

## 解肝煎이 생쥐의 Immobilization-Stress 및 Cold-Stress에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실  
황태원, 심호철, 김송백, 유성근, 조한백

### ABSTRACT

#### Effects of *Haeganjeon* on Immobilization-Stress or Cold-Stress in Mice

Tae-Won Hwang, Ho-Cherl Sim, Song-Baeg Kim, Sim-Keun Yoo, Han-Back Cho  
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,  
college of Oriental Medicine, Wonkwang university.

**Purpose** : Investigate the effects of *Haeganjeon* water extract (HGJ) on immobilization-stress or cold-stress in C57BL/6J mice.

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

**Results** : HGJ decreased the serum level of histamine and corticosterone increased by immobilization-stress or cold-stress. HGJ inhibited the release of histamine from mast cells. In addition, HGJ enhanced the cell viability of thymocytes decreased by immobilization-stress or cold-stress and decreased DNA fragmentation of thymocytes increased by immobilization-stress or cold-stress. Also, HGJ increased the cell viability of splenocytes decreased by cold-stress and decreased DNA fragmentation of splenocytes increased by cold-stress. HGJ decreased the population of thymic CD4+ cells increased by immobilization-stress. HGJ increased the population of B220+ cells decreased by immobilization-stress and decreased the population of Thy1+ cells increased by immobilization-stress. Also, HGJ decreased the population of splenic CD4+ cells increased by immobilization-stress. HGJ enhanced the production of  $\gamma$ -interferon decreased by immobilization-stress or cold-stress and increased the production of interleukin-4 decreased by immobilization-stress. Furthermore, HGJ enhanced the phagocytic activity decreased by immobilization-stress or cold-stress and enhanced the level of nitric oxide decreased by immobilization-stress or cold-stress.

**Conclusion** : HGJ 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** : *Haeganjeon*(HGJ), immobilization-stress, cold-stress, histamine, corticosterone, immune response

이 논문은 2004년도 원광대학교 연구비지원에 의하여 연구됨

## I. 緒 論

解肝煎은 明代 張<sup>1)</sup>의 《景岳全書》에 最初로 記載된 以來, 肝氣鬱結로 인한 鬱證, 腫脹, 痞滿 등을 治療하기 위해 臨床에서 널리 應用되어온 處方이다<sup>2,3)</sup>.

Stress란 個人으로 하여금 適應하기를 強要하는 身體的 또는 心理的인 壓迫狀態를 말하며 生體에 가해진 各種의 有害因子에 대한 反應과 그에 따른 防禦反應의 總和로 定義된다<sup>4)</sup>.

韓醫學에서는 stress를 氣의 不足과 循環障礙로 發生하여 모든 病의 原因이 될 수 있다고 본다<sup>5)</sup>. stress로 誘發되는 疾患은 直接 五臟을 傷하거나 또는 臟腑氣機 異常을 招來하게 된다<sup>6)</sup>. 특히 五臟中 肝臟의 疏泄機能이 stress와 密接한 關聯이 있는데, 《素問·靈蘭秘典論》<sup>7)</sup>에 肝이 神志活動에 있어 思考計測을 하여 外界事物에 對應하는 機能에 重要的 影響을 미친다고 하였다<sup>8)</sup>.

免疫系에 대한 stress의 影響은 動物의 種類, stress의 性質, 動物의 生理的인 狀態 등에 따라 상당히 多樣하게 나타날 수 있지만 一般的으로 stress는 免疫反應을 抑制하는 것으로 報告되고 있다<sup>9)</sup>.

이에 著者는 肝氣鬱結로 인한 多樣한 症狀에 活用되는 解肝煎의 stress에 대한 作用機轉을 究明하고자, 생쥐에 解肝煎을 經口投與한 후 immobilization-stress 및 cold-stress를 各各 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

#### 1) 實驗動物

本 實驗에 使用한 mouse는 C57BL/6J계 수컷  $18 \pm 2g$ 을 大韓實驗動物(株)에서 購入하여, 溫度  $20 \pm 3^{\circ}C$ , 濕度  $50 \pm 5\%$ , dark/light 12時間, 1週日 以上 實驗室에 適應시킨 후 使用하였으며, 固形飼料과 물을 自由스럽게 攝取하도록 하였다.

#### 2) 試藥 및 器具

實驗에 使用한 試藥은 phospho-cellulose powder, orthop hthal aldehyde는 Wako C o., histamine  $\cdot 2HCl$ , 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  $\gamma$ -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., 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), Micro plate-Reader (Dynatech MR5000), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), spectrofluorometer (Kotron Co.) 등을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

本 實驗에 使用한 解肝煎의 構成은 張<sup>1)</sup>의 《景岳全書》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하여 使用하였고 그 內容과 1貼의 分量은 다음과 같다.

