

## 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響

김일영 \* · 이상재 \* · 김광호 \* \*

\* 경희대학교 대학원 한의학과

\* \* 경희대학교 한의과대학 예방의학교실 · 경희대학교 한의학연구소

### Effects of POLIGONI MULTIFORI RADIX on Imunosuppretion Induced by Methotrexate in Rat

Il Young Kim \* · Sang Jae Lee \* · Kwang Ho Kim \* \*

\*Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

\* \*Dept. of Preventive Medicine, College Of Oriental Medicine · Institue of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

#### Abstract

To examine the effects of Polygonum multiflorum on white rats with deteriorated immunity caused by methotrexate, first of all, methotrexate was fed to the rats once a day for 4 days. After the immune response of the rats are dereriated, dried extracts of Polygonum multiflorum mixed in water was fed to the white rats once a day for 14days. The next conclusion was made by examining the rates of B-cells and T-cells of the peripheral blood and the changes in rates of CD4+ T-cells and CD8+ T-cell of the blood sampled from the spleen and peripheral region.

Polygonum multiflorum has an effect of increasing immune responses on white rats with deteriorated immunity caused by MTX. Especially the count of CD4+ T-cells of the peripheral blood and the count of CD4+ T-cell of the spleen proved the significant effect of increasing immune responses statistically.

Verification of the effects of the Polygonum multiflorum should be made through comparitive studies using various immune response indexes. Also additional studies for a modern and practicible application of Polygonum multiflorum seems to be needed.

## I. 緒論

醫療技術의 發達과 生活水準의 向上과 더불어 人間의 壽命은 점점 延長되고<sup>1)</sup> 있다. 그와 더불어 각종 公害物質의 增加와 環境汚染의 深化가 全地球의인 문제로 擡頭되고 있다. AIDS 등 免疫機能低下와 관련된 疾病이 세계적의 문제로 登場하였으며, 感氣 毒感 및 각종 알러지 疾患 등이 여전히 맹위를 떨치고 있다.

近來에 發表되는 研究, 報告들은 疾病이 免疫機能과 有關한 것으로 強調되고 있으며<sup>2)</sup>, 免疫機能을 增強시킴으로써 免疫缺乏疾患, 癌 등으로 苦痛받는 患者들을 治療할 수 있으리라는 報告들이 있다<sup>3)</sup>. 또한 바이러스성 疾患 및 알러지성 疾患의 豫防과 治療 그리고 人口의 老齡化에 따른 各種 疾病의 增加와 關聯하여 免疫學的인 觀點이 照明을 받고 있다.

韓醫學에서는 疾病의 發生과 變化에는 正氣와 邪氣의 두 要因이 關係한다고 認識하고 있다<sup>4)</sup>. 한의학의 고전인 黃帝內經, 〈素問 刺法論〉<sup>43)</sup>의 “正氣存內, 邪不可干”, 〈素問 評熱病論〉<sup>43)</sup>의 “邪氣所湊, 其氣必虛”라는 理論에서 알 수 있듯이 正氣와 虛라는 概念을 疾病 發生에서 가장 重要한 要因으로 보고 있는 것이다. 여기서 正氣라 함은 人體의 正常的 機能活動과 疾病에 대한 抵抗能力을 말하며 虛라는 概念도 人間의 構成要素의 一部가 不足하여 抵抗能力이 低下된 狀態를 말하는 것으로 우리가 重要視하는 免疫概念과 密接한 關聯을 가지고 있다고 볼 수 있다

이러한 關係에 着眼하여, 各種 韓醫 治療 手段들의 免疫 增強 效果에 대한 研究가 활발히 이루어지고 있다. 藥材 및 藥鍼液으로서 當歸<sup>5)</sup>, 靈芝<sup>8)</sup>, 人蔘<sup>9), 10), 11), 24), 71)</sup>, 熟地黃<sup>10)</sup>, 녹용<sup>11), 10), 23)</sup>, 五加皮<sup>10)</sup>, 魚腥草<sup>12)</sup>, 黃芪<sup>21), 22), 23)</sup> 등이, 處方으로는 消積白朮散<sup>13)</sup>, 桑菊飲<sup>12)</sup>, 四君子湯<sup>14)</sup>, 四物湯<sup>14)</sup>, 鹿血生化湯<sup>19)</sup>, 歸龍湯<sup>20)</sup>, 十全大補湯<sup>68)</sup>, 補中益氣湯<sup>69), 70)</sup>, 香砂六君子湯

<sup>69)</sup>, 등이 免疫機能을 充進시키는 效能이 있다고 報告되었으며, 鍼灸<sup>15), 16), 17), 18)</sup>, 蜂毒藥鍼<sup>25)</sup>의 免疫增強 效果에 대한 研究도 이루어졌다.

何首烏는 마디풀과의 여러해살이풀 하수오 (Polygonum multiflorum THUNB)의 塊莖을 乾燥한 것으로 精血을 補充시키고 毛髮을 검게하는 效能을 가지고 있는 代表的인 韓藥材이다.<sup>26), 73)</sup>

이에 筆者는 何首烏의 免疫機能低下에 미치는 影響을 살펴보고자 methotrexate로 흰쥐의 免疫反應을 低下시키고 何首烏를 對照 投與하여 末梢血液의 B細胞率과 T細胞率을 測定하고 脾臟과 末梢 血液內 CD4+ T細胞率과 CD8+ T細胞率의 變化를 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 實驗材料

#### (1) 動物

동물은 體重 200±20g의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 使用하였으며, 飼料은 固形飼料(構成成分: 조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6% 인 0.6%)와 물을 充分히 供給하면서 實驗室 環境에서 2週 以上 적응시킨 후 使用하였다.

#### (2) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 市중에서 하수오 (Polygonum multiflorum THUNB.)를 구입하여 精選한 후 使用하였다.

#### (3) 試藥 및 機器

##### 1) 試藥

RPMI1640(GibcoBRL, NY, USA), Methotrxate (MTX; C20H11N8O5 Sigma, U.S.A), Concanavalin-A(Sigma, USA), Substrate

reagent A, B(Pharmingen, San Diego, CA, USA), FITC Anti-Rat CD4 + Monoclonal Antybody, PE Anti-Rat CD8 + Monoclonal Antybody (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada), Mouse IgG1-PE, Mouse IgG1-FITC, Monoclonal antibody rat CD4-PE, Monoclonal antibody rat CD8-PE (Immunotech), Anti-Rat CD3-FITC monoclonal antibody(Pharmingen), Monoclonal antibody to Rat B-cell(Caltag laboratories), Lymphoprep(Nycomed pharma, Norway).

