

化肝煎이 생쥐의 Immobilization-Stress 및 Cold-Stress에 미치는 影響

원광대학교 한의과대학 부인과학교실
박종문, 고정민, 안규환, 최창민, 유심근

ABSTRACT

Effects of *Hwaganjeon* on Immobilization-Stress or Cold-Stress in Mice

Jong-Moon Park, Jeong-Min Ko
Kyu-Hwan Ahn, Chang-Min Choe, Sim-Keun Yoo
Department of Oriental Obstetric and Gynecology,
college of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose : This study is to examine the effects of *Hwaganjeon* water extract(HGJ) on immobilization-stress or cold-stress in BALB/c mice.

Methods : We have *Hwaganjeon* water extract(HGJ) by freeze-dryer & melt it by a saline solution. We feed HGJ 500mg/Kg to 5mice, and add immobilization-stress by putting mice in plastic cylinder 10 hours, and add cold-stress by putting mice in 4°C cold room 6 hours.

Results :

1. 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 at the concentration of 1 mg/ml.
2. HGJ did not affect the cell viability of thymocytes decreased by immobilization-stress or cold-stress, but increased the cell viability of splenocytes decreased by immobilization-stress or cold-stress.
3. HGJ decreased the population of splenic CD4⁺ and CD8⁺ cells increased by immobilization-stress or cold-stress.
4. HGJ enhanced the production of γ -interferon(IFN) and interleukin(IL)-2 decreased by immobilization-stress or cold-stress.

Conclusion : These results indicate that 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 : *Hwaganjeon*(HGJ), immobilization-stress, cold-stress, histamine, corticosterone, *immune response*

I. 緒 論

Stress란 라틴어에서 유래한말로 外部環境의 物理的, 心理的, 精神的 壓力과 內部保護 抵抗力 사이의 均衡이 깨져, 人間個體의 保護 能力이 損傷됨으로써 身體的 및 精神的인 證狀으로 나타나는 것을 말한다¹⁾.

모든 살아있는 生命體들은 外部의 持續的인 stress에 대해 恒常性(homeostasis)이라는 複雜한 生理的 狀態를 통하여 防禦하는 機構를 가지고 있다. Stress에 대한 反應은 주로 adrenocorticotrophic hormone, catecholamine 및 glucocorticoids와 같은 neuroendocrine messengers와 密接한 關係가 있으며, stress가 일어나는 동안 이들 messengers는 生體가 適應하고 살아갈 수 있도록 多樣한 生理的인 變化를 일으키는 것으로 알려져 있다. 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 있다²⁾.

外部에서 stress가 加해지면 警告反應期에 있어서 體液의 化學變化와 神經系의 刺戟에 의해 腦의 視床下部가 刺戟되어 交感神經이 興奮하고 副腎髓質호르몬이 分泌되어, 腦下垂體로부터 ACTH의 分泌를 促進하며, ACTH는 副腎皮質에서 glucocorticoid를 分泌시켜, 糖新生, 抗炎症作用 등의 代謝變化를 일으켜 生體가 stress에 대한 抵抗性を 나타내게 한다^{3,4)}. 現在까지 stress의 first mediator로는 histamine, vassopressin, catecholamine, serotonin, CRF 및 ACTH 등이 알려져 있다⁵⁻⁹⁾.

韓醫學에서는 stress를 기후의 변화(外因), 情志過度(內因), 불규칙한 생활(不內外因), 등의 刺戟에 대한 不適切한 適應 反應으로 認識하였고, 反應으로서 나타나는 현상을 氣의 變化로 觀察하여 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆 등의 範疇에서 다루고 있다^{10,11)}.

肝氣鬱結은 肝의 疏泄機能 失調로 氣機가 不暢하여 氣가 血을 順行시키지 못하므로 나타나는데, 이런 상태가 오래 되면 臨床上 火로 인한 證候들이 往往 나타나게 된다^{12,13,14)}.

化肝煎은 明代 張¹⁵⁾의 《景岳全書》에 “治怒氣傷肝, 因而氣逆動火, 致爲煩熱, 脇痛, 脹痛, 動血等證”이라 最初로 記載된 以來, 肝氣鬱結로 인한 鬱證, 胸悶, 胃脘痛, 腹痛, 脇痛, 妊娠惡阻, 胎氣不安, 吐血 등을 治療하기 위해 臨床에서 널리 應用되어온 處方이다¹⁶⁻²⁵⁾.

化肝煎에 관한 實驗的 研究로서는 유²⁶⁾가 흰쥐에서 CCL4로부터 誘導되는 肝中毒에 의한 肝細胞의 破壞로부터 강한 保護效果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 관한 研究는 아직 接해보지 못하였다.

이에 著者는 化肝煎의 stress에 대한 作用機轉을 究明하고자, 생쥐에 化肝煎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 생쥐는 BALB/c계 수컷 18 ± 2 g을, 흰쥐는 SD계 수컷 180 ± 20 g을 大韓實驗動物(株)에서 購入하여, 溫度 20 ± 3oC, 濕度 50 ± 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과 물을 자유스럽게 攝取하도록 하였다.

2. 實驗 方法

1) 檢液의 調劑

本 實驗에 使用한 化肝煎의 構成은 張¹⁵⁾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.

化肝煎(HGJ)의 처방구성

韓藥名	生藥名	重量(g)
青 皮	Aurantii Immatri Pericarpium	8.0
陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	8.0
芍 藥	Paeoniae Radix	8.0
貝 母	Fritillariae Bulbus	8.0
丹 皮	Moutan Cortex Radicis	6.0
梔子(炒)	Gardeniae Fructus	6.0
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	6.0
Total		50.0

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 化肝煎 粉末 41.6g (수득률, 27.7%, 이하 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 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-stress를 加한 후 實驗에 使用하였다²⁷⁾.

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 500 mg/kg을 1日 1回씩 7日間 經口投與한 다음 생쥐를 4 oC 冷藏室에서 6 時間 넣어 놓은 후 實驗에 使用하였다²⁸⁾.

4) 血清 中 histamine 含量 測定

Stress를 加한 생쥐를 斷頭하여 얻은 血液을 遠心分離 (3,000 rpm, 10mins)하여 血清을 얻었다. 血清 1ml당 0.4N-HClO₄ 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 溶出溶媒로 使用하여 溶出し켰다. 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하였다²⁹⁾.

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

³⁰⁾에 準하였다. 즉 血清 0.3 ml에 蒸溜水 0.7 ml를 넣어 混合하고 chloroform 10 ml를 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 (H₂SO₄ : 50% C₂H₅OH = 2.4 : 1) 3 ml를 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 의 해 定量하였다.