# 解肝煎(HGJ)의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量(g)
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	6.0
半夏	Pinelliae Tuber	6.0
厚朴	Magnoliae Cortex	6.0
茯苓	Hoelen	6.0
蘇葉	Perillae Herba	4.0
芍藥	Paeoniae Radix	4.0
砂仁	Amomi Semen	2.8
生薑	Zingiberis Rhizoma	6.0
Total		40.8

處方 3貼 分量을 蒸溜水 2,000ml로 2回 加熱 抽出, 濾過하여 濾液을 rotary evaporator로 濃縮한 다음, freeze dryer로 凍結乾燥하여 解肝煎 粉末 19.6g (以下 HGJ라 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 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 HGJ 500mg/kg을 1日 1回씩 7日間 經口投與한 다음 생쥐를 플라스틱 圓筒에 넣어 못 움직이게 10時間 동안 immobilization-stress를 加한 후 實驗에 使用하였다<sup>10)</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 HGJ 500mg/kg을 1日 1回씩 7日間 經口投與한 다음 생

쥐를 4°C 冷藏室에서 6時間 넣어 놓은 후 實驗에 使用하였다<sup>11)</sup>.

4) 血清 中 histamine 含量 測定

Stress를 加한 생쥐를 斷頭하여 얻은 血液을 遠心分離 (3,000rpm, 10mins)하여 血清을 얻었다. 血清 1ml당 0.4N-HClO<sub>4</sub> 2.5 ml를 加하여 蛋白質을 除去한 후, 激烈하게 振蕩하고 遠心分離 (3,000rpm, 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 湧出溶媒로 使用하여 湧出시켰다. 湧出液 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>12)</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>13)</sup>에 準하였다.

6) 腹腔 mast cell의 分離

Kanemoto 등<sup>14)</sup>의 方法에 準하여 생쥐 腹腔 mast cell을 分離하였다.

7) Histamine 定量

分離한 細胞培養液 中의 histamine의 定量은 Harvima 등<sup>16)</sup>의 方法을 修正하여 測定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 생쥐의 胸腺 및 脾臟을 分離하여 細胞懸濁液을 Wysocki<sup>17)</sup> 및 Mizel<sup>8)</sup> 등의 方法을 利用하여 調劑하였다.

Macrophage의 分離는 stress를 加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 1,300rpm으로 10 分間 遠心分離하고 RPMI 배지로 2回 洗滌 후, 直徑 120mm petri dish에 分주하여 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. 생쥐 thymocytes, splenocytes 및 macrophage는 RPMI 1640 배지를 使用하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100units/ml, 100µg/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>19)</sup>이 開發하여 Kotnik 등<sup>20)</sup>이 變形시킨 MTT 方法으로 測定하였다.

#### 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 (10µg/ml) 20µl를 넣어 氷冷下에서 30分間 染色한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 測定하였다<sup>21)</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-co

njugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 二中 染色하여 4°C에서 30分間 反應시킨 후 flow cytometer [excitation : 488nm, emission : 525nm(FITC), 575nm(PE)]로 subpopulation을 測定하였다<sup>22)</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 200µl 씩 分주한 후, 72時間 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다. 培養液을 遠心分離 (2,500rpm, 2分, 4°C) 한 다음, 상등액 50µl를 取하여 mouse immunoassay kit를 利用하여 cytokines의 量을 測定하였다. 즉 sample 50µl에 assay diluent 50µl를 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 100µl를 加하여 室溫에서 2時間 incubation한 후, 5回 洗滌하고 substrate solution 100µl를 混合하여 30分 동안 室溫에서 培養하였다. Stop solution 100µl를 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>23)</sup>.

#### 13) 腹腔 macrophages의 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophages를  $2 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2.6g/l HEPES, pH 7.2)에 浮游시켜 實驗에 使用하였다. Lucigenin 溶液의 製造는 10ml의 DPBS-A에 溶解한 후, 濾過 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>24-25)</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 macrophages의 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 RPMI1640 배지로 1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml 되도록 調整한 후 100 $\mu$ l를 96 well에 분주한 다음, *E. coli* particles을 HBSS 溶液으로 1mg/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>26)</sup>.

**15) 腹腔 macrophages의 nitric oxide 測定**

分離한 macrophage를 24 well plate에 well당 2  $\times$  10<sup>6</sup> cells를 분주한 후 macrophage로 부터 生成되는 nitric oxide (NO)의 量을 Griess法<sup>27)</sup>으로 測定하였다.

**16) 統計處理**

모든 實驗結果들은 mean  $\pm$  SE로 나타내었고 統計處理는 Student's *t*-test를 實施하여 p<0.05를 基準으로 有意性 與否를 判定하였다.