## 2) 機器

Centrifuge(Hettich, ROTANTA/R), Microspine (Hanil science industrial co. Ltd), GC-shaker(Korea green cross corp.), Vortex Mixer (Torika Mixer MA-1, Japan Torika corp.), Microscope(Olympus), 0.22 $\mu$ m disposable sterile bottle top filter(Corning, USA), Flow cytometer (Becton dickinson, USA), Rotary vacumn evaporator(EYELA, Japan), Deep freezer (SANYO, Japan), Freezer dryer(EYELA, Japan)

## 2. 實驗方法

### (1) 검액의 준비

上記한 何首烏(Polygonum multiflorum THUNB.) 300g 분량을 5,000cc의 둥근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2 $\mu$ m filter로 여과한 여액을 rotary vacumn evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80 $^{\circ}$ C deep freezer (SANYO, Japan)에서 한시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 94g의 분말을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50 ml cornical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사

용하였다.

### (2) 實驗動物群 分離

正常群(Normal group), 對照群(Control group), 實驗群(HSO group)으로 구분하여, 한 군에 10마리씩 配定하였다. 정상군(Normal group)은 固形飼料과 물만을 充分히 供給하였고, 對照群(Control group)은 正常群과 同一한 環境에서 MTX를 투여하였고, 實驗群에 투여하는 검액과 같은 양의 생리식염수를 경구투여 하였다. 實驗群(HSO group)은 對照群과 同一한 方法으로 MTX를 투여하고 何首烏를 경구투여 하였다.

### (3) MTX를 이용한 免疫 低下

Methotrxate(MTX; C20H11N8O5 Sigma, U.S.A) 粉末을 2mg/kg으로 조정하여 생리식염수에 녹여 1ml씩 1日, 1回, 4日間 경구투여하여 免疫을 低下시켰다.

### (4) 검액 투여

MTX투여로 免疫低下를 유발한 다음 이틀째 되는 날부터 何首烏 건조엑기스를 마리 당 63 mg/200g씩 증류수로 희석하여 실험군의 흰쥐에 1일 1회 14일간 일정한 시각에 경구 투여하였다. 대조군은 동량의 식염수를 경구 투여하였다.

### (5) 採血

클로로포름으로 마취하고 心臟穿刺하여 혈액을 EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Dipotassium Salt)가 들어 있는 병에 넣어 잘 섞어서 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

### (6) 脾臟細胞의 준비

心腸採血 후 腹部를 70% 알콜로 완전히 도포한 후 무균적으로 脾臟을 적출한 다음, 脾臟 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하여 4 $^{\circ}$ C RPMI-1640 (GibcoBRL, NY, USA)배지로

2회 세척한 뒤, RPMI-1640이 들어있는 petri dish에서 작은 해부가위로 脾臟을 잘게 자르고 멸균된 유리막대로 조심스럽게 문질러 脾臟細胞를 부유시켰다. 이 부유액을 스테인레스 철망(mesh No. 100: 청계상공사, 한국)에 여과하여 조직편 및 유리되지 않은 細胞덩어리를 제거하고 RPMI-1640으로 1회, HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Cat. No. 21250-089, GibcoBRL, USA)로 2회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로 hypotonic shock을 일으켜 적혈구를 완전히 용혈시킨 뒤, 10×HBSS로 2회 세척하고 RPMI-1640배지로 한 번 더 세척한 다음 10% FBS가 첨가된 혼합배지에 脾臟細胞를 재 부유하였다.

#### (7) 末梢血液과 脾臟내의 B細胞率과 T細胞率 측정

Serum은 15일째에 心臟穿刺를 통해 얻었다. 심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 x 75 시험관에 100 $\mu$ l 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 $\mu$ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD45R/B220 Monoclonal Antibody (Caltag Laboratories)를 0.5  $\mu$ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer(Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

#### (8) 脾臟과 末梢 血液내 CD4+ T細胞率의 변화

심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12

x 75 시험관에 100 $\mu$ l 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 $\mu$ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD4 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 0.5  $\mu$ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer (Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

#### (9) 脾臟과 末梢 血液내 CD8+ T細胞率의 변화

심장채혈된 혈액을 EDTA tube에 담고, 12 x 75 시험관에 100 $\mu$ l 넣었다. FITC Anti-Rat CD3 Monoclonal Antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 0.1 $\mu$ l 가하고 다시 PE Anti-Rat CD8 Monoclonal Antibody (Immunotech)를 0.5  $\mu$ g 가하고 Vortex mixer로 잘 섞고 암소에 30분간 방치한 후 lysing solution(FACS lysing solution, Becton dickinson, USA) 2ml를 가하고 잘 섞어 다시 15분간 암소에 방치하였다. Lysis를 확인하고 원심분리기에서 1000rpm, 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 2ml의 washing solution(PBS)을 가한 후 다시 1000rpm, 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 500 $\mu$ l의 PBS를 가하여 Vortex mixer로 잘 섞은 후 Flow cytometer (Becton dickinson, USA)로 분석 하였다.

### 3. 統計分析

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 8.0)를 이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균±표준오차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons(Duncan's method)으로 분석하였다. 유의수준은 0.05로 하였다.

## Ⅲ. 實驗成績

### 1. 末梢血液内の B lymphocyte 比에 미치는 影響

末梢血液의 B lymphocyte 比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 38.47±1.26%, 對照群(Control group)은 33.68±1.62%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 34.55±1.28%으로, 집단 간 B lymphocyte의 比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=3.344, p=0.063, ANOVA test). 다만 對照群과 何首烏를 投與한 群(HSO group)에서 정상군에 比하여 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

Table 1. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of B lymphocyte of peripheral blood in rat

	B lymphocyte in peripheral blood (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	38.47±1.26 A	0.063 (F=3.344)
Control(n=6)	33.68±1.62 B	
HSO(n=6)	34.55±1.28 AB	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate.