6) 腹腔 mast cell의 分離

Kanemoto 등³¹⁾의 方法에 準하여 생쥐 腹腔 mast cell을 分離하였다. 생쥐를 ether로 痲醉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 按摩한 다음 腹腔液을 採取하여 遠心分離 (1,500 rpm, 5mins)하였다. 15ml tube에 22.5% metrizamide (4 oC) 2ml를 넣고 Yurt 등의 方法³²⁾에 따라 그 위에 DME 배지로 稀釋한 細胞浮游液을 서서히 加하고 1,300rpm에서 10分間 遠心分離 하였다. 細胞를 DME 배지로 洗滌한 후 2 × 10⁵ cells/ml로 調劑하여 實驗에 使用하였다. 分離한 mast cell을 2 × 10⁵ cells/ml로 調劑하여 eppendorf tube에 1 ml씩 넣고, CO₂-incubator에서 10分間

培養한 후 PMC buffer로 稀釋한 HGJ를 最終濃度가 0.25, 0.5 및 2.5 mg/ml로 되도록 各各 加하고 37 oC에서 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 1,500 rpm으로 10分間 (4 oC) 遠心分離하여 上層液을 分離하였다.

7) Histamine 定量

分離한 細胞培養液 中の histamine의 定量은 Harvima 등³³⁾의 方法을 修正하여 測定하였다. 遠心分離 후 上層液 10 μ와 S-adenosyl (methyl-14C) methionine (2 μci/ml) 1.5μl, 300mM Tris-glycine buffer (pH 8.3) 40μl, histamine N-methyl transferase 5μl를 添加하여 37 oC 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 × 10⁵ cells/ml인 250μl를 100 oC로 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 생쥐의 胸腺 및 脾臟을

分離하여 細胞懸濁液을 Wysocki³⁴⁾ 및 Mizel³⁵⁾ 등의 方法을 利用하여 調劑하였다. 즉 생쥐를 頸椎奪骨하여 屠殺한 후, 摘出した 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 2회 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 加하기 3日 前에 생쥐 腹腔에 3% thioglycollate 2ml를 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 oC에서 1,300 rpm으로 10分間 遠心分離하고 RPMI 배지로 2회 洗滌 후, 直徑 120mm petri dish에 분주하여 CO2-incubator에서 培養시키고 2時間 후 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 (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 Mosmann³⁶⁾이 開發하여 Kotnik 등³⁷⁾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 × 10⁷ cells/ml)를 接種하고 thymocytes에는 concanavalin A (Con A)를, splenocytes에는

lipopolysaccharide (LPS) 10µg/ml를 添加하거나 添加하지 않은 條件으로 37 °C의 CO2-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 570nm에서 測定하여 細胞生存率을 算定하였다.

In vitro 實驗에서는 分離한 thymocytes 및 splenocytes에 HGJ 10, 100 및 1,000 µg/ml를 48 時間 處理하고 同一한 實驗을 實施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 (10 µg/ml) 20µl를 넣어 氷冷下에서 30分間 染色한 후, flow cytometer로 sub-G1 peak를 測定하였다³⁸⁾

11) Thymocytes 및 splenocytes의 sub population 測定

分離한 thymocytes 및 splenocytes를 各各 RPMI 1640 배지로 3회 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 oC에서 30 分間 反應시킨 후 flow cytometer [excitation : 488nm, emission : 525nm (FITC), 575nm (PE)]로 subpopulation을 測定하였다³⁹⁾.

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, 2×10^7 cells/ml로 調劑한 다음 96 well plate에 200 μ l 씩 分注한 후, 72時間 동안 CO₂-incubator에서 培養하였다. 培養液을 遠心分離 (2,500 rpm, 2min, 4 oC) 한 다음, 上등액 50 μ l를 取하여 mouse immunoassay kit를 利用하여 cytokines의 量을 測定하였다. 즉 sample 50 μ l에 assay diluent 50 μ 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 μ l를 加하여 室溫에서 2時間 incubation한 후, 5回 洗滌하고 substrate solution 100 μ l를 混合하여 30分 동안 室溫에서 培養하였다. Stop solution 100 μ 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하였다⁴⁰⁾.

13) 腹腔 macrophages의 lucigenin chemiluminescence 測定

分離한 macrophages를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/l NaHCO₃, 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 10ml의 DPBS-A에 溶解한 후, 濾過 滅菌하여 -20 oC에서 保管하면서 使用하였다 (stock solution). Lucigenin stock solution은 使用하기 直前に DME 배지에 1/10로 稀釋하여 使用하였다. Chemiluminescence 測定은 luminometer를 利用하여 37 oC에서 測定하였다^{41,42)}. 測定用 microplate(white)의 各 well에

準備된 macrophage 浮游液 50 μ l와 lucigenin 溶液 50 μ l 및 zymosan 溶液 30 μ l를 添加하여 最終 volume이 200 μ l가 되도록 한 후, 37 oC에서 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 食食作用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 μ g/ml 濃度로 溶解하여 使用하였다. 分離한 macrophages를 RPMI 1640 배지로 1×10^5 cells/ml 되도록 調整한 후 100 μ l를 96 well에 分注한 다음, E. coli particles를 HBSS 溶液으로 1 mg/ml 되게 調劑한 懸濁液 25 μ l를 加하여 1時間 동안 CO₂-incubator에서 培養하였다. 培養液을 除去하고 extracellular fluorescence를 抑制하기 위해 trypan blue 100 μ l를 添加하여 inverted fluoromicroscope로 觀察하였다⁴³⁾.

15) 腹腔 macrophages의 nitric oxide 測定

分離한 macrophage를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells를 分注한 후 macrophage 로 부터 生成되는 nitric oxide (NO)의 量을 Griess法⁴⁴⁾으로 測定하였다. 各 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 添加하여 24時間 培養한 후, 培養液 100 μ l와 Griess 試藥 (1% sulfanilamide + 0.1% N-naphthylenediamine · 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 混合하여 96 well module에 넣고, 37 oC에서 10分間 放置한 후 570nm에서 microplate-reader로 吸光度를 測定하여 미리 作成

한 NaNO₂의 檢量線에 의해 NO₂-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 67.5 ± 4.1 ng/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은 96.3 ± 3.2 ng/ml로, cold-stress를 負荷한 control群은 85.9 ± 3.5 ng/ml로 normal群에 비해 增加하였다.

HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 83.3 ± 3.4 ng/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는 72.3 ± 3.2 ng/ml로 control群에 비해 減少하였다 (Table I).

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

Samples	Stress	Histamine (ng/ml)
Normal	-	67.5 ± 4.1
Control	Immobilization-stress	96.3 ± 3.2**
	Cold-stress	85.9 ± 3.5*
HGJ	Immobilization-stress	83.3 ± 3.4#
	Cold-stress	72.3 ± 3.2#

HGJ (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 oC. The serum histamine was determined with spectrofluorometer. 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).

2. 血清 中 corticosterone 含量에 미치는 效果

Stress를 負荷하지 않은 normal群의 血清 中 corticosterone 含量은 376.8 ± 13.2 ng/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은 630.5 ± 21.5 ng/ml로, cold-stress를 負荷한 control群은 532.1 ± 22.5 ng/ml로 normal群에 비해 增加하였다.

HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 550.7 ± 23.2 ng/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는 450.7 ± 21.7 ng/ml로 control群에 비해 減少하였다 (Table II).