**III. 實驗結果**

**1. 血清 中 histamine 含量에 미치는 效果**

Table I. Effect of HGJ on the concentration of serum histamine in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Histamine (ng/ml)
Normal	-	52.8 $\pm$ 3.6
Control	Immobilization-stress	88.3 $\pm$ 4.2**
	Cold-stress	75.4 $\pm$ 3.7*
HGJ	Immobilization-stress	71.2 $\pm$ 4.3#
	Cold-stress	62.8 $\pm$ 3.5#

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs 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<0.01, \*\*; p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

**2. 血清 中 corticosterone 含量에 미치는 效果**

Table II. Effect of HGJ on the concentration of serum corticosterone in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Corticosterone (ng/ml)
Normal	-	327.8 $\pm$ 15.9
Control	Immobilization-stress	553.7 $\pm$ 29.8*
	Cold-stress	473.6 $\pm$ 28.5*
HGJ	Immobilization-stress	426.9 $\pm$ 24.8##
	Cold-stress	374.6 $\pm$ 21.4#

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs 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, \*\*; p<0.001).

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

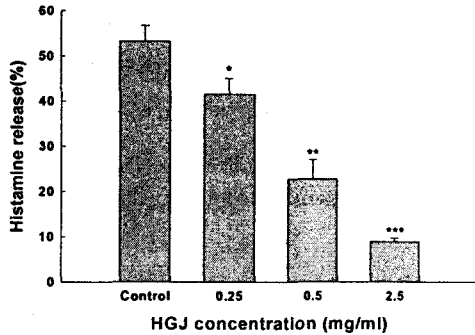


Fig. 1. Effect of HGJ on histamine release induced by compound 48/80 from rat peritoneal mast cells *in vitro*

Various concentration of HGJ (0.25, 0.5 and 2.5mg/ml) were added into the rat peritoneal mast cells for 10mins before compound 48/80 (0.5µg/ml) treated. The data represents the mean ± SE from 3 experiments. \*; Significantly different from control group (p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001).

### 4. Thymocytes의 細胞生存率에 미치는 效果

Table III. Effect of HGJ on the cell viability of thymocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Cell Viability (%)	
		ConA-nontreated	ConA-treated
Normal	-	100.0 ± 1.8	138.4 ± 1.8
Control	Immobilization-stress	85.1 ± 2.1**	120.9 ± 1.9**
	Cold-stress	90.8 ± 1.3*	124.8 ± 1.1*
HGJ	Immobilization-stress	92.3 ± 1.2 <sup>#</sup>	129.4 ± 1.8 <sup>#</sup>
	Cold-stress	95.9 ± 1.1 <sup>#</sup>	133.5 ± 1.4 <sup>#</sup>

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The separated thymocytes (1 × 10<sup>7</sup>cells/ml) were cultured for 48hrs in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen of concanavalin A (Con A). The data represents the mean ± SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.01, \*\*; p<0.001). <sup>#</sup>; Significantly differ

ent from control group (p<0.05).

### 5. Splenocytes의 細胞生存率에 미치는 效果

Normal群의 splenocytes에 lipopolysaccharide (LPS)를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 LPS를 處理하였을 때는 145.7 ± 2.2%, immobilization-stress를 加한 control群은 LPS를 處理하지 않았을 때 76.4 ± 2.0%, LPS를 處理하였을 때는 120.7 ± 1.8%였으며, cold-stress를 加한 control群은 LPS를 處理하지 않았을 때 83.7 ± 1.5%, LPS를 處理하였을 때는 131.8 ± 1.5%였다. HGJ 500mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 加한 實驗群은 LPS를 處理하지 않았을 때는 78.5 ± 2.1%, LPS를 處理하였을 때는 125.4 ± 1.4%, HGJ 500mg/kg을 投與하고 cold-stress를 加한 實驗群은 LPS를 處理하지 않았을 때는 91.6 ± 1.6%, LPS를 處理하였을 때는 139.3 ± 1.3%였다 (Table IV).

Table IV. Effect of HGJ on the cell viability of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Cell Viability (%)	
		LPS-nontreated	LPS-treated
Normal	-	100.0 ± 1.6	145.7 ± 2.2
Control	Immobilization-stress	76.4 ± 2.0*	120.7 ± 1.8*
	Cold-stress	83.7 ± 1.5*	131.8 ± 1.5*
HGJ	Immobilization-stress	78.5 ± 2.1	125.4 ± 1.4
	Cold-stress	91.6 ± 1.6 <sup>#</sup>	139.3 ± 1.3 <sup>#</sup>

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The separated splenocytes (1 × 10<sup>7</sup>cells/ml) were cultured for 48hrs in RPMI1640 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). <sup>#</sup>; Significantly different from control group (p<0.05).

6. Thymocytes의 DNA fragmentation

에 미치는 效果

Table V. Effect of HGJ on DNA fragmentation of thymocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	DNA fragmentation (%)
Normal	-	4.3 ± 0.2
Control	Immobilization -stress	8.6 ± 0.6*
	Cold-stress	6.5 ± 0.5*
HGJ	Immobilization -stress	6.2 ± 0.4#
	Cold-stress	5.2 ± 0.3#

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

7. Splenocytes의 DNA fragmentation

에 미치는 效果

Table VI. Effect of HGJ on DNA fragmentation of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	DNA fragmentation (%)
Normal	-	5.4 ± 0.4
Control	Immobilization -stress	10.3 ± 0.6**
	Cold-stress	8.7 ± 0.5*
HGJ	Immobilization -stress	9.5 ± 0.5
	Cold-stress	6.3 ± 0.3#

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The separated 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<0.01, \*\*; p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.05).

8. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 效果

Normal群 thymocytes 中 CD4<sup>+</sup> 細胞는 12.5 ± 0.4%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.8 ± 0.2%, immobilization-stress를 加한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 16.4 ± 0.5%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.2 ± 0.3%였으며, cold-stress를 加한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 13.3 ± 0.3%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.6 ± 0.2%였다. HGJ 500mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 加하였을 때 CD4<sup>+</sup> 細胞는 14.1 ± 0.4%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 4.0 ± 0.3%였으며, cold-stress를 加하였을 때 CD4<sup>+</sup> 細胞는 13.4 ± 0.3%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 3.5 ± 0.3%였다 (Fig. 2, Table VII).

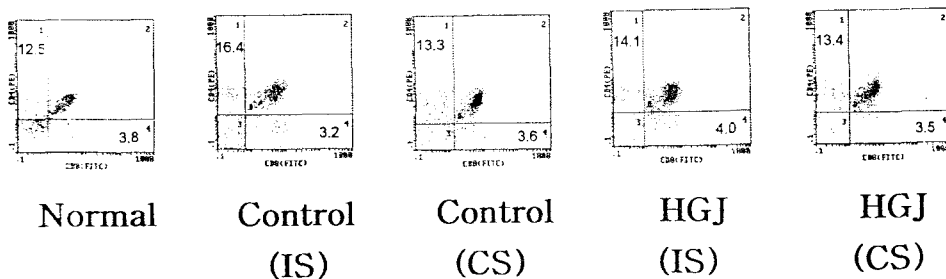


Fig. 2. Cytofluorometric pattern of thymocytes subpopulation change in immobilization-stress (IS) or cold-stress (CS) mice administered with HGJ

Table VII. Effect of HGJ on subpopulation of thymocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Subpopulation (%)	
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Normal	-	12.5 ± 0.4	3.8 ± 0.2
Control	Immobilization-stress	16.4 ± 0.5*	3.2 ± 0.3
	Cold-stress	13.3 ± 0.3	3.6 ± 0.2
HGJ	Immobilization-stress	14.1 ± 0.4#	4.0 ± 0.3
	Cold-stress	13.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30mins 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 中 B220<sup>+</sup> 細胞는 33.8 ± 1.4%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 21.2 ± 1.2%, immobilization-stress를 加한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 27.4 ± 1.5%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 26.7 ± 1.5%, cold-stress를 加한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 30.3 ± 1.8%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 24.8 ± 1.3%였다. HGJ 500mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 加하였을 때 B220<sup>+</sup> 細胞는 31.2 ± 1.7%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 22.5 ± 1.3%, cold-stress를 加한 control群의 B220<sup>+</sup> 細胞는 32.4 ± 1.3%, Thy1<sup>+</sup> 細胞는 23.7 ± 1.9%였다.

Normal群 splenocytes 中 CD4<sup>+</sup> 細胞는 12.4 ± 0.3%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 6.8 ± 0.5%, immobilization-stress를 加한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 18.4 ± 0.4%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 10.4 ± 0.6%, cold-stress를 加한 control

群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 16.7 ± 0.5%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 9.3 ± 0.3%였다. HGJ 500mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 加하였을 때 CD4<sup>+</sup> 細胞는 14.7 ± 0.4%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 8.7 ± 0.5%, cold-stress를 加한 control群의 CD4<sup>+</sup> 細胞는 14.8 ± 0.5%, CD8<sup>+</sup> 細胞는 8.2 ± 0.4%였다 (Fig. 3, Table VIII).

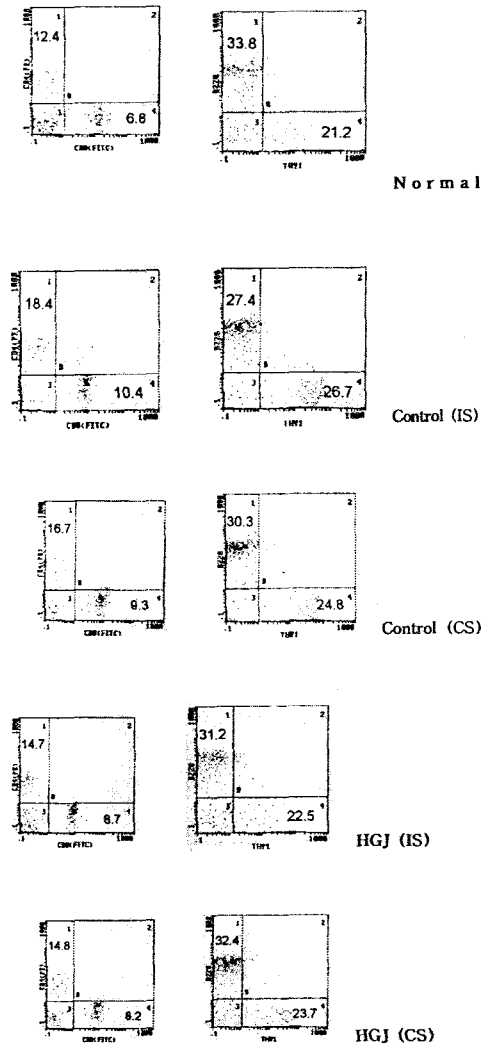


Fig. 3. Cytofluorometric pattern of splenocytes subpopulation change in immobilization-stress or cold-stress mice administered with HGJ



