

# 淸肝解鬱湯이 생쥐에 Immobilization-Stress 및 Cold-Stress 負荷後 血中 Histamine과 Corticosterone 含量 및 免疫能에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실

강복환, 정우석, 김송백, 유심근

## ABSTRACT

**Effects of *Chungganhaewooltang* on Serum Levels of Histamine and  
Corticosterone and Immune Response  
after Immobilization-Stress or Cold-Stress in Mice**

**Bok-Hwan Kang, Woo-Suk Jung, Song-Baeg Kim, Sim-Keun Yoo**

**Department of Oriental Obstetric and Gynecology,  
College of Oriental Medicine, Wonkwang University**

**Purpose :** Investigate the effects of *Chungganhaewooltang*(CHT) on immobilization-stress or cold-stress in C57BL/6J mice.

**Methods :** Male C57BL/6J 30 mice of weighting 18±2g, were divided into sixs groups including the immobilization-stress group(5heads), after immobilization-stress CHT oral administration(500mg/kg) groups(5heads), cold-stress group(5heads) and after cold-stress CHT oral administration(500mg/kg) groups(5heads). then we observed changes in the serum histamine and corticosterone level and changes immune system

**Results :** Immobilization-stress or cold-stress increased the serum level of histamine and corticosterone. CHT decreased the serum level of histamine and corticosterone increased by cold-stress. CHT inhibited the release of histamine from mast cells at the concentration of 0.1 mg/ml. In addition, immobilization-stress or cold-stress decreased the cell viability of murine thymocytes and splenocytes. CHT increased the cell viability of thymocytes decreased by immobilization-stress or cold-stress, but did not affect the cell viability of splenocytes decreased by immobilization-stress or cold-stress. Also, immobilization-stress or cold-stress increased DNA fragmentation of thymocytes and splenocytes. CHT decreased DNA fragmentation of thymocytes increased by immobilization-stress or cold-stress, but did not affect DNA fragmentation of splenocytes increased by immobilization-stress or cold-stress. Immobilization-stress increased the population of thymic CD4<sup>+</sup> cells. CHT decreased the population of thymic CD4<sup>+</sup> cells increased by immobilization-stress. Immobilization-stress or cold-stress decreased the population of B220<sup>+</sup> cells and increased the population of Thy1<sup>+</sup> cells. CHT decreased the population of Thy1<sup>+</sup> cells increased by immobilization-stress or cold-stress. Immobilization-stress or cold-stress increased the population of splenic CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells. CHT decreased the population of splenic CD4<sup>+</sup> cells increased by immobilization-stress or cold-stress. Immobilization-stress or cold-stress decreased the production of γ-IFN, interleukin(IL)-2 and IL-4. CHT enhanced the production of γ-IFN decreased by immobilization-stress or cold-stress, but did not affect the production of IL-2 and IL-4 decreased by immobilization-stress or cold-stress. Furthermore, Immobilization- stress or cold-stress decreased the phagocytic activity of peritoneal macrophages and the production of nitric oxide. CHT enhanced the phagocytic activity and nitric oxide production decreased by cold-stress.

**Conclusion :** CHT may be useful for the prevention and treatment of stress via suppression of serum histamine and corticosterone level and enhancement of immune response.

**Key words :** *Chungganhaewooltang*(CHT), immobilization-stress, cold-stress, histamine, corticosterone, immune response

## I. 緒論

Stress란 健康을 維持하거나 疾病을 극복하기 위한 身體의 能力에 影響을 줄 수 있는 環境的, 遺傳的, 生理的, 精神的 및 기타 社會的 要因들의 複合的構成 要所 중의 하나이다<sup>1)</sup>.

韓醫學에서는 《靈樞·口問編》<sup>2)</sup>에 “夫百病之始生也 皆生於風雨寒暑, 陰陽喜怒, 飲食居處, 大驚卒恐則 氣血分離”라 하여 stress의 原因을 外感과 情動, 飲食, 起居 등으로 提示하였으며<sup>3)</sup>, 이러한 刺載에 대한 反應으로서 나타나는 現狀을 氣의 變化로 관찰하여 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆, 氣滯 등의 範疇에서 다루고 있다<sup>4,5)</sup>. 또한, stress는 臟腑의 生理機能 중에서 肝臟의 疏泄機能의 障碍와 密接한 關聯이 있다<sup>6)</sup>.

淸肝解鬱湯은 明代 陳<sup>7)</sup>의 《外科正宗》에 “治一切憂鬱氣滯 乳結腫硬 不疼不痒 久漸作痛 或胸膈不利 肢體倦怠 面色萎黃 飲食減少”라 記載된 以來, 肝鬱氣滯로 인한 吹乳, 乳癰, 乳巖 등의 乳房疾患과 肝失條暢한 一切雜病에 應用되어진 處方이다<sup>8-11)</sup>.

淸肝解鬱湯에 關한 實驗的 研究로서는 서<sup>12)</sup>가 消炎鎮痛作用과 乳房癌細胞에 대해 直接的인 細胞毒性效果가 있음을 報告하였으나, stress 負荷後 血中 Hormone 含量 및 免疫能 變化에 미치는 影響에 關한 研究는 아직 接해보지 못하였다.

이에 著者は淸肝解鬱湯의 stress에 대한 作用機轉을 究明하고자, 生쥐에淸肝解鬱湯을 經口投與한 후 immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 加하고 血中 histamine과 corticosterone 量 및 immune system의 變化를 觀察하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗 材料

本 實驗에 使用한 生쥐는 BALB/c계 수컷  $18 \pm 2$  g을, 흰쥐는 SD계 수컷  $180 \pm 20$  g를 大韓實驗動物(株)에서 購入하여, 溫度  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 濕度  $50 \pm 5\%$ , dark/light 12時間의 條件下에서 1週日 以上 實驗室에 適應시킨 후 使用하였으며, 固形飼料와 물을 자유스럽게 摄取하도록 하였다.

### 2) 試藥 및 器具

實驗에 使用한 試藥은 phospho-cellulose powder, orthophthal aldehyde는 Wako Co., histamine · 2HCl, corticosterone, Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), propidium iodide, metrizamide, penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), histamine N-methyl transferase는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco Co., mouse γ-IFN immunoassay kit, mouse interferon-2 (IL-2) immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co. FITC-conjugated E. coli K-12 bio-particles는 Molecular probes Co. 製品을 使用하였으며, 기타 試藥은 cell culture用 및 1級 試藥을 使用하였다. 使用器具는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub>-incubator (Vision scientific Co.), inverted micro-

scope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), spectrofluorometer (Kotron Co.) 등을 사용하였다.

## 2. 實驗 方法

### 1) 檢液의 調劑

본 實驗에 使用한 清肝解鬱湯의 構成은 明代 陳<sup>7)</sup>의 《外科正宗》에 準하였으며, 使用한 藥材들은 圓光大學校 韓醫科大學 附屬 益山韓方病院에서 購入한 후 良質의 것을 精選하였고 그 內容과 1貼의 分量은 다음과 같다.

### # 清肝解鬱湯(CTH)의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量 (g)
陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	3.2
白芍藥	Paeoniae Radix alba	3.2
川 茯	Ligustici Rhizoma	3.2
當 歸	Angelicae Sinensis Radix	3.2
生地黃	Rehmanniae Radix crudus	3.2
半 夏	Pinelliae Tuber	3.2
香附子	Cyperi Rhizoma	3.2
青 皮	Aurantii Immatri Pericarpium	2.4
遠 志	Polygalae Radix	2.4
茯 神	Hoelen Cum Radix	2.4
貝 母	Fritillariae Bulbus	2.4
蘇 葉	Perillae Folium	2.4
桔 梗	Platycodi Radix	2.4
甘 草	Glycyrrhizae Radix	1.6
梔 子	Gardeniae Fructus	1.6
木 通	Akebiae Caulis	1.6
Total		41.6

處方 3貼 分量을 蒸溜水 2,000ml로 2回 加熱 抽出한 후, 濾過하여 濾液을 rotary evaporator로 濃縮한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 清肝解鬱湯 粉末 32.5g (수득률, 26.2%, 이하 CHT라 함)을 얻어, 動物實驗時에는 生理食鹽水에 溶解시켜 使用하였다.