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

Samples	Stress	Corticosterone (ng/ml)
Normal	-	376.8 ± 13.2
Control	Immobilization-stress	630.5 ± 21.5 ^o
	Cold-stress	532.1 ± 22.5 ^o
HGJ	Immobilization-stress	550.7 ± 23.2 [#]
	Cold-stress	450.7 ± 21.7 [#]

HGJ (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 oC. The serum corticosterone was determined with spectrofluorometer. 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).

3. 腹腔 mast cell로부터 histamine 遊離에 미치는 效果

Mast cell에 compound 48/80 0.5 μg/ml를 가했을 때 放出되는 histamine量은 78.6 ± 3.8% 이었다. HGJ 0.1, 1 및 10

mg/ml를 前處理 하였을 때는 75.3 ± 3.4%, 23.7 ± 2.7% 및 8.5 ± 1.8%로 1 mg/ml 이상의 농도에서 복강 mast cell로부터 histamine의 放出을 抑制하였다 (Table III).

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

Drug Concentration (mg/ml)	Histamine release (%)
Control	78.6 ± 3.8
HGJ 0.1	75.3 ± 3.4
HGJ 1.0	23.7 ± 3.7*
HGJ 10.0	8.5 ± 1.8*

Various concentration of HGJ (0.1, 1.0 and 10 mg/ml) were added into the rat peritoneal mast cells 10 mins before compound 48/80 (0.5 µg/ml) treated. The data represents the mean ± SE from 3 experiments. *: Significantly different from control group (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 129.9 ± 1.8%로 增加하였고, immobilization-stress를 負荷한 control群은 Con A를 處理하지 않았을 때 83.4 ± 2.6%로, Con A를 處理하였을 때는 111.5 ± 1.7%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 91.3 ± 1.2%로, Con A를 處理하였을 때는 120.4 ± 1.4%로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였다.

HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 群은 Con A를 處理하지 않았을 때는 86.2 ±

1.8%로, Con A를 處理하였을 때는 114.9 ± 2.1%로 control群에 비해 別 差異가 없었으며, HGJ 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群은 Con A를 處理하지 않았을 때는 93.8 ± 1.5%로, Con A를 處理하였을 때는 123.9 ± 2.1%로 control群에 비해 別 差異가 없었다 (Table IV). HGJ 10, 100 및 1,000 µg/ml를 in vitro에서 處理하고 Con A를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 HGJ를 處理한 群은 각각 101.3 ± 1.2%, 112.5 ± 1.4% 및 120.6 ± 1.8%로 細胞生存率이 增加하였다. Con A를 處理한 대조군의 細胞生存率은 138.5 ± 1.7% 이었으며, HGJ를 處理한 群은 140.7 ± 1.7%, 150.9 ± 1.5% 및 160.7 ± 1.6%로 細胞生存率이 增加하였다 (Table V).

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

Samples	Stress	Cell Viability (%)	
		Con A-nontreated	Con A-treated
Normal	-	100.0 ± 1.5	129.9 ± 1.8
Control	Immobilization-stress	83.4 ± 2.6**	111.5 ± 1.7**
	Cold-stress	91.3 ± 1.2	120.4 ± 1.4
HGJ	Immobilization-stress	86.2 ± 1.8	114.9 ± 2.1
	Cold-stress	93.8 ± 1.5	123.9 ± 2.1

HGJ (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 (1 × 10⁷ cells/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 ± SE of 5 mice. *: Significantly different from normal group (*: p<0.01, **: p<0.001).

Table V. Effect of HGJ on the cell viability of thymocytes in vitro.

Drug Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)	
	Con A-nontreated	Con A-treated
Control	100.0 \pm 1.2	138.5 \pm 1.7
HGJ 10	101.3 \pm 1.2	140.7 \pm 1.7
HGJ 100	112.5 \pm 1.4*	150.9 \pm 1.5*
HGJ 1,000	120.6 \pm 1.8*	160.7 \pm 1.6*

Various concentration of HGJ (10, 100 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$) 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 ($p < 0.001$).

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 142.1 \pm 1.9%로 增加하였고, immobilization-stress를 負荷한 control群은 LPS를 處理하지 않았을 때 81.2 \pm 2.2%로, LPS를 處理하였을 때는 124.5 \pm 2.4%로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였으며, cold-stress를 負荷

한 control群은 LPS를 處理하지 않았을 때 86.6 \pm 1.2%로, LPS를 處理하였을 때는 129.5 \pm 1.8%로 normal群에 비해 細胞生存率이 減少하였다.

HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 群은 LPS를 處理하지 않았을 때는 93.6 \pm 1.4%로, LPS를 處理하였을 때는 138.7 \pm 2.0%로 control群에 비해 增加하였으며, HGJ 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群은 LPS를 處理하지 않았을 때는 95.6 \pm 1.6%로, LPS를 處理하였을 때는 138.3 \pm 1.3%로 control群에 비해 增加하였다 (Table VI). HGJ 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 in vitro에서 處理하고 LPS를 處理하지 않았을 때의 細胞生存率을 100%로 하였을 때 HGJ를 處理한 군은 각각 102.7 \pm 2.2%, 115.8 \pm 1.7% 및 127.9 \pm 1.5%로 細胞生存率이 增加하였다. LPS를 處理한 대조군의 細胞生存率은 142.8 \pm 1.9% 이었으며, HGJ을 處理한 군은 144.8 \pm 1.5%, 157.4 \pm 1.9% 및 164.5 \pm 1.8%로 細胞生存率이 增加하였다 (Table VII).

Table VI. 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 \pm 1.6	142.1 \pm 1.9
Control	Immobilization-stress	81.2 \pm 2.2**	124.5 \pm 2.4*
	Cold-stress	86.6 \pm 1.2**	129.5 \pm 1.8*
HGJ	Immobilization-stress	93.6 \pm 1.4*#	138.7 \pm 2.0*#
	Cold-stress	95.6 \pm 1.6*	138.3 \pm 1.3*

HGJ (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 oC. The separated splenocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 hrs in RPMI 1640 media mixed with an activating mitogen of lipopolysaccharide (LPS). The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from normal group (*: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$). #: Significantly different from control group (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$).

Table VII. Effect of HGJ on the cell viability of splenocytes in vitro.

Drug Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)	
	LPS-nontreated	LPS-treated
Control	100.0 \pm 1.0	142.8 \pm 1.9
HGJ 10	102.7 \pm 2.2	144.8 \pm 1.5
HGJ 100	115.8 \pm 1.7*	157.4 \pm 1.9*
HGJ 1,000	127.9 \pm 1.5*	164.5 \pm 1.8*

Various concentration of HGJ (10, 100 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$) 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 ($p < 0.001$).

6. Thymocytes의 DNA fragmentation에 미치는 效果

Normal群의 DNA fragmentation은 3.5 \pm 0.2% 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은 12.7 \pm 0.9%로, cold-stress를 負荷한 control群은 8.3 \pm 0.6%로 normal群에 비해 增加하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 11.2 \pm 0.8%로, cold-stress를 負荷하였을 때는 7.5 \pm 0.4%로 control群에 비해 別 差異가 없었다 (Table VIII).