HSO: treated with Polygonum multiflorum

THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons (Duncan's method) test

### 2. 末梢血液内の T lymphocyte 比에 미치는 影響

末梢血液의 T lymphocyte 比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 56.39±1.31%, 對照群(Control group)은 44.27±1.34%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 49.64±1.47%으로, 집단 간 T lymphocyte 比는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=19.482, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 對照群의 T lymphocyte 比는 正常群에 比하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 比하여 有意한 증가를 보였다(Table 2).

Table 2. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of Tlymphocytes of peripheral blood in rat

	T lymphocytes in peripheral blood (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	56.39±1.31 A	0.0001 (F=19.482)
Control(n=6)	44.27±1.34 C	
HSO(n=6)	49.64±1.47 B	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate HSO:

treated with Polygonum multiflorum THUNB.

(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B, C : Means with different Letter(A, B or C) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

### 3. 末梢血液내의 CD3+CD4+ T-cell에 미치는 影響

末梢血液의 CD3+CD4+ T-cell率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은  $38.80 \pm 0.96\%$ , 對照群(Control group)은  $27.96 \pm 1.68\%$ , 何首烏를 投與한 群(HSO group)은  $32.26 \pm 1.25\%$ 으로, 집단 간 CD3+CD4+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며( $F=16.909$   $p=0.0001$ , ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比는 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 有意한 증가를 보였다(Table 3, Figure1).

Table 3. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD4+ T-cell of peripheral blood in rat

	CD3+CD4+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	$38.80 \pm 0.96$ A	0.0001 (F=16.909)
Control(n=6)	$27.96 \pm 1.68$ C	
HSO(n=6)	$32.26 \pm 1.25$ B	

Value are expressed as mean  $\pm$  SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate.  
HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B C: Means with different Letter(A, B, or C) are statistically different by multiple comparisons (Duncan's method) test

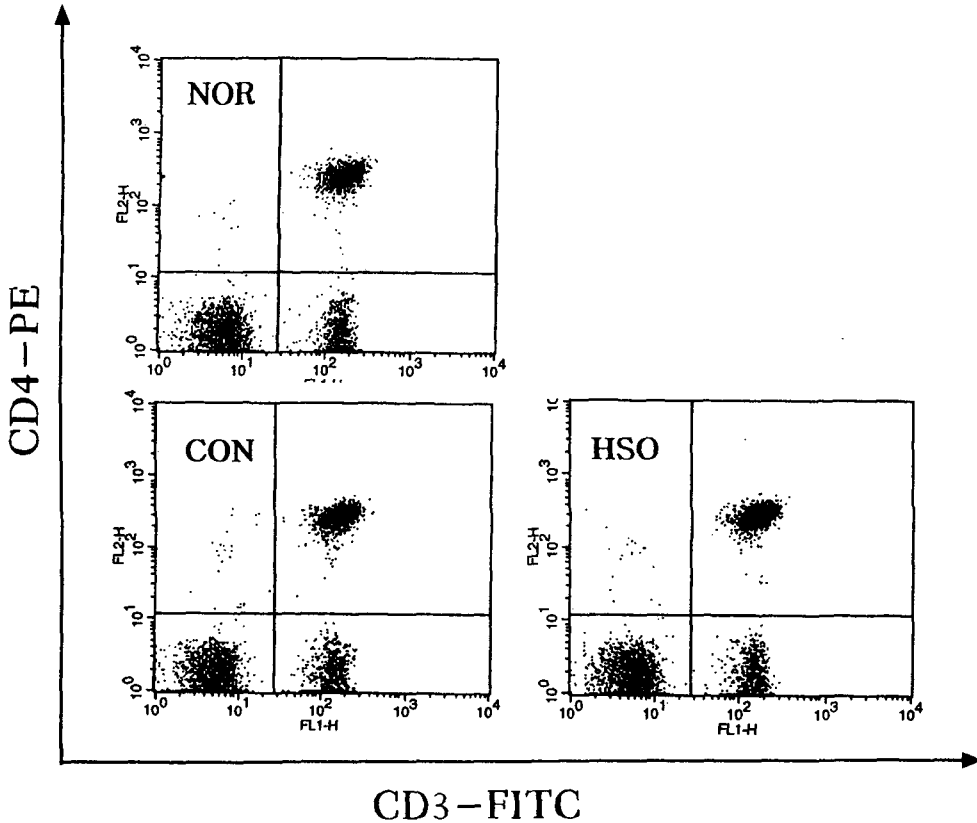


Figure 1. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD4+ T-cell of peripheral blood in rat

NOR: normal group. CON: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate. HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

analyzed by flow cytometer

CD3 is t-cell marker, CD4+ helper t-cell marker of rat. Dots scattered onto upper-right region is CD3+CD4+ t-cell

4. 末梢血液内の CD3+CD8+ T-cell에 미치는 影響

末梢血液의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 14.82 ± 0.83%, 對照群(Control group)은 17.94

± 1.12%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 16.93 ± 0.80%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다.(F=2.943, p=0.084, ANOVA test) (Table 4, Figure 2)

Table 4. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD8+ T-cell of peripheral blood in rat

	CD3+CD8+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	14.82±0.83	
Control(n=6)	17.95±1.12	0.084 (F=2.943)
HSO(n=6)	16.93±0.80	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate.

HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

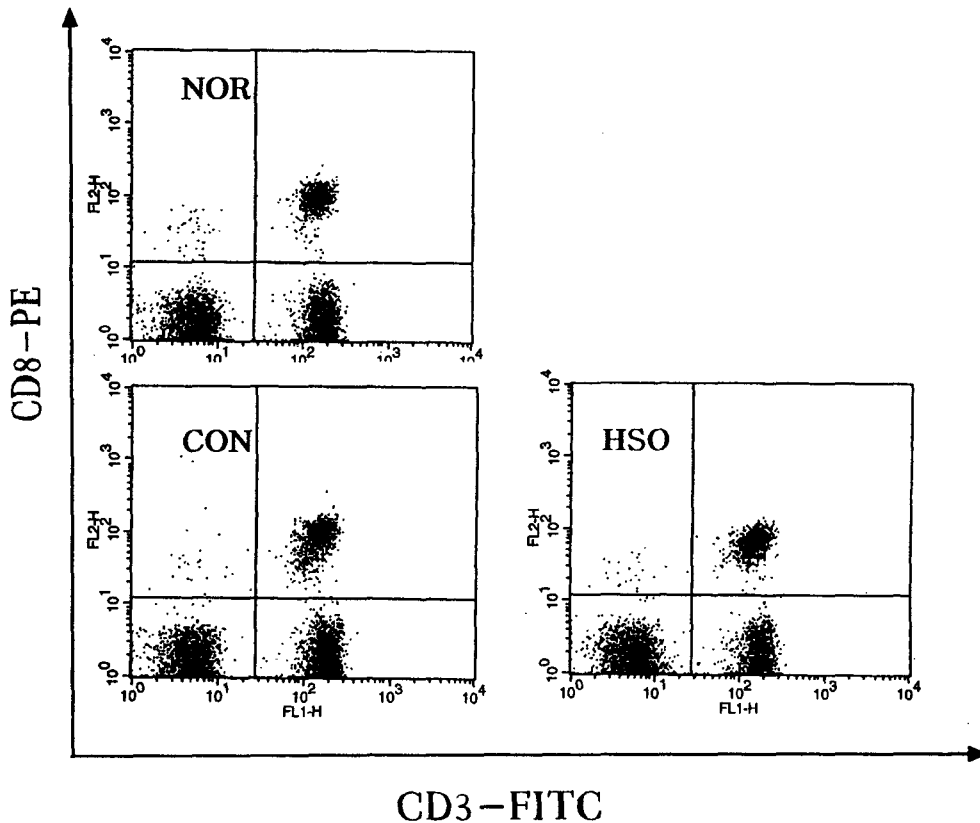




Figure 2. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD8+ T-cell of peripheral blood in rat

NOR: normal group. CON: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate. HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

analyzed by flow cytometer

CD3 is t-cell marker, CD8 is cytotoxic or suppressor t-cell marker of rat. Dots scattered onto upper-right region is CD3+CD8+ t-cell

5 末梢血液내의 CD4+/CD8+ 比率에 미치는 影響

末梢血液의 CD4+/CD8+ 比率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 2.65±0.14, 對照群(Control group)은 1.61±0.17, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 1.93±0.14으로, 집단 간 CD4+/CD8+ 比率은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=12.745, p=0.001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+ 比率은 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 有意하지는 않았다(Table 5).

Table 5. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the CD4+/CD8+ T-cell ratio of peripheral blood in rat

	CD4+/CD8+ T-cell ratio	p-value* (F-value)
normal(n=6)	2.65±0.14 A	0.001 (F=12.745)
Control(n=6)	1.61±0.17 B	
HSO(n=6)	1.93±0.14 B	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate. HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons(Duncan's method) test

6. 脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell에 미치는 影響

脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 37.43±2.18%, 對照群(Control group)은 29.12±0.98%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 33.34±1.30%으로, 집단 간 CD3+CD4+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=7.189, p=0.006, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比는 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 有意한 증가를 보였다(Table 6).

Table 6. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD4+ T-cell of spleen in rat

	CD3+CD4+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	37.43±2.18 A	0.006 (F=7.189)
Control(n=6)	29.12±0.98 B	
HSO(n=6)	34.34±1.30 A	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B: Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons (Duncan's method) test

### 7. 脾臟내의 CD3+CD8+ T-cell에 미치는 影響

脾臟의 CD3+CD8+ T-cell比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 20.28±2.05%, 對照群(Control group)은 21.83±1.55%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 19.88±1.26%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=0.389, p=0.684 ANOVA test)(Table 7).

Table 7. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the percentage of CD3+CD8+ T-cell of spleen in rat

	CD3+CD8+ T-cell (%)	p-value* (F-value)
normal(n=6)	20.28±2.05	0.684 (F=0.389)
Control(n=6)	21.83±1.55	
HSO(n=6)	19.88±1.26	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate. HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

### 8. 脾臟내의 CD4+/CD8+ 比率에 미치는 影響

脾臟내의 CD4+/CD8+ 比率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 1.94±0.22, 對照群(Control group)은 1.36±0.08, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 1.78±0.14으로, 집단 간 CD4+/CD8+ 比率은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=3.699, p=0.049, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+ 比率은 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로는 有意하지 않았다(Table 8).

Table 8. Effect of Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) on the CD4+/CD8+ T-cell ratio of spleen in rat

	CD4+/CD8+ T-cell ratio	p-value* (F-value)
normal(n=6)	1.94±0.22	0.049 (F=3.699)
Control(n=6)	1.35±0.08	
HSO(n=6)	1.78±0.14	

Value are expressed as mean±SEM.

Control: treated with normal saline for 14 days after administration of methotrexate HSO: treated with Polygonum multiflorum THUNB.(何首烏) for 14 days after administration of methotrexate

\* calculated by ANOVA test

A, B : Means with different Letter(A, B) are statistically different by multiple comparisons (Duncan's method) test

#### IV. 考 察

免疫은 생물이 만드는 갖가지 유기물질의 하나하나를 미세한 構造의 差異로서 識別할 수 있는 고도로 分化된 細胞集團인 淋巴球를 축으로 하여, 이 淋巴球에 통제되어 동원되는 탐색細胞와 다른 보다 廣範圍의 細胞가 나타내는 生體防禦에 향해진 작동이라고 정의될 수 있다 (32), (33)

免疫에는 體液性 免疫과 細胞 媒介性 免疫이 있다. 體液性 免疫은 抗體의 生成과 이를 血液과 體液內에 分泌하는 反應이며, 細胞 媒介性 免疫은 감작된 淋巴球를 生産하여 이들 細胞 표면에 있는 수용체와 抗原이 상호작용을 하게 하는 반응이다. 細胞媒介性 免疫에서는 감작된 淋巴球가 臟器移植時 拒否反應을 나타내게 하거나 virus, 진균 및 세균에 대하여 저항을 하

게 한다. 이러한 면역반응에 관여하는 주요細胞는 淋巴球인데 이 淋巴球는 다시 B-cell과 T-cell로 나눌 수 있다. B-cell은 抗體를 만드는 형질細胞의 前驅細胞이며 T-cell은 細胞媒介性 免疫 反應에서 中개자 역할을 한다. 대식구라는 細胞 또한 免疫反應을 유도하거나 細胞媒介性 免疫 反應의 發現에 관여하고 있다 (4), (34), (35), (36), (37)

T 淋巴球는 骨髓에서 생겨 胸腺으로 이동한 후 成熟한다. 胸腺細胞는 세 段階의 중요한 發達過程을 거치게 되는데, 아주 初期의 胸腺細胞는 CD4도 CD8도 發顯하지 않아 이들을 CD4-CD8- 또는 더블 네가티브 (Double Negative)로 부른다. 다음 段階에서 이들은 CD4+CD8+ 혹은 더블 포지티브 (Double positive)되며 마지막 段階에서 胸腺細胞는 CD4+CD8- 혹은 CD4-CD8+인 싱글 포지티브 (Single Positive)의 細胞로 發達해간다.