Table VIII. Effect of HGJ on subpopulation of splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Subpopulation (%)			
		B220 <sup>+</sup>	Thy1 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Normal	-	33.8 ± 1.4	21.2 ± 1.2	12.4 ± 0.3	6.8 ± 0.5
	Immobilization - stress	27.4 ± 1.5*	26.7 ± 1.5**	18.4 ± 0.4*	10.4 ± 0.6*
Control	Cold-stress	30.3 ± 1.8	24.8 ± 1.3*	16.7 ± 0.5*	9.3 ± 0.3*
	Immobilization - stress	31.2 ± 1.7#	22.5 ± 1.3#	14.7 ± 0.4#	8.7 ± 0.5
HGJ	Cold-stress	32.4 ± 1.3	23.7 ± 1.9	14.8 ± 0.5	8.2 ± 0.4

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs 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 30mins 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 (ˆ; p<0.05, \*\*; p<0.01). #; Significantly different from control group (p<0.05).

10. Cytokines 分泌에 미치는 效果

Table IX. Effect of HGJ on the production of γ-interferon from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	γ-interferon (pg/ml)
Normal	-	786.3 ± 32.8
Control	Immobilization -stress	476.8 ± 25.4*
	Cold-stress	538.5 ± 27.3*
HGJ	Immobilization -stress	612.8 ± 28.9#
	Cold-stress	679.3 ± 25.5#

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The production of γ-interferon was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean ± SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (p<0.001). #; Significantly different from control group (p<0.01).

Table X. Effect of HGJ on the production of interleukin-2 from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Interleukin-2 (pg/ml)
Normal	-	476.5 ± 22.6
Control	Immobilization -stress	308.8 ± 23.9**
	Cold-stress	358.1 ± 25.3*
HGJ	Immobilization -stress	354.4 ± 25.8
	Cold-stress	390.6 ± 21.7

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4°C. The production of interleukin-2 was determined in the separated splenocytes with ELISA kit. The data represents the mean ± SE of 5 mice. \*; Significantly different from normal group (ˆ; p<0.05, \*\*; p<0.01).

Table XI. Effect of HGJ on the production of interleukin-4 from splenocytes in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Interleukin-4 (pg/ml)
Normal	-	169.3 ± 13.5
Control	Immobilization -stress	114.2 ± 9.6*
	Cold-stress	147.5 ± 10.2
HGJ	Immobilization -stress	148.7 ± 10.8#
	Cold-stress	156.3 ± 8.6

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

11. 腹腔 macrophages의 phagocytic activity에 미치는 效果

Chemiluminescence (CL)는 phagocytosis가 進行되는 동안 生成되는 oxygen radical에 의해 發生되며, lucigenin에 의해 增加되는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>. Normal

群의 macrophages로부터 生成되는 CL 量 보다 immobilization-stress 및 cold-stress 를 加한 control群의 macrophages에서 生成되는 CL 量은 normal群에 비해 현저히 減少하였다. HGJ 500mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 加한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 CL 量은 control 群에 비해 增加하였으며, HGJ 500mg/kg 을 投與하고 cold-stress를 加한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 CL 量도 control 群에 비해 增加하였다 (Fig. 4). 또한 FITC-conjugated *E. coli* particles의 貪食 實驗에서도 同一한 結果를 觀察할 수 있었다 (Fig. 5).

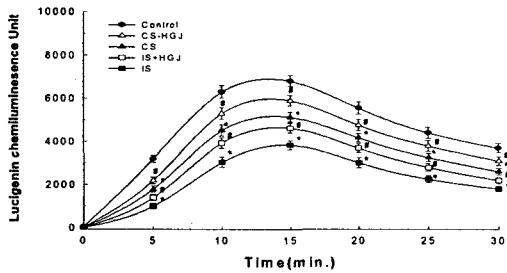


Fig. 4. Effect of HGJ on lucigenin chemiluminescence in immobilization-stress or cold-stress mice

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days 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 30min 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 ( $p < 0.001$ ).

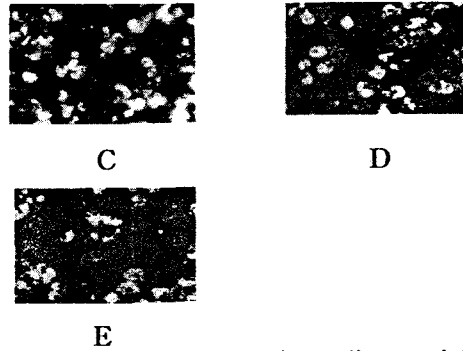
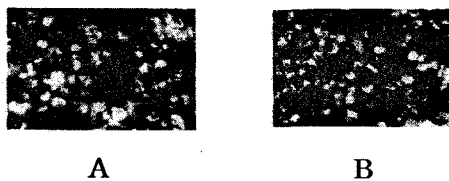


Fig. 5. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages

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 HGJ (D) and cold-stress mice administered with HGJ (E).

