

## 시호 추출물이 세포성 면역반응에 미치는 영향

정영미 · 김종면 · 송희종 · 조정곤

전북대학교 수의과대학

(1993년 5월 20일 접수)

### Effect of *Bupleurum falcatum* extract on cellular immune responses

Young-mee Jung, Jong-myeon Kim, Hee-jong Song, Jeong-goen Cho

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received May 20, 1993)

**Abstract :** *Bupleurum falcatum* has been used for treatment of inflammation, jaundice, influenza and hepatitis as a traditional orient folk medicine. This experiment was carried out to evaluate the effect of *B falcatum* extract on cellular immune responses *in vivo* and *in vitro*. Antigen binding cell(ABC) assay, antibody production, Arthus and delayed-type hypersensitivity(DTH) reaction against sheep erythrocytes(SRBC) were very depressed in *B falcatum* extract treated group *in vivo*. The growth of *Staphylococcus aureus* in brain heart infusion(BHI) broth containing *B falcatum* extract was remarkably inhibited. Otherwise, that of *Salmonella typhimurium* was not significantly increased *in vitro*. When *B falcatum* extract pretreated mice were intraperitoneally(IP) injected *S typhimurium* and *S aureus*, respectively, the number of bacteria in peritoneal exudates were time dependent declination compared with those of control, and the weight of spleen and the number of macrophage migration into peritoneal cavity have no difference from those of untreated control. *B falcatum* extract gradually increased phagocytic activities of peritoneal macrophage against *Candida albicans* time and dose dependently, and was not significant production of migration inhibitory factor(MIF). But migration abilities of normal leucocytes in *B falcatum* extract pretreated group were decreased dose dependently. When *B falcatum* extract was IP administered, these data indicate that *B falcatum* extract increases level of serum corticosterone. Therefore, *B falcatum* extract was indirectly mediated in immune system by serum corticosterone having relation to immunosuppression. These results lead to the conclusion that *B falcatum* extract acts as a trigger or regulator of cellular immune responses in immune system.

**Key words :** *Bupleurum falcatum*, ABC assay, Arthus-DTH reaction, MIF, corticosterone.

## 서 론

최근 일부의 생물체에서 항염, 항미생물 및 면역변조제로서 작용하는 물질이 함유되어 있음이 보고된<sup>1~5</sup> 이후 새로운 물질 개발에 대한 관심과 더불어 전통 민간요법으로 사용되어온 식용 및 약용식물이 새롭게 조명되고 있다.<sup>6~10</sup> 이들로 부터 다양한 천연산물이 추출되었

고 일부는 그 구조와 생화학적 특성<sup>1~5</sup>이 명확히 밝혀져 있으며 세포의 증식 및 기능의 변화와 관련된 일부의 천연산물은 중요한 면역변조제로 취급되어 그 특성은 물론 작용기전에 대하여 자세히 연구되고 있다.

시호(*Bupleurum falcatum* L.)는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로써 다른 약제와 혼합하여 전통 민간요법에서 항염, 간염, 황달, 진통, 진정, 감기 등 다양한 용

도로 광범위하게 사용되는 매우 중요한 생약제이다.

시호에 대한 연구는 경험적인 처방으로 전래된 약리 작용 즉, 항염, 진통, 진정<sup>11-13</sup> 등의 그 효과를 구명한 보고가 이루어진 이래, 약리작용을 발현하는 성분 그리고 그 구조의 특성<sup>14-17</sup>이 밝혀지고, 독성<sup>13</sup>과 간 기능에 미치는 효과<sup>6,7,10</sup> 등이 보고 되었으며 최근에는 혈중의 corticosterone 유도 증가<sup>18</sup>, Trp-1, Trp-2 그리고 benzopyrene을 이용한 변이원성 함유유무<sup>19</sup>, 방사선 장애에 대한 효과 등이 계속 보고되었다.<sup>20</sup> 그러나 일부의 한약 제중 감소 등에 대해서는 그 약리작용이<sup>8,21</sup> 성분분석과 함께 면역학적인 연구<sup>22-23</sup> 등이 계속 이어지고 있는 반면, 시호에 대해서는 면역계를 대상으로 실시된 실험보고<sup>24</sup>는 거의 찾아보기 어렵다. 따라서 본 연구는 수용성 시호 근추출물에 대한 시험관내 및 생체내 항균효과와 복강대식세포의 탐식능, 시험관내에서 MIF생산 유도와 백혈구 유주능 등을 측정하고, 한편 시호 추출물을 생체내에 주입함으로써 발현되는 면역반응을 검색하고자 SRBC에 대한 항원결합세포 측정, 항체생산능, 즉척증창(Arthus 및 DTH) 반응을 측정하여 시호 추출물의 세포성면역능에 미치는 영향에 대하여 실험한 바 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**시호 추출물** : 시호는 전통 민간 요법에서 사용되고 있는 방식으로 추출하였다. 즉, 건조 시호를 깨끗이 세척한 후 세절하여 그 무게의 10배에 달하는 증류수에 넣고 10시간 증탕하여 수용성 수출액을 얻었다. 그 후 이를 여과지(0.2 $\mu$ m)로 여과하여 불용성 입자를 제거한 다음, 냉동 건조하였다. 그 추출물은 사용목적에 따라 Hanks balanced salt solution(HBSS) 또는 RPMI 1640(Gibco, Grand Island)에 적절한 농도로 용해한 후 재여과 하여 사용하였다.

**실험동물** : 생후 7~8주령된 Balb/c 마우스를 암·수 구별없이 사용하였고 이들 실험동물은 수도물과 pellet 사료(삼양사료)를 공급하고 가능한 한 스트레스를 받지 않도록 하면서 실험에 사용하였다.

**사용 균주** : 본 교실에서 계대보존중인 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 및 *Candida albicans*를 사용하였으며 이들 균주는 brain heart infusion(BHI) broth(Difco, Detroit)에 배양하여 필요에 따라 사용하였다.

**세균증식도의 측정** : 각 사용균주를 BHI broth에 12시간 배양한 다음, 계열 희석하여 spectrophotometer(Cecil)에 의한 흡광도(635nm)를 측정하였고, 평판중층배양법으로 균수를 측정하여 표준곡선을 만들고 이 표준곡선에 따라 균량을 계산하였다. 시호 추출물을 BHI

broth 50ml에 다양한 농도(0.5, 5, 50 및 500 $\mu$ g/ml)로 첨가한 다음 1000개의 세균 세포(20cells/ml)를 접종하여 37 $^{\circ}$ C 항온조에 배양하면서 경시적(12, 24, 36 및 48시간)으로 각 배양액 4ml를 취하고 spectrophotometer를 이용하여 균량을 계산하였다.

