

# 귀비탕이 C57BL/6 Mouse에 Stress 부하 후 특이적 면역반응에 미치는 영향

이택렬 · 한미숙 · 오찬호<sup>1</sup> · 은재순\*

우석대학교 약학대학, 1:이공대학

## Effects of Kwibitang on the Specific Immune Response after Immobilization Stress in C57BL/6 Mice

Taek Yul Lee, Mi Sook Han, Chan Ho Oh<sup>1</sup>, Jae Soon Eun\*

College of Pharmacy, 1: College of Science and Technology, 2: College of Oriental Medicine, Woosuk University

Stress is known to influence the immune function via an effect on the central nervous system. To investigate the effects of Kwibitang water extract (KBT) on the specific immune response in C57BL/6 mice stressed by immobilization, we evaluated the changes in the cell viability, DNA fragmentation and subpopulation of thymocytes and splenocytes. KBT enhanced the cell viability of thymocytes and splenocytes decreased by immobilization stress. Also, KBT decreased DNA fragmentation of thymocytes and splenocytes increased by immobilization stress. KBT decreased the population of CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells in thymocytes and Thy1<sup>+</sup> cells in splenocytes increased by immobilization stress, but increased the population of B220<sup>+</sup> cells decreased by immobilization stress. In addition, KBT enhanced the production of  $\gamma$ -interferon and IL-2 decreased by immobilization stress. These results indicate that KBT may be useful for the prevention and treatment of stress via enhancement of the specific immune response

Key words : Kwibitang(歸脾湯), immobilization stress, thymocytes, splenocytes

### 서론

생체에는 항상성 (homeostasis) 유지 기구가 있으며, 이러한 생체의 방어반응이 일어나는 것을 general adaptation syndrome 이라 하며, 경고반응기, 저항기 및 피로기의 3단계로 구분된다. 경고반응기는 생체가 stress에 대해 적극적으로 저항을 나타내는 시기로, 외부에서 stress가 가해지면 체액의 화학변화와 신경계의 자극에 의해 뇌의 시상하부가 자극되어 교감신경이 흥분하고 부신피질호르몬이 분비되어, 뇌하수체로부터 ACTH의 분비를 촉진하며, ACTH는 부신피질에서 glucocorticoid를 분비시켜, 당신생, 항염증작용 등의 대사변화를 일으켜 생체가 stress에 대한 저항성을 나타내게 한다. 경고반응기를 지나고도 계속 stress에 노출되면 저항기로 이행되며, stress에 대한 저항이 가장 강한 시기이다. 피로기는 stress에 대한 저항력이 떨어져 생체에 여러 증

상이 나타나며 몸의 저항력이 극도로 약화된 상태를 말한다<sup>1,2)</sup>. 현재까지 stress의 first mediator로는 histamine, vasopressin, catecholamine, serotonin, CRF 및 ACTH 등이 알려져 있다<sup>3-6)</sup>. 한편, 최근에는 stress가 corticosteroid를 증가시켜 면역억제작용을 나타낼 뿐만 아니라, lymphocytes 및 macrophages의 활성에도 영향을 주어 면역계를 변화시키는데, 면역계에 대한 stress의 영향은 glucocorticoid에 의해 mediate 될 뿐만 아니라 catecholamines, endogenous opioids 및 pituitary hormone 등에 의해서도 mediate 된다고 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. 본 연구는 현대인의 질병 원인 중 가장 커다란 요인이 되고 있는 stress를 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 진행되었다. 본 실험에 사용한 한방탕제인 歸脾湯은 思慮過度하고 勞傷 心脾하여 怔忡, 健忘, 驚悸, 盜汗, 發熱, 體倦하고 食少 不眠하며, 혹은 脾虛로 血을 統攝하지 못하여 血이 妄行하는 모든 證을 다스리는 處方이다<sup>9)</sup>. 이러한 귀비탕의 stress에 대한 효능을 살펴보고자, 귀비탕을 경구로 투여한 다음, 생쥐에 immobilization

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학  
· E-mail : jseun@woosuk.ac.kr · Tel : 063-290-1569  
· 접수 : 2003/06/27 · 수정 : 2003/07/31 · 채택 : 2003/09/29

stress를 가하고 특이적 면역반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

본 실험에 사용한 mouse는 C57BL/6계 수컷 18±2 g을 대한 실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20±3 °C, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), propidium iodide, penicillin-streptomycin, concanavalin A (Con A), lipopolysaccharide (LPS, 055:B5)은 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Co., mouse  $\gamma$ -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. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Nikon Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 귀비탕의 구성은 방약합편<sup>9)</sup>에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하여 사용하였고 그 내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of Kwibitang

韓藥名	生藥名	重量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
龍眼肉	Longanae Arillus	4
酸棗仁(炒)	Zizyphi Spinosi Semen	4
遠志	Polygalae Radix	4
人參	Ginseng Radix Alba	4
黃芪	Astragali Radix	4
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4
白茯苓	Hoelen Alba	4
木香	Saussureae Radix	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.2
生薑	Zingiberis Rhizoma	4
大棗	Zizyphi Fructus	4
Total		43.2

처방 3첩 분량을 증류수 2,000 ml로 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 귀비탕 분말 27.0g (이하 KBT라 함)을 얻어, 동물 실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

### 4. Immobilization stress 부하

#### 1) Stress 2시간 부하 조건

생쥐 1군을 5 마리로 하여 normal군 (정상군) 및 control군 (stress 부하군)에는 생리식염수만을, 실험군에는 KBT 500 mg/kg을 경구로 1회 투여하고, 1 시간 후에 생쥐를 바닥에 등쪽으로 놓힌 후 반창고로 다리, 꼬리 및 입을 움직이지 못하게 고정하여 2 시간 동안 immobilization stress를 가한 다음 15 시간 후에 도살하여 thymocytes 및 splenocytes를 분리하여 실험에 사용하였다. 또한 반복투여에 의한 KBT의 영향을 알아보기 위해, 500 mg/kg을 1일 1회씩 5 일간 경구투여한 후 동일한 실험을 실시하였다.