### 2) Immobilization stress 負荷 條件

생쥐 5마리를 1群으로 하여 normal群 (正常群) 및 control群 (stress 負荷群)에는 生理食鹽水만을, 實驗群에는 CHT 500 mg/kg을 1日 1回씩 7日間 經口投與한 다음 생쥐를 플라스틱 원통에 넣어 움직이지 못하게 하여 10時間 동안 immobilization-stress 를 負荷한 후 實驗에 使用하였다<sup>13)</sup>.

### 3) Cold stress 負荷 條件

생쥐 1群을 5마리로 하여 normal群 (正常群) 및 control群 (stress 負荷群)에는 生理食鹽水만을, 實驗群에는 CHT 500 mg/kg 을 1日 1回씩 7日間 經口投與한 다음 생쥐를 4°C 冷藏室에서 6時間동안 넣어 놓은 후 實驗에 使用하였다<sup>14)</sup>.

### 4) 血清 中 Histamine 含量 測定

Stress를 加한 生쥐를 斷頭하여 얻은 血液을 遠心分離 (3,000 rpm, 10mins)하여 血清을 얻었다. 血清 1ml당 0.4N-HClO<sub>4</sub> 2.5ml를 加하여 蛋白質을 除去한 후, 激烈하게 振蕩하고 遠心分離 (3,000 rpm, 5mins)하여 上層液을 分離하였다. 미리 活性化시킨 phospho-cellulose powder를 3 × 0.6cm column에 充塵한 후 0.03M-phosphate buffer와 0.06M-phosphate buffer로 차례로 洗滌한 다음 물로 洗滌하고 0.1M-borate buffer를 histamine 溶出媒로 使用하여 溶出시켰다. 溶出液 3ml에 orthophthal aldehyde 0.2ml를 加하여 spectrofluorometer (excitation : 350nm, emission : 444nm)로 螢光을 測定하여 標準 histamine 檢量線에 의해 定量하였다<sup>15)</sup>.

### 5) 血清 中 Corticosterone 含量 測定

同一한 方法으로 얻은 血清 中 corticosterone 含量은 Zenker 등의 方法<sup>16)</sup>에 準하였다. 즉 血清 0.3ml에 蒸溜水 0.7ml를 넣어 混合하고 chloroform 10ml를 加

하여 15秒 以上 激烈하게 振蕩한 다음 遠心分離 (2,500 rpm, 5mins)하여 上層液을 除去하였다. 다시 chloroform層을 0.1N-NaOH 溶液 1ml로 洗滌한 다음 遠心分離 후 上層液을 分離 除去하였다. 洗滌한 chloroform層 9ml에 螢光試液 ( $H_2SO_4$  : 50%  $C_2H_5OH = 2.4 : 1$ ) 3ml를 加한 다음 15秒 以上 激烈하게 振蕩하였다. 遠心分離 (2,500 rpm, 5mins)한 후, 上層의 chloroform層을 완전히 除去하고 殘留液을 2時間 동안 發色시킨 후 spectrofluorometer (excitation : 470nm, emission : 520nm)로 螢光을 測定하여 標準 corticosterone 檢量線에 의해 定量하였다.

#### 6) 腹腔 mast cell의 分離

Kanemoto 등<sup>17)</sup>의 方法에 準하여 흰쥐 腹腔 mast cell을 分離하였다. 흰쥐를 ether로 麻醉시킨 후 室溫에서 PMC buffer (Phosphate Buffered Saline(PBS) 100ml, Fetal Bovine Serum(FBS) 10ml, Heparin 10,000unit 1ml에 3次 蒸溜水를 加해 1,000ml로 調劑, pH 7.0) 30ml를 腹腔에 注入하고 90秒間 腹壁을 가볍게 마사지한 다음 腹腔液을 採取하여 遠心分離 (1,500 rpm, 5mins)하였다. 15ml tube에 22.5% metrizamide (4 °C) 2ml를 넣고 Yurt 등의 方法<sup>18)</sup>에 따라 그 위에 DME 배지로 稀釋한 細胞浮游液을 서서히 加하고 1,300 rpm에서 10分間 遠心分離 하였다. 細胞를 DME 배지로 洗滌한 후  $2 \times 10^5$  cells/ml로 調劑하여 實驗에 使用하였다. 分離한 mast cell을  $2 \times 10^5$  cells/ml로 調劑하여 eppendorf tube에 1ml씩 넣고, CO2-incubator에서 10分間 培養한 후 PMC buffer로 稀釋한 CHT를 最終濃度가 0.25, 0.5 및 2.5 mg/ml로 되도록 각각 加

하고 37 °C에서 10分間 培養한 다음 compound 48/80 0.5 µg/ml를 加하여 10分間 培養하였다. 培養液을 4°C에서 遠心分離 (1,500 rpm, 10mins)하여 上層液을 分離하였다.

#### 7) Histamine 定量

分離한 細胞培養液 中의 histamine의 定量은 Harvima 등<sup>19)</sup>의 方法을 修正하여 測定하였다. 遠心分離 후 上層液 10µl와 S-adenosyl (methyl-<sup>14</sup>C) methionine (2 µci/ml) 1.5µl, 300mM Tris-glycine buffer (pH 8.3) 40µl, histamine N-methyl transferase 5µl를 添加하여 37 °C 항온조에서 90分間 反應시킨 후 3N-perchloric acid 20µl를 加하여 反應을 中止시켰다. Perchloric acid를 中和시키기 위해 10N-NaOH 20µl를 加하고, toluene-isoamyl alcohol 1ml로 抽出한 후 上層液 700µl를 얻어 cocktail 溶液으로 scintillation 시킨 다음, β-counter를 使用하여 CPM (counter per minute) 값을 測定한 후 histamine 標準曲線에 의해 量을 測定하였다. Histamine 量은 histamine 總量에 대한 百分率로 標示하였으며, 總 histamine 量은 mast cell 數가  $2 \times 10^5$  cells/ml인 250µl를 100 °C로 10分間 加熱한 다음 遠心分離하여 얻은 上層液으로부터 測定된 histamine 量을 100으로 定하였다.

Histamine 遊離率 (%) = (實驗群 histamine 遊離量 ÷ 總 histamine 遊離量) × 100

#### 8) Thymocytes, splenocytes 및 腹腔 macrophages의 分離

Stress를 加한 生쥐의 胸腺 및 脾臟을 分離하여 細胞懸濁液을 Wysocki<sup>20)</sup> 및 Mizel<sup>21)</sup> 등의 方法을 利用하여 調劑하였다. 즉 生쥐를 頸椎奪骨하여 屠殺한 후, 摘出

한 胸腺 및 脾臟을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 粉碎하고 滅菌된 stainless mesh로 濾過하여 細胞浮游液을 얻은 후, DPBS-A로 2回 洗滌한 다음 (1,500 rpm에서 10分間 遠心分離), thymocytes 및 splenocytes 浮游液으로 하였다.

Macrophage의 分離는 stress를 負荷하기 3日 前에 생쥐 腹腔에 3% thioglycollate 2 ml를 注入하여 實驗하였다. 腹腔에 cold PBS 10ml를 넣어 腹腔細胞를 收集하였다. 收集한 細胞를 4 °C에서 遠心分離 (1,300 rpm, 10mins)하고 RPMI 배지로 2回 洗滌 후, 直徑 120mm petri dish에 分離하여 CO<sub>2</sub>-incubator에서 培養시키고 2時間 후에 附着되지 않은 細胞를 除去한 다음, 附着한 macrophage를 cell scraper로 分離하여 使用하였다. 生쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 使用하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 µg/ml)을 添加하여 使用하였다.

