

영지버섯 다당체의 Nitric Oxide 생성능 및 생성기전 연구

김 성 환

중부대학교 식품영양학과

Nitric Oxide Production Ability and its Formation Mechanisms in Macrophage TIB 71 Cell Line by Polysaccharide Extracted from *Ganoderma lucidum*

Sung-Whan Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Joongbu University, Choong-nam 312-940, Korea

Abstract

This study was carried out to get information on the nitric oxide production ability and its formation mechanisms of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*(PSG) by using murine macrophage cell line. The cultured mycelial cells of *Ganoderma lucidum* were extracted by alkali, and then neutralized by acid. The extract were passed through the column of DEAE cellulose for more purification. The neutral fraction was concentrated and precipitated with 95% ethanol. The precipitate was lyophilized and PSG was obtained. The immunomodulating effects of PSG on macrophage were performed by using murine macrophage cell line ATCC TIB 71 cells. The promising antitumor effector molecule, reactive nitrogen intermediate, was determined in TIB 71 cells with PSG 0.5mg. PSG alone could not induce the production of nitrite, but it had a significant potential effect on nitrite secretion when the cells were primed and triggered with BCG and Interferon(IFN)- γ . Also it was prominent by using calcium channel blocker(verapamil) and adenylate cyclase activator(forskolin).

Key words: nitric oxide production, *Ganoderma lucidum*, TIB 71cell, calcium channel blocker, adenylate cyclase activator

서 론

버섯류를 포함한 담자균류를 비롯하여 진균류, 효모류, 세균류, 지의류, 해조류, 고등동물 등에서 수 많은 생리활성물질들이 분리 정제되고 있다(1-9). 이러한 생리활성물질(biological response modifier: BRM)들은 기능성 물질로서 생체에 대한 생리활성을 나타낼 뿐만 아니라 종양세포에 대한 직접적인 세포독성은 없으나 특이적 또는 비특이적 면역증강에 의한 숙주자체의 방어기구 부활 효과를 나타내는 것으로 그 기전이 조금씩 밝혀지고 있으며 최근에는 특히 버섯 중에 함유되어 있는 다당체들의 항암 및 면역조절작용 등과 관련한 연구가 많이 진행되고 있다(3-9). 따라서 본 연구에서는 영지버섯 다당체가 면역계 전체의 기능을 조정하는 대식세포의 활성화 단계 전후에 있어 대식세포의 활성화 및 탐식능(4), cytokine 생성능(5) 등을 연구한 전보에 계속하여 항암작용 등 면역증강작용을 측정하는 새로운 방법으로 연구되고 있는 자유라디칼 형성반응(10-21) 중

반응질소 대사산물 측정법을 활용하여 반응 질소 대사산물의 생성능과 그 생성 기전을 연구함으로써 면역계에 있어서 호중구와 함께 이 물질에 대한 숙주의 일차 방어계를 담당하는 대식세포의 기능에 미치는 영지버섯 다당체의 면역조절작용을 연구하였다.

재료 및 방법

영지버섯 다당체

본 실험에서 사용한 영지버섯 다당체(polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*: PSG)는 영지버섯에서 분리한 배양균사체로부터 얻은 다당체로서 88.2%의 중성당과 우론산, 단백질이 각각 18.4%, 0.7%를 함유하고 있으며 글루코스를 주성분으로 한 글루칸에 미량의 단백질이 함께 구성된 단백질다당체이다(4).

TIB 71 대식세포주 배양

American type culture collection(ATCC)의 마우스

대식세포주인 TIB 71 세포는 중앙의대 미생물학교실에서 분양받았다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(peniciline 100unit 및 streptomycin 100 µg/ml, GIBCO, USA)가 첨가된 세포배양액(DMEM)에서 수행하였다. 다습한 5% CO₂ 배양기에서 48시간 정도 증식시킨 세포를 FBS를 제외한 DMEM에 24시간 동안 연장배양 후에 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 세포는 trypan blue exclusion 검사로 생존율 95% 이상인 것만을 선택 사용하였다(4,5,22).