T 淋巴球는 機能的으로 細分되는데, 그 중 補助 T 淋巴球와 細胞溶解性(或은 細胞障害性) T 淋巴球 외에 免疫反應을 抑制하는 것으로 알려진 抑制 T 淋巴球가 있다. 이 T 淋巴球의 亞集團을 分析하거나 確認하는데 있어 가장 重要한 進歩는 機能的으로 分化된 細胞에 의해 각기 다른 細胞膜 蛋白質이 發現된다는 것을 밝혀낸 것이다. 이 蛋白質들이 각기 다른 淋巴球 集團을 區分짓게 해주는 表現形 標指 (phenotypic marker)로서 이용되는데, 대부분의 補助 T 淋巴球는 CD4라는 表面蛋白質을, 또 대부분의 細胞溶解性 T 淋巴球는 다른 標指인 CD8이라는 表面蛋白質을 發現한다. 그러므로 그러한 標指에 대한 抗體를 이용하여 多樣한 淋巴球 집단을 分離하여 確認할 수 있게 되었다. CD란 分化群 (cluster of differentiation)이란 말의 英文略字로 淋巴球의 分化段階나 細胞의 由來를 알아보기 위해 이용했던 單一 클론 抗體 (monoclonal antibody)의 群 (cluster)에 의해 認識된 分子를 意味하며 이로써 淋巴球들간의 區別이 可能해졌다.

CD4와 CD8은 T 淋巴球 表面 糖蛋白質로 特徵的인 樣相으로 MHC에 制限的인 成熟 T 淋巴球의 表面에서 相互排他的으로 發見되는 MHC 分子의 非多形性 部位와 結合한다. CD4는 Class II MHC 分子와 직접 結合하여 T 淋巴球에서 발현하는데 그 TCR은 펩타이드와 Class II MHC 分子의 複合體를 認識하게 된다. 대부분의 CD4+ Class II MHC 제한 T 淋巴球는 사이토카인(cytokine)을 生産하는 補助細胞의 機能的 表現形을 가지고 있다. CD4는 附着 및 信號傳達의 聯合機能을 修行함으로써 抗原에 대한 T 淋巴球의 敏感性이 크게 向上된다. 이들은 TCR과 密接하게 聯關되어 있고 抗原認識時에 標的細胞 혹은 APC위의 MHC 分子와 結合하기 때문에 公助收容體라고 부른다. 末梢 αβ-陽性 T 淋巴球의 약 65%가 CD4를 發顯한다. CD4의 機能的 役割은 이 分子들에 대한 特異적 抗體가 生體內 및 生體外에서 T 淋巴球의 MHC 制限 抗原刺戟을 抑制하는 能力을 통한다. 특히 CD4에 대한 抗體는 Class II MHC 制限 補助 T 淋巴球의 活性을 抑制한다. CD4는 T 淋巴球 活性化에 있어 아래와 같은 두가지의 重要한 機能을 한다. 첫째, CD4는 MHC 제한 T 淋巴球가 MHC 分子에 대한 特異的 親和度에 의해 APCs 혹은 標的細胞와의 附着을 增加시킨다. 둘째, CD4는 T 淋巴球가 APC상의 펩타이드-MHC를 認識할 때에 發生하는 初期 信號傳達反應에 參與한다. 이처럼 CD4 補助 收容體의 附着 및 信號傳達機能의 聯合은 成熟 T 淋巴球의 抗原刺戟 效率를 크게 向上시킨다. 이러한 役割을 하는 淋巴球 表面의 標指 蛋白質에 대한 抗體를 使用하여 免疫力을 定量한다. 末梢 CD4+ T-cell 比率는 後天性免疫缺乏性疾患의 進展을 評價하는데 가장 普遍的으로 使用하는 檢査方法이며 一般的인 免疫力의 指標로도 廣範圍하게 應用되고 있다.<sup>54), 55), 56), 57), 58), 59), 60), 61), 62), 63), 64), 65), 66), 67)</sup>

생체의 免疫反應은 免疫억제제인 MTX를 投與하면 低下되는데 이는 MTX가 folic acid와 構造上 類似하여 folic acid의 拮抗物質로 作用하므로 folic acid에서 folinic acid로의 轉換에 關여하는 folic acid reductase를 阻害하여 folic acid로 환원되는 것을 抑制함으로써 DNA 合成을 妨害하기 때문이며, 生體에 있어서 folic acid 缺乏을 招來하며 細胞독작용으로 골수를 억제하여 白血球 감소현상이 나타나며, 신장독성이 강하다.<sup>38), 39)</sup>

MTX는 동물에 投與時 食慾不振, 出血性 泄瀉, 漸進的 體重減少, 白血球 減少, 昏睡狀態에 이르게 하여 死亡케한다. 또한 生體 投與時 骨髓抑壓과 腸管上皮 脫落에 의한 潰瘍을 주로 일으키게 된다. 投與 6시간 以內에 腸管 表皮 粘膜炎 浮腫 및 공포화현상을 일으키며, 표피 細胞 박리, 장관내로의 血漿 流出 등이 초래되어 심한 出血性 剝離腸炎을 일으킨다. 骨髓의 退行性 變成에도 關여하여 투여 24시간 以內에 赤血球 成熟障碍, 白血球 生成低下, 骨髓 障碍, 림프조직내 림프細胞 감소, 造血障碍로 末梢血液의 현저한 과립구 감소를 일으킨다. 이러한 MTX는 抗癌治療劑 또는 免疫抑制劑로 사용되며, 주로 T-cell(주로 helper T-cell)의 增殖을 차단한다. 주로 음모막암에 탁월한 효과를 보이나 골수 억압, 장관상피 탈락에 의한 潰瘍, 胃潰瘍, 泄瀉, 脫毛症, 皮膚炎, 腎臟障碍 등의 副作用을 일으킨다.<sup>40), 41)</sup>