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

Samples	Stress	DNA fragmentation (%)
Normal	-	3.5 \pm 0.2
Control	Immobilization-stress	12.7 \pm 0.9*
	Cold-stress	8.3 \pm 0.6*
HGJ	Immobilization-stress	11.2 \pm 0.8
	Cold-stress	7.5 \pm 0.4

HGJ (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 oC. 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 ($p < 0.001$).

7. Splenocytes의 DNA fragmentation에 미치는 效果

Normal群 splenocytes의 DNA fragmentation은 3.3 \pm 0.3%이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群은 14.7 \pm 0.5%로, cold-stress를 負荷한 control群은 10.3 \pm 0.7%로 normal群에 비해 增加하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 11.3 \pm 0.6%로 control群에 비해 減少하였으며, cold-stress를 負荷하였을 때는 8.3 \pm 0.4%로 control群에 비해 減少하였다 (Table IX).

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

Samples	Stress	DNA fragmentation (%)
Normal	-	3.3 \pm 0.3
Control	Immobilization-stress	14.7 \pm 0.5*
	Cold-stress	10.3 \pm 0.7*
HGJ	Immobilization-stress	11.3 \pm 0.6#
	Cold-stress	8.3 \pm 0.4#

HGJ (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 oC. 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 ($p < 0.001$). #: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

8. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 效果

Normal群 thymocytes 중 CD4+ 細胞는 12.3 \pm 0.3%, CD8+ 細胞는 3.1 \pm 0.2%이었으나, immobilization-stress를

負荷한 control群의 CD4+ 細胞는 17.2 ± 0.7%로, CD8+ 細胞는 3.0 ± 0.2%로 normal群에 비해 CD4+ 細胞의 population이 增加하였으며, cold-stress를 負荷한 control群의 CD4+ 細胞는 12.5 ± 0.3%로, CD8+ 細胞는 3.2 ± 0.2%로 normal群에 비해 별 差異가 없었다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고

immobilization-stress를 負荷하였을 때 CD4+ 細胞는 16.3 ± 0.5%로, CD8+ 細胞는 2.9 ± 0.3%로 control群에 비해 별 差異가 없었으며, cold-stress를 負荷하였을 때 CD4+ 細胞는 12.4 ± 0.2%로, CD8+ 細胞는 3.2 ± 0.3%로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Fig. 1, Table X).

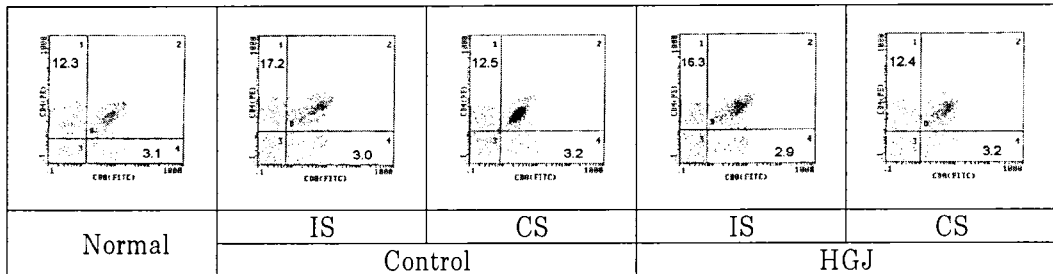


Fig. 1. Cytofluorometric pattern of thymocytes subpopulation change in immobilization-stress (IS) or cold-stress (CS) mice administered with HGJ.

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

Samples	Stress	Subpopulation (%)	
		CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺
Normal	-	12.3 ± 0.3	3.1 ± 0.2
Control	Immobilization- stress	17.2 ± 0.7	3.0 ± 0.2
	Cold-stress	12.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2
HGJ	Immobilization- stress	16.3 ± 0.5	2.9 ± 0.3
	Cold-stress	12.4 ± 0.2	3.2 ± 0.3

HGJ (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 oC. The separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 mins at 4 oC. 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).

9. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 效果

Normal群 splenocytes 중 B220+ 細胞는 37.6 ± 1.7%, Thy1+ 細胞는 22.5 ± 1.1%이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群의 B220+ 細胞는 30.4 ± 1.3%로, Thy1+ 細胞는 27.7 ± 1.3%로, cold-stress를 負荷한 control群의

B220+ 細胞는 32.3 ± 1.2%로, Thy1+ 細胞는 26.8 ± 1.3%로 normal群에 비해 B220+ 細胞의 population은 減少하고 Thy1+ 細胞의 population은 增加하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 B220+ 細胞는 35.3 ± 1.4%로, Thy1+ 細胞는 26.5 ± 1.1%로 control群에 비해

B220+ 細胞의 population은 增加하였으며, cold-stress를 負荷한 control群의 B220+ 細胞는 $36.7 \pm 1.4\%$ 로 control群에 비해 別 差異가 없었으나, Thy1+ 細胞는 $23.0 \pm 1.3\%$ 로 control群에 비해 減少하였다. Normal群 splenocytes 중 CD4+ 細胞는 $15.7 \pm 0.5\%$, CD8+ 細胞는 $7.2 \pm 0.4\%$ 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群의 CD4+ 細胞는 $18.5 \pm 0.4\%$ 로, CD8+ 細胞는 $9.6 \pm 0.3\%$ 로, cold-stress를 負荷한 control群의 CD4+ 細胞는 $17.9 \pm 0.3\%$ 로,

CD8+ 細胞는 $9.0 \pm 0.3\%$ 로 normal群에 비해 CD4+ 細胞 및 CD8+ 細胞의 population이 增加하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 CD4+ 細胞는 $17.8 \pm 0.3\%$ 로, CD8+ 細胞는 $9.2 \pm 0.4\%$ 로 control群에 비해 別 差異가 없었으며, cold-stress를 負荷한 control群의 CD4+ 細胞는 $16.2 \pm 0.4\%$ 로, CD8+ 細胞는 $7.9 \pm 0.4\%$ 로 control群에 비해 減少하였다 (Fig. 2, Table XI).

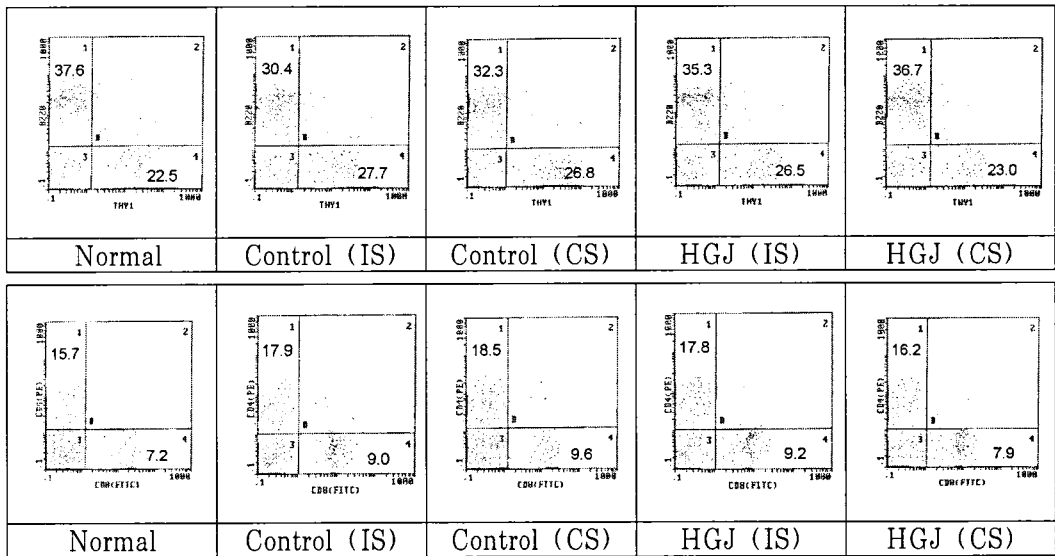


Fig. 2. Cytofluorometric pattern of splenocytes subpopulation change in immobilization-stress or cold-stress mice administered with HGJ.