#### 2) Stress 15시간 부하 조건

생쥐 1군을 5 마리로 하여 normal군 (정상군) 및 control군 (stress 부하군)에는 생리식염수만을, 실험군에는 KBT 500 mg/kg을 경구로 1회 투여하고, 1 시간 후에 생쥐를 플라스틱 원통에 넣어 움직이지 못하게 하여 15 시간 동안 immobilization stress를 가한 후 즉시 도살하였다. 또한 반복투여에 의한 KBT의 영향을 알아보기 위해, 500 mg/kg을 1일 1회씩 5 일간 경구투여한 후 동일한 실험을 실시하였다.

### 5. 세포분리

Immobilization stress를 가한 생쥐의 흉선 및 비장을 분리하여 세포현탁액을 Wysocki<sup>10)</sup> 및 Mizel<sup>11)</sup> 등의 방법을 이용하여 조제하였다. 즉 생쥐를 경추탈골하여 도살한 후, 적절한 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 10 분간 원심분리), thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다. 수집한 세포를 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척 후 사용하였다. 생쥐 thymocytes 및 splenocytes는 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### 6. Thymocytes 및 Splenocytes의 증식능 측정

Thymocytes 및 splenocytes의 증식능 측정은 Mosmann<sup>12)</sup>이 개발하여 Kotnik 등<sup>13)</sup>이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 RPMI 1640 배지로 세포부유액을 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 분주하고 thymocytes에는 concanavalin A (Con A)를, splenocytes에는 lipopolysaccharide (LPS) 10  $\mu$ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37 °C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100  $\mu$ l를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

### 7. Thymocytes 및 Splenocytes의 DNA fragmentation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes에 PI buffer (0.1% Na-citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide (10 µg/ml) 20 µl를 넣어 빙냉하에서 30 분간 염색한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 측정하였다<sup>14)</sup>.

8. Thymocytes 및 Splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다<sup>15)</sup>.

9. Cytokines 측정

Splenocytes 배양액 중 cytokine의 측정은 분리한 비장으로 부터 세포를 분리하여, 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml로 조제한 다음 96 well plate에 200 µl 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500rpm, 2분, 4 °C) 한 다음, 상등액 50 µl를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokine의 양을 측정하였다. 즉 sample 50 µl에 assay diluent 50 µl를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 µl를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 µl를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 µl를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다<sup>16)</sup>.

10. 통계처리

모든 실험 결과들은 Mean±SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Thymocytes 및 Splenocytes의 증식능에 미치는 효과

Stress를 가하지 않은 군 (normal군)의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때 Con A를 처리하였을 때는 125.4±1.8%로 증가하였고, stress를 2시간 부하한 군 (control군)에 Con A를 처리하지 않았을 때는 82.8±1.7%로, Con A를 처리하였을 때는 106.7±1.5%로 normal군에 비해 세포생존율이 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가한 군 (실험군)은 Con A를 처리하지 않았을 때는 78.7±1.9%로, Con A를 처리하였을 때는 103.5±1.9%로 control군에 비해 별 차이가 없었으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군

도 Con A를 처리하지 않았을 때는 84.2±1.5%로, Con A를 처리하였을 때는 109.7±1.8%로 control군에 비해 별 차이가 없었다. Stress를 15 시간 가한 control군의 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때는 48.7±2.1%로, Con A를 처리하였을 때는 76.7±2.2%로 normal군에 비해 세포생존율이 현저히 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가한 실험군은 Con A를 처리하지 않았을 때는 52.7±1.5%로, Con A를 처리하였을 때는 82.5±2.3%로 control군에 비해 별 차이가 없었으나, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 Con A를 처리하지 않았을 때는 62.5±2.2%로, Con A를 처리하였을 때는 95.5±1.5%로 control군에 비해 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of KBT on the cell viability of thymocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
			Con A-nontreated	Con A-treated
Normal	-	Saline	100.0±1.3	125.4±1.8
Control	2	Saline	82.8±1.7*	106.7±1.5*
KBT	2	500 (1 day)	78.7±1.9	103.5±1.9
KBT	2	500 (5 day)	84.2±1.5	109.7±1.8
Control	15	Saline	48.7±2.1**	76.7±2.2**
KBT	15	500 (1 day)	52.7±1.5	82.5±2.3
KBT	15	500 (5 day)	62.5±2.2*	95.5±1.5*

KBT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 1 day and 5 days, and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The separated thymocytes (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*, Significantly different from normal group (\*: p<0.01, \*\*: p<0.001). †: Significantly different from control group (p<0.001).