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

Table XII. Effect of HGJ on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in immobilization-stress or cold-stress mice

Samples	Stress	Nitric oxide ( $\mu$ M)
Normal	-	19.7 $\pm$ 1.4
Control	Immobilization -stress	13.2 $\pm$ 1.1**
	Cold-stress	14.5 $\pm$ 1.3*
HGJ	Immobilization -stress	16.4 $\pm$ 1.2 <sup>#</sup>
	Cold-stress	18.4 $\pm$ 1.1 <sup>#</sup>

HGJ (500mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7days and mice were treated by immobilization-stress for 10hrs or cold-stress for 6hrs at 4 $^{\circ}$ C. 3% thioglycollate was injected *i.p.* at the 4th day. Peritoneal macrophages obtained after 2hrs. Adherence period were cultured in RPMI1640 media in the presence LPS and  $\gamma$ -interferon. The data represents the mean  $\pm$  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

肝氣鬱結이란 精神的 緊張과 情緒의 過度한 變化로 肝의 疏泄作用이 失調되고 氣血이 鬱滯되어 나타나는 病理現象으로서, 現代醫學의 意味로는 stress에 의하여 腦下垂體와 副腎皮質호르몬의 分泌가 促進되어 血壓上昇, 脈搏增加, 體溫上昇 등의 自律神經系 失調現象이 나타나는 것이라고 할 수 있다<sup>28)</sup>.

解肝煎은 陳皮, 半夏, 厚朴, 茯苓 各一錢半, 蘇葉, 芍藥 各一錢, 砂仁 七分, 生薑 三·五片으로 構成되어<sup>2,3)</sup>, 肝氣鬱結로 인해 肝氣乘脾된 腹脹, 納呆 等症이 比較的 甚할 境遇 適用하는 處方으로서<sup>3)</sup>, 現代의 意味의 stress로 인한 各種 症狀에 活用될 수 있을 것으로 생각된다.

韓醫學에서는 《素問·上古天真論》 《素問·刺法論》 《素問·評熱病論》<sup>7)</sup> 《靈樞·百病始生篇》<sup>29)</sup>에 人體의 正氣가 旺盛하면 비록 邪氣가 體內에 入하여도 豫防 및 治病이 容易함을 밝힘으로써 疾病의 成立過程 中에서 生體의 抵抗性인 正氣를 重要한 因子로 認識하였다. 이러한 元氣, 原氣, 眞氣 등으로 指稱되는 正氣와 六淫 및 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 發病因子間의 相爭過程이 오늘날에는 免疫機能에 關聯지어 解釋되고 있으며, 免疫疾患의 治療에 있어서도 免疫機能 低下로 인한 疾患은 扶正法을 爲主로 하고, 免疫過敏反應은 祛邪法을 爲主로 하되 대부분 扶正과 祛邪의 比率를 適切히 應用하고 있다<sup>30-31)</sup>.

最近 stress와 關聯된 많은 論文들이 報告되고 있는데 김 등<sup>32)</sup>은 抗 stress 實驗에 관한 比較 研究에서 韓醫學에서 str

ess를 主題로 發表한 41개의 論文을 整理한 結果를 報告하였다.

한편, 解肝煎에 관한 實驗的 研究로서는 李<sup>33)</sup>가 解肝煎이 흰쥐에서 CCL<sub>4</sub>로부터 誘導되는 肝中毒에 의한 肝細胞의 破壞로부터 강한 保護效果가 있음을 報告하였고, 안 등<sup>34)</sup>은 흰쥐에서 解肝煎의 抗酸化 活性 및 肝細胞의 酸化的 損傷에 대한 保護效果에 關해 報告했다.

이에 著者는 本 實驗에서 肝氣鬱結로 인한 多樣한 症狀에 活用되는 解肝煎의 stress에 대한 作用機轉을 究明할 目的으로, 생쥐에 解肝煎을 經口投與한 후 immobilization-stress 및 cold-stress를 各 各 加하고 血中 histamine과 corticosterone 量의 變化 및 immune system의 變化를 觀察하였다.

생쥐에 immobilization-stress를 10時間 負荷<sup>35)</sup>하였을 때와 cold-stress를 6時間 負荷<sup>36)</sup>하였을 때, HGJ을 7日間 投與하였을 때 各 各 serum histamine 量을 比較함으로써 immobilization-stress가 cold-stress에 비해 stress의 強度가 強하며, HGJ가 stress의 種類에 關係없이 histamine의 分泌를 抑制하여 stress를 抑制할 수 있음을 알 수 있다.