**세균집중 및 복강삼출액내 균수 측정** : *S aureus*와 *S typhimurium*을 BHI broth에 24시간 배양한 다음, 이를 다시 동일배지에 4시간 재배양 하여 phosphate buffered & saline(PBS) solution으로 3회 세척한 후 표준곡선에 따라 균수를  $1 \times 10^6$ CFU/ml로 되게 조정하여 그 0.5ml를 시호 추출물을 4일간 투여한 군과 대조군 각 마우스에 복강내로 접종하였다. 그 후 경시적(1, 4 및 10시간)으로 실험군 당 각 4수의 마우스를 희생시켜 4 $^{\circ}$ C 멸균 생리식염수 5ml를 복강내로 주입 세척하여 복강세척액을 얻고 그 세척액 내의 세균수를 평판중층배양법으로 측정하였다.

**복강삼출 세포수 측정** : 시호 추출물(1mg/ml/mouse)를 4일간 투여한 군과 PBS를 투여한 대조군 마우스에 각 사용균주( $0.5 \times 10^6$ CFU/mouse)를 복강내로 감염시키고 1, 4 및 10시간에 마우스를 희생시킨 다음 복강삼출액을 취한 후 복강삼출액내로 유주된 대식세포수는 혈구계산판을 이용하여 산출하였다.

**비장지수 측정** : 시호 추출물(1mg/ml)를 4일간 투여한 군과 PBS를 투여한 대조군 마우스에 각 사용균주( $0.5 \times 10^6$ CFU/mouse)를 복강내로 감염시키고 1, 4 및 10시간에 마우스를 희생시킨 다음 비장을 적출하여 이의 무게를 중량한 다음, 아래의 공식에 의해 비장지수를 구하였다.

$$\text{Spleen index} = \frac{\text{spleen weight}}{\text{body weight}} \times 100$$

**복강 대식세포 탐식능 측정** : 마우스 복강내에 멸균 fluid thioglycollate medium 2ml)를 주입하여 복강대식세포의 삼출을 유도하였고 3일후 다양한 농도의 시호를 투여하였다. 그 후 3일째에 heparin(5 unit/ml)이 함유된 4 $^{\circ}$ C HBSS를 복강내 주입, 절개한 후 복강삼출액을 수집하였다. 회수한 복강삼출액을 500g로 10분씩 2회 세척한 후 삼출세포를 분리한 다음, 5% 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 (5% FCS RPMI 1640)에  $5 \times 10^6$  cells/ml이 되게 부유하였다. 복강대식세포의 단층배양세포층을 만들기 위해서 세포 부유액을 plastic petridish에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 부란기에서 5시간 배양한 다음, 37 $^{\circ}$ C RPMI 1640으로 세척하여 petridish내의 비흡착된 세포들을 제거하였다. 흡착세포들을 4 $^{\circ}$ C RPMI 1650으로 씻어  $4 \times 10^6$  cells/ml로 부유시킨 후 1시간 배양

하였다. 복강 대식세포의 탐식능을 측정하기 위해 위와 같이 준비된 대식세포의 단층세포층에 *C. albicans*( $4 \times 10^6$  CFU/ml)를 첨가한 다음, 재배양하였다. 탐식능의 측정에는 재배양 후 30분, 1시간, 3시간 그리고 6시간에 각각의 petridish를 Wright-Giemsa 염색을 실시하여 jelly로 봉입검경 하여 탐식세포수와 미 탐식세포수를 측정하였다.

**비장세포 부유액**: 마우스를 희생시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 4°C HBSS( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  free)에 조심스럽게 teasing하고 lens paper에 여과하여 결합조직과 죽은 세포피를 제거하였으며 4°C HBSS로 10분씩 3회 원심(400g)세척한 후 필요한 농도로 조정하였다. 세포의 생존율은 trypan blue dye exclusion 법으로 실시하였으며, 이때 세포생존율은 95% 이상이었다.

**림프구의 준비**: 마우스 비장세포부유액으로 부터 통상의 Ficoll-Hypaque 밀도원심구배법에 의해 단핵세포만을 분리(500g 30분)하고 이를 4°C HBSS로 10분씩 (400g), 3회 세척한 후 FCS free RPMI 1640에 각기 목적에 맞추어 농도를 조정하였다.

**MIF 생산**: 마우스 비장에서 얻은 림프구를 얻은 후 FCS free RPMI 1640에  $3 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 재부유하여 여기에 Con A( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 가해 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  부란기에서 20시간 배양하였으며 이를 500g로 30분간 원심하여 상청액(cell free supernatant)을 얻고 상청액내의 Con A의 제거는 동량의 Sephadex G-100(Sigma Chemical, St. Louis, Mo)를 가해 4°C에서 24시간 방치 후 그 상청액을 여과멸균 하여 이를 MIF 역가검사에 사용하였다.

**MIF 표적세포**: 백혈구 유주저지반응시 표적세포로는 닭 백혈구를 사용하였다. 표적세포의 준비는 heparin( $1000 \text{ unit}/\text{ml}$ )이 처리된 주사기를 이용하여 닭의 정맥혈을 채취한 후 80g로 10분간 원심하여 백혈구층을 조심스럽게 분리한 후 이를 HBSS( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  free)로 10분씩 2회 원심(500g)세척하여 최종농도가  $8-10 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 FCS free RPMI 1640에 부유하여 사용하였다. 이때의 세포생존율은 95% 이상이었다.

**백혈구 유주억제시험**: Seshadri<sup>25</sup> 및 Bellina 등<sup>26</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 요약하면 70  $\mu\text{l}$  미세 시험관에 상기와 같이 준비한 닭 백혈구 부유액을 채운 후 그 일단을 clay adams로 밀봉하여 500g로 10분간 원심한 후 세포가 들어있지 않은 모세시험관 부분을 절단, 제거한 다음, plastic petridish에 silicon grease를 이용하여 부착한 다음, Con A 또는 다양한 농도의 시호에 의해 자극 유도된 백혈구 유주억제인자가 함유된 배양상층액을 넣은 후 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  부란

기에서 20시간 배양하여 유주를 유도한 다음 그 유주역을 측면기(planimetry)를 이용하여 측정하였다. 이 때 시료마다 3개의 모세시험관과 petridish를 사용하였다. 유주저지율은 다음 공식에 의해 계산하였다.

Migration inhibition(%) =

$$1 - \frac{\text{Migration area with MIF from } B.falcatum \text{ extract treated cells}}{\text{Migration area with MIF from non treated cells}} \times 100$$

**닭 백혈구 유주시험 표적세포의 준비와 시험**: 닭 백혈구 유주능에 대한 시호 추출물에 대한 영향을 확인하기 위하여 닭 백혈구 유주능의 표적세포를 준비하였고 여기에 다양한 농도(0.1, 1, 10 및  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )의 시호 추출물을 첨가하여 닭 백혈구 유주억제시험 방법에 따라 실험하였다.