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

Samples	Stress	Subpopulation (%)			
		B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Normal	-	37.6 ± 1.7	22.5 ± 1.1	15.7 ± 0.5	7.2 ± 0.4
Control	Immobilization-stress	$30.4 \pm 1.3^*$	$27.7 \pm 1.3^*$	$18.5 \pm 0.4^*$	$9.6 \pm 0.3^*$
	Cold-stress	$32.3 \pm 1.2^*$	$26.8 \pm 1.3^*$	$17.9 \pm 0.3^*$	$9.0 \pm 0.3^*$
HGJ	Immobilization-stress	$35.3 \pm 1.4^{\#}$	26.5 ± 1.1	$17.8 \pm 0.3^*$	9.2 ± 0.4
	Cold-stress	36.7 ± 1.4	$23.0 \pm 1.3^*$	$16.2 \pm 0.4^{\#}$	$7.9 \pm 0.4^{\#}$

HGJ (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 oC. The separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thyl monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 mins at 4 oC. 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). #: Significantly different from control group (p<0.05).

10. Cytokines 分泌에 미치는 效果

Normal群 splenocytes培養液 중 γ -interferon의 양은 824.8 ± 29.7 pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는 501.7 ± 23.4 pg/ml로 normal群에 비해 減少하였으며, cold-stress를 負荷한 control群에서는 603.8 ± 25.4 pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 611.7 ± 23.1 pg/ml로 control群에 비해 增加하였으며, cold-stress를 負荷하였을 때는 728.9 ± 27.6 pg/ml로 control群에 비해 增加하였다 (Table XII).

Table XII. 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	-	824.8 ± 29.7
Control	Immobilization-stress	$501.7 \pm 23.4^*$
	Cold-stress	$603.8 \pm 25.4^*$
HGJ	Immobilization-stress	$611.7 \pm 23.1^*$
	Cold-stress	$728.9 \pm 27.6^{*#}$

HGJ (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 oC. 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<0.05, ## : p<0.01).

Normal群 splenocytes培養液 중

interleukin-2의 양은 532.1 ± 21.8 pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는 312.7 ± 25.3 pg/ml로 normal群에 비해 減少하였으며, cold-stress를 負荷한 control群에서는 391.4 ± 21.5 pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 427.8 ± 24.8 pg/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는 470.5 ± 19.7 pg/ml로 control群에 비해 增加하였다 (Table XIII).

Table XIII. 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	-	532.1 ± 21.8
Control	Immobilization-stress	$312.7 \pm 25.3^*$
	Cold-stress	$391.4 \pm 21.5^*$
HGJ	Immobilization-stress	$427.8 \pm 24.8^*$
	Cold-stress	$470.5 \pm 19.7^{\#}$

HGJ (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 oC. 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 (p<0.001). #: Significantly different from control group (p<0.05).

Normal群 splenocytes培養液 중 interleukin-4의 양은 215.8 ± 18.5 pg/ml 이었으나, immobilization-stress를 負荷한 control群에서는 127.6 ± 12.8 pg/ml

로, cold-stress를 負荷한 control群에서는 136.4 ± 10.8 pg/ml로 normal群에 비해 減少하였다. HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때는 136.5 ± 13.6 pg/ml로, cold-stress를 負荷하였을 때는 147.9 ± 10.5 pg/ml로 control群에 비해 별 差異가 없었다 (Table XIV).

Table XIV. 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	-	215.8 ± 18.5
Control	Immobilization-stress	127.6 ± 12.8*
	Cold-stress	136.4 ± 10.8*
HGJ	Immobilization-stress	136.5 ± 13.6
	Cold-stress	147.9 ± 10.5

HGJ (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 oC. 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).

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.

HGJ 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 增加하였으며, HGJ 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群의 macrophages에서 生成되는 CL量도 control群에 비해 增加하였다 (Fig. 3). 또한 FITC-conjugated E. coli particles의 탐식 實驗에서도 동일한 結果를 觀察할 수 있었다 (Fig. 4).

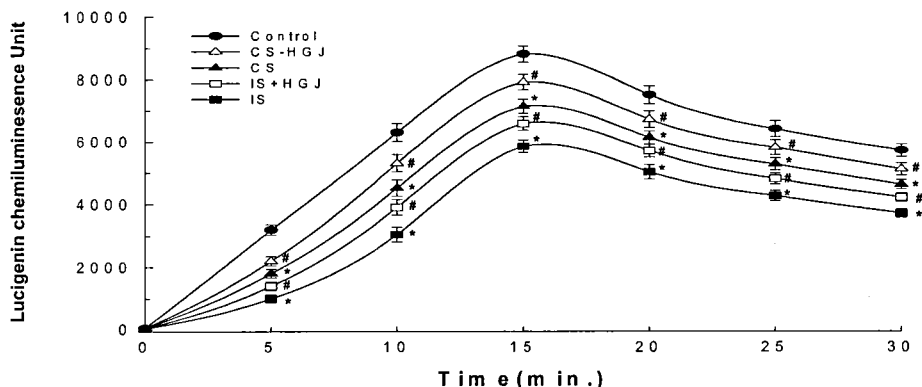


Fig. 3. Effect of HGJ on lucigenin chemiluminescence in immobilization-stress or cold-stress mice.

HGJ (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated peritoneal macrophages (2 × 10⁶ 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±SE of 5 mice. *: Significantly different from normal group (p<0.001). #: Significantly different from control group (p<0.001).

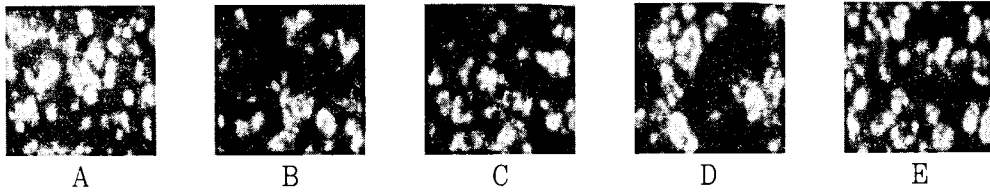


Fig. 4. Photomicrographs of engulfment of fluorescein conjugated *E. coli* particles in murine peritoneal macrophages.