### 9) Thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率測定

Thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率測定은 Mosmann<sup>22)</sup>이 開發하여 Kotnik 등<sup>23)</sup>이 變形시킨 MTT方法으로 測定하였다. 分離한 thymocytes 및 splenocytes를 RPMI 1640 배지로 細胞浮游液을 調劑한 후, 96-well plate의 各 well에 細胞浮游液 100µl ( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 接種하고 thymocytes에는 concanavalin A (Con A)를, splenocytes에는 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/ml를 添加하거나 添加하지 않은 條件으로 37 °C의 CO<sub>2</sub>-incubator에서 48時間 培養하였다. 培養 終了 4時間 前에 5 mg/ml 濃度로 DPBS-A에 稀釋

된 MTT溶液 20µl를 各 well에 添加하고, 0.1N-HCl에 溶解시킨 10%-SDS 100µl를 各 well에 添加하여 遮光 狀態에서 18時間 더 培養한 후 發色된 各 well의 吸光度를 microplate-reader로 570 nm에서 測定하여 細胞生存率을 算定하였다.

*In vitro* 實驗에서는 分離한 thymocytes 및 splenocytes에 CHT 10, 100 및 1,000 µg/ml를 48 時間 處理하고 동일한 實驗을 實시하였다.

### 10) Thymocytes 및 splenocytes의 DNA fragmentation測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes에 PI buffer (0.1% Na-citrate + 0.2% Triton X-100)에 溶解시킨 propidium iodide (10 µg/ml) 20µl를 넣어 冰冷下에서 30分間 染色한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 測定하였다<sup>24)</sup>.

### 11) Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各各 RPMI 1640 배지로 3回 洗滌하였다. 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 二重 染色하여 4 °C에서 30分間 反應시킨 후 flow cytometer [excitation : 488 nm, emission : 525nm (FITC), 575nm (PE)]로 subpopulation을 測定하였다<sup>25)</sup>.

### 12) Cytokines測定

Splenocytes 培養液 中 cytokines의 測定은 分離한 脾臟으로부터 細胞를 各各 分離하여,  $2 \times 10^7$  cells/ml로 調劑한 다음 96

well plate에 200 $\mu$ l 씩 분주한 후, 72時間 동안 CO<sub>2</sub>-incubator에서 培養하였다. 培養液을 遠心分離 (2,500 rpm, 2mins, 4°C) 한 다음, 上等액 50 $\mu$ l를 取하여 mouse immunoassay kit를 利用하여 cytokines의 量을 測定하였다. 즉 sample 50 $\mu$ l에 assay diluent 50 $\mu$ l를 混合하여 室溫에서 2時間 동안 incubation한 후 4回 洗滌하였다. 洗滌 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 $\mu$ l를 加하여 室溫에서 2時間 incubation한 후, 5回 洗滌하고 substrate solution 100 $\mu$ l를 混合하여 30分 동안 室溫에서 培養하였다. Stop solution 100 $\mu$ l를 加하여 450nm에서 microplate reader로 吸光度를 測定한 후, 미리 作成한 檢量線에 의해 cytokines의 量을 換算하였다<sup>26)</sup>.

### 13) 腹腔 macrophages의 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophages를 2 × 10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/l HEPES, pH 7.2)에 浮游시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 製造는 10 ml의 DPBS-A에 溶解한 후, 瀝過 滅菌하여 -20 °C에서 保管하면서 使用하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 使用하기 直前에 DME 배지에 1/10로 稀釋하여 使用하였다. Chemiluminescence 測定은 luminometer를 利用하여 37 °C에서 測定하였다<sup>27,28)</sup>. 測定用 microplate (white)의 各 well에 準備된 macrophage 浮游液 50 $\mu$ l와 lucigenin 溶液 50 $\mu$ l 및 zymosan 溶液 30  $\mu$ l를 添加하여 最終 volume이 200 $\mu$ l가 되도록 한 후, 37 °C에서 15分間 前處理한 다음, 5分 間隔으로 30分 동안

lucigenin chemiluminescence 量을 測定하였다.

### 14) 腹腔 macrophage의 貪食作用에 의한 engulfment 測定

FITC-conjugated *E. coli* particles를 HBSS에 懸濁시켜 sonification한 후 使用하였으며, trypan blue는 citrate buffer(pH 4.4)에 250  $\mu$ g/ml 濃度로 溶解하여 使用하였다. 分離한 macrophages를 RPMI 1640 배지로 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml 되도록 調整한 후 100 $\mu$ l를 96 well에 分주한 다음, *E. coli* particles을 HBSS 溶液으로 1 mg/ml 되게 調劑한 懸濁液 25 $\mu$ l를 加하여 1時間 동안 CO<sub>2</sub>-incubator에서 培養하였다. 培養液을 除去하고 extracellular fluorescence를 抑制하기 위해 trypan blue 100 $\mu$ l를 添加하여 inverted fluoromicroscope로 觀察하였다<sup>29)</sup>.

### 15) 腹腔 macrophages의 nitric oxide 測定

分離한 macrophage를 24 well plate에 well당 2 × 10<sup>6</sup> cells를 分주한 후 macrophage로 부터 生成되는 nitric oxide (NO)의 量을 Griess法<sup>30)</sup>으로 測定하였다. 各 well에 LPS 1  $\mu$ g/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 添加하여 24時間 培養한 후, 培養液 100 $\mu$ l와 Griess 試藥 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylenediamine · 2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100 $\mu$ l를 混合하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10分間 放置한 후 570nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成한 NaNO<sub>2</sub>의 檢量線에 의해 NO<sub>2</sub>의 濃度를 換算하였다.

### 16) 統計處理

모든 實驗結果들은 mean ± SE로 나타내었고 統計處理는 Student's t-test를 實施하여 p<0.05를 基準으로 有意味性 與否를 判定하였다.

### III. 實驗 結果

#### 1. 血清 中 histamine 含量에 미치는 效果

Stress를 負荷하지 않은 normal群의 血清 中 histamine 含量은  $78.4 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$  이었으나, immobilization-stress를 한 control群은  $102.2 \pm 3.7 \text{ ng/ml}$ 로, cold-stress를 負荷한 control群은  $93.4 \pm 3.6 \text{ ng/ml}$ 로 normal群에 비해 增加하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $94.5 \pm 3.4 \text{ ng/ml}$ 로 control群과 별 差異가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는  $80.2 \pm 3.1 \text{ ng/ml}$ 로 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 1).

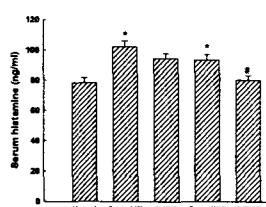


Fig. 1. Effect of CHT on the concentration of serum histamine in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress (IS) for 10 hrs or cold-stress (CS) for 6 hrs at 4 °C. The serum histamine was determined with spectrofluorometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). \*; Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

#### 2. 血清 中 corticosterone 含量에 미치는 效果

Stress를 加하지 않은 normal群의 血清 中 corticosterone 含量은  $401.3 \pm 15.6 \text{ ng/ml}$  이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은  $670.8 \pm 24.7 \text{ ng/ml}$ 로, cold-stress를 負荷한 control群은  $605.8 \pm$

$21.3 \text{ ng/ml}$ 로 normal群에 비해 增加하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $625.9 \pm 25.4 \text{ ng/ml}$ 로 control群과 별 差異가 없었으나, cold-Stress를 加하였을 때는  $510.1 \pm 22.5 \text{ ng/ml}$ 로 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 2).

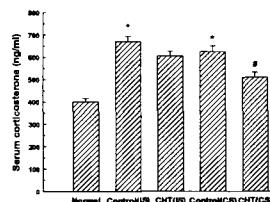


Fig. 2. Effect of CHT on the concentration of serum corticosterone in immobilization -stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The serum corticosterone was determined with spectrofluorometer. The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). \*; Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

#### 3. 腹腔 mast cell로부터 histamine 遊離에 미치는 效果

Control群의 mast cell에 compound 48/80 0.5 µg/ml를 가했을 때 放出되는 histamine量은  $78.6 \pm 3.8\%$  이었다.