正氣는 疾病에 대한 人體의 抵抗力을 말하며 邪氣는 疾病을 일으키는 모든 發病原因을 가리킨다. 精·神·津液·氣血 등은 모두 人間이 生長하고 發育하며 健壯하게 하는 物質 및 原動力으로 모두 正氣의 範疇에 속한다.<sup>42)</sup> 〈素問·刺法論〉<sup>43)</sup>의 “正氣存內 邪不可干 避其毒氣”, 〈素問·評熱病論〉<sup>43)</sup>의 “邪之所湊 其氣必虛”, 〈靈樞·口問〉<sup>44)</sup>의 “邪之所在 皆爲不足” 〈靈樞·百病始生篇〉<sup>44)</sup>의 “風雨寒熱不得虛, 邪不能獨傷人” 등은 모두 正氣와 邪氣의 關係로 疾病을 說明하고 있다. 따라서 外部에서 들어오는 病因

에 대한 正氣의 作用으로 抵抗力이 形成되는데 이는 免疫防禦機能과 相似하여 正氣와 病邪間의 相爭은 免疫현상으로 볼 수 있다.<sup>45)</sup>

이러한 關聯性에 根據하여 最近 免疫學的인 側面에서 鍼灸, 韓藥 및 藥鍼液의 免疫 增強 效果 등에 對한 研究가 이루어지고 있다. 崔<sup>15)</sup>, 周<sup>16)</sup>, 宋<sup>17)</sup> 등은 鍼灸療法 및 溫鍼, 레이저침이 免疫機能에 미치는 影響에 對하여 研究하였고, 吉<sup>12)</sup>, 羅<sup>71)</sup>, 金<sup>20)</sup>, 李<sup>19)</sup>, 黃<sup>68)</sup>, 洪<sup>69)</sup> 등은 人蔘, 白朮과 枸杞子, 歸茸湯, 鹿血生化湯, 十全大補湯, 補中益氣湯의 免疫 效果에 對하여 研究하였고, 高<sup>24)</sup>, 李<sup>23)</sup> 등은 人蔘, 鹿茸, 當歸 藥鍼이 免疫反應에 미치는 影響을 研究하였다. 특히 裴<sup>21)</sup>, 朴<sup>22)</sup> 등은 黃芪 藥鍼이 MTX로 誘發된 免疫低下를 改善시키는 效果에 대해 研究하였고, 崔<sup>14)</sup> 등은 四君子湯과 四物湯이 MTX로 誘導된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響을 報告하였고, 李<sup>25)</sup> 등은 蜂毒 藥鍼刺戟이 MTX로 誘發된 生쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響을 研究하였다.

何首烏는 예로부터 精血을 補하는 데 자주 사용되었다. 東醫寶鑑을 살펴보면 何首烏는 足, 脈, 毛髮, 身形, 肉, 精, 虛勞, 筋, 餌松柏葉法 등의 門에서 單方으로 言及되고 있는데, 각 門에 나오는 何首烏의 效能으로는 足門<sup>46)</sup>에서는 骨軟風, 腰膝痛에 쓰며, 脈門<sup>47)</sup>에서는 氣가 雄壯하여 十二經脈을 通하며, 毛髮門<sup>48)</sup>에서는 鬚髮을 검게 하고, 身形門<sup>49)</sup>에서는 白髮을 검게 하고, 精髓를 補益하며 延年不老시킨다고 하며, 肉門<sup>50)</sup>에서는 積年の 勞瘦를 다스리고 살찌게 하며, 精門<sup>51)</sup>에서는 精髓를 補益하고, 虛勞門<sup>52)</sup>에서는 虛勞, 五勞와 七傷을 다스리고 血氣를 더하여 陰을 補하고 陽을 壯하게 하며, 筋門<sup>53)</sup>에서는 筋力을 기르는 것으로 나와있다. 何首烏의 毛髮을 검게하고, 延年不老시키고, 精髓를 補益하고, 血氣를 더하는 效能은 바로 人間의 免疫力 增強에의 活用的 可能性을 示唆하는 것이다. 何首烏에는 anthraquinone誘導體가 含有되어 있는데, 主成分은 chrysophanic

acid, chrysophanol, emodin, rhein, anthronene, 전분이다. 그 藥理作用으로는 血清 콜레스테롤치를 내리고 죽상동맥경화를 감소시키거나 방지하고, 생쥐에게 추위를 견디는 능력을 높여주며, 늙은 생쥐의 흉선 위축을 막아 주므로 면역 기능에 관여한다고 알려져 있다.<sup>73)</sup>

따라서 本 實驗에서는 何首烏가 免疫機能에 미치는 影響을 알아보고자 MTX를 注射하여 흰쥐의 免疫反應을 低下시킨 후 何首烏를 對照 投與하여 면역 기능의 指標가 되는 末梢血液의 B細胞率과 T細胞率을 측정하고 脾臟과 말초 혈액내 CD4+ T細胞率과 CD8+ T細胞率의 變化를 관찰하였다.

末梢血液의 B lymphocyte比를 살펴본 결과 正常群(Normal group), 對照群(Control group), 何首烏를 投與한 群(HSO group)의 각 집단 간 B lymphocyte의 比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다( $F=3.344$ ,  $p=0.063$ , ANOVA test). 다만 對照群과 何首烏를 投與한 群(HSO group)에서 정상군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

末梢血液의 T lymphocyte比에 있어서는 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 對照群의 T lymphocyte比는 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

末梢血液의 CD3+CD4+ T-cell率을 살펴본 결과 통계적으로 有意한 차이가 있었으며, 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比는 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

末梢血液의 CD3+CD8+ T-cell率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은  $14.82 \pm 0.83\%$ , 對照群(Control group)은  $17.94 \pm 1.12\%$ , 何首烏를 投與한 群(HSO group)은

16.93±0.80%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다.(F=2.943, p=0.084, ANOVA test)

末梢血液의 CD4+/CD8+比率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 2.65±0.14, 對照群(Control group)은 1.61±0.17, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 1.93±0.14으로, 집단 간 CD4+/CD8+ 比率은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=12.745, p=0.001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+比率은 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 有意하지는 않았다.

脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 37.43±2.18%, 對照群(Control group)은 29.12±0.98%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 33.34±1.30%으로, 집단 간 CD3+CD4+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=7.189, p=0.006, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比는 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 有意한 증가를 보였다.