Normal군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때 LPS를 처리하였을 때는 142.7±1.9%로 증가하였고, stress를 2 시간 가한 control군에 LPS를 처리하지 않았을 때는 91.8±1.5%로, LPS를 처리하였을 때는 124.5±1.8%로 normal군에 비해 세포생존율이 감소하였다.

Table 3. Effect of KBT on the cell viability of splenocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Cell Viability (%)	
			LPS-nontreated	LPS-treated
Normal	-	Saline	100.0±1.5	142.7±1.9
Control	2	Saline	91.8±1.5*	124.5±1.8*
KBT	2	500 (1 day)	125.5±1.7*	169.3±2.1*
KBT	2	500 (5 day)	126.9±1.8*	172.4±2.5*
Control	15	Saline	73.4±1.8**	115.5±2.2**
KBT	15	500 (1 day)	102.8±1.7*	145.4±1.5*
KBT	15	500 (5 day)	114.7±1.7*	151.3±2.2*

KBT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 1 day and 5 days, and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The separated splenocytes (1 × 10<sup>6</sup> 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 normal group (\*: p<0.05, \*\*: p<0.001). †: Significantly different from control group (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01).

KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가한 실험군은 LPS를 처리하지 않았을 때는 125.5±1.7%로, LPS를 처리하였을 때는 169.3±2.1%로 control군에 비해 세포생존율이 증가하였

며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 LPS를 처리하지 않았을 때는 126.9±1.8%로, LPS를 처리하였을 때는 172.4±2.5%로 control군에 비해 증가하였다. Stress를 15 시간 가한 control군에 LPS를 처리하지 않았을 때는 73.4±1.8%로, LPS를 처리하였을 때는 115.5±2.2%로 normal군에 비해 세포생존율이 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 1회 투여하고 stress를 가한 실험군은 LPS를 처리하지 않았을 때는 102.8±1.7%로, LPS를 처리하였을 때는 145.4±1.5%로 control군에 비해 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 LPS를 처리하지 않았을 때는 114.7±1.7%로, LPS를 처리하였을 때는 151.3±2.2%로 control군에 증가하였다 (Table 3).

2. Thymocytes 및 Splenocytes의 DNA fragmentation에 미치는 효과

Normal군 thymocytes의 DNA fragmentation은 4.7±0.3%이었으나, stress를 2시간 부하한 control군 thymocytes의 DNA fragmentation은 4.9±0.2%로 normal군에 비해 별 차이가 없었으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 5.2±0.2%로 control군과 별 차이가 없었다. Stress를 15시간 부하한 control군 thymocytes의 DNA fragmentation은 8.3±0.4%로 normal군에 비해 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 7.0±0.3%로 control군에 비해 감소하였다. Normal군 splenocytes의 DNA fragmentation은 6.4±0.3%이었으나, stress를 2시간 부하한 control군 splenocytes의 DNA fragmentation은 10.3±0.5%로 normal군에 비해 증가하였으며, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 9.7±0.8%로 control군과 별 차이가 없었다.

Stress를 15시간 부하한 control군 splenocytes의 DNA fragmentation은 12.8±0.5%로 normal군에 비해 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 8.5±0.3%로 control군에 비해 감소하였다 (Table 4).

Table 4. Effect of KBT on DNA fragmentation of thymocytes and splenocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	DNA Fragmentation (%)	
			Thymocytes	Splenocytes
Normal	-	Saline	4.7±0.3	6.4±0.3
Control	2	Saline	4.9±0.2	10.3±0.5*
KBT	2	500	5.2±0.2	9.7±0.8
Control	15	Saline	8.3±0.4*	12.8±0.5*
KBT	15	500	7.0±0.3*	8.5±0.3**

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The separated thymocytes and splenocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from normal group (p<0.001). \*\*: Significantly different from control group (\*: p<0.01, \*\*: p<0.001).

3. Thymocytes 및 Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

Normal군 thymocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는 12.3±0.4%, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.3±0.2%이었으나, stress를 2시간 부하한 control군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 16.2±0.5%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 6.0±0.3%로 normal군에 비해 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다. KBT 500

mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 13.3±0.5%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 4.0±0.4%로 control군에 비해 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population이 감소하였다. Stress를 15시간 부하한 control군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 17.7±0.5%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.5±0.2%로 normal군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 CD4<sup>+</sup> 세포는 14.7±0.4%로, CD8<sup>+</sup> 세포는 3.2±0.3%로 control군에 비해 CD4<sup>+</sup> 세포의 population이 감소하였다 (Fig 1, Table 5).

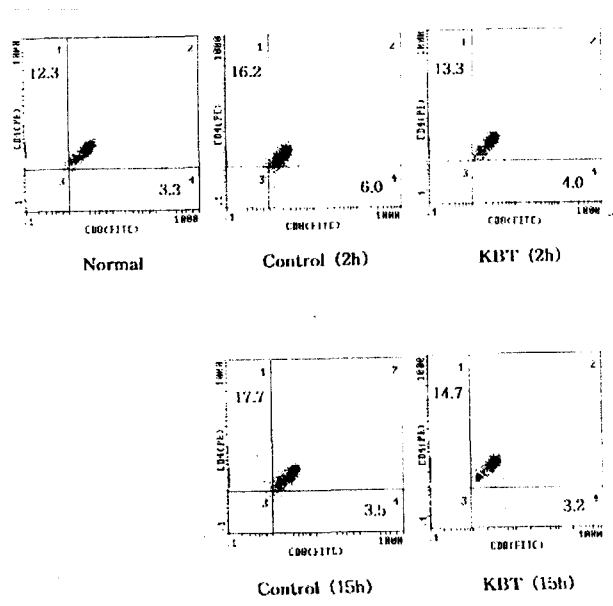


Fig. 1. Cytofluorometric patterns of thymocytes subpopulation change in immobilization stress mice.