CHT 0.1, 1 및 10 mg/ml를 前處理 하였을 때는  $62.3 \pm 3.2\%$ ,  $28.5 \pm 2.4\%$  및  $6.4 \pm 1.2\%$ 로 全濃度에서 腹腔 mast cell로부터 histamine의 放出을 抑制하였다 (Fig. 3).

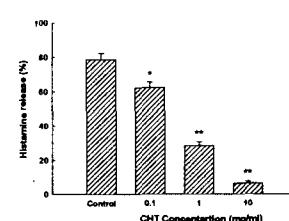


Fig. 3. Effect of CHT on histamine release induced by compound 48/80 from rat peritoneal mast cells *in vitro*.

Various concentration of CHT (0.1, 1.0 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added into the rat peritoneal mast cells 10 mins before compound 48/80 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated. The data represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. ; Significantly different from control group (; p<0.05, \*\*; p<0.001).

#### 4. Thymocytes의 細胞生存率에 미치는 效果

Normal群의 thymocytes에 concanavalin A (Con A)를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 Con A를 處理하였을 때는  $132.5 \pm 2.1\%$ 로 增加하였고, immobilization-stress를 負荷한 control群은 Con A를 處理하지 않았을 때  $79.3 \pm 1.7\%$ 로, Con A를 處理하였을 때는  $110.3 \pm 1.5\%$ 로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였으며, cold-stress를 負荷한 control群은 Con A를 處理하지 않았을 때  $89.7 \pm 1.4\%$ 로, Con A를 處理하였을 때는  $122.1 \pm 1.1\%$ 로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였다.

CHT 500  $\text{mg}/\text{kg}$ 을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 群은 Con A를 處理하지 않았을 때는  $88.3 \pm 1.2\%$ 로, Con A를 處理하였을 때는  $121.8 \pm 2.0\%$ 로, CHT 500  $\text{mg}/\text{kg}$ 을 投與하고 cold -stress를 負荷한 實驗群은 Con A를 處理하지 않았을 때는  $101.2 \pm 1.3\%$ 로, Con A를 處理하였을 때는  $135.4 \pm 1.8\%$ 로 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 4).

CHT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 *in vitro*에서 處理하고 Con A를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 CHT를 處理한 군은 각각  $103.2 \pm 1.4\%$ ,  $111.7 \pm 1.8\%$  및  $122.1 \pm 1.7\%$ 로  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$

$\text{ml}$  이 상의 濃度에서 細胞生存率이 增加하였다. Con A를 處理한 control群의 細胞生存率은  $132.9 \pm 1.4\%$ 이었으며, CHT를 處理한 군은  $136.7 \pm 1.5\%$ ,  $144.6 \pm 1.7\%$  및  $156.9 \pm 1.5\%$ 로  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  이 상의 濃度에서 細胞生存率이 增加하였다 (Fig. 5).

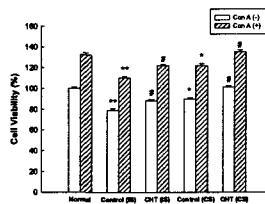


Fig. 4. Effect of CHT on the cell viability of thymocytes in immobilization- stress or cold-stress mice.

CHT (500  $\text{mg}/\text{kg}$ ) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The separated thymocytes ( $1 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ ) were cultured for 48 hrs in RPMI 1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A (Con A). The data represents the mean  $\pm$  SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group (; p<0.01, \*\*; p<0.001). \*; Significantly different from control group (p<0.05). Con A (-); Concanavalin A-nontreated group, Con A (+); Concanavalin-treated group

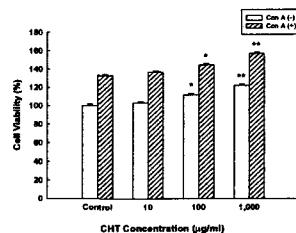


Fig. 5. Effect of CHT on the cell viability of thymocytes *in vitro*.

Various concentration of CHT (10, 100 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added into mouse thymocytes and were cultured for 48 hrs. The data represents the mean  $\pm$  SE from 3 experiments. ; Significantly different from control group (; p<0.01, \*\*; p<0.001).

## 5. Splenocytes의 細胞生存率에 미치는效果

Normal群의 splenocytes에 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 LPS를 처리하였을 때는  $138.5 \pm 1.7\%$ 로 增加하였고, immobilization-stress를 負荷한 control群은 LPS를 처리하지 않았을 때  $78.4 \pm 2.0\%$ 로, LPS를 처리하였을 때는  $116.5 \pm 1.7\%$ 로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였으며, cold-stress를 負荷한 control群은 LPS를 처리하지 않았을 때  $82.5 \pm 1.4\%$ 로, LPS를 처리하였을 때는  $121.7 \pm 1.6\%$ 로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 群은 LPS를 처리하지 않았을 때는  $82.3 \pm 1.8\%$ 로, LPS를 처리하였을 때는  $121.5 \pm 2.1\%$ 로 control群에 비해 별 差異가 없었으며, CHT 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群은 LPS를 處理하지 않았을 때는  $85.6 \pm 1.7\%$ 로, LPS를 처리하였을 때는  $125.3 \pm 1.5\%$ 로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 6).

CHT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 *in vitro*에서 處理하고 LPS를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 CHT를 處理한 군은 각각  $102.5 \pm 1.8\%$ ,  $121.8 \pm 1.3\%$  및  $129.6 \pm 1.7\%$ 로  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 濃度에서 細胞生存率이 增加하였다. LPS를 處理한 control群의 細胞生存率은  $137.8 \pm 1.5\%$  이었으며, CHT를 處理한 군은  $138.2 \pm 1.7\%$ ,  $153.2 \pm 1.8\%$  및  $168.4 \pm 1.8\%$ 로  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 濃度에서 細胞生存率이 增加하였다 (Fig. 7).

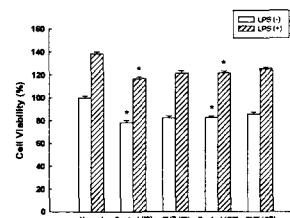


Fig. 6. Effect of CHT on the cell viability of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The separated splenocytes ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI 1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide (LPS). The data represents the mean ± SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). LPS(-); Lipopolysaccharide-nontreated group, LPS(+); Lipopolysaccharide-treated group

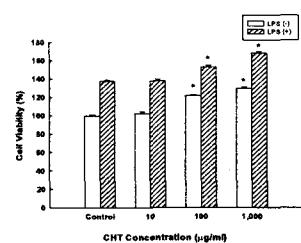


Fig. 7. Effect of CHT on the cell viability of splenocytes *in vitro*.

Various concentration of CHT (10, 100 and 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added into mouse splenocytes and were cultured for 48 hrs. The data represents the mean ± SE from 3 experiments. ; Significantly different from control group ( $p<0.001$ ).

## 6. Thymocytes의 DNA fragmentation에 미치는效果

Normal群의 DNA fragmentation은  $2.7 \pm 0.2\%$  이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은  $11.8 \pm 0.7\%$ 로, cold-stress를 負荷한 control群은  $7.5 \pm 0.5\%$ 로 normal群에 비해 增加하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $9.3 \pm 0.5\%$ 로, cold-stress를 負荷하였을 때

는  $5.8 \pm 0.4\%$ 로 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 8).

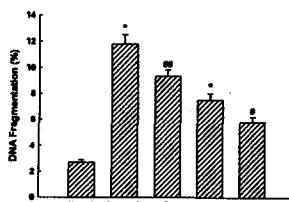


Fig. 8. Effect of CHT on DNA fragmentation of thymocytes in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT ( $500 \text{ mg/kg}$ ) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at  $4^\circ\text{C}$ . The separated thymocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. \*: Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). #: Significantly different from control group (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ ).