Inverted fluoromicroscope photomicrographs (200×) showing uptake of fluorescein conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages of control mice (A), immobilization-stress mice (B), cold-stress mice (C), mobilization-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

Normal群的의 macrophages로부터 生成되는 nitric oxide (NO)양은 LPS와 γ -IFN을 處理하지 않았을 때 $2.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 이었으며, LPS와 γ -IFN을 處理하였을 때 $19.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 로 增加하였으며, immobilization-stress를 負荷한 control群的의 macrophages에서 生成되는 NO양은 LPS와 γ -IFN을 處理하였을 때 $12.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 로, cold-stress를 負荷한 群은 $15.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 로 normal群에 비해 減少하였다.

HGJ 500 mg/kg을 投與하고 immobilization-stress를 負荷한 實驗群的의 macrophages에서 生成되는 NO양은 $17.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 로 control群에 비해 增加하였으며, HGJ 500 mg/kg을 投與하고 cold-stress를 負荷한 實驗群的의 macrophages에서 生成되는 NO양도 $18.7 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 로 control群에 비해 增加하였다 (Table XV).

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

Samples	Stress	Nitric oxide (μM)
Normal	-	19.5 ± 1.2
Control	Immobilization-stress	$12.8 \pm 1.3^{**}$
	Cold-stress	$15.2 \pm 1.1^*$
HGJ	Immobilization-stress	$17.3 \pm 1.4^\#$
	Cold-stress	$18.7 \pm 1.3^\#$

HGJ (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 \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from normal group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). #: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

V. 考 察

Stress는 同一한 stress라 하더라도 주 어지는 時間 및 使用한 쥐의 strain에 따라 免疫系에 미치는 影響에 差異가 있다고 알려져 있다^{46,47}. 따라서, 本 實驗에서는 stress를 負荷하는 實驗을 할 때 BALB/c계 생쥐를 사용하였으며, immo

bilization-stress의 條件은 Eun 등의 報告⁴⁸⁾에 의하여 stress 負荷時間을 10時間으로 하였으며, cold-stress의 條件은 Morishita 등의 方法⁴⁹⁾에 의하여 stress 負荷時間을 6時間으로 하였다.

생쥐에 immobilization-stress를 10 時間 負荷하였을 때와 cold-stress를 6 時間 負荷하였을 때 각각 serum histamine量 96.3 및 85.9 ng/ml로 stress를 負荷하지 않은 normal群 67.5 ng/ml에 비해 增加하였으며, HGJ 500 mg/kg을 7일간 投與하였을 때 serum histamine量은 83.3 및 72.3 ng/ml로 stress를 負荷한 control群에 비해 有意性 있게 減少하였다 (Table I). 實驗結果 immobilization-stress가 cold-stress에 비해 stress의 強度가 강하였으며, HGJ가 stress의 種類에 관계없이 histamine의 分泌를 抑制하였다. 이는 electric shock stress⁵⁰⁾ 및 cold stress⁴⁹⁾가 serum histamine을 增加시킨다는 報告와도 동일한 結果이다.

생쥐에 immobilization-stress를 10 時間 負荷하였을 때와 cold-stress를 6 時間 負荷하였을 때 각각 serum corticosterone量은 630.5 및 532.1 ng/ml로 normal群 376.8 ng/ml에 비해 현저히 增加하였으며, HGJ를 投與하였을 때 serum corticosterone量은 550.7 및 450.7 ng/ml로 control群에 비해 減少하였다 (Table II). 이러한 結果는 stress에 의해 serum corticosterone量이 增加한다는 Li 등⁵¹⁾ 및 Eun 등²⁷⁾의 報告와도 동일한 結果이다. Nakano 등^{52,53)}은 副腎 摘出 rat에 stress를 負荷하면 정상 rat에 비해 死亡率이 增加하는데, glucocorticoid를 前處理하면 死亡率이 減少하며, stress 負荷시 glucocorticoid의 分泌에 histamine이

직접적인 mediator로써 關여한다고 하였다. 본 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.

Histamine는 生體 내에 있는 mast cell의 顆粒속에 貯藏되어 있다가 mast cell의 高親和性 IgE 受容體 (FcεRI)를 經유하여 活性化가 일어나면 細胞質 내의 Ca²⁺ 농도가 상승하여 脫顆粒이 일어나 histamine 등의 mediator가 遊離되어 다양한 생리적인 현상을 나타내는 것으로 알려져 있다³¹⁾. HGJ가 serum histamine을 減少시켰기 때문에, 이의 作用을 확인하고자 mast cell을 分離하여 實驗하였다. Mast cell에 HGJ를 前處理하고 脫顆粒을 促進하는 compound 48/80을 處理하였을 때 HGJ는 1 mg/ml 이상의 농도에서 mast cell로부터 histamine 分泌를 抑制하였다 (Table III). 이는 HGJ가 mast cell로부터 histamine의 脫顆粒을 抑制하여 corticosterone을 分泌를 抑制함을 강력히 시사하는 것이다.

Stress가 免疫系에 미치는 影響을 살펴보기 위해 thymocytes 및 splenocytes의 細胞生存率을 측정하였다. 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. HGJ를 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 별 差異가 없었다

(Table IV, V). 이는 HGJ가 stress에 의해 減少되는 thymocytes의 細胞生存率에 影響을 주지 않음을 시사하는 것이다. 이의 作用이 HGJ의 直接作用에 의한 것인가를 확인하기 위해 HGJ 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 in vitro에서 thymocytes에 處理하였을 때 細胞生存率이 增加하였다. 이 結果는 HGJ의 作用이 間接作用에 의해 기인되고 있음을 意味하는 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, immobilization-stress가 cold-stress 보다 splenocytes의 細胞生存率을 강하게 抑制하였다. HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때는 splenocytes의 生存率이 control群과 비교하여 모두 增加하였다 (Table VI, VII). 이는 HGJ가 stress에 의해 減少되는 splenocytes의 生存率을 增加시켜 免疫能을 增強시킬 수 있음을 시사하는 것이다. 이는 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 변화가 없다는 報告⁵⁴⁾와 비교하였을 때 stress가 T 및 B cell에 서로 다른 影響을 줄 수 있음을 意味하는 것이다.

Thymocyte 및 splenocytes의 細胞生存率 減少가 이들 細胞의 apoptosis에 의해 야기된 것인가를 확인하기 위해 DNA fragmentation을 測定하였다. Immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 負荷하였을 때 thymocytes의 DNA fragmentation이 normal群에 비해 增加하였으며, HGJ를 投與하고 stress를 負

荷하였을 때 DNA fragmentation은 대조군과 별 差異가 없었다 (Table VIII). 또한, immobilization-stress 및 cold-stress를 각각 負荷하였을 때 splenocytes의 DNA fragmentation이 normal群에 비해 增加하였으며, HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 모두 DNA fragmentation이 減少하였다 (Table IX). 이 結果는 immobilization-stress 및 cold-stress는 모두 thymocytes 및 splenocytes의 apoptosis를 誘導하여 細胞生存率을 減少시키나, HGJ를 投與하였을 때 thymocytes일 경우에는 stress에 의해 誘導된 apoptosis에 影響을 주지 않으나, splenocytes일 경우에는 stress에 의해 誘導된 apoptosis를 減少시켜 細胞生存率을 增加시킨다고 사료된다. 이러한 結果는 cold-stress에 의해 thymocytes의 apoptosis가 促進된다는 Morishita 등의 報告²⁸⁾와도 동일한 結果이다.