Table 5. Effect of KBT on subpopulation of thymocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Subpopulation (%)	
			CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
Normal	-	Saline	12.3±0.4	3.3±0.2
Control	2	Saline	16.2±0.5*	6.0±0.3*
KBT	2	500	13.3±0.5*	4.0±0.4**
Control	15	Saline	17.7±0.5*	3.5±0.2
KBT	15	500	14.7±0.4*	3.2±0.3

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. 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 normal group (p<0.001). \*\*: Significantly different from control group (\*: p<0.01, \*\*: p<0.001).

Normal군 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 세포는 33.4±1.2%, Thy1<sup>+</sup> 세포는 21.7±1.7%이었으며, stress를 2시간 부하한 control군의 B220<sup>+</sup> 세포는 29.7±0.8%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 27.1±1.0%로 normal군에 비해 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 감소하고 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의 B220<sup>+</sup> 세포는 32.3±0.7%로, Thy1<sup>+</sup> 세포는 22.6±1.5%로 control군에 비해 B220<sup>+</sup> 세포의 population은 증가하고 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population은 감소하였다.

Normal군 splenocytes 중 CD4<sup>+</sup> 세포는 13.2±0.4%, CD8<sup>+</sup> 세

포는  $6.3 \pm 0.3\%$ 이었으며, stress를 2시간 부하한 control군의  $CD4^+$  세포는  $17.7 \pm 0.5\%$ 로,  $CD8^+$  세포는  $8.7 \pm 0.2\%$ 로 normal군에 비해  $CD4^+$  및  $CD8^+$  세포의 population이 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의  $CD4^+$  세포는  $11.1 \pm 0.6\%$ 로,  $CD8^+$  세포는  $6.5 \pm 0.3\%$ 로 control군에 비해  $CD4^+$  및  $CD8^+$  세포의 population이 감소하였다. Stress를 15시간 부하한 control군의  $B220^+$  세포는  $29.3 \pm 1.5\%$ 로 normal군에 비해 감소하였으며,  $Thy1^+$  세포는  $26.5 \pm 1.4\%$ 로 normal군에 비해 population이 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의  $B220^+$  세포는  $27.2 \pm 1.2\%$ 로 control군에 비해 별 차이가 없었으나,  $Thy1^+$  세포는  $22.5 \pm 1.7\%$ 로 control군에 비해 population이 감소하였다. Stress를 15시간 부하한 control군의  $CD4^+$  세포는  $16.7 \pm 0.4\%$ 로,  $CD8^+$  세포는  $9.3 \pm 0.4\%$ 로 normal군에 비해  $CD4^+$  및  $CD8^+$  세포의 population이 증가하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군의  $CD4^+$  세포는  $14.0 \pm 0.3\%$ 로 control군에 비해 감소하였으나,  $CD8^+$  세포는  $8.8 \pm 0.4\%$ 로 control군에 비해 별 차이가 없었다 (Fig. 2, Fig. 3, Table 6).

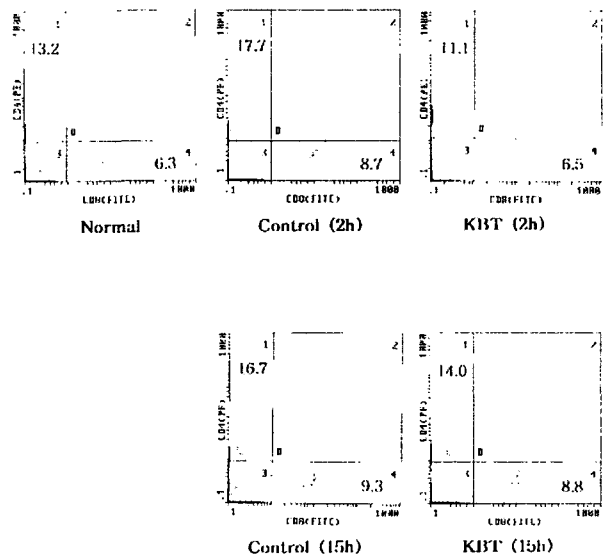


Fig. 3. Cytofluorometric patterns of splenocytes subpopulation change ( $CD4^+/CD8^+$ ) in immobilization stress mice.

Table 6. Effect of KBT on subpopulation of splenocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Subpopulation (%)			
			B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Normal	-	Saline	33.4±1.2	21.7±1.7	13.2±0.4	6.3±0.3
Control	2	Saline	29.7±0.8*	27.1±1.0*	17.7±0.5*	8.7±0.2*
KBT	2	500	32.3±0.7*	22.6±1.5*	11.1±0.6**	6.5±0.3**
Control	15	Saline	29.3±1.5*	26.5±1.4*	16.7±0.4*	9.3±0.4*
KBT	15	500	27.2±1.2	22.5±1.7*	14.0±0.3*	8.8±0.4

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and 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 normal group ( $p < 0.001$ ). \*\*: Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ ).