**항원**: 흉선 의존성 항원인 면양 적혈구(SRBC)를 사용하였으며 SRBC는 면양의 경정맥으로부터 채혈한 후 동량의 Alsever's액(pH 6.1)을 넣어 4°C에 보관 4주 이내 것을 사용직전에 멸균 PBS로 3회 원심세척 하여 적절한 농도로 부유하여 사용하였다.

**시호 추출물의 처리**: 시호 근추출물은 SRBC 감작 전(I), 후(II), 4일간씩 그리고 전후(III) 8일간 실험군 마우스 복강내에  $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 매일 투여하고 대조군에는 PBS 1ml을 복강내에 주사하였다(Table 1).

**항원결합세포수 측정**: 면역는 면양 적혈구(SRBC)를 마우스 복강내로 실시<sup>27-29</sup>하였으며 비장세포의 항원결합세포의 검사는 하 및 이<sup>30</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 요약하면 3회 원심세척 하여 HBSS에 부유한 비장세포부유액  $0.5 \text{ ml}$ ( $1 \times 10^7/\text{ml}$ )과 SRBC 부유액  $0.5 \text{ ml}$ ( $25 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ )를 혼합하여 200g로 5분간 원심한 다음, 4°C에서 30분간 방치하였으며 그 후 0.3% methylene blue 1 방울을 첨가하고 조심스럽게 흔들어서 재부유하였다. 그 후 그 부유액 1방울을 혈구계산판에 떨어뜨리고 항원결합세포를 계산하여 이의 결합율을 다음식에 의해서 산출하였다.

$$\% \text{ of antigen binding cell} = \frac{\text{No. of antigen binding cells}}{\text{No. of total cell counted}} \times 100$$

**SRBC에 대한 응집소 역가**: SRBC 부유액( $1 \times 10^7$  cells/ml)의 1ml를 마우스 복강내에 주사하여 면역시킨 후 7일째에 마우스의 안와정맥총에서 채혈, 혈청을 분리하였다. 응집소 역가는 하 및 이 등<sup>28</sup>이 기술한 microtitration 방법으로 실시하였다. 요약하면 총항체를 측정하기 위해서는 microtitration tray(Chemical Co. Inc.,

New heavens, CT)의 각 well에 56°C, 30분간 비동화시킨 혈청 25  $\mu$ l 을 PBS로 2배 계열희석한 다음, 동량의 1% SRBC부유액을 혼합하여 37°C에서 1시간 방치 후 응집의 유형을 관찰하였고 응집을 일으키는 혈청의 최고희석도를 항체가로 판정하였다.

**즉척 종창반응 검사** : 면역은 SRBC 부유액(1 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml) 0.1ml를 마우스의 복강내에 주사하여 실시하였으며, 면역후 4일에 20% SRBC 부유액 0.03ml을 좌측 즉척 피내에 야기주사(T<sub>0</sub>)하고 야기주사 후 3(T<sub>3</sub>) 및 24(T<sub>24</sub>)시간에 즉척종창정도를 microcaliper로 측정하였고 한편 우측즉척피내에 PBS 0.03ml을 투여하여 종창정도와 좌측종창정도를 비교하여 즉척 종창반응 검사를 실시하였다.

$$\% \text{ of increase} = \frac{\frac{T_{1L}}{T_{1R}} \text{ OR } \frac{T_{24L}}{T_{24R}} \frac{T_{0L}}{T_{0R}}}{\frac{T_{0L}}{T_{0R}}} \times 100$$

L : SRBC 투여  
R : PBS 투여

## 결 과

**시호 추출물이 시험관내 세균증식에 미치는 영향** : 시호 추출물이 시험관내 세균증식에 미치는 영향은 Fig 1과 같다. 즉, *S aureus*는 시호 추출물 첨가농도에 비례하여 대수 증식기인 12~24시간에서는 대조군에 비해 농도에 따라 증식이 크게 억제되었고 특히 50  $\mu$ g/ml 처리군에서 현저하였다. 반면에 *S typhimurium*은 추출물의 첨가에 별다른 영향을 받지않았다.

**시호 추출물이 복강내 점종세균의 recovery에 미치는 영향** : 시호 추출물의 투여가 복강내 세균 recovery에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 마우스에 추출물을 4일간 주입한 후 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU의 *S typhimurium* 또는 *S aureus*를 접종하였다. 그 후 1, 4 및 10시간에 마우스를 희생시켜 복강삼출액을 얻은 후 삼출액내의 균수를 측

정한 바(Fig 2), 시간의 경과에 따른 세균회수율은 1 또는 4 시간군에서는 대조군과 차이가 없었으나 배양 후 10시간군에서는 크게 감소되었다.

**시호 추출물이 대식세포의 복강내 유주에 미치는 영향** : 시호 추출물을 복강내에 4일간 연속 투여한 마우스에 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU의 *S aureus* 또는 *S typhimurium*을 접종한 후 1, 4 및 10시간에 복강삼출액을 얻고 삼출액 내의 대식세포수를 계산하였다. 그 결과(Table 2) 균집중 후 시간이 경과함에 따라 삼출세포의 점진적인 숫적증가가 인정되었으나 시호추출물의 투여에 의한 차이는 보이지 않았다.

**시호 추출물이 비장증량에 미치는 영향** : 시호 추출물을 복강내 4일간 연속 투여한 마우스에 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU의 *S aureus* 또는 *S typhimurium*을 접종한 후 1, 4 및 10시간에 비장을 얻은 결과 Table 3에서와 같이 균집중 후 시간이 경과함에 따라 점진적으로 비장 중량이 증가하였으나 시호 추출물 투여에 의한 차이는 보이지 않았다.

**시호 추출물이 복강 대식세포 탐식능에 미치는 영향** : 시호 추출물을 마우스 복강내에 100, 10, 1, 및 0.1  $\mu$ g/ml을 3일동안 투여한 후 복강 대식세포를 얻어 시험관내에서 *C albicans*에 대한 복강 대식세포의 탐식능을 측정된 결과 Fig 3에서와 같이 접종 후 시간의 경과에

Table 1. Schedule of *B Falcatum* extract treatment

Groups	No. of mouse	Day of <i>B falcatum</i> extract treatment in relation to SRBC sensitization		Route
I	5	-4, -3, -2, -1		i.p.*
II	5	+1, +2, +3, +4		i.p.
III	5	-4, -3, -2, -1		i.p.
		+1, +2, +3, +4		i.p.
Control#	5	0		i.p.

\* Intraperitoneal injection # Administration of PBS 1ml for 8 days.