## 7. Splenocytes의 DNA fragmentation에 미치는 效果

Normal群 splenocytes의 DNA fragmentation은  $2.8 \pm 0.2\%$ 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은  $13.8 \pm 0.6\%$ 로, cold-stress를 負荷한 control群은  $11.7 \pm 0.5\%$ 로 normal群에 비해 增加하였다.

CHT  $500 \text{ mg/kg}$ 을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $12.6 \pm 0.5\%$ 로, cold-stress를 負荷하였을 때는  $11.3 \pm 0.6\%$ 로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 9).

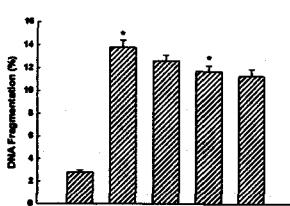


Fig. 9. Effect of CHT on DNA fragmentation of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT ( $500 \text{ mg/kg}$ ) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at  $4^\circ\text{C}$ . The separated splenocytes were stained with propidium iodide. DNA fragmentation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. \*: Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ).

## 8. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 效果

Normal群 thymocytes 중  $\text{CD}4^+$  細胞는  $12.5 \pm 0.3\%$ ,  $\text{CD}8^+$  細胞는  $2.9 \pm 0.2\%$ 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群의  $\text{CD}4^+$  細胞는  $17.8 \pm 0.5\%$ 로,  $\text{CD}8^+$  細胞는  $3.1 \pm 0.3\%$ 로 normal群에 비해  $\text{CD}4^+$  細胞의 population이 增加하였으며, cold-stress를 負荷한 control群의  $\text{CD}4^+$  細胞는  $12.7 \pm 0.3\%$ 로,  $\text{CD}8^+$  細胞는  $3.0 \pm 0.2\%$ 로 normal群에 비해 별 差異가 없었다.

CHT  $500 \text{ mg/kg}$ 을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때  $\text{CD}4^+$  細胞는  $15.5 \pm 0.4\%$ 로 control群에 비해 減少하였으나,  $\text{CD}8^+$  細胞는  $3.0 \pm 0.3\%$ 로 control群에 비해 별 差異가 없었다. Cold-stress를 負荷하였을 때  $\text{CD}4^+$  細胞는  $12.5 \pm 0.3\%$ 로,  $\text{CD}8^+$  細胞는  $2.8 \pm 0.2\%$ 로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 10).

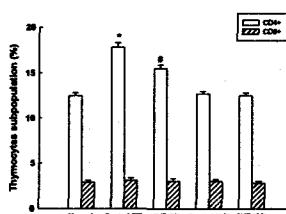


Fig. 10. Effect of CHT on subpopulation of thymocytes in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 mins 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 ( $p<0.05$ ).

### 9. Splenocytes의 subpopulation에 미치는效果

Normal群 splenocytes 중 B220<sup>+</sup> 細胞는 36.7 ± 1.2%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 21.6 ± 1.2% 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 31.2 ± 1.0%로, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 26.5 ± 1.1%로, cold-stress를 負荷한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 32.5 ± 1.2%로, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 25.8 ± 1.2%로 normal群에 비해 B220<sup>+</sup> 細胞의 population은減少하고 Thy1<sup>+</sup> 細胞의 population은增加하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 B220<sup>+</sup> 細胞는 32.4 ± 1.7%로 control群에 비해 별 差異가 없었으나, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 23.5 ± 1.2%로 control群에 비해減少하였으며, cold-stress를 負荷한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 33.5 ± 1.3%로 control群에 비해 별 差異가 없었으나, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 22.5 ± 1.1%로 control群에 비해减少하였다.

Normal群 splenocytes 중 CD4<sup>+</sup> 細胞는 16.4 ± 0.4%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 6.7 ± 0.2% 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 19.3 ± 0.5%로, CD8<sup>+</sup> 細胞는 9.8 ± 0.4%로, cold-stress를 負荷한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 18.9 ± 0.3%로, CD8<sup>+</sup> 細胞는 8.8 ± 0.3%로

normal群에 비해 CD4<sup>+</sup> 細胞 및 CD8<sup>+</sup> 細胞의 population이增加하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 CD4<sup>+</sup> 細胞는 17.8 ± 0.4%로 control群에 비해减少하였으나, CD8<sup>+</sup> 細胞는 9.1 ± 0.2%로 control群에 비해 별 差異가 없었다. Cold-stress를 負荷한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 17.4 ± 0.4%로 control群에 비해减少하였으나, CD8<sup>+</sup> 細胞는 7.9 ± 0.3%로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 11).

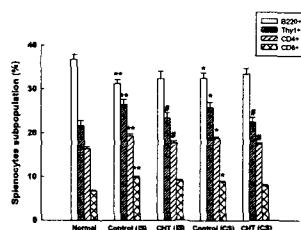


Fig. 11. Effect of CHT on subpopulation of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. 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 ( ;  $p<0.05$ , ;  $p<0.01$ ). \*; Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

### 10. Cytokine 分泌에 미치는效果

Normal群 splenocytes培養液 중 γ-IFN의 양은 786.5 ± 23.5 pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는 512.5 ± 21.4 pg/ml로 normal群에 비해减少하였으며, cold-stress를 負荷한

control群에서는  $635.7 \pm 22.8$  pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $598.7 \pm 21.7$  pg/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는  $715.3 \pm 22.6$  pg/ml로 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 12).

Normal群 splenocytes培養液 중 IL-2의 양은  $478.3 \pm 19.7$  pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는  $298.3 \pm 18.9$  pg/ml로, cold-stress를 負荷한 control群에서는  $357.4 \pm 20.7$  pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $324.7 \pm 23.6$  pg/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는  $397.2 \pm 22.6$  pg/ml로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 13).

Normal群 splenocytes培養液 중 IL-4의 양은  $187.9 \pm 17.6$  pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는  $112.5 \pm 14.8$  pg/ml로, cold-stress를 負荷한 control群에서는  $126.8 \pm 11.4$  pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는  $116.4 \pm 12.5$  pg/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는  $131.3 \pm 11.7$  pg/ml로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 14).

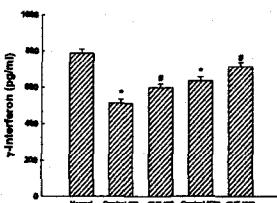


Fig. 12. Effect of CHT on the production of  $\gamma$ -interferon from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The production of  $\gamma$ -interferon was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). \*; Significantly different from control group ( $p<0.05$ ).

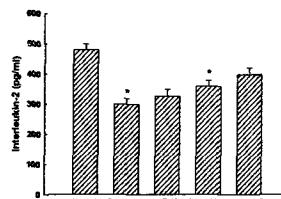


Fig. 13. Effect of CHT on the production of interleukin-2 from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The production of interleukin-2 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ).

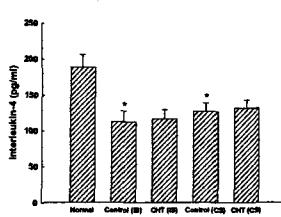


Fig. 14. Effect of CHT on the production of interleukin-4 from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. The production of interleukin-4 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.01$ ).

## 11. 腹腔 macrophages의 phagocytic activity에 미치는效果

Normal群의 macrophages로부터生成되는 CL量 보다 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷한 control群의 macrophages에서 生成되는 CL量은 normal群에 비해 현저히 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 CL量은 control群에 비해 별 差異가 없었으나, CHT 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 CL量은 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 15). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles의 貪食 實驗에서도 동일한 結果를 관찰할 수 있었다 (Fig. 16).

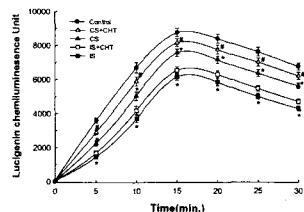


Fig. 15. Effect of CHT on lucigenin chemiluminescence in immobilization stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and the separated peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean $\pm$ SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ( $p<0.001$ ). ; Significantly different from control group ( $p<0.001$ ).