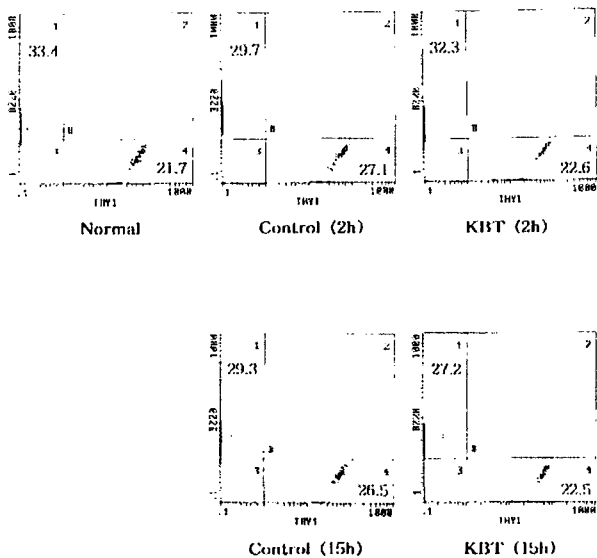


Fig. 2. Cytofluorometric patterns of splenocytes subpopulation change ( $B220^+/Thy1^+$ ) in immobilization stress mice.

#### 4. Cytokine 분비에 미치는 효과

Normal군 splenocytes배양액 중  $\gamma$ -interferon의 양은 대조군에서  $655.4 \pm 21.7$  pg/ml 이었으나, stress를 2시간 부하한 control군에서는  $537.7 \pm 23.5$  pg/ml으로 normal군에 비해 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은  $615.5 \pm 22.3\%$ 로 control군에 비해 증가하였다. Stress를 15시간 부하한 control군에서는  $426.5 \pm 22.8$  pg/ml으로 normal군에 비해 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은  $510.5 \pm 21.7\%$ 로 control군에 비해 증가하였다. Normal군 splenocytes배양액 중 interleukin-2의 양은 대조군에서  $327.6 \pm 19.5$  pg/ml 이었으나, stress를 2시간 부하한 control군에서는  $225.4 \pm 16.7$  pg/ml으로 normal군에 비해 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은  $297.7 \pm 15.4\%$ 로 control군에 비해 증가하였다.

Table 7. Effect of KBT on the production of cytokines from splenocytes in immobilization stress mice

Samples	Stress Time (hr.)	Dose (mg/kg)	Cytokine production (pg/ml)		
			$\gamma$ -interferon	interleukin-2	interleukin-4
Normal	-	Saline	655.4±21.7	327.6±19.5	135.4±12.4
Control	2	Saline	537.7±23.5*	225.4±16.7*	126.8±8.5
KBT	2	500	615.5±22.3*	297.7±15.4*	137.8±11.2
Control	15	Saline	426.5±22.8**	165.5±17.5**	95.6±7.8*
KBT	15	500	510.5±21.7*	232.8±16.3*	97.8±9.5

KBT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 5 days, and mice were treated by immobilization stress for 2h or 15h. The production of cytokines was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from normal group (\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ ). \*\*: Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ).

Stress를 15시간 부하한 control군에서는  $165.5 \pm 17.5$  pg/ml으로 normal군에 비해 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은  $232.8 \pm 16.3\%$ 로 control군에 비해 증

가하였다. Normal군 splenocytes배양액 중 interleukin-4의 양은 대조군에서 135.4±12.4 pg/ml 이었으나, stress를 2시간 부하한 control군에서는 126.8±8.5 pg/ml으로, KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 137.8±11.2%로 control군과 별 차이가 없었다. Stress를 15시간 부하한 control군에서는 95.6±7.8 pg/ml으로 normal군에 비해 감소하였다. KBT 500 mg/kg을 5회 투여하고 stress를 가한 실험군은 97.8±9.5%로 control군에 비해 별 차이가 없었다 (Table 7).

## 고 찰

歸脾湯은 宋代의 嚴<sup>17)</sup>에 의하여 濟生方에 최초로 收載된 처방으로 思慮過度로 心·脾를 傷함으로 인한 健忘怔忡을 치료할 목적으로 立方되었으며, 그 후 元代의 危<sup>18)</sup>에 의해 嚴의 主治症 외에 思慮로 脾를 傷하여 脾가 充血하지 못함으로서 血이 妄行하여 발생하는 吐血, 下血의 치료를 첨가하였고, 明代의 薛<sup>19)</sup>은 遠志 및 當歸를 加味하여 驚悸盜汗, 心脾作痛, 肢體重痛, 月經不調와 思慮로 脾를 傷함으로 인하여 발생한 질병의 치료로 그 응용 범위를 넓혔다. 귀비탕은 心脾兩虛, 氣血不足으로 인한 증상을 치료한다. 心은 藏神하면서 主血하고 脾는 主思하며 統血함으로 思慮勞倦이 과도하게 되면 心脾를 손상하게 된다. 脾胃는 氣血生化의 근원으로 脾가 虛하면 氣衰血少하게 되고 心은 영양받는 바를 잃게 되어 神을 저장할 수 없게 되므로 心悸怔忡, 健忘失眠, 體倦食少, 舌淡, 苔薄白, 脈細弱하게 된다. 처방 중의 黃芪는 味甘微溫하여 補脾益氣하며 龍眼肉은 甘溫하여 脾氣를 補할 수 있을 뿐만 아니라, 心血도 기를 수 있다. 人蔘, 白朮은 甘溫하며 黃芪와 함께 補脾益氣의 효능을 증가시키고, 當歸는 甘辛微溫하며 滋養養血하여 龍眼肉과 배합되어 補心養血의 효능을 증가시킨다. 茯神, 酸棗仁, 遠志는 寧心安神하고 木香은 理氣醒脾하여 補氣養血藥과 배합하면 補하면서도 胃에 부담을 주지 않고 補하면서도 滯하지 않게 하고, 炙甘草는 補氣健脾, 調和諸藥한다. 本方의 구성의 특징은 첫째, 心脾를 같이 치료하지만 重點은 脾에 있어 脾를 왕성하게 하면 氣血化生에 근원이 된다. 둘째, 氣血을 함께 補하지만 補氣에 치중되어 있고 그 의도는 生血하는 데 있다<sup>20)</sup>.