Table 2. Effects of *B falcatum* extract on the migration of cells into peritoneal cavity of mice infected with *S aureus* or *S typhimurium*

Infected with	Treatment of <i>B falcatum</i> extract	No. of recovered cells (X10 <sup>6</sup> cells/mouse)		
		1hr	4hr	10hr
		<i>S aureus</i>	+	0.99
	-	0.85	0.91	1.78
<i>typhimurium</i>	+	0.73	1.13	1.75
	-	0.61	1.15	1.58

Mice were pretreated with *B falcatum* extract(1mg/mouse) or PBS for 4 days, and then infected i.p. with 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU of *S aureus* or *S typhimurium*. Peritoneal exudated were collected at 1, 4, and 10 hrs after bacterial infection and peritoneal exudates cells were counted by hemocytometer.

**Table 3.** Effects of *B. falcatum* extract on the spleen indices of mice infected with *S. aureus* and *S. typhimurium*

Infected with	Treatment of <i>B. falcatum</i> extract	Spleen indices at		
		1hr	4hr	10hr
<i>S. aureus</i>	+	0.43	0.53	0.65
	-	0.45	0.58	0.62
<i>S. typhimurium</i>	+	0.43	0.48	0.64
	-	0.48	0.54	0.76

Mice were pretreated with *B. falcatum* extract(1mg/mouse, daily) or PBS(as a control) for 4 days and infected i.p. with  $0.5 \times 10^6$  CFU of *S. aureus* or *S. typhimurium*. All mice were sacrificed for splenectomy at the indicated hours after infection

$$\text{Spleen index} = \frac{\text{Spleen weight}}{\text{Body weight}} \times 100$$

**Table 4.** Effects of *B. falcatum* extract on migration inhibitory factor production and its migration area from mice splenocytes against normal chicken leucocytes

Extract ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Migration area ( $\text{mm}^2$ )	% on control
Con A+0 of B.F. *	59.94 ± 1.27	100.0
0.1 of B.F.	63.71 ± 2.28	97.0
1 of B.F.	66.31 ± 1.51	94.9
10 of B.F.	60.75 ± 3.18	99.3
100 of B.F.	56.80 ± 0.64	102.2

Migration inhibitory factor was obtained from co-cultured mouse splenocytes with Con A( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of varying concentrations of *B. falcatum* extract for 20 hrs at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubation. And then, the cultural supernatants(migration inhibitory factor) were added into the migration chamber attached capillary tube filled with normal chicken leucocytes, and migration inhibitory tests were performed.

# Mean ± S.E.

\* *Bupleurum falcatum* extract

**Table 5.** Effect of *B. falcatum* extract on migration of normal chicken leucocytes

Extract( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Migration area( $\text{mm}^2$ )	% of control
Control	105.19 ± 0.79	100.0
0.1	NT*	
1	103.41 ± 9.32	98.3
10	98.39 ± 13.87	93.6
100	74.58 ± 6.48	70.9

Varying concentrations of *B. falcatum* extract were added into the migration chamber when migration abilities of normal chicken leucocytes were assayed.

# Mean ± S.E.

\* Not tested.

따라 농도의 증가함에 점진적인 탐식능의 증가를 인정할 수 있었다,

**시호 추출물이 MIF 생산능에 따른 그 유주역에 미치는 영향 :** 마우스 비장세포를 다양한 농도의 시호 추출물에 Con A를 첨가하여 배양한 후 MIF 생산과 그 유주역을 측정한 바 Table 4에서와 같이 MIF의 생산은 대조군에 비해 3, 5, 1, 0.7%가 감소하였으며 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 2% 증가를 보여 MIF과 그 유주역은 증감의 차이는 없었다.

**시호 추출물이 백혈구 유주능에 미치는 영향 :** 닭 백

**Table 6.** Effect of *B. falcatum* extract on the antigen binding cell of mouse splenocytes

Time of extracts treatment relative to SRBC sensitization		% of antigen binding cells
Control		12.25 ± 0.16
I		7.95 ± 0.15
II		5.95 ± 0.25
III		6.60 ± 0.18

*B. falcatum* extracts(1mg/mouse, daily) was treated the indicated days, and all mice were sensitized with 1ml of  $1 \times 10^7$  SRBC on day 4. Antigen binding cell assay were performed on day 7 after SRBC sensitization.

# Mean ± S.E.

혈구를 표적세포로 하고 다양한 농도의 시호 추출물을 첨가하여 배양하고 그에 따른 유주역을 측정한 결과는 Table 5와 같으며 농도의 증가에 따라 103.41 ± 9.32, 98.39 ± 13.87, 74.58 ± 6.48로 나타났으며 대조군 105.19 ± 0.79에 비해 1, 7, 30%가 감소하는 경향을 보였으며 특히 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30%의 유주역이 감소하였다.

**시호 추출물이 비장세포의 항원결합세포에 미치는 영향 :** 시호 추출물 투여에 따른 비장세포의 항원결합세포에 미치는 영향은 Table 6에서와 같이 시호 추출물 투여

**Table 7.** Effects of *B. falcatum* extract on the antibody production against SRBC in mice

Time of extracts treatment relative to SRBC sensitization	Hemagglutinin titer (log <sub>2</sub> )
Control	5.29±0.36
I	5.14±0.50
II	5.53±0.46
III	4.14±0.25

*B. falcatum* extract(1mg/mouse, daily) was administered i.p. for the indicated days. All mice were i.p. sensitized with 1mℓ (1 × 10<sup>7</sup> SRBC/mℓ) on day 4. Hemagglutinin titers were assayed on day 7 after sensitization.  
#Mean ± S.E.

군 전 (I), 후 (II), 전후 (III) 각각 7.95 ± 0.15, 5.95 ± 0.25, 6.60 ± 0.18로써 대조군 12.25 ± 0.16에 비해 공히 낮았으며 특히 면역후 투여 (II)에서 5.95 ± 0.25로써 더욱 낮은 형성율을 보였다.

**시호 추출물이 SRBC에 대한 항체생성에 미치는 영향:** 시호 추출물의 투여에 따른 마우스에서 SRBC에 대한 항체생성의 결과는 Table 7에서와 같이 시호 추출물 투여군 전 (I), 후 (II), 전후 (III)에서 각각 5.14 ± 0.50, 3.53 ± 0.46, 4.14 ± 0.25로써 대조군 5.29 ± 0.36에 비해 대체로 낮은 항체가를 보였으며 면역후 투여군 (II)에서 최저치를 보였다.

**시호 추출물이 족척 종창반응에 미치는 영향:** 시호 추출물이 족척 종창반응에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 8과 같다. 즉, 야기 주사 3시간에 측정한 Arthus 반응은 시호 추출물 전투여군 (I) 21.0 ± 0.7, 후 투여군 (II) 18.6 ± 0.9, 전·후 투여군 (III) 18.7 ± 0.5로써 대조군 27.0 ± 1.3에 비하여 현저히 감소되었다. 한편 야기 주사 24시간에 측정한 지연성 과민반응은 면역

적 투여군 (I)에서 19.8 ± 2.6로써 대조군 19.3 ± 1.8비해 다소 증강된 반응을 보였으나 면역 전·후 투여군 (III)에서 14.4 ± 0.2로 현저히 감소되었다.