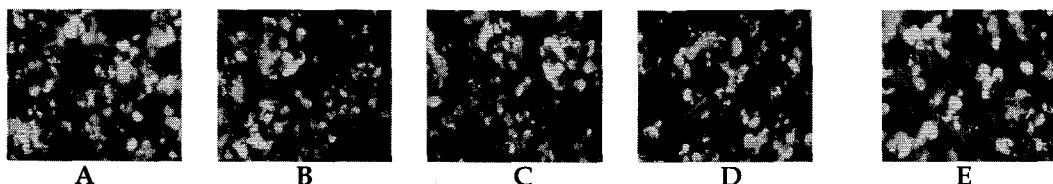


Fig. 16. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages.

Inverted fluoromicroscope photomicrographs (200 $\times$ ) showing uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages of control mice (A), immobilization-stress mice (B), cold-stress mice (C), immobilization-stress mice administered with CHT (D) and cold-stress mice administered with CHT (E).

## 12. 腹腔 macrophages의 nitric oxide 生成에 미치는效果

Normal群의 macrophages로부터 生成되는 nitric oxide (NO)量은 LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하지 않았을 때  $2.1 \pm 0.2$   $\mu$ M 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하였을 때  $17.7 \pm 1.4$   $\mu$ M로 增加하였으며, immobilization-stress를 負荷한 control群의 macrophages에서 生成되는 NO量은

LPS와  $\gamma$ -IFN을 處理하였을 때  $12.1 \pm 1.2$   $\mu$ M로, cold-stress를 負荷한 群은  $13.3 \pm 1.2$   $\mu$ M로 normal群에 비해 減少하였다.

CHT 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 NO量은  $13.5 \pm 1.1$   $\mu$ M로 control群에 비해 별 差異가 없었으나, CHT 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群의

macrophages에서 生成되는 NO量은 16.8 ± 1.3 μM로 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 17).

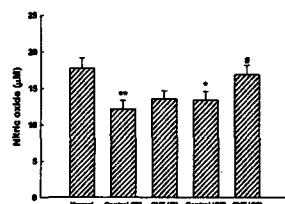


Fig. 17. Effect of CHT on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in immobilization-stress or cold-stress mice.

CHT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and mice were treated by immobilization-stress for 10 hrs or cold-stress for 6 hrs at 4 °C. 3% thioglycollate was injected i.p. at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2 hrs adherence period were cultured in RPMI 1640 media in the presence LPS and γ-interferon. The data represents the mean±SE of 5 mice. ; Significantly different from normal group ('; p<0.05, "; p<0.01). \*; Significantly different from control group (p<0.05).

#### IV. 考 察

韓醫學에서는 인간에게 變化를 일으키는 要因으로 個人生活의 失常과 四時氣候變化의 失常으로 論하였는데<sup>31)</sup>, 要因들에 대한 身體反應을 氣의 變化로 설명하여, 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆, 氣滯 등의 範疇에서 다루고 있다<sup>4,5)</sup>.

長期의인 精神 刺戟이나 갑자기 極烈한 精神의인 상처를 받으면 生理的으로 調節할 수 있는 正常範圍를 초과하여 氣機가 結聚하여 각종 病理變化가 생기는데 이를 七情傷이라 하며 氣鬱, 또는 鬱滯의 痘證을 나타낸다<sup>31,32)</sup>. 《素問·陰陽應象大論》 33)에서는 “喜傷心 怒傷肝 思傷脾 憂傷肺 恐傷腎”이라 하여 七情의 偏勝이 五臟에 미치는 影響을 表現하고 있다. 이러한 七

情傷은 현대의 stress에 해당되는 것으로 보고 있으며, 五藏 中에서도 주로 肝臟에 影響을 미친다고 한다<sup>34)</sup>.

淸肝解鬱湯은 明代 陳<sup>7)</sup>의 《外科正宗》에 “治一切憂鬱氣滯 乳結腫硬 不疼不痒 久漸作痛 或胸膈不利 肢體倦怠 面色萎黃 飲食減少”라 記載되었으며, 陳皮, 白芍, 川芎, 當歸, 生地黃, 半夏, 香附子, 各 八分, 青皮, 遠志, 茯神, 貝母, 蘇葉, 桔梗, 各 六分, 甘草, 山梔子, 木通 各 四分으로 構成되어 있다.

通治血病하는 四物湯과 通治痰飲하는 二陳湯을 合한 處方에, 理氣化痰 解鬱清火하는 香附子, 貝母, 茯神, 青皮, 遠志, 桔梗, 蘇葉, 梔子, 木通을 加하여 構成되어, 解鬱理氣 活血祛痰하여 肝臟鬱火를 清하고 痰瘀가 結한 것을 除去하는 處方이다<sup>11, 35)</sup>.

乳房은 女人에게 性命之根이며 產育에 이로써 哺養하는데, 經絡上 乳頭는 肝經, 乳房은 胃經에 속하며, 乳汁은 氣血이 生化하며 源出於胃하니 水穀의 精華가 되고, 乳汁分泌는 肝의 疏泄機能으로 調節하게 된다<sup>8)</sup>.

Stress가 免疫 및 炎症反應에 대해 細胞 및 分子 水準에서의 作用 機轉에 대해서는 正確하게 究明되지 않았으나<sup>36)</sup>, stress는 免疫能이 抑制된 動物에서 IL-12 및 γ-IFN의 分泌를 減少시키며 免疫能을 더욱 減少시키고<sup>37)</sup>, NK cell의 細胞毒性 및 lymphocytes의 수를 減少시키며<sup>38)</sup>, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) 系를 活性화하여 血中 corticosterone 및 pro-inflammatory cytokine의 濃度를 增加시키는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>.

Stress에 反應하는 生體의 가장 重要的 pathway는 HPA이며, HPA가 活性화되면

glucocorticoids가 합성되어 副腎에서 循環系로 分泌되어, gluconeogenesis, protein catabolism, glucose transport와 같은 多樣한 代謝過程을 調節하는 것으로 報告되었다<sup>40</sup>. 分泌된 glucocorticoids는 lymphocyte s의 programmed cell death를 誘導하기 때문에<sup>41,42</sup>, HPA pathway를 活性化하는 강한 stress는 生體에서 thymocytes의 apoptosis를 誘導하여 免疫能을 抑制하는 것으로 알려져 있다<sup>43,44</sup>. 또한, catecholamine과 같은 生體 hormone含量도 增加되어 免疫能을 抑制하는 것으로 알려져 있다<sup>45,46</sup>.

한편, 精神的인 stress는 phagocytosis의 減少, lymphocyte의 反應性 減少 및 NK cell의 活性을 減少시킴으로써 bacteria나 virus에 의한 疾病 誘發率을 增加시키며<sup>47,48</sup>, 癌細胞의 增殖도 促進시키는 것으로 報告되었다<sup>49</sup>.

이에 著者は 清肝解鬱湯(CTH)의 stress에 대한 作用機轉을 究明할 目的으로, 生쥐에 清肝解鬱湯을 經口投與한 후 immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 加하고 血中 histamine과 corticosterone量의 變化 및 immune system의 變化를 觀察하였다.

Stress는 同一한 stress라 하더라도 주어지는 時間 및 使用한 쥐의 strain에 따라 免疫系에 미치는 影響에 差異가 있다고 알려져 있다<sup>50,51</sup>.

생쥐에 immobilization-stress를 10 時間 負荷하였을 때와 cold-stress를 6 時間 負荷하였을 때 각각 serum histamine量은 stress를 負荷하지 않은 normal群에 비해 增加하였으며, CHT를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 serum histamine量은 control群과 별 差異가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는 control群에

비해 減少하였다 (Fig. 1). 實驗結果 immobilization-stress가 cold-stress에 비해 stress의 強度가 강하였으며, CHT는 약한 stress일 경우에는 histamine의 分泌를 抑制하였다.