Stress는 lymphocyte의 반응성 감소 및 natural killer cell의 활성을 감소시킴으로써 bacteria나 virus에 의한 질병 유발율이 매우 커지게 되며<sup>21,22)</sup>, 암세포의 증식도 촉진되는 것으로 보고되었다<sup>23)</sup>. 또한, 면역계는 다양한 stress에 의해 영향을 받아 그 기능이 감소하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 소음 stress<sup>24)</sup> 및 surgical stress<sup>25,26)</sup>에 의해 thymus 및 spleen의 세포성면역이 억제되며, 그 외에도 다양한 stress에 의해 특이적 및 비특이적 면역계가 억제되고 있음이 보고되었다<sup>27,29)</sup>. 본 실험에서는 임상에서 stress를 억제할 목적으로 사용하고 있는 귀비탕 (KBT)이 immobilization stress에 의해 변화되는 특이적 면역반응에 대한 영향을 관찰하고자 실험하였다. Stress는 동일한 stress라 하더라도 주어지는 시간 및 사용한 쥐의 strain에 따라 면역계에 미치는 영향에 차이가 있다고 알려져 있다<sup>30,31)</sup>. 따라서 본 실험에서는

immobilization stress의 조건을 2시간 및 15시간으로 2가지 조건으로 실험하였으며, KBT 투여 방법도 1회 및 5회로 하여 1회 투여 및 반복투여의 효과를 관찰하였다. 또한, 사용한 생쥐는 면역계에 민감한 반응을 나타내는 C57BL/6J를 사용하였다. Stress가 특이적 면역반응에 미치는 영향을 살펴보기 위해 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율을 측정하였다. Stress를 2시간 및 15시간 부하 하였을 때 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율은 감소하였으며, 15시간 stress를 부하 하였을 때 2시간 stress를 부하 하였을 때보다 현저히 세포생존율이 감소하였다. KBT를 1일 및 5일 투여하고 stress를 2시간 부하하였을 때는 stress에 의해 감소되는 세포생존율이 증가하지 못하였으나, KBT를 5일 투여하고 15 시간 stress를 부하 하였을 때는 stress에 의해 감소되는 세포생존율이 control군에 비해 증가하였다. 이는 KBT가 stress에 의해 감소되는 thymocytes의 세포생존율을 증가시켜 면역능을 회복시킬 수 있음을 시사하는 것이다. KBT를 1일 및 5일 투여하고 stress를 2시간 부하한 후 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 stress에 의해 감소되는 세포생존율이 control군에 비해 증가하였다. KBT를 1일 및 5일 투여하고 stress를 15시간 부하 하였을 때도 LPS를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 stress에 의해 감소되는 세포생존율이 control군에 비해 증가하였다. 이는 KBT가 stress에 의해 감소되는 splenocytes의 세포생존율을 증가시켜 면역능을 회복시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 이러한 결과는 stress를 부하하고 분리한 T cell은 Con A에 대한 반응성이 증가되나, stress를 부하하고 분리한 B cell은 LPS에 대한 반응성에 변화가 없다는 보고<sup>32)</sup>와는 다른 결과이지만, stress의 종류 및 강도에 따라 변화가 다양하게 나타나기 때문이 아닌가 사료된다. Stress에 의한 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율 감소가 이들 세포의 apoptosis에 의해 야기된 것인가를 확인하기 위해 DNA fragmentation을 측정하였다. 앞의 실험에서 KBT를 1일 투여하였을 때는 control군에 비해 별 차이가 없었기 때문에 이후 실험에서는 KBT를 5일간 투여한 군만을 실험하였다. 2시간 stress를 부하 하였을 때는 thymocytes의 DNA fragmentation은 normal군에 비해 별 차이가 없었으나, splenocytes의 DNA fragmentation은 normal군에 비해 증가하였다. Stress를 15시간 부하 하였을 때는 thymocytes 및 splenocytes 모두 normal군에 비해 DNA fragmentation이 증가하였으며, KBT를 5일 투여하였을 때 thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation이 모두 감소하였다. 이 결과는 stress가 짧은 시간 부하 되었을 때는 세포생존율의 감소가 이들 세포의 apoptosis 이외의 다른 기전이 작용하고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. 한편, 장 시간 stress가 부하 되었을 때는 세포생존율의 감소에 apoptosis 기전이 일부 관여하고 있음을 의미하는 것이며, KBT가 이들 세포의 apoptosis를 억제하여 세포생존율을 증가시키고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. Stress를 받은 생쥐는 bone marrow, liver, thymus 및 spleen 등 조직의 종류에 따라 면역세포의 subpopulation에 다양한 변화가 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. Stress에 의한 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 변화에 미치는 KBT의 영향을 관찰하고자, stress