本 實驗에서 HGJ 投與시 histamine 및 corticosterone의 分泌가 동시에 減少하였다는 結果는 HGJ가 histamine의 分泌를 抑制하여 corticosterone의 分泌를 抑制하는 것이 아닌가 推定된다.

HGJ가 serum histamine을 減少시켰기 때문에, 이의 作用을 確認하고자, mast cell을 分離하여 HGJ를 前處理하고 脫顆粒을 促進하는 compound를 處理하였을 때 HGJ는 用量依存의으로 mast cell로부터 histamine 分泌를 抑制하였다. 이는 HGJ가

mast cell로부터 histamine의 脫顆粒을 抑制하여 corticosterone의 分泌를 抑制함을 強力히 示唆하는 것이다.

Stress가 免疫系에 미치는 影響을 살펴 보기 위해 thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率을 測定함으로써 HGJ가 stress에 의해 減少되는 thymocytes의 細胞生存率을 增加시켜 免疫能을 增加시킬 수 있음을 알 수 있다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때, HGJ를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 細胞生存率을 비교함으로써 HGJ가 강한 stress일 때는 splenocytes의 細胞生存率을 增加시키지 못하나, 弱한 stress일 때는 splenocytes의 細胞生存率을 增加시킬 수 있음을 알 수 있다.

Thymocyte 및 splenocytes의 細胞生存率 減少가 이들 細胞의 apoptosis에 의해 惹起된 것인가를 確認하기 위해 DNA fragmentation을 測定한 結果, immobilization-stress 및 cold-stress 모두 thymocytes 및 splenocytes의 apoptosis를 誘導하여 細胞生存率을 減少시키나, HGJ를 投與하면 thymocytes일 境遇에는 immobilization-stress 및 cold-stress에 의한 apoptosis를 減少시켜 細胞生存率을 增加시킨다고 推定된다. Splenocytes일 境遇에는 cold-stress에 의한 apoptosis를 減少시켜 細胞生存率을 增加시키나, immobilization-stress에 의한 細胞生存率의 減少는 apoptosis와 다른 經路를 通하여 作用하고 있음을 示唆하는 것이다.

Stress에 의한 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 變化에 미치는 HGJ의 影響을 觀察하였을 때 HGJ가 immobilization-stress에 의해 增加되는  $CD4^+$  cell

의 population을 減少시켜 thymocytes의 subpopulation을 調節하고 있다고 思料된다.

Stress에 의해 splenocytes에서 分泌되는 cytokines의 變化에 미치는 HGJ의 影響을 觀察한 結果, HGJ가 주로 Th1 cell의 活性을 增加시키고 있음을 알 수 있다.

Macrophage로부터 生成되는 chemiluminescence (CL)를 測定한 結果, HGJ가 stress에 의해 低下되는 phagocytosis를 回復시킬 수 있음을 알 수 있다. 本 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 經路에 의해 調節되고 있음을 示唆하는 것이다.

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

以上の 實驗結果 肝氣鬱結로 인한 多様な 症狀에 使用되는 解肝煎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 處方으로 臨床에서 stress와 關聯된 症狀에 널리 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

## V. 結 論

解肝煎 (HGJ)을 생쥐에 經口投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 加하였을 때 hormone 및 免疫系의 變化는 다음과 같았다.

1. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 serum histamine量은 增加되었으며 HGJ를 投與하였을 때 減少되었다.
2. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 serum corticosterone量은 增加되었으며 HGJ를 投與하였을 때 減少되었다.
3. HGJ는 mast cell로부터 histamine 分泌를 用量依存的으로 抑制하였다.
4. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 thymocytes의 細胞 生存率은 減少되었으며 HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.
5. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 細胞 生存率은 減少되었으며 HGJ를 投與하였을 때 cold-stress에 의해 減少된 細胞 生存率만 增加되었다.
6. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 thymocytes의 DNA fragmentation은 增加되었으며 HGJ를 投與하였을 때 減少되었다.
7. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 DNA fragmentation은 增加되었으며 HGJ를 投與하였을 때 cold-stress에 의해 增加된 DNA fragmentation만 減少되었다.
8. Immobilization-stress에 의해 thymocytes의  $CD4^+$  細胞의 population은

增加하였으나, cold-stress에 의해서는  $CD4^+$  細胞의 population에 變化가 없었으며 HGJ를 投與하였을 때 immobilization-stress에 의해 增加된  $CD4^+$  細胞의 population은 減少되었다.

