣湯을 投與한 實驗群에서 對照群에 比하여 有意性있는 抑制가 認定되었다. 이는 補中益氣湯이 cisplatin에 의한 體重減少를 恢復시키는데 無效하다는 報告²³⁾와는 相反되는 結果인데, 이러한 結果는 補中益氣湯이 體重에 作用하는 正確한 機轉은 알 수 없으나 腎臟損傷을 주로 일으키는 cisplatin의 副作用을 減少시키기보다는 胃腸管 損傷을 주로 일으키는 MTX의 副作用을 減少시키는데 有效하게 作用한 것으로 생각되며, 胃腸管 損傷이 防止됨으로써 體重減少가 抑制된 것으로 여겨진다.

補中益氣湯이 淋巴組織의 重量變化에 미치는 영향에서는 MTX의 投與로 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 무게가 正常群에 比하여 對照群에서 有意性있게 減少하였으며, 補中益氣湯을 投與한 實驗群에서는 胸線의 무게가 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였

고 脾臟과 兩側 腋窩 淋巴節의 무게는 有意한 差異가 없었다. 補中益氣湯의 投與는 抗原刺戟에 의해 活性化되는 末梢淋巴組織보다 抗原의 刺戟없이 지속적으로 lymphocyte를 成熟 分化시키는 中樞淋巴組織의 무게를 增加시키는데 有效하였으며, 이는 補中益氣湯이 MTX로 抑制되는 胸線의 lymphocyte를 活性化시켜 lymphocyte의 數的인 增加를 가져옴으로써 胸線의 무게가 增加한 것으로 여겨진다.

血中 lymphocyte 數는 補中益氣湯을 投與한 實驗群과 對照群間에 有意한 差異가 없었으며, 血中 CD4+ T細胞率은 實驗群에서 對照群에 比하여 有意性있는 增加가 認定되었다. 이는 補中益氣湯이 血液의 lymphocyte보다는 CD4+ T細胞를 活性化시키는데 有效한 것으로 생각되며, 大黃煎湯液으로 誘發된 脾胃氣 損傷이 細胞免疫能力의 指標인 末梢血液의 CD4+ T細胞數를 減少시킬 수 있다고 한 報告²⁰⁾와는 반대로 補中益氣湯으로 脾胃氣를 調補함으로써 血液의 CD4+ T細胞率이 增加한 것은 脾胃氣와 CD4+ T細胞가 서로 聯關되어 있음을 立證한 것이라 하겠다.

胸線에서의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率은 補中益氣湯을 投與한 實驗群에서 對照群에 比하여 有意性있는 增加가 認定되었다. 이는 補中益氣湯이 胸線의 lymphocyte와 CD4+ T細胞를 活性化시키는데 有效한 것으로 생각되며, 胸線의 무게를 增加시킨 것과 關聯하여 意味있는 結果라 하겠다. 또한 補中益氣湯과 香砂六君子湯 併用投

與가 胸線의 helper T細胞를 增加시켜 細胞性 免疫機能을 增強시키는데 有效하다는 報告²⁶⁾와 符合된다.

脾臟에서의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率은 補中益氣湯을 投與한 實驗群에서 對照群에 比하여 有意性있는 增加가 認定되었다. 이는 補中益氣湯이 脾臟의 lymphocyte와 CD4+ T細胞를 活性化시키는데 有效한 것으로 생각되며, 補中益氣湯이 S-180 腹腔癌細胞로 免疫低下된 脾臟의 淋巴球 增殖反應이 T細胞에 의한 lymphocyte의 活性으로 增加되었다는 報告²⁵⁾와 일치한다.

腋窩 淋巴節에서의 lymphocyte 數는 補中益氣湯을 投與한 實驗群과 對照群間에 有意한 差異가 없었으며, 腋窩 淋巴節에서의 CD4+ T細胞率은 實驗群에서 對照群에 比하여 有意性있는 增加가 認定되었다. 이는 補中益氣湯의 投與가 末梢淋巴器官인 腋窩 淋巴節에서는 lymphocyte보다 CD4+ T細胞를 活性化시키는데 有效한 것으로 생각되며, 또한 末梢의 狀況을 反映하는 血液에서의 結果와 일치함을 보여 준다.