Stress를 받은 생쥐는 bone marrow, liver, thymus 및 spleen 등 조직의 種類에 따라 免疫細胞의 subpopulation에 다양한 變化가 나타나는 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾. Stress에 의한 thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 變化에 미치는 HGJ의 影響을 觀察하였을 때 immobilization-stress를 負荷하였을 경우에는 thymocytes의 CD4+ cell의 population이 normal群에 비해 增加하였으나, CD8+ cell의 population은 normal群과 별 差異가 없었으며, cold-stress를 負荷하였을 때는 CD4+ cell 및 CD8+ cell의 population은 normal群과 差異가 없었다. HGJ를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 control群에 비

해 별 차이가 없었다 (Fig. 1, Table X). 이 결과는 HGJ가 immobilization-stress에 의해 증가되는 CD4+ cell의 population에 영향을 주지 못함을 시사하는 것이다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 B220+ cell의 population은 減少하고, Thy1+ cell의 population은 增加하였다. HGJ를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 B220+ cell의 population은 control群에 비해 增加하고 Thy1+ cell의 population은 별 영향이 없었다. Cold-stress를 負荷하였을 때는 B220+ cell의 population은 control群에 비해 별 차이가 없었으나, Thy1+ cell의 population은 control群에 비해 減少하였다. Immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 splenocytes의 CD4+CD8- cell 및 CD4-CD8+ cell의 population은 모두 normal群에 비해 增加하였으나, HGJ를 投與하고 immobilization-stress를 負荷하였을 때 CD4+CD8- 및 CD4-CD8+ cell의 population은 control群과 별 차이가 없었으나, cold-stress를 負荷하였을 때는 CD4+CD8- 및 CD4-CD8+ cell의 population이 대조군에 비해 모두 減少하였다 (Fig. 2, Table XI).

한편, Evans 등⁵⁶⁾은 stress의 種類에 따라서는 cytotoxic T cell의 population이 減少된다고 報告하여, stress의 條件에 따라 subpopulation에 變化가 차이가 있을 수 있음을 시사하였다.

Thymocytes는 thymus의 皮質 및 髓質에서 增殖 및 分化과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T

lymphocyte (Tc)로 分化되며, 分化된 Th1 cell은 γ -interferon (γ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 分泌하여 다른 T cell, B cell 및 macrophage의 增殖과 分化를 促進하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 活性化시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁹⁾

Li 등⁵⁷⁾은 stress는 Th1 cell을 抑制하여 γ -IFN 및 IL-2의 生産을 抑制하나, Th2 cell에서 分泌되는 IL-4의 生産에는 영향을 주지 않는다고 報告하였으며, Sukhikh 등⁵⁸⁾은 stress에 의해 interferon의 生産이 減少되어 NK cell의 活性이 抑制된다고 報告하여, stress가 cytokine 分泌를 抑制하여 免疫能을 抑制할 수 있음을 시사하였다.

Stress에 의해 splenocytes에서 分泌되는 cytokines의 變化에 미치는 HGJ의 영향을 觀察하고자, immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 γ -IFN 및 IL-2는 分泌가 normal群에 비해 모두 抑制되었으며, HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 γ -IFN 및 IL-2의 分泌는 control群에 비해 增加하였다 (Table XII, XIII). IL-4의 分泌는 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 normal群에 비해 減少하였다.

HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 interleukin-4의 分泌는 control群에 비해 별 차이가 없었다 (Table XIV). 이는 짧은 시간의 stress에 의해서는 Th1 cell의 活性이 抑制되나, 긴 시간의 stress에 의해서는 Th1 cell 및 Th2 cell의 活性이 모두 抑

制된다는 Eun 등의 結果⁷⁴⁾와도 유사한 結果이다. HGJ 投與에 의해 v-IFN 및 IL-2의 分泌가 增加되었다는 結果는 HGJ가 주로 Th1 cell의 活性을 增加시키고 있음을 시사하는 것이다.

外部로부터 異物質이 侵入하게 되면 生體는 自己防禦를 위해 macrophages가 活性化되어 phagocytosis가 促進된다. 이러한 phagocytosis는 polymorphonuclear leukocytes에서도 일어난다. Phagocytosis는 免疫的인 側面에서 重要하지만, 상처 치유 過程에서도 매우 重要하다. 본 實驗에서 macrophages의 phagocytic activity를 測定하는데 chemiluminescence (CL)를 測定하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 macrophages가 particle을 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 生成하는데, 이때 生成된 oxygen radical과 lucigenin이 反應하여 lucigenin CL를 發生하는 것을 測定함으로써 phagocytic activity가 진행되는 것을 확인하는 것이다. Macrophage로부터 生成되는 CL를 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量を 減少시켰으나, HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때는 control群에 비해 CL量이 增加하였다 (Fig. 3, 4). 이 結果는 HGJ가 stress에 의해 低下되는 phagocytosis를 回復시킬 수 있음을 意味하는 것이다.

Nitric oxide(NO)는 活性化된 macrophages의 pseudopodia 형성을 抑制하는 것으로 알려져 있다.

Immobilization-stress 및 cold-stress를

負荷하였을 때 macrophages로부터 NO量은 normal群에 비해 減少하였으나, HGJ를 投與하고 immobilization-stress 및 cold-stress를 負荷하였을 때 control群에 비해 NO量이 增加하였다 (Table XV). 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 調節되고 있음을 시사하는 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 化肝煎은 immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 增加되는 histamine 및 corticosterone의 量を 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

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

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 1 mg/ml 이상의 농도에서 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 影響이 없었다.
 5. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 細胞生存率은 減少되었으며, HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.
 6. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 thymocytes의 DNA fragmentation은 增加되었으며, HGJ를 投與하였을 때 影響이 없었다.
 7. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 DNA fragmentation은 增加되었으며, HGJ를 投與하였을 때 減少되었다.
 8. Immobilization-stress에 의해 thymocytes의 CD4+ 細胞의 population은 增加되었으나, HGJ를 投與하였을 때 影響이 없었다.
 9. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenocytes의 B220+ 細胞의 population은 減少되고 Thy1+ 細胞의 population은 增加되었으며, HGJ를 投與하였을 때 immobilization-stress에 의해 減少된 B220+ 細胞는 增加되고, cold-stress에 의해 增加된 Thy1+ 細胞는 減少되었다.
 10. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 splenic CD4+ 및 CD8+ 細胞의 population은 增加되었으나, HGJ를 投與하였을 때 cold-stress에 의해 增加된 CD4+ 및 CD8+細胞의 population이 減少되었다.
 11. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 γ -IFN 및 IL-2의 分泌가 減少되었으며, HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.
 12. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 IL-4의 分泌는 減少되었으며, HGJ를 投與하였을 때 影響이 없었다.
 13. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages의 phagocytic activity는 減少되었으나, HGJ를 投與하였을 때 增加되었다.
 14. Immobilization-stress 및 cold-stress에 의해 macrophages로부터 nitric oxide 分泌가 減少되었으나, HGJ를 投與 하였을 때 增加되었다.
- 以上の 實驗結果 化肝煎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, 臨床에서 stress와 關聯된 症狀에 널리 活用될 수 있을 것으로 思料된다.
- 투 고 일 : 2006년 10월 27일
□ 심 사 일 : 2006년 10월 30일
□ 심사완료일 : 2006년 11월 06일