脾臟의 CD3+CD8+ T-cell比를 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 20.28±2.05%, 對照群(Control group)은 21.83±1.55%, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 19.88±1.26%으로, 집단 간 CD3+CD8+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=0.389, p=0.684 ANOVA test)

脾臟내의 CD4+/CD8+比率을 살펴본 결과 正常群(Normal group)은 1.94±0.22, 對照群(Control group)은 1.36±0.08, 何首烏를 投與한 群(HSO group)은 1.78±0.14으로,

집단 간 CD4+/CD8+ 比率은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=3.699, p=0.049, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 對照群의 CD4+/CD8+比率은 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, HSO group은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로는 有意하지 않았다.

이상의 實驗結果로 보아 何首烏는 MTX로 低下된 免疫力의 免疫機能을 增加시키는 것으로 나타났다는데, 특히 T lymphocyte比와 末梢血液의 CD3+CD4+ T-cell率, 脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell比에 있어서 통계적으로 有意한 免疫 增強 效果가 있는 것으로 드러났다. 이후, 다양한 免疫反應指標를 활용한 比較研究를 거쳐서 何首烏의 效能을 檢證해야 하며, 何首烏의 현대적 應用을 위한 研究도 追加로 進行되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

何首烏가 methotrexate로 誘發된 免疫力의 免疫機能低下에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 흰쥐에게 methotrexate를 1日, 1회로 4日 間 經口 投與하여 免疫低下를 誘發한 다음 이틀째 되는 날부터 何首烏 乾燥엑기스를 蒸溜水로 稀釋하여 실험군의 흰쥐에 1일 1회로 14일간 經口 投與하여 末梢血液의 B細胞率과 T細胞率을 測定하고 脾臟과 말초 혈액내 CD4+ T細胞率과 CD8+ T細胞率의 變化를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 末梢血液의 B lymphocyte比는 正常群, 對照群, 實驗群의 각 집단 간 有意한 차이가 없었다.

2. 末梢血液의 T lymphocyte比에 있어서는 對照群이 正常群에 비하여 有意한 감소를 보였고, 실험군은 對照群에 비하여 有意한 증가를

보였다.

3. 末梢血液의 CD3+CD4+ T-cell率에 있어서는 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比가 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 실험군은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

4. 末梢血液의 CD3+CD8+ T-cell率은 각 집단간 유의한 차이가 없었다.

5. 末梢血液의 CD4+/CD8+比率에 있어서는 對照群의 CD4+/CD8+比率은 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 실험군은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

6. 脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell比에 있어서는 對照群의 CD3+CD4+ T-cell比가 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 실험군은 對照群에 비하여 유의한 증가를 보였다.

7. 脾臟의 CD3+CD8+ T-cell比는 통계적으로 有意한 차이가 없었다.

8. 脾臟내의 CD4+/CD8+比率에 있어서는 對照群의 CD4+/CD8+比率이 正常群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 실험군은 對照群에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

이상의 實驗結果로 보아 何首烏는 MTX로 低下된 흰쥐의 免疫機能을 增加시키는 것으로 나타났다. 특히 T lymphocyte比와 末梢血液의 CD3+CD4+ T-cell率, 脾臟내의 CD3+CD4+ T-cell比에 있어서 통계적으로 有意한 免疫增強 效果가 있는 것으로 드러났다. 이 후, 다양한 免疫反應指標를 活用한 比較 研究를 거쳐서 何首烏의 效能을 檢證해야 하며, 何首烏의 현대적 應用을 위한 研究도 追加로 進行되어야 할 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 金光湖, 金聖洙 : 東醫豫防醫學, 서울, 慶熙大學 校 韓醫科大學 豫防醫學教室, pp. 256-259,

1990.

2. 박재갑 : 인간생명과학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 209-225, 1993

3. 문은이 등 : 당귀추출물이 면역계에 미치는 影響 II. 대한면역학회지 13(1):pp. 71-77, 1991

4. 安德均 역 : 면역과 한방, 서울, 열린책들, pp. 19-21, 1994

5. 문혜선 외 6인 : 당귀추출물이 면역계에 미치는 영향, 대한면역학회지 12(1)113-118, 1990

6. 楊甲三 : 침구학, 북경, 인민위생출판사, pp. 438-559 561, 1989

7. 왕기 등 : 황재내경소문금석, 서울, 정보사, pp. 8 20 169 412, 1983

8. 임사비나, 이해정 : 영지수침이 한냉자극으로 저하된 생쥐의 면역기능에 미치는 영향, 경희의학, 5(1):97-105, 1989

9. 김대수 : 삼종의 제법에 따른 인삼수침이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향, 대한한의학회지 13(1):97-105, 97-105

10. 고병희 : 녹용, 숙지황, 인삼, 오가피가 면역반응 및 NK 細胞 활성화도에 미치는 영향, 경희한의대 논문집, 9:193-215, 1986

11. 황경애 : 인삼 및 녹용수침이 시간경과에 따른 면역효과연구, 경희의학, 4(2)150-157, 1988

12. 길영성, 정승기, 이형구 : 여성초 및 상국음이 면역기능에 미치는 영향, 대한한의학회지, 16(1):295-318, 1995

13. 조성기, 조종관 : 소적백출산의 함압, 면역증강 효과 및 cisplatin의 신장독성억제에 미치는 영향에 관한 연구, 대한한의학회지, 14(2)281-309, 1993

14. 최윤정 : 四君子湯 및 四物湯이 methotrexate로 誘發된 흰쥐의 免疫기능저하에 미치는 影響, 동국대학교대학원 박사학위논문, 1996