以上の 實驗結果에서 補中益氣湯은 免疫低下로 誘發된 體重減少率을 抑制시키고 胸線의 무게를 增加시키며 胸線과 脾臟의 lymphocyte 數와 血液, 胸線, 脾臟, 腋窩 淋巴節의 CD4+ T細胞率을 有意性있게 增加시키는 것이 認定되었다. 따라서 補中益氣湯은 血液 및 中樞와 末梢淋巴組織의 細胞性 免疫機能을 全般的으로 增強시키는데 有效하였으며, 향후 다양한 免疫指標

를 통한 實驗的 比較研究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結論

補中益氣湯이 methotrexate(MTX)로 誘導된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 MTX와 補中益氣湯을 1日 2回 4日間 經口投與한 후 體重減少率과 胸線, 脾臟, 兩側 腋窩 淋巴節의 重量 및 이들 각 組織과 血液의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 體重減少率은 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 抑制되었다.
2. 胸線의 무게는 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였으며, 脾臟과 兩側 腋窩 淋巴節의 무게는 補中益氣湯 投與群과 對照群間에 有意한 差異가 없었다.
3. 血中 lymphocyte 數는 補中益氣湯 投與群과 對照群間에 有意한 差異가 없었으며, 血中 CD4+ T細胞率은 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였다.
4. 胸線에서의 lymphocyte 數와 CD4+ T細胞率은 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였다.
5. 脾臟에서의 lymphocyte 數와 CD4+

T細胞率は 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였다.

6. 腋窩 淋巴節에서의 lymphocyte 數는 補中益氣湯 投與群과 對照群間에 有意한 差異가 없었으며, 腋窩 淋巴節에서의 CD4+ T細胞率は 補中益氣湯 投與群이 對照群에 比하여 有意性있게 增加하였다.

參 考 文 獻

1. 金永勳 : 晴崗醫鑑, 서울, 成輔社, 1984, pp.174-176.
2. 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, 1988, p.50, 201, 381.
3. 文潛典, 安圭錫, 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울, 高文社, 1990, p.22, 118, pp.78-80.
4. 박정식, 윤영선 : 현대통계학, 서울, 茶山出版社, 1997, pp.413-441.
5. 裴秉哲 : 臨床方劑學, 서울, 成輔社, 1995, pp.216-218.
6. 서울대학교 의과대학 편 : 면역학, 서울, 서울대학교출판부, 1993, p.17-27.
7. 유지수 황애란 : 임상약리학, 서울, 현문사, 1994, pp.393-395.
8. 尹吉榮 : 東醫臨床方劑學, 서울, 明寶出版社, 1985, p.307.
9. 이부영 편 : 의학개론 I, 서울, 서울대학교출판부, 1995, p.25, 27, 31.
10. 이부영 편 : 의학개론 III, 서울, 서울대학교출판부, 1996, p.228.
12. 李淵台 譯 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, 1982, p.506, pp.21-35, 68-69.
13. 정태호, 김정철, 김문규 : 최신 면역학 강의, 대구, 경북대학교출판부, 1996, pp.2-9.
14. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, 1979, pp.262-266.
15. 홍사식 엮음 : 이우주의 약리학