를 2시간 부하 하였을 때 thymocytes의 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 normal군에 비해 증가하였으나, KBT 5일 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 control군에 비해 감소하였다. Stress를 15시간 부하 하였을 때는 thymocytes의 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell의 population이 증가하였으나, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population은 control군에 비해 별 차이가 없었으며, KBT 5일 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell의 population이 control군에 비해 감소하였다. Stress를 2시간 부하 하였을 때 splenocytes의 B220<sup>+</sup> cell의 population은 감소하고, Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 증가하였으며, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 normal군에 비해 증가하였으나, KBT를 5일 투여하였을 때 B220<sup>+</sup> cell의 population은 control군에 비해 증가하였으나, Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 감소하였으며, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 control군에 비해 감소하였다. Stress를 15시간 부하 하였을 때 splenocytes의 B220<sup>+</sup> cell의 population은 감소하고, Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 증가하였으며, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population은 normal군에 비해 증가하였으나, KBT를 5일 투여하였을 때 B220<sup>+</sup> cell의 population은 변화가 없었으나, Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 control군에 비해 감소하였다. KBT를 5일 투여하였을 때 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell의 population은 control군에 비해 감소하였으나, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population은 control군과 별 차이가 없었다. 대조군의 thymocytes 중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 11.2%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 3.5%로 normal 생쥐 흉선에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells은 약 12%, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며<sup>34)</sup>, stress에 의해 thymocytes에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 증가하였으나 KBT 투여에 의해 감소하였다. 또한, stress에 의해 splenocytes에서 B220<sup>+</sup> cell의 population은 감소하고 Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 증가하였으나, KBT 투여에 의해 B220<sup>+</sup> cell의 population은 증가하고 Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 감소하였다. Stress에 의해 splenocytes의 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 control군에 비해 증가하였으나, KBT 투여에 의해 이들 population이 감소하였다. 이러한 실험 결과는 immobilization stress에 의해 thymus와 spleen에서 immature-T cell (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell)의 population이 증가하고, mature T cell인 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cell 및 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cell의 population이 감소한다는 Teshima의 보고<sup>27)</sup>와도 유사한 결과라 할 수 있다. 한편, Evans 등<sup>35)</sup>은 stress의 종류에 따라서는 cytotoxic T cell의 population이 감소된다고 보고하여, stress의 조건에 따라 subpopulation에 변화가 나타날 수 있음을 시사하였다. Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, 분화된 Th1 cell은  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -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 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>. Li

등<sup>37)</sup>은 stress는 Th1 cell을 억제하여  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 생산을 억제하나, Th2 cell에서 분비되는 interleukin-4의 생산에는 영향을 주지 않는다고 보고하였으며, Sukhikh 등<sup>38)</sup>은 stress에 의해 interferon의 생산이 감소되어 NK cell의 활성이 억제된다고 보고하여, stress가 cytokine 분비에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하였다. Stress에 의해 splenocytes에서 분비되는 cytokines의 변화에 미치는 KBT의 영향을 관찰하고자, stress를 2시간 부하 하였을 때  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2는 분비가 억제되었으나, interleukin-4의 분비는 별 영향을 받지 않았다. KBT 500 mg/kg을 5일간 투여하였을 때  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 control군에 비해 증가하였다. 15시간 stress를 부하 하였을 때는  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 2시간 stress를 부하 하였을 때에 비해 더욱 억제되었으며, interleukin-4의 분비도 억제되었다. KBT 500 mg/kg을 5일간 투여하였을 때  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 control군에 비해 증가하였다. 이는 Li 등<sup>37)</sup>의 보고와도 동일한 결과이며, 짧은 시간의 stress에 의해서는 Th1 cell의 활성이 억제되나, 긴 시간의 stress에 의해서는 Th1 cell 및 Th2 cell의 활성이 모두 억제됨을 의미하는 것이다. KBT 투여에  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 분비가 증가되었다는 결과는 KBT가 주로 Th1 cell의 활성을 증가시키고 있음을 시사하는 것이다.

## 결 론

귀비탕 (KBT)이 C57BL/6 mouse에 immobilization stress 부하 후 특이적 면역반응에 미치는 영향은 다음과 같다. KBT는 immobilization stress에 의해 증가된 thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation, thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 세포 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population, splenocytes의 Thy1<sup>+</sup> 세포의 population, splenic CD4<sup>+</sup> 세포 및 CD8<sup>+</sup> 세포의 population을 감소시켰으며, immobilization stress에 의해 감소된 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율, splenocytes의 B220<sup>+</sup> 세포의 population,  $\gamma$ -interferon 및 interleukin-2의 분비를 증가시켰다.