## 고 찰

현재까지 알려진 시호의 약리성분은 saikosaponin으로써<sup>14~17</sup> 주로 olenane계의 saikosaponin a, c, d이다.<sup>16</sup> 이러한 성분은 crude extract에 0.5~1% 정도가 함유되어 있다.<sup>14</sup> 생약제중 감초에서 분리된 saponin인 glyrrhizin(GL)과 시호의 saikosaponin은 구조와 약리작용이 매우 유사하고<sup>17</sup> GL은 감초의 강력한 면역조절제의 기능<sup>31,32</sup>을 가지고 있기 때문에 시호 saikosaponin의 그 기능 또한 유추할 수도 있다. 또한 시호 saikosaponin은 복강내 투여시 혈중의 corticosterone의 수준을 정상시의 10배 정도 증가시킨다.<sup>18</sup> Steroid hormone인 corticosterone은 항염제로써 뿐만아니라 면역조절 특히 면역억제작용을 한다는 보고가 축적되어 있다.<sup>33~38</sup>

본 실험은 시호 추출물을 마우스에 투여하고 생체 주요 방어기구인 면역계에 미치는 영향을 구명하기 위해서 시도되었다. 그러나 시호에 대한 면역학적인 연구가 거의 전무한 상태이므로 객관적으로 비교, 고찰할 수는 없으나 시호 추출물에 포함된 saikosaponin이 생체 특히 복강내에 투여될 때 corticosterone이라는 steroid hormone의 혈중농도를 증가시킨다는 보고에 의거<sup>18</sup> 시호에 대한 면역학적 해석을 steroid hormone이 마우스 생체내 미치는 면역반응과 비교하여 우회적으로 검토하려 한다.

즉, 시험관내에서 BHI broth에 여러단계 희석된 시호 추출물을 첨가, 배양한 실험결과 화농성 세균인 *S. au-*

**Table 8.** Effect of *B. falcatum* extract on the footpad swelling reaction against SRBC in mice

Time of extract treatment relative to SRBC sensitization	Footpad thickness(%)	
	3hrs	24hrs
Control	27.0±1.3	19.3±0.6
I	21.0±0.7	19.8±0.9
II	18.6±0.9	17.8±0.7
III	18.7±0.5	14.4±0.0

# Mean ± S.E.

*B. falcatum* extract(1mg/mouse/day) was injected i.p. for the indicated days. All mice were sensitized with 1 × 10<sup>7</sup> SRBC an day 0 and challenged with 0.03mℓ of 20% SRBC on day 4. Footpad thickness was measured at 3 and 24 hrs after challenge.

$$\% \text{ of increase} = \frac{\frac{T_{3L}}{T_{3R}} \text{ OR } \frac{T_{24L}}{T_{24R}} - \frac{T_{0L}}{T_{0R}}}{\frac{T_{0L}}{T_{0R}}} \times 100$$

L : SRBC 투여  
R : PBS 투여

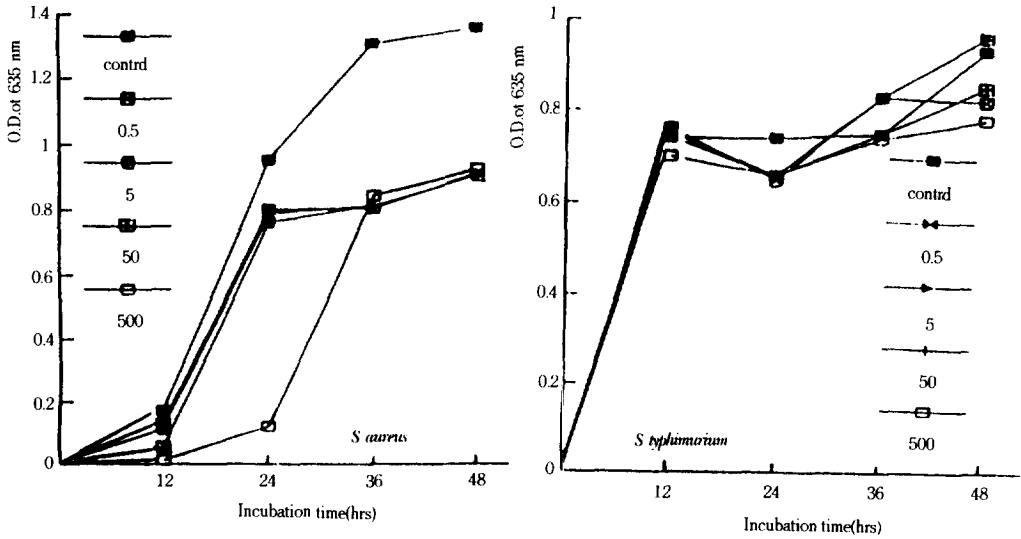


Fig 1. Effect of *B. falcatum* extract on the growth of *S. aureus* and *S. typhimurium* in BHI broth for 48 hrs. *S. typhimurium* and *S. aureus* were cultured with varying concentrations of *B. falcatum* extract for 48 hrs, respectively, and were measured by the spectrophotometer (O. D. at 635nm) at the indicated hours. These data mean O.D. values.

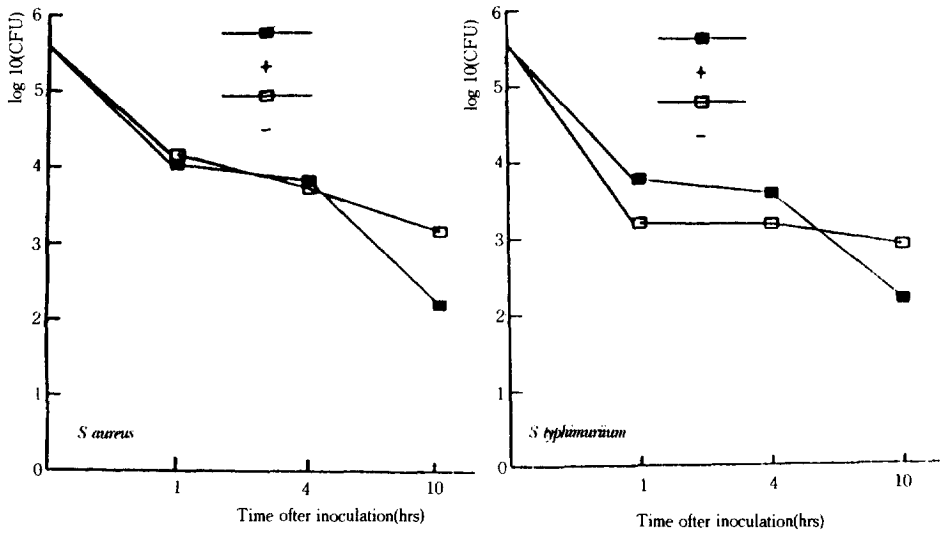


Fig 2. Effect *B. falcatum* extract on the recovery of *S. typhimurium* or *S. aureus* from peritoneal cavity of mice. All mice treated i. p. with *B. falcatum* extract (1mg/day) for 4 days were infected with  $0.5 \times 10^4$  CFU of *S. aureus* or *S. typhimurium*, respectively. Four mice per group were sacrificed at the indicated hours after inoculation for harvest of peritoneal exudates and then, the number of bacteria in exudates were counted by colony forming units.