영지버섯 다당체의 처리조건

영지버섯 다당체(PSG)는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 필요한 농도로 현탁하여 멸균하였다. 배양액을 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 교환하고, 배양세포에의 PSG 처리는 투여 총 용량이 100µg가 되게 각각의 농도실험군을 조정하였으며, 24시간 처리를 기본 배양시간으로 하였다(4,5).

반응질소 대사산물 생성능 측정

NO₃⁻의 측정은 환원 효소로 다시 환원시켜서 측정해야 되기 때문에 이들 중 환원반응이 필요없는 NO₂⁻을 발색시켜서 ELISA 측정기(molecular device, USA)로 측정하였다(10,12-15). 각각 1×10⁶개의 세포가 들어 있는 각 well 중의 세포배양액(DMEM)에 매 ml당 PSG의 농도를 다르게(0.1, 0.5, 1.0, 10.0mg)하여 24시간동안 혼합배양한 배양기의 각 well에서 100µl의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess시약(0.1% N-1-naphthylethylenediamine in H₂O: 1% sulfanilamide in 5% H₃-PO₄=1:1(v:v))과 상온에서 10분 정도 반응시켰다. NO₂⁻ 생성정도는 ELISA titer tek plate에서 흡광도 540nm에서 측정하였다. 한편 동일한 방법으로 PSG(0.5mg/ml)와 함께 BCG(vaccine BCG Lyophilise, Pasteur merieux : 100µg/ml), IFN-γ(recombinant mouse IFN-γ, Genyme : 1,000unit/ml)를 각각 또는 함께 부가하고 24시간 혼합 배양한 후 같은 방법으로 측정값을 얻었다. NO₂⁻정량은 단계회색에 의한 NaNO₃의 표준곡선을 이용하였다

반응질소 대사산물 생성기전

PSG의 병용처리가 활성화된 대식세포에서 반응질소 대사산물 생성을 촉진하는 정보전달경로를 알아보기 위하여 30ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate, 50µM staurosporin, 100mM sphingosine, 300ng/ml calcium inophore, 200nM verapamil, 200µM forskolin, 200

mM sodium orthovanadate, 200µM 3-isobutyl-1-methylxanthine 그리고 300µM neomycin sulfate 등을 1×10⁶개의 TIB 71세포에 PSG(0.5mg/ml)와 함께 BCG 및 IFN-γ를 부가하여 24시간 혼합 배양한 후에 배양상층액 100µl을 취해 전술한 반응성 질소 생성능 측정방법에 따라 측정하였다(Table 1).

통계처리

실험결과는 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 표시하였으며 실험에 사용한 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test를 실시하였으며 상관계수를 이용하여 유의도를 판정하였다(23).

결과 및 고찰

반응질소 대사산물 생성능

반응질소 대사산물은 소위 호흡폭발이라고 불리는 산소대사에 의하여 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 nitric synthetase에 의해서 생성되는 무기물질의 하나로 NO·, NO₂⁻ 및 NO₃⁻ 등이 있고 이들은 대식세포, 비만세포, 호중구 및 내피세포 등에서 분비된다(10,13-15,18-21). 대식세포에서 유래하는 반응질소 대사산물은 매우 정밀한 면역기능의 조절하에서 생성되는 물질로써 특히 체세포 특유의 효소 생성을 매개하며 이물질의 침입 또는 종양의 발생시, 항종양 면역과 항미생물 퇴치작용을 나타내어 생체방어기전의 매우 중요한 작용분자의 역할을 한다(10, 21,24,25). 이러한 기능은 aconitase의 활성을 저해하여 표적물의 대사능을 상실케함에 있다고 알려져 있으며 최근에는 반응질소 대사산물이 중추신경계의 신경전달물질로 더욱 각광을 받고 있다(19).