15. **崔啟燮** : 침구요법이 면역기능에 미치는 영향에 관한 고찰, 대한침구학회지, 10(1):61-74, 1993
16. **주대청** : 온침이 한냉에 노출된 생쥐의 면역기능 저하에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 15:297-311, 1992
17. **송윤희** : 온침, Laser침 및 호침이 한냉자극으로 저하된 생쥐의 면역기능에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 15:69-90, 1992
18. **송윤희** : 온침이 methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응저하에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 12:301-313, 1989
19. **李晟來 外3人** : 鹿血生化湯이 마우스의 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 14:85~130, 1991
20. **김덕호, 김병운** : 歸茸湯이 免疫反應에 미치는 影響, 대한한의학회지, 6(2):55-63, 1985
21. **裴元永, 高炯均, 金昌煥** : 黃耆藥鍼이 methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):49~66, 1994
22. **朴鎮雄 外2人** : 濃度差에 따른 黃耆藥鍼이 methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 大韓鍼灸學會誌, 11(1):67~81, 1994
23. **이재동** : 녹용, 황기, 당귀 수침이 방사선 피폭에 의한 면역기능저하에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 17(2):119-140, 1993
24. **高敬錫 外2人** : 人蔘水鍼이 methotrexate를 投與한 생쥐의 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 11:37~54, 1988
25. **이홍석 외5인** : 봉독 약침자극이 methotrexate로 유발된 생쥐의 면역기능저하에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 347-359
26. **전국한의과대학 본초학교수 공편저** : 본초학, 서울, 영림사, pp583-584, 1991
27. **安德均 역** : 면역과 한방, 서울, 열린책들, pp 23-27, 67-63, 1994
28. **유정재 우관문 편저** : 중의면역, 사천성, 중경출판사, pp8-10, 54-60, 1983
29. **장재형 주편** : 중서의결합연구총서:아과질병연구, 상해, 상해과학기술출판사, pp29-37, 1988
30. **진기 주편** : 중약약리연구방법학, 북경, 인민위생출판사, pp703-704, 1003, 1008, 1993
31. **한선달** : 시론중의치치면역조절, 절강중의학원학보, 15(5):8-9, 1991
32. **김우호** : 免疫, 강원대학교 출판부, 춘천, p 1-4, 1993
33. **타다 토미오** : 免疫의 意味論, 한울, 서울, pp.117~121, 1998
34. **이부영** : 의학개론 2, 서울, 서울대출판부, pp31, 1994
35. **이연태 역, 국지호길 외 저** : 최신면역학, 서울, 집문당, pp 33, 198, 215-216, 478-481, 508, 1982
36. **이종훈** : 병원미생물학, 서울, 수문사, pp 171-186, 1992
37. **정태호** : 면역학강의, 대구, 경북대학교출판부, pp 2-3, 219-221, 1991
38. **한국약학대학협의회 약전분석회** : 大韓藥典 제4개정 제1·2부 해설, 서울, 문성사, p.181-183, 1982
39. **서울대학교 의과대학 편** : 임상약리학, 서울, 서울대출판부, pp468, 1995
40. **홍사석** : 이우주의 藥理學 講義, 서울, 의학문화사, p.646-648, 622, 1993
41. **대한임상약학회** : 臨床藥學叢書 I 臨床藥學概論, 서울, 회성출판사, p.180, 770, 1991
42. **文淸典** : 東醫病理學, 서울, 一中社, pp.188~191, 1999년
43. **洪元植 編著** : 精校黃帝內經素問, 東洋醫學研究院出版部, 서울, 1985
44. **洪元植 編著** : 精校黃帝內經靈樞, 東洋醫學研究院出版部, 서울, 1985



45. 文濬典 등 : 東醫病理學, 서울, 高文社, p22, 1993
46. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p414, 1969
47. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p393, 1969
48. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p421, 1969
49. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p14, 1969
50. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p386, 1969
51. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p24, 1969
52. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p684, 1969
53. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p396, 1969
54. Aries S.P. (et al) : Fas (CD95) expression on CD4+ T-cells from HIV-infected patients increases with disease progression. *J Mol Med* 73(12):591~3, 1995
55. Chiappelli F. (et al) : Pituitary-Adrenal Immune system in normal subjects and in patients with anorexia nervosa : The number of circulating helper T lymphocytes (CD4+) expressing the homing receptor Leu8 is regulated in part by pituitary-adrenal products. *Psychoendocrinology* 16(5):423~432, 1991
56. de Jong R. (et al) : Maturation and differentiation-dependent responsiveness of human CD4+ T-helper subsets. *J Immunol*. 149(8):2795~2802, 1992
57. Everaus H. : Hormons and immune responsiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 8(6):483~489, 1992
58. Ferguson A. et al : Spectrum of expression of intestinal cellular immunity: proposal for a change in diagnostic criteria of celiac disease. *Ann Allergy*. 71(1) p.29~32. 1993
59. Hofmann B. (et al) : Buspirone, a serotonin receptor agonist, increases CD4+ T-cell counts and modulates the immune system in HIV-seropositive subjects. *AIDS*. 1996, Oct. 10(12) pp.1339~1347
60. Jaros A. (et al) : Nutritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. *European J of Clinical Nutrition*, 47(11):787~793, 1993
61. Karina M. Butler (et al) : CD4+ Status and P24 Antigenemia. *AJDC*. 146:932~936, 1992
62. Klein S.L. et al : Social environment and steroid hormones affect species and sex differences in immune function among voles. *Horm Behav*, 32(1):30~39, 1997
63. Lacour M. (et al) : cAMP up-regulates IL-4 and IL-5 production from activated CD4+ T-cells while decreasing IL-2 release and NF-AT induction. *Int Immunol* 6(9):1333~1343, 1994
64. Maarten Koot (et al) : Prognostic Value of Hiv-1 Syncytium-inducing Phenotype for Rate of CD4+ T-cell Depletion and Progression to AIDS. *Arch Int Med*. 118: 681~688, 1993
65. McDyer J.F. (et al) : Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T-cell counts have impaired Th1 responses. *J Immunol* 158(1):492~500, 1997
66. Robert E. Anderson (et al) : Use of  $\beta$  2-microglobulin level and CD4+ lymphocyte count to predict development of AIDS in persons with HIV Infection. *Arch Intern Med*. 150:73~77, 1990

67. Stein D.S. Korvick J.A. Vermund SH / CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review / J Infect Dis. 1992;165:352~363
68. 黃奎東 外3人 :十全大補湯 瓦松 및 十全大補湯 加瓦松의 抗癌效果와 免疫反應에 관한 研究, 大韓韓方腫瘍學會誌, 2(1):1~24, 1996
69. 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
70. 韓晟圭 外2人 : 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 관한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, 서울, 1995
71. 하대유 : 인삼에 대한 細胞學 및 면역학적 연구 (제III보), 대한면역학회지, 1(1):45-52, 1979.
72. 安德均 : 원색한국본초도감, 서울, 교학사, pp675, 1998