reus는 대조군에 비해 대수증식기인 12시간까지 현저히 증식이 억제되었으며 특히 500 µg/ml일 때 24시간까지 거의 증식이 억제된 반면, 세포 내재성 기생체인 *S. typhimurium*은 대조에 비해서 다소 억제된 증식소견을 보였다. 본 실험결과에서 시호 추추물은 세균에 따라

특이적으로 작용을 달리하는 것으로 보이며 이것은 최 등의 보고<sup>39</sup>와 일치하였다(Fig 1).

시호 추출물을 4일간 투여한 마우스에 *S. aureus*와 *S. typhimurium*을 접종하고 1, 4, 10시간 후에 측정된 세균 회수율(Fig 2), 삼출세포의 복강내 축적(Table 2) 그리

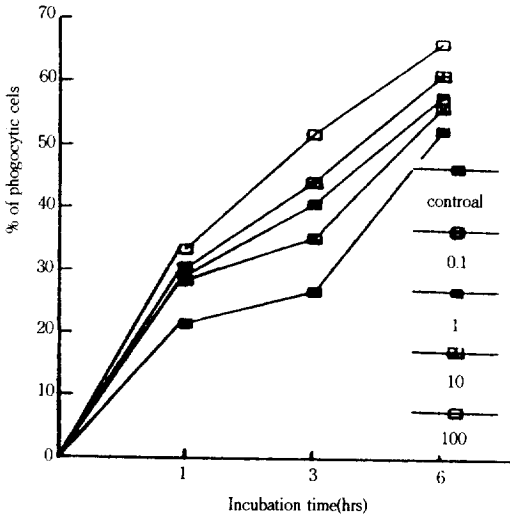


Fig 3. Effect of *B. falcatum* extract on phagocytic abilities of macrophages. Peritoneal macrophages ( $4 \times 10^4$  cells/ml) obtained from mice treated with varying concentrations of *B. falcatum* extract for 3 days were cultured for 5 hrs. *Candida albicans* ( $4 \times 10^4$  CFU/ml) were inoculated into the cultures and phagocytosis of peritoneal macrophages was assayed.

고 비장지수 (Table 3)는 경시적으로 측정된 결과가 공히 대조군과 별다른 차이가 없었으나 세균 회수율의 경우 10시간 경과 후 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 또한 여러 단계로 희석한 시호 추출물을 3일간 투여한 마우스의 복강 대식세포를 시험관내에서 *C. albicans*와 1, 3 및 6시간 배양한 후 대식세포의 탐식능을 관찰한 결과 (Fig 3), 대조군에 비해 시호 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라 탐식능의 점진적인 증가를 보였으며 배양 시간이 경과함에 따라 대조군에 비하여 더욱 증가되는 경향이였다.

이러한 실험의 결과는 steroid hormone이 대식세포의 활성을 억제함으로써 탐식능이 감소되고, 표적세포와의 배양시간이 길면 갈수록 탐식능이 더욱 현저하게 감소되며 적정용량 이하의 낮은 용량을 투여하였을 때나 4시간 이하의 배양시간은 탐식능에 영향을 주지 않으며 또한 같은 항염제 일지라도 ketorolac같은 non-steroid계 항염제는 탐식능에 영향을 미치지 않는다고한 Grasso 등의 보고<sup>40-42</sup>들과 비교할 때 시호 추출물의 투여량과 투여횟수가 탐식능에 영향을 주지않을 정도의 혈중 corticosterone수준을 유도시켰을 것이라고 여겨지며 또한 짧은 배양시간도 탐식능에 영향을 주지 않았을 것이라고 사료된다.

또한 steroid hormone은 염증반응시 간성 대식세포가

간으로 유입되는 것을 억제하며 zymosan이나 corynebacterium을 처리하여 간성 대식세포가 2~3배 증가된 상태의 마우스에 steroid hormone을 투여하였을 때 간성 대식세포가 정상수준으로 감소된다는 사실로 미루어<sup>43</sup> 복잡내로 대식세포 유주와 비장내로 대식세포와 림프구의 유주를 조절하여 1, 4 및 10시간 공히 대조군과 유사한 결과를 가져왔다고 사료된다.

MIF는 T 림프구가 특정항원의 작용에 의해서 분비되는 lymphokine으로써 염증부위에서 대식세포의 유주를 억제시키는 숙주-기생체간의 상호작용에 관여하며, 대식세포 유주저지 반응은 *in vitro*에서 세포성 면역반응을 평가하는 척도가 된다. MIF 생산은 (Table 4) Con A와 여러 농도의 시호 추출물을 배양했을 때와 Con A 단독배양시 증가의 차를 인정할 수 없었다. 그러나 다양한 농도로 희석한 시호 추출물을 직접 처리하였을 때 백혈구 유주능은 시호 추출물의 농도가 증가할 수록 억제되었다 (Table 5). 그러므로 백혈구 유주저지는 MIF에 의한 것이 아니고 단순히 saikosaponin이 백혈구 유주를 억제하였다고 사료되며 이는 강 등<sup>44</sup>과 이 등<sup>45</sup>이 수행한 실험에서 saponin이 백혈구 유주를 억제하였다는 보고와 유사한 결과라고 해석되었다.

SRBC 감작에 의한 항원-세포 결합능 (Table 6)과 항체생산 (Table 7)이 시호 추출물 처리군에서 공히 대조군에 비해 감소되었다. Steroid hormone이 SRBC에 대한 Ig G 및 Ig M PFC반응을 억제한다는 보고, 혈청 항체 또는 PFC반응을 억제한다는 보고,<sup>38, 46, 47</sup> 그리고 비 억제적이라는 보고<sup>48</sup>는 본 실험에서 시호 추출물을 마우스에 투여하여 얻어진 항원-세포 결합능과 항체생산의 결과와 일치하는 것으로 보아 시호 추출물에 포함된 saikosaponin의 복잡내 대사에 의해 증가된 corticosterone의 작용으로 인하여 억제되었다고 사료된다.