9. Immobilization-stress에 의해 splenocytes의  $B220^+$  細胞의 population은 減少되고  $Thy1^+$  細胞의 population은 增加되었으며, cold-stress에 의해  $Thy1^+$  細胞의 population은 增加되었으나 HGJ를 投與하였을 때 immobilization-stress에 의해서만 減少된  $B220^+$  細胞는 增加하고 增加된  $Thy1^+$  細胞는 減少하였다. 또한, immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의  $CD4^+$  및  $CD8^+$  細胞의 population은 增加하였으나 HGJ를 投與하였을 때 immobilization-stress에 의해 增加된  $CD4^+$  細胞의 population만 減少하였다.
10. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해  $\gamma$ -interferon의 分泌가 減少되었으며 HGJ를 投與하였을 때 增加되었다. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 interleukin-2의 分泌가 減少되었으나 HGJ를 投與하였을 때 別다른 差異가 없었다. Immobilization-stress에 의해 interleukin-4의 分泌는 減少되었으며 HGJ를 投與하였을 때 增加되었으나, cold-stress에 의해 interleukin-4의 分泌는 別다른 差異가 없었다.
11. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages의 phagocytic

activity는 減少되었으며 HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.

12. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages로 부터 nitric oxide 分泌가 抑制되었으며 HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.

以上の 實驗結果 解肝煎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 思料된다.

- 투 고 일 : 2005년 04월 29일
- 심 사 일 : 2005년 05월 02일
- 심사완료일 : 2005년 05월 10일

## 參考文獻

1. 張介賓. 景岳全書. 北京: 中國中醫藥出版社. 1994; 680.
2. 경희 한의대 제47기 졸업준비위원회 학술부. 景岳全書(上·下). 서울: 도서출판 정담. 1999; 385, 387, 430, 436, 448, 450, 459, 487-488, 730, 733, 738, 772, 774, 1075.
3. 鄭遇悅. 韓方病理學. 全州: 三進社. 1988; 202-204, 221.
4. 李丙允. 精神醫學辭典. 서울: 一湖社. 1990; 272.
5. 金相孝. 東醫神經精神科學. 서울: 杏林出版社. 1995; 42, 57-62, 258-266, 277-278.
6. 朴贊國. 病因病理學. 서울: 傳統醫學研究所. 1978; 187.
7. 王 冰. 新編黃帝內經素問. 서울: 大星文化社. 1994; 1-4, 26-27, 103-106, 320-329.
8. 金完熙 등. 臟腑學의 理論과 臨床. 서울: 一中社. 1996; 56-67, 72-75.
9. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. J Am Med Assoc. 1992; 267: 1244-1252.
10. Eun JS, Oh CH, Han JH. Effects of glycyrrhizae radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization-stress in mice. Kor J Pharmacogn. 1989; 20(1): 37-42.
11. Morishita S et al. Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. Pathophysiology. 1997; 4: 213-219.
12. Endo Y. In methods in enzymology. Academic Press. 1983; 94-100.
13. Zenker N, Bernstein DE. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. J Biol Chem, 1958; 231(2): 695-701.
14. 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.
15. Yurt RW, Leid RW, Austen KF. Native heparin from rat peritoneal mast cells. J Biol Chem. 1977; 252: 518.
16. Harvima RJ, Harvima IJ, Traki JE. Optimization of histamine radioenzymatic assay with purified histamin

- e N-methyltransferase. *Clinica Chimica Acta*. 1988; 171: 247.
17. Wysocki LJ, Sato VL. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 2844.
  18. Mizel SB, Openheim JJ, Rosensteich DL. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J Immunol*. 1979; 120: 1497.
  19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol methods*. 1983; 65: 55.
  20. Kotnic V, Fleischmann WRJr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J Immunol methods*. 1990; 129: 23.
  21. 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.
  22. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med*. 1994; 179: 873-879.
  23. 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.
  24. Boudard F et al. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J Immunol Methods*. 1994; 174: 259.
  25. Blair AL et al. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J Immunol Methods*. 1988; 112: 163.
  26. Chok PW, Choon SP, Benjamin HS. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J Immunol Methods*. 1993; 162: 1.
  27. Rocket KA et al. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immunology*. 1991; 59(9): 3280.
  28. 문호전, 안규석, 최승훈. 동의병리학. 서울: 고문사. 1990; 199-200, 333.
  29. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯解. 서울: 大星文化社. 1990; 468-475.
  30. 趙鐘寬. 免疫에 관한 東洋醫學의 考察. 東洋醫學. 1985; 23.
  31. 蔡禹錫. 免疫疾患의 韓方概念과 治療에 관한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌. 1990; 11(2): 54-58.
  32. 김근우, 구병수. 抗 stress 實驗에 관한 比較 研究. 東醫神經精神科學會誌. 1997; 8(1): 111-125.
  33. 李昇宰. 解肝煎이 carbon tetrachloride로 誘導한 흰쥐의 肝中毒에 미치는 影響. 東國大學校 大學院. 1995.
  34. 안병태 등. 解肝煎의 抗酸化 活性 및 肝細胞의 酸化的 損傷에 대한 保護效果. 大韓韓醫學方劑學會誌. 2002; 10(2): 127-141.
  35. Eun JS, Song JM. Effects of Kwibitang on serum levels of hormone and the non-specific immune response

after immobilization stress in mice.  
Kor J Oriental Physiology & Pathology. 2004; 18(1): 172-178.

36. Morishita S et al. Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. Pathophysiology. 1997; 4: 213-219.