Table 1. Modulators in signal transduction pathways and their roles of actions

| Modulators | Roles of actions |
|----------------------|------------------------------------|
| PMA ¹⁾ | Protein kinase activator |
| Staurosporin | Protein kinase inhibitor |
| Calcium inophore | Ca ⁺⁺ inducer into cell |
| Verapamil | Ca ⁺⁺ channel blocker |
| Forskolin | Adenylate cyclase activator |
| IBMX ²⁾ | Phosphodiesterase inhibitor |
| Neomycin sulfate | Phospholipase C inhibitor |
| Sodium orthovanadate | cGMP stimulator |
| Sphingosine | Protein kinase inhibitor |

¹⁾Phorbol 12-myristate 13-acetate

²⁾3-Isobutyl-1-methylxanthine

본 연구에서는 대식세포주 TIB 71 세포를 사용하여 PSG가 반응질소 대사산물 생성능에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험하였다. 대식세포가 활성화됨으로써 생산되는 반응질소 대사산물(reactive nitrogen intermediates: RNI) 혹은 활성질소인 산화질소(nitric oxide: NO·)는 nitrogen dioxide로 일차 산화되고 또 다시 산화되어 세포배양액 속에서 아질산이온(nitrite: NO₂⁻) 및 질산이온(Nitrate: NO₃⁻) 형태로 축적되어 존재하며 대부분 NO₂⁻ 형태로 축적된다(10-15). 실험결과 모든 실험군에서 대조군의 반응질소 대사산물 생성량 7.50 μM과 거의 동일하거나 0.10 μM 정도의 차이를 나타내서 PSG 단독 처리만으로는 아질산 생성을 유도하지 못했다(Fig. 1).

따라서 대식세포에서 반응질소 대사산물 생성의 전제조건인 BCG로 여기 및 IFN-γ로 자극시키면서 PSG가 반응질소 대사산물 생성에 미치는 효과를 측정하였다(24,25). 실험결과 Table 2 및 Fig. 2에서와 같이 아질산 생성은 BCG 단독처리군의 8.60 μM 그리고 IFN-γ 단독처리군의 7.76 μM으로서 대조군의 7.50 μM와 유사하여 통계적으로 유의성이 없었다. 그러나 BCG 및 IFN-γ로 처리된 계대세포주 TIB 71 세포는 현저히 증가된 반응질소 대사산물 생성결과 59.84 μM를 보였고 PSG와 BCG 및 IFN-γ로 여기 자극된 TIB 71 세포에서도 아질산 생성을 유의하게 증가(p<0.001)시켰다.

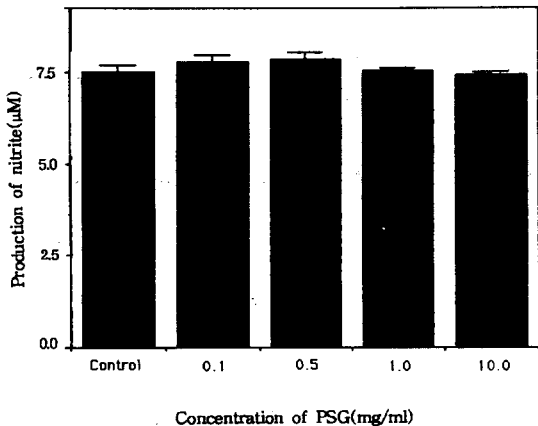


Fig. 1. Production of nitrite from TIB 71 cells treated with protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*.

The cells (1 × 10⁶) were incubated with various concentrations of PSG for 24hrs at CO₂ incubator. 100 μl of culture supernatant was added with the same volume of Griess reagent for 10min at room temperature.

The absorbance of mixture was determined by ELISA reader at 540nm.

The production of nitrite was calculated by the calibration curve for nitrite determination.