參 考 文 獻

1. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. J Am Med Assoc. 1992; 267: 1244-1252
2. Ottaviani E, FRanceschi. C. The

- neuroendocrinology of stress from invertebrates to man. *Prog Neurobiol.* 1996; 48: 421-440
3. Kopin IJ. Catecholamines, adrenal hormones, and stress. In *Neuroendocrinology* (ed. Krieger DT, Hugjes JC.). Sinauer Association Inc. 1980: 159
 4. Guillemin RG. Beta-lipotropin and endorphin: Implications of current knowledhe. In *Neuroendocrinology* (ed. Krieger DT, Hugjes JC.). Sinauer Association Inc. 1980: 67
 5. Bugajski J, Gadek A. Central H1- and H2-histaminergic stimulation of pituitary adrenocortical response under stress in rats. *Neuroendocrinology* 1983; 36(6): 424-430
 6. Mormede P. The vasopressin receptor antagonist dPTyr (Me) AVP does not prevent stress- induced ACTH and corticosterone release. *Nature* 1983; 302(5906): 345-346
 7. Rivier C, Vale W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature.* 1983; 305(5932): 325-327
 8. Fuller RW, Sonddy HD. Effect of serotonin-releasing drugs on serum corticosterone concentration in rats. *Neuroendocrinology.* 1980; 31(2): 96-100
 9. Nakane T. et al. Evidence for a role of endogenous corticotropin -releasing factor in cold, ether, immobilization, and traumatic stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82(4): 1247-1251
 10. 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
 11. 黃義完, 金知赫. 東醫精神醫學. 서울: 現代醫學書籍社. 1987; 99-109, 626, 651-657
 12. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社. 1990: 141-148
 13. 柳道坤. 東醫 生理學 講義. 익산: 원광대학교출판국. 1999; 354-381, 636-651
 14. 鄭遇悅. 韓方病理學. 益山: 圓光大學校 韓醫科大學 病理學教室. 1995; 31, 32, 203
 15. 張介賓. 景岳全書. 北京: 人民衛生出版社. 1997; 1267
 16. 葉桂. 國譯 葉天士女科. 서울: 大星文化社. 1995; 154
 17. 段苦寒. 中醫臨床處方手冊. 北京: 中國醫藥科技出版社. 1999; 296
 18. 楊思澍 등. 中醫臨床大全. 北京: 北京科學技術出版社. 1991; 306
 19. 中醫大辭典 編纂委員會. 中醫大辭典·方劑分冊 第二卷. 北京: 人民衛生出版社. 1983; 621
 20. 方藥中 등. 實用中醫內科學. 서울: 一中社. 1988; 437
 21. 李長. 東醫 臨床內科學. 서울: 法仁文化社. 1999; 315
 22. 洪喜鐸 譯. 동의 임상부인과학. 서울: 法仁文化社. 1999; 202
 23. 夏桂成. 實用 婦科方劑學. 北京: 人民衛生出版社. 1997; 266, 267
 24. 傳統醫學研究所 編纂. 東洋醫學大辭典. 서울: 成輔社. 2000; 2678
 25. 金갑성 등. 실용동서의학임상총서 1

- 권. 서울: 정담. 2001; 416. 423
26. 박선동, 유정원. 化肝煎이 carbon tetrachloride 로 誘導한 肝中毒 흰쥐에 미치는 影響. 동국한의학연구소 논문집 1995; 4(3): 313-325
27. 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
28. Morishita S. et al. Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. Pathophysiology. 1997; 4: 213-219
29. Endo Y. In methods in Enzymology. New York. Academic Press. 1983; 94-100
30. Zenker N. Bernstein DE. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. J Biol Chem. 1958; 231: 695
31. 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
32. Yurt RW. et al. Native heparin from rat peritoneal mast cells. J Biol Chem. 1977; 518
33. Harvima RJ. et al. Optimization of histamine radioenzymatic assay with purified histamine N-methyltransferase. Clinica Chinica Acta. 1988; 171: 247
34. Wysocki LJ, Sato VL. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA. 1978; 75: 2844.
35. Mizel SB. et al.. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J Immunol. 1979; 120: 1497
36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol methods. 1983; 65: 55
37. Kotnic V, Fleischmann WRJr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J Immunol methods. 1990; 129: 23
38. 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
39. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas- ligand that induces apoptosis. J Exp Med. 1994; 179: 873-879
40. 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
41. Boudard F. et al. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. J Immunol Methods. 1994; 174: 259
42. Blair AL. et al. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J Immunol Methods. 1988; 112: 163
43. Chok PW. et al. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. J

- Immuno Methods. 1993; 162: 1
44. Rocket KA. et al. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immunity*. 1991; 59(9): 3280
45. 고경봉. 스트레스와 정신신체의학. 서울: 일조각. 2002: 3
46. Schedlowski M, Schmidt RE. Stress and the immune system. *Naturwissenschaften* 83(5): 1996; 214-220
47. 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
48. 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*. 18(1): 172-178. 2004.
49. Morishita S. et al. Cold-stress induces thymocyte apoptosis in the rat. *Pathophysiology* 4: 1997 : 213-219
50. Campos HA, Jurpe H. Evidence for a cholinergic mechanism inducing histamine increase in the rat brain in vivo. *Experientia*. 1970; 26(7): 746-747
51. Li T. et al. Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4+ T cells. *Anticancer Res*. 1997; 17(6D): 4259-4268
52. Nakano K. et al. Possible role of glucocorticoids in a complement-activated state induced by cobra venom factor in rats. *Acta Endocrinol*. 1986; 112(1): 122-129
53. Nakano K. et al.: Significance of increased secretion of glucocorticoids in mice and rats injected with bacterial endotoxin. *Brain Behavior and Immunity*. 1987; 1(2): 159-172
54. 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
55. Sudo N. et al. Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation*. 1997; 4(3): 113-119
56. Evans DL. et al. Stress-associated reductions of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells in asymptomatic HIV infection. *Am J Psychiatry*. 1995; 152(4): 543-550
57. Li T. et al.: Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4+ T cells. *Anticancer Res*. 17(6D): 4259-4268. 1997.
58. Sukhikh FT. et al. Interrelations of natural cellular cytotoxicity and interferon systems in immobilization stress. *Biull Eksp Biol Med*. 1984; 98(11): 593-595
59. Channon JY. et al. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide
-

anion and inhibition by agents
that increase intracellular cyclic

AMP. J Leucocyte Biol. 1987; 41:
450-455