이상의 실험결과 귀비탕은 immobilization stress에 의해 감소되는 특이적 면역능을 회복시켜 stress를 억제할 수 있는 당제라고 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. Kopin, I.J.: Catecholamines, adrenal hormones, and stress: In Neuroendocrinology (ed. Krieger, D.T., Hugjes, J.C.), Sinauer Association Inc., p.159, 1980.
2. Guillemin, R.G.: Beta-lipotropin and endorphin:

- Implications of current knowledge: In Neuroendocrinology (ed. Krieger, D.T., Hugjes, J.C.), Sinauer Association Inc., p.67, 1980.
3. Bugajski, J. and Gadek, A.: Central H1- and H2-histaminergic stimulation of pituitary-adrenocortical response under stress in rats. *Neuroendocrinology*, 36(6), 424-430, 1983.
  4. Mormede, P.: The vasopressin receptor antagonist dP<sup>1</sup>Tyr (Me) AVP does not prevent stress-induced ACTH and corticosterone release. *Nature*, 302(5906), 345-346, 1983.
  5. Rivier, C. and Vale, W.: Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature*, 305(5932), 325-327, 1983.
  6. Nakane, T., Audhya, T., Kanie, N. and Hollander, C.S.: Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing factor in cold, ether, immobilization, and traumatic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(4), 1247-1251, 1985.
  7. Ader, R.: *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, New York, pp.15-57, 1981.
  8. Danzer, R. and Kelley, K.W.: Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sciences*, 44(26), 1995-2008, 1989.
  9. 申載鏞: 方藥合編解說, 成輔社, 서울 p.61, 1988.
  10. Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2844, 1978.
  11. 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.* 120, 1497, 1979.
  12. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, 65, 55, 1983.
  13. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, 129, 23, 1990.
  14. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. A.: Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139, 271, 1991.
  15. Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873-879, 1994.
  16. Eun, J. S., Suh, Y. H., Kim, D. K., Jeon, H.: Regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. *Arch Pharm Res.*, 23(5), 531-534, 2000.
  17. 嚴用和: 嚴氏濟生方, 北京, 人民衛生出版社, p.117, 1980.
  18. 危亦林: 世醫得效方(文淵閣本), 서울, 驪江出版社, 7卷, p.36, 1986.
  19. 薛己: 薛氏醫安(文淵閣本), 서울, 驪江出版社, 1卷, p.27, 1986.
  20. 李範九, 朴贊斗: 方劑學, 대성의화사, 서울, p.266-267, 2000.
  21. Nagata, S.: Stress-induced immune changes, and brain-immune interaction. *J. UOEH*, 15(2), 161-171, 1993.
  22. Teshima, H., Sogawa, H., Kihara, H., Kubo, C., Mori, K. and Nakagawa, T.: Prevention of immunosuppression in stressed mice by neurotrophin(NSP). *Life Sci.*, 47(10), 869-876, 1990.
  23. Toge, T., Hirai, T., Takiyama, W. and Hattori, T.: Effects of surgical stress on natural killer activity, proliferative response of spleen cells and cytostatic activity of lung macrophages in arts. *Gann*, 72(5), 790-794, 1981.
  24. Freire-Garabal, M., Belmonte, A. and Suarez-Quintanilla, J.: Effects of buspirone on the immunosuppressive response to stress in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 314, 160-168, 1991.
  25. Freire-Garabal, M., Belmonte, A. Balboa, J.L. and Nunez, M.J.: Effects of midazolam on T-cell immunosuppressive response to surgical stress in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43(1), 85-89, 1992.
  26. Freire-Garabal, M., Belmonte, A. Orallo, F., Couceiro, J. and Nunez, M.J.: Effects of alprazolam on T-cell immunosuppressive response to surgical stress in mice. *Cancer Lett.*, 58(3), 183-187, 1991.
  27. Teshima, H., Sogawa, H., Kihara, H. and Nakagawa, T.: Influence of stress on the maturity of T-cells. *Life Sciences*, 49(21), 1571-1581, 1991.
  28. Antelman, S.M., Cunnick, J.E., Lysle, D.T., Caggiula, A.R., Knopf, S., Kocan, D.J., Rabin, B.S. and Edwards, D.J.: Immobilization 12 days (but not one hour) earlier enhanced 2-deoxy-D-glucose-induced immunosuppression: evidence for stressor-induced time-dependent sensitization of the immune system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 14(4), 579-590, 1990.
  29. Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T. and Weinstock, M.: Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol. Behav.* 63(3), 397-402, 1998.
  30. Schedlowski, M. and Schmidt, R.E.: Stress and the immune system. *Naturwissenschaften*, 83(5), 214-220, 1996.
  31. Shanks, N. and Kusnecov, A.W.: Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice: in vivo dependence on macrophages. *Physiol. Behav.*, 65(1), 95-103, 1998.
  32. Lysle, D.T., Cunnick, J.E. and Rabin, B.S.: Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhancement of mitogenic responsiveness. *Brain Behav. Immun.* 4(4), 269-277, 1990.



33. Sudo, N., Yu, X.N., Sogawa, H. and Kubo, C.: Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation*, 4(3), 113-119, 1997.
34. Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59, 1993.
35. Evans, D.L., Leserman, J., Perkins, D.O., Stern, R.A., Murphy, C., Tamul, K., Liao, D., Horst, C.M., Hall, C.D. and Folds, J.D.: Stress-associated reductions of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in asymptomatic HIV infection. *Am. J. Psychiatry*, 152(4), 543-550, 1995.
36. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.
37. Li, T., Harada, M., Tamada, K., Abe, K. and Nomoto, K.: Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells. *Anticancer Res.*, 17(6D), 4259-4268, 1997.
38. Sukhikh, F.T., Nosik, N.N., Parshina, O.V., Van'ko, L.V. and Meerson, F.Z.: Interlations of natural cellular cytotoxicity and interferon systems in immobilization stress. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 98(11), 593-595, 1984.