시호 추출물이 SRBC 감작에 대한 Arthus 반응과 DTH에 미치는 영향 (Table 8)에 관한 본 실험결과 중 Arthus 반응은 대조군에 비해 시호추출물 처리군에서 현저히 낮았다. DTH에서 대조군에 비해 시호 추출물을 SRBC 감작 후 (II), SRBC 감작전후 (III)에 투여했을 경우 7%, 28%가 낮았으나 감작전 (I)시호 추출물 투여군에서 미약한 증가(4%)를 보였다. 이는 하 등<sup>49</sup>과 성적이 일치한다 (Table 8). DTH의 감소는 억제 T 세포의 관여와 협조 T 세포의 억제<sup>35, 36</sup>에 의해서 유발되며, steroid hormone을 투여한 DTH 결과와 본 실험성적이 일치함을 이루는 것으로 미루어 시호 추출물의 직접적인 작용보다는 이로 인하여 유도는 steroid hormone에 의한 영향으로 사료되었다.

본 실험을 총괄하여 볼 때 시호 추출물은 생체에 투여



되어 면역계 특히 세포성 면역에 정도의 차이는 있었으나 분명히 작용함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 시호 추출물 자체의 직접적인 작용이라기보다는 1차적으로 생체내에 작용하여 corticosterone의 혈중농도를 높힘으로써 면역기능의 변조에 관여하는 것으로 사료되었다.

## 결 론

본 실험은 전통 민간요법제로 널리 알려진 시호 근 추출물을 대상으로 마우스의 생체내 및 시험관내에서 직접적인 항균작용의 유무와 면역계 세포에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

즉, 시호 추출물 투여가 세균저항에 미치는 효과를 평가하고자 생체내에서 세균회수, 대식세포유주, 비장지수 및 대식세포탐식능과 아울러 시험관내에서 세균증식상태를 관찰하였고, 유주억제인자 생산의 유무에 따른 백혈구 유주능의 변화에 미치는 시호근 유래 추출물의 효과를 측정하였으며, 마우스를 면역 적혈구로 감각하고, 시호 근 추출물을 면역 전(I), 후(II) 및 전후(III)에 걸쳐 복강내 투여한 후 항원결합세포 형성능, 항체생산, 즉척종창반응을 실시하였다.

1. 48시간동안 시험관내에서 배양된 세균 증식도는 *S typhimurium* 경우 대수증식기인 12시간까지 증식이 억제되었으며 특히 500 µg/ml일 때는 24시간까지 증식이 대조군에 비해 현저히 억제되었으나 한편 *S typhimurium*은 대조군에 비해 별다른 차이가 없었다.

2. *S typhimurium*과 *S aureus*를 복강내 감염시킨 후 경시적으로 희생시켜 세균회수, 복강대식세포유주 및 비장지수를 측정한 결과는 세균회수는 1, 4시간 경과후 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았으나 10시간 후 두균주 공히 급격한 감소를 보였고, 복강내 대식세포와 비장지수는 1, 4, 및 10시간 후 공히 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다.

3. *Candida albicans*에 대한 복강대식세포의 탐식능은 농도의 증가에 따라 시간의 경과에 따라 다소 미약한 증가의 경향을 보였을 뿐이다.

4. 마우스 비장세포에서 유주억제인자의 생산은 증감의 차를 인정할 수 없었으며 백혈구의 유주능은 농도의 증가에 따라 특히 200 µg/ml에서 뚜렷한 감소를 보였다.

5. 면역 적혈구에 대한 항원 결합세포 형성능 및 항체생산은 실험군에서 대체로 감소되었으나 추출물 투여 시기에 따라 감소의 정도에 차이가 있었다. 감각전 시호 추출물을 투여한 군에서의 항체생산은 15% 정도 증가하였다.

6. 면역 적혈구에 대한 즉척종창반응은 대조군에 비해 시호 추출물 투여군에서 공히 감소하였으며 감각전 투여군에서 약간의 증가(5%)가 있었으나 감소의 유형이 항원 결합세포 형성능 및 항체생산의 결과와 유사하였다.

## 참 고 문 헌

1. 최민순, 이정호, 김종면 등. Lentinan이 면역활성에 미치는 영향. 대한 면역학회지 1990 ; 12 : 235~249.
2. Yamoda H. Recent studies on bioactive polysaccharides from chinese herbal medicine. *Proc Int Symp on Advances in Bioactive Natural product chemistry*. 1990 ; 57~76.
3. Kikumoto S, Miyazima T, Kimura K, Study on the polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. Nippon Nogeikagaku Kaishi. *Jap J Agr growth* 1971 ; 169.
4. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) from *Ganoderma Lucidum*. *Gann* 1989 ; 65 : 557~558.
5. Pettit GR, Singh SB, Hanel E. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combrestatin A-4. *Experimentia* 1988 ; 45 : 209 ~ 211.
6. Noriko K, Setsuko O, Shiou-Hwa T, et al. Protective effects of various methanol extract of crude drugs on experimental hepatic injury induced by  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate in rats. *Yakugaku Zasshi* 1991 ; 113 : 199~204.
7. Lin CC, Kan ES. Medical plants used for the treatment of hepatitis in Tiwan. *Am J Chinese Med* 1990 ; 18 : 35~43.
8. Hu ZH. Studies and uses of glycyrrhizin as drugs. *Acta Pharma Sinica* 1988 ; 23 : 553~557.
9. Lin CN, Tome WP. The anti-hepatotoxic principles of *Sambucus Formosa Nahai Planta medica* 1988 ; 40 : 224~227.
10. Lin CC, Chiu HF, Yen MH, et al. The pharmacological pathological studies on Taiwan folk medicine(III) : The effects of *Bupleurum kaai* and cultivated *Bupleurum falcatum* var. *komarovi*. *Am J chinese Med* 1990 ; 18 : 105~112.