- 강의(2판), 서울, 鮮一文化社, 1990, pp.616-617.
16. 黃道淵：方藥合編, 서울, 南山堂, 1989, pp.142-145.
 17. 金秀鎮：補中益氣湯 및 少陰人補中益氣湯이 S-180에 對한 抗腫瘍效果와 Cyclophosphamide에 依한 副作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 1993, 8(1):119-136.
 18. 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, 大韓韓醫學會 方劑分科學會誌, 1991, 2(1):107-129.
 19. 朴宰賢：補中益氣湯이 Cyclosporin A를 投與한 흰쥐의 肝 및 腎損傷에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 1994, 15(1):451-466.
 20. 박중배：大黃煎湯液 經口投與가 흰쥐의 위장관 기능 및 CD4 T세포에 미치는 영향, 慶熙韓醫大論文集, 1997, 19(2):1-12.
 21. 鄭昇杞：魚腥草藥鍼이 放射線被爆에 의한 免疫機能低下에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 1997, 18(2):97-107.
 22. 金榮權：六味地黃湯이 生理活性指標와 淋巴球細胞數에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院, 서울, 1998.
 23. 李永宇：四君子湯, 四物湯, 十全大補湯 및 補中益氣湯이 cisplatin 投與로 誘發된 體重減少와 血液變化에 미치는 影響, 圓光大學校大學院, 이리, 1991.
 24. 周泰青：쑥뜸刺戟이 寒冷스트레스로 誘發된 免疫 및 甲狀腺 기능저하에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院, 서울, 1998.
 25. 韓晟圭：補中益氣湯, 手拈散 및 補中益氣湯合手拈散의 抗癌과 免疫調節作用에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校大學院, 서울, 1995.
 26. 洪律憲：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, 東國大學校大學院, 서울, 1994.
 27. 龔廷賢：增補壽世保元, 서울, 裕昌德出版社, 庚子年, p.110.
 28. 楊維傑 編：黃帝內經靈樞譯解, 台北, 台聯國風出版社, 民國65年, p.295.
 29. 王肯堂：六科準繩, 서울, 翰成社, 1982, p.63.
 30. 王琦外 編著：黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, 1983, pp.93-100.
 31. 汪昂：醫方集解, 서울, 成輔社, 1983, pp.129-133.
 32. 李杲：東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, 1983, pp.86-88.
 33. 李用粹：證治彙補, 臺灣, 旋風出版社, 中華民國65年, p.18, 125.
 34. 李梴：校精醫學入門, 서울, 翰成社, 1984, pp.340-341.
 35. 林珮琴：類證治裁, 서울, 成輔社, 1980, pp.159-160.
 36. 張機：金匱要略, 北京, 人民衛生出版社, 1989, p.24.
 37. 陣偉, 路一平 主編：方劑學, 서

- 을, 醫聖堂, 1994, pp.196-200.
38. H. B. Waynforth & P. A. Flecknell : Experimental and surgical technique in the rat, San Diego, U.S.A. Academic Press, 1992, pp.330-331.
39. BO Hofmann et al : Buspirone, a serotonin receptor agonist, increases CD4 T-cell counts and modulates the immune system in HIV-seropositive subjects, AIDS, 1996, 10(12):1339-1347.
40. Brigitte Autran et al : Thymocyte and thymic microenvironment alterations during a systemic HIV infection in a severe combined immunodeficient mouse model, AIDS, 1996, 10(7):717-727.
41. Henry Masur et al : CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus(HIV) infection, Annals of Internal Medicine, 1989, 111(3):223-231.
42. Karina M. Butler et al : CD4 status and P24 antigenemia, AJDC, 1992, 146:932-936.
43. Kenji Katamura et al : Prostaglandin E₂ at priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5, The Journal of Immunology, 1995, pp.4604-4612.
44. Nerenberg S. T. et al : Sequential blood samples from the tail vein of rats and mice obtained with modified Liebig condenser jackets and vacuum, J. Lab Clin Med, 1975, 85(3):523-526.
45. Rolien DE Jong et al : Maturation- and differentiation-dependent responsiveness of human CD4⁺ T helper subsets, The Journal of Immunology, 1992, 149(8):2795-2802.
46. Sungsub Choi et al : CD4⁺ lymphocytes are an incomplete surrogate marker for clinical progression in persons with asymptomatic HIV infection taking Zidovudine, Annals of Internal Medicine, 1993, 118(9):674-680.
47. Vitaya Sridama et al : Decreased levels of helper T cells, N Engl J Med, 1982, pp.352-356.