생쥐에 immobilization-stress를 10 時間 負荷하였을 때와 cold-stress를 6 時間 負荷하였을 때 각각 serum corticosterone量은 normal群에 비해 현저히 增加하였으며, CHT를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 serum corticosterone量은 control群과 별 差異가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 2). CHT는 약한 stress일 경우에는 corticosterone의 分泌를 抑制하였다.

본 實驗에서 CHT를 投與하고 cold-stress를 負荷하였을 때 histamine 및 corticosterone의 分泌가 同시에 減少하였다는 結果는 CHT가 histamine의 分泌를 抑制하여 corticosterone의 分泌를 抑制하는 것이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

Mast cell에 CHT를 前處理하고 탈과립을 促進하는 compound 48/80을 處理하였을 때 CHT는 0.1 mg/ml 이상의 濃度에서 mast cell로부터 histamine 分泌를 抑制하였다 (Fig. 3). 이는 CHT가 mast cell로부터 histamine의 탈과립을 抑制하여 corticosterone을 分泌를 抑制함을 강력히 시사하는 것이다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 thymocytes의 細胞生存率은 모두 減少하였으며, 이때에도 immobilization-stress가 cold-stress 보다 thymocytes의 細胞生存率을 강하게 抑制하였다. CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 thymocytes의 細胞生

存率은 Con A를 處理하지 않았을 때나 Con A를 處理하였을 때 모두 細胞生存率이 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 4). 이는 CHT가 stress에 의해 減少되는 thymocytes의 細胞生存率을 增加시켜 免疫能을 增強시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 이의 作用이 CHT의 直接作用에 의한 것인가를 확인하기 위해 CHT 10, 100 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 *in vitro*에서 thymocytes에 處理하였을 때 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 濃度에서 細胞生存率이 增加하였다 (Fig. 5). 이 結果는 CHT의 作用이 直接作用에 의해 기인되고 있음을 의미하는 것이다.

또한, immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 細胞生存率도 모두 normal群에 비해 減少하였으며, 이 때에도 immobilization-stress가 cold-stress 보다 splenocytes의 細胞生存率을 강하게 抑制하였다. CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때는 splenocytes의 生存率이 control群과 비교하여 별 差異가 없었다 (Fig. 6). 이러한 結果는 stress를 負荷하고 分離한 T cell은 Con A에 대한 反應性이 增加되나, stress를 負荷하고 分離한 B cell은 LPS에 대한 反應性에 變化가 없다는 報告<sup>52)</sup>와 stress에 의해 T cell의 增殖이 抑制된다는 報告<sup>53)</sup>와 비교하였을 때 stress가 T cell 및 B cell에 서로 다른 影響을 줄 수 있음을 의미하는 것이다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 負荷하였을 때 thymocytes의 DNA fragmentation이 normal群에 비해 增加하였으며, CHT를 投與하고 stress를 加하였을 때 DNA fragmentation은 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 8). 또한, immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 負荷하

였을 때 splenocytes의 DNA fragmentation이 normal群에 비해 增加하였으며, CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 DNA fragmentation이 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 9). 이러한 結果는 immobilization-stress 및 cold-stress가 thymocytes 및 splenocytes의 apoptosis를 誘導하여 細胞生存率을 減少시킴을 시사하는 것이다. CHT를 投與하였을 때 thymocytes일 경우에는 stress에 의해 誘導된 apoptosis를 減少시켜 細胞生存率을 增加시키나, splenocytes일 경우에는 stress에 의해 誘導된 apoptosis에 별 影響을 주지 않았다.

Stress에 의한 thymocytes의 subpopulation 變化에 미치는 CHT의 影響을 관찰하였을 때 immobilization-stress를 負荷하였을 경우에는 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> cell의 population이 normal群에 비해 增加하였으나, CD8<sup>+</sup> cell의 population은 normal群과 差異가 없었으며, cold-stress를 負荷하였을 경우에는 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> cell의 population이 normal群에 비해 별 差異가 없었다. CHT를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 control群에 비해 CD4<sup>+</sup> cell의 population이 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 10). 이 結果는 CHT가 immobilization-stress에 의해 增加되는 CD4<sup>+</sup> cell의 population을 조절하여 免疫能을 조절할 수 있음을 시사하는 것이다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 B220<sup>+</sup> cell의 population은 減少하고, Thy1<sup>+</sup> cell의 population은 增加하였다. CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 B220<sup>+</sup> cell의 population은 control群에 비해 별 差異가 없었으나, Thy1<sup>+</sup> cell

의 population은 減少하였다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 CD4<sup>+</sup> cell 및 CD8<sup>+</sup> cell의 population은 모두 normal群에 비해 增加하였으나, CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold- Stress를 加하였을 때 CD4<sup>+</sup> cell의 population은 control群에 비해 減少하였으나, CD8<sup>+</sup> cell의 population은 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 11). 이러한 實驗結果는 CHT가 stress에 의해 變化되는 splenic CD4<sup>+</sup> cell의 population을 조절하여 免疫能을 조절할 수 있음을 의미하는 것이다.

Stress에 의해 splenocytes에서 分泌되는 cytokines의 變化에 미치는 CHT의 影響을 관찰하고자, immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때  $\gamma$ -IFN, IL-2 및 IL-4의 分泌는 normal群에 비해 모두 抑制되었으며, CHT를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때  $\gamma$ -IFN의 分泌는 control群에 비해 增加하였으나, IL-2 및 IL-4의 分泌는 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 12-14). CHT 投與에 의해  $\gamma$ -IFN의 分泌가 增加된 것은 CHT가 주로 Th1 cell의 活性을 增加시키고 있음을 시사하는 것이다.

Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence(CL) 를 測定한 結果 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 normal群에 비해 CL量이 減少하였으며, immobilization-stress가 cold-stress보다 더욱 강하게 CL量을 減少시켰으나, CHT를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 control群에 비해 CL量이 별 差異가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는 CL量이 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 15, 16). 이 結果는 CHT가 cold-stress

에 의해 低下되는 phagocytosis를 回復시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 macrophages로부터 NO量은 normal群에 비해 減少하였으나, CHT를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 control群에 비해 NO量이 별 差異가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는 NO量이 增加하였다 (Fig. 17). 본 實驗에서 stress에 의해 NO 生成이 抑制되고 phagocytic activity가 抑制되었다는 것은 stress에 의한 phagocytic activity의 減少가 NO가 아닌 다른 경로에 의해 조절되고 있음을 시사하는 것이다.

Stress에 의해 減少된 phagocytic activity가 CHT 投與에 의해 增加되었다는 實驗結果는 CHT가 macrophages가 關與하는 非特異的 免疫反應을 增強시킬 수 있음을意味하는 것이다.

以上의 實驗結果로 보아 清肝解鬱湯은 immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 增加되는 histamine 및 corticosterone의量을 抑制하고, 減少되는 特異的 및 非特異的 免疫能을 回復시켜 stress를 抑制한다.

## V. 結論

清肝解鬱湯 (CHT)을 생쥐에 經口投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 血中 hormone 및 免疫系의 變化에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 serum histamine과 corticosterone量은 增加되었으며, cold-stress에 의해 增加된 histamine와 corticosterone量은 CHT를 投與하였을 때 減少되었

- 다.
2. CHT는 mast cell로부터 histamine 分泌를 0.1 mg/ml 이상의濃度에서 抑制하였다.
  3. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 thymocytes의 細胞生存率은 減少되었으며 CHT를 投與하였을 때 增加하였다.
  4. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 細胞生存率은 減少되었으며 CHT를 投與하였을 때 별 差異가 없었다.
  5. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 thymocytes와 splenocytes의 DN A fragmentation은 增加되었으며 CH T를 投與하였을 때 thymocytes의 DN A fragmentation은 減少하였다.
  6. Immobilization-stress에 의해 thymocytes의 CD4<sup>+</sup> 細胞의 population은 增加되었으나, CHT를 投與하였을 때 減少하였다.
  7. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 B220<sup>+</sup> 細胞의 population은 減少되고 Thy1<sup>+</sup> 細胞의 population은 增加되었으며, splenic CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 細胞의 population은 增加되었으나, CHT를 投與하였을 때 immobilization stress 및 cold-stress에 의해 增加된 Thy1<sup>+</sup> 細胞는 減少되었고, 增加된 splenic CD4<sup>+</sup> 細胞의 population이 減少되었다.
  8. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 γ-IFN, IL-2 및 IL-4의 分泌가 減少되었으며, CHT를 投與하였을 때 IL-2의 分泌가 增加되었다.
  9. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages의 phagocytosis는

減少되었으나, CHT를 投與하였을 때 cold-stress에 의해 저하된 phagocytosis가 增加되었다.

10. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages로부터 NO 分泌가 減少되었으나, CHT를 投與하였을 때 cold-stress에 의해 저하된 NO 分泌가 增加되었다.

以上의 實驗結果 清肝解鬱湯은 immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 增加되는 histamine 및 corticosterone의 量을 抑制하고, 減少되는 特異的 및 非特異的 免疫能을 回復시켜 stress를 抑制하는 것으로 料된다.

투고일 : 2005년 07월 29일  
 심사일 : 2005년 08월 02일  
 심사완료일 : 2005년 08월 10일

## 參考文獻

1. Radosevic-Vidacek B. et al. Stress and allergy. Arh Hig Rada Toksikol. 2004; 55(2-3): 205-211.
2. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞解釋. 서울: 동양의학연구원 출판사. 1985; 158.
3. 金鍾佑, 金知赫 등. Stress의 韓醫學的理解. 東醫神經精神科學會誌. 1993; 4(1); 19-26.
4. 金相孝. 東醫神經精神科學. 서울: 杏林出版社. 1995; 57-62, 79, 146, 258-266, 277-278.
5. 黃義完, 金知赫. 東醫精神醫學. 서울: 現代醫學書籍社. 1987; 99-109, 608-616, 626, 651-657.
6. 박찬국. 痘因病理學. 서울: 傳統醫學研究所. 1978; 187.

7. 陳實功. 外科正宗. 北京: 人民衛生出版社. 1964; 144, 147.
8. 宋柄基. 漢方婦人科學. 서울: 杏林出版社. 1995; 263-269, 278-286, 609.
9. 全國韓醫科大學 肝系內科學教室. 肝系內科學. 서울: 東洋醫學研究院. 1989; 4 4, 45, 661.
10. 侯如蓉 主編. 乳腺癌的防治. 北京: 科學技術文獻出版社. 1996; 294.
11. 黃度淵. (對譯)證脈方藥合編. 서울: 南山堂. 1977; 250.
12. 서정민, 유통열. 清肝解鬱湯의 消炎, 鎮痛, 免疫細胞 및 乳房癌細胞에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997; 10 (2): 69-83.
13. Eun JS, Oh CH. et al. Effects of Glycyrrhizae Radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. Kor J Pharmacogn. 1989; 20(1): 37-42.
14. Morishita S. et al. Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. Pathophysiology. 1997; 4: 213-219.
15. Endo Y. In methods in Enzymology. New York: Academic Press. 1983; 94-100.
16. Zenker N, Bernstein DE. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. J Biol Chem. 1958; 231: 695.
17. Kanemoto T. et al. Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. Int Arch Allergy Immunol. 1993; 100: 99.
18. Yurt RW. et al. Native heparin from rat peritoneal mast cells. J Biol Chem. 1977; 252: 518.
19. Harvima RJ. et al. Optimization of histamine radioenzymatic assay with purified histamine N-methyltransferase. Clinica Chinica Acta. 1988; 171: 247.
20. Wysocki LJ, Sato VL. "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection, Proc. Natl Acad Sci USA. 1978; 75(6): 2844.
21. Mizel SB. et al. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P3 88D1. J Immunol methods. 1979; 120: 1497.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol methods. 1983; 65: 55.
23. Kotnic V, Fleischmann WRJr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J Immunol methods. 1990; 129: 23.
24. Nicoletti I. et al. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991; 139: 271.
25. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J Exp Med. 1994; 179: 873-879.
26. Eun JS. et al. Regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. Arch Pharm Res. 2000; 23(5): 531-534.

27. Boudard F. et al. Chemiluminenscence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J Immunol Methods.* 1994; 174: 259.
28. Blair AL. et al. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a micro titer plate format. *J Immunol Method.* 1988; 112: 163.
29. Chok PW, Choon SP. et al. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J Immuno Methods.* 1993; 162: 1.
30. Rocket KA, Awburn MM. et al. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun.* 1991; 59(9): 3280.
31. 전국한의과대학 한방병리학교실. 東醫病理學. 서울: 일중사. 1999; 37, 120.
32. 傳統醫學研究所 編纂. 東洋醫學大辭典. 서울: 成輔社. 2000; 2678.
33. 洪元植 譯. (校勘直譯)黃帝內經素問. 서울: 傳統文化研究會. 1992; 43, 44, 59, 239.
34. 李光濬. 韓方心理學. 서울: 學文社. 2002; 228, 364.
35. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 영림사. 1998; 354, 463, 349, 302, 496, 125, 460, 315, 167.
36. Pruett SB. Stress and the immune system. 2003; 9(3): 133-153.
37. Cao L. et al. Stress causes a further decrease in immunity to herpes simplex virus-1 in immunocompromised hosts. *J Neuroimmunol.* 2004; 156(1-2): 21-30.
38. Sheridan JF. et al. Experimental models of stress and wound healing. *World J Surg.* 2004; 28(3): 327-330.
39. Wrona D. et al. Blood and spleen natural killer cell cytotoxicity after exposure to open field stress in rats, the effect of spontaneous locomotor activity. *J Neuroimmunol.* 2004; 150(1-2): 88-97.
40. Robinson RG. et al. The effect of insulin-induced hypoglycemia on gene expression in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat. *Endocrinology.* 1992; 130: 920-925.
41. Compton MM. Cidlowski JA. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology.* 1986; 118: 38-45.
42. Schwartzman RA. Cidlowski JA. Intracellular deoxy-ribonucleic acid cleavage activity in apoptotic thymocytes detection and endocrine regulation. *Endocrinology.* 1991; 128: 1190-1197.
43. Tanaka M. et al. Naloxone enhances stress-induced noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Life Sci.* 1982; 30(19): 1663-1669.
44. Eun JS. et al. Effects of Glycyrrhizae Radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. *Kor J Pharmacogn.* 1989; 20(1): 37-42.
45. Tanaka M. et al. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982; 16(2): 315-319.
46. Shin JS. et al. Effects of berberine on serum levels of catecholamines after i

- immobilization stress in mice. Kor J Clin Pharm. 1997; 7(2): 81-85.
47. Nagata S. Stress-induced immune changes, and brain-immune interaction. J UOEH. 1993; 15(2): 161-171.
48. Teshima H. et al. Prevention of immunosuppression in stressed mice by neurotropin(NSP). Life Sci. 1990; 47(10): 869-876.
49. Toge T. et al. Effects of surgical stress on natural killer activity, proliferative response of spleen cells and cytotoxic activity of lung macrophages in rats. 1981; 72(5): 790-794.
50. Schedlowski M. Schmidt RE. Stress and the immune system. Naturwissenschaften. 1996; 83(5): 214-220.
51. Shanks N. Kusnecov AW. Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice in vivo dependence on macrophages. Physiol Behav. 1998; 65(1): 95-103.
52. Lysle DT. et al. Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice evidence for enhancement of mitogenic responsiveness. Brain Behav Immun. 1990; 4(4): 269-277.
53. Gazda LS. et al. Stressor exposure produces long-term reductions in antigen-specific T and B cell responses Stress. 2003; 6(4): 259-267.