11. Yamamoto M, Kumagai A, Yamamura Y. Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. I. Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneim-Forsch*(Drug Res) 1975 ; 27 : 1021~1023.
12. Takagi K, Shibata M. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. II . Anti-inflammatory and other pharmacological action of crude saikosides. *Yakugaku Zasshi* 1969 ; 89 : 1367~1378.
13. Takagi K, Shibata M. Pharmacological studies on *Bupleurum falcatum* L. I. Acute toxicity and central depressant action of crude saikosides. *Yakugaku Zasshi* 1969 ; 89 : 712~720.
14. 한대석, 이덕근. HPLC에 의한 시호 saponin의 분리 및 정량. *생약학회지* 1985 ; 16 : 175~179.
15. Hiai S, Oura H, Kitai A, et al. A simultaneous colorimetric estimation of biologically active and inactive saikosaponins in *Bupleurum falcatum* extract. *Planta Medica* 1976 ; 29 : 247~257.
16. Seichi S, Hirotoishi M. Purification of saikosaponins a, c and d. application of large scale reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chrom* 1987 ; 400 : 293~295.
17. Yamamoto M, Kumagai A, Yamamura Y. Structure and action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. II . Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneim-Forsch*(Drug Res) 1975 ; 25 : 1240~1243.
18. Nose M, Amagaya S, Ogihara Y. Corticosterone secretion-inducing activity of saikosaponin metabolites formed in the alimentary tract. *Chem Pharm Bull* 1989 ; 37 : 2736~2740.
19. Nikawa M, Sakai Y, Ose Y, et al. Enhancement of the mutagenicity of Trp-p-1, Trp-P-2 and Benzopyrene by *Bupleuri radix* extract. *Chem Pharm Bull* 1990 ; 38 : 2035~2039.
20. Wang CM, Ohta S, Shinoda M. Studies on chemical protectors against radiation 34 : Survival effects of aqueous extracts of various chinese traditional medicines on radiation injury. *Yakugaku Zasshi* 1991 ; 3 : 322~328.
21. Qiu G, Wu AR. Chinese materia medica with anti-atopy effect. *Abst Chinese Med* 1986 ; 1 : 113~116.
22. Zhang YH, Yoshida T, Isobe K, et al. Modulation by glycyrrhizin of the cell-surface expression of H-2 Class I antigen on murine tumor cell lines and normal cell populations. *Immunology* 1990 ; 70 : 405~410.
23. Shinada M, Azuma M, Kawai H, et al. Enhancement of interferon- $\gamma$  production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to Con A and to surface antigen of hepatitis B virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986 ; 181 : 205~210.
24. 丁林娜, 浦霖醫, 中島 泉, 小柴胡湯經口投與による免疫機能の調整, *日本細菌學雜誌* 1991 ; 41 : 391 (symposium).
25. Seshadri STM, Poduval TB. Migration of normal rat thymocytes as an *in vitro* method for detecting cell mediated immunity. *J Immunol Methods* 1982 ; 52 : 231~234.
26. Bellina L, Salerno A. Chicken buffy coat leucocyte as indicator cells for human leucocyte migration inhibitory factor. *J Immunol Methods* 1987 ; 3 : 227~231.
27. Ventura M, Bleux C, Crepin Y, et al. Ig-isotype diversity generated in antibody-forming cells of the mouse. *J Immunol* 1978 ; 21 : 817~822.
28. Diamansteim T, klos M, Hann H, et al. Direct *in vitro* Evidence for different susceptibilities to 4-hydroperoxy-cyclophosphamide of antigen primed T cells regulating humoral and cell mediated immune response to sheep erythrocytes : A possible explanation for the inverse action of cyclophosphamide on humoral and cell mediated immune responses. *J Immunol* 1981 ; 126 : 5~10.
29. Whisler RL and Stobo JD. Suppression of humoral and delayed hypersensitivity response by distinct T cell subpopulation. *J Immunol* 1978 ; 121 : 539~542.
30. 하대유, 이정호. 면양 적혈구 감각량이 마우스의 자연성 과민반응과 항체생산에 미치는 영향. *전북 의대논문집* 1979 ; 3 : 95~97.
31. Fujisawa K, Watanabe Y, Kimura K. Therapeutic approach to chronic active hepatitis with glycyrrhizin *Asian Med J* 1980 ; 23 : 745~749.
32. Abe N, Ebina T, Ishida N. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol Immunol* 1982 ; 26 : 535~540.
33. Del Rey A, Besedovsky H, Sorkin E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *J Immunol*

- 1984 ; 133 : 572~576.
34. Besedovsky HO, Del A, Sorkin E, Lymphokine containing supernatants from Con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J Immunol* 1981 ; 126 : 385~389.
  35. Blomgren H. Synergism between thymocytes and lymph node cells in the graft versus-host response. Effect of cortisone treatment of the thymus cell donor. *J Immunol* 1973 ; 110 : 114~118.
  36. Marrkham ROB, Stashak PW, Prescott B, et al. Selective sensitivity to hydrocortisone of regulatory functions that determine the magnitude of the antibody response to type 3. Pneumococcal polysaccharide. *J Immunol* 1978 ; 121 : 829~834.
  37. Ezaki T, Nawa Y, Hayama T, et al. Modulation of the immune responses against SRBC after arostriol treatment in mice. *Clin Exp Immunol* 1982 ; 48 : 239~243.
  38. Dracott RN, Smith CET. Hydrocortisone and the antibody response in mice 3. Correlations between serum antibody and PFC in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology* 1979 ; 38 : 437~442.
  39. 최영태, 수종 한약의 항균작용에 대하여. *생약학회지* 1986 ; 17 : 302~307.
  40. Becker J, Grasso RJ. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophages cultures. inability of arachidonic acid, indomethacin, and hydroquaratic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid inducible factor *Int J immunopharmacol* 1985 ; 7 : 839~845.
  41. Grasso RJ, West LA, Guay jr. RC, et al. Inhibition of yeast phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures : reversibility of the effect and enhanced suppression in cultures of stimulated macrophages *J Immunopharmacol* 1982 ; 4 : 265~270.
  42. Elizabeth B, Fraser Smith, Thomas R Matthews. Effect of ketorolac on phagocytosis of *Candida albicans* by peritoneal macrophages. *Immunopharmacology* 1988 ; 16 : 151~155.
  43. MMC Diesselhoff-Den Durk, RW Crofton, Van Furth. Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response. *Immunology* 1979 ; 37 : 7~14.
  44. Kang SS, Lee YS, Lee EB. Isolation of Azukisaponin V possessing leukocyte migration inhibitory from *Melilotus officinalis*. *Kor J Pharmacol* 1987 ; 18 : 89~93.
  45. 이미숙, 정규선, 이연태, 영지 추출물이 백혈구의 Chemotaxis에 미치는 영향. *대한면역학회지* 1988 ; 10 : 167~174.
  46. Newsom SE, Darrach M. Effect of corticotropin and corticosterone on the production of haemolytic antibodies in mouse. *Can J Biochem Physiol* 1954 ; 33 : 374~380.
  47. Gabrielson A, Good RA. Chemical suppression of adaptive immunity. *Adv Immunol* 1967 ; 6 : 91~97.
  48. Wlodarski K, Zaleski M. Effect of cortisone acetate on plaque forming cell formation in mice. *Folia Biol (Praha)* 1970 ; 16 : 427~431.
  49. 하대유, 이용구, 이현구 등. Steroid Hormone이 체액성 및 세포성 면역반응에 미치는 영향. *대한면역학회지* 1986 ; 8 : 1~11.