Table 2. Production of nitrite from TIB 71 cells at various experimental conditions

| Experimental conditions ¹⁾ | Nitrite ²⁾ production (μM) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| BCG+IFN-γ+PSG | 69.0 ± 3.7 ³⁾ |
| BCG+IFN-γ+PSG+PMA | 43.1 ± 1.2 |
| BCG+IFN-γ+PSG+staurosporin | 61.8 ± 3.1 |
| BCG+IFN-γ+PSG+sphingosine | 59.8 ± 13.7 |
| BCG+IFN-γ+PSG+calcium inophore | 27.7 ± 1.4 |
| BCG+IFN-γ+PSG+sulfonamide | 63.7 ± 1.5 |
| BCG+IFN-γ+PSG+verapamil | 78.1 ± 7.3 ⁴⁾ |
| BCG+IFN-γ+PSG+forskolin | 77.0 ± 6.6* |
| BCG+IFN-γ+PSG+sod. orthovenadate | 62.0 ± 3.5 |
| BCG+IFN-γ+PSG+IBMX | 72.4 ± 6.8 |
| BCG+IFN-γ+PSG+neomycin sulfate | 60.1 ± 4.7 |

¹⁾TIB 71 cells which was primed and triggered with BCG and IFN-γ were incubated with the below various chemicals for 24 hours at 5% CO₂ incubator.

²⁾Concentration of chemicals as follows: BCG, 100 μg/ml; IFN-γ, 1,000 unit/ml; PSG, 0.5 mg/ml; PMA, 30 ng/ml; staurosporin, 100 μM; sphingosine, 100 mM; Ca⁺⁺ inophore, 300 ng/ml; verapamil, 200 nM; forskolin, 200 μM; Sod. orthovenadate, 200 mM; IBMX, 200 μM; neomycin sulfate, 300 μM

³⁾Production of nitrate was determined using Griess reagent and ELISA reader at 540nm.

⁴⁾Data expressed as a mean ± S.D. of hexaplicates. * is significantly different from control at 0.001% level

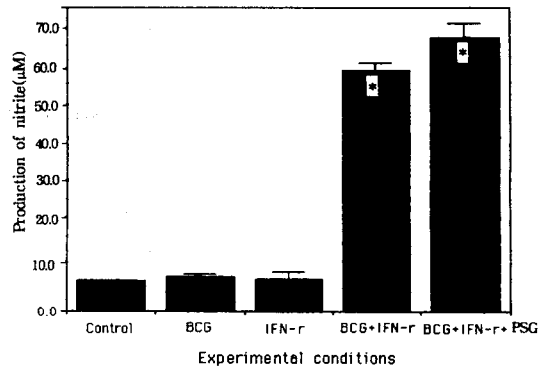


Fig. 2. Production of nitrite from TIB 71 cells at various experimental conditions.

Refer table 1.

* is significantly different from control at 0.001% level. Others are the same as Fig. 1.

이러한 결과는 전보(5)에서 영지버섯 다당체는 단독 처리시 cut off값 이하를 나타내어 유의성이 없었으며, 대식세포에서 유래하는 세포간물질 즉 interleukin-1, interleukin-6 및 tumor necrosis factor의 생성에 관여하지 않는 것으로 생각되나 영지버섯 다당체(PSG)와 BCG 및 IFN-γ를 모두 함께 병용 투여함으로써 각각 PSG와

BCG 또는 PSG와 IFN- γ 를 투여하는 경우에 비하여 IL-1의 분비증가를 보였으며 TNF의 분비 역시 현저한 증가를 보인 것과 유사한 결과를 보여 영지버섯 다당체가 초기 감염시 숙주의 1차 방어기능에 관여함을 알 수 있었다.

반응질소 대사산물 생성기전

PSG가 활성화된 TIB 71 세포에서 반응질소 대사산물 생성을 자극함으로써, 항미생물작용 및 항종양작용을 증가시키는 정보전달경로를 알아보기 위하여 Table 1에 기재된 각 시약을 이용하여 실험한 결과 Table 2에서와 같이 세포밖의 calcium을 세포내로 유입시키는 calcium inophore 처리시 반응질소 대사산물 생성량은 27.74 μM 로 대조군(BCG, IFN- γ , PSG 함께 병용처리)의 68.98 μM 에 비교하여 현저한 감소를 보일 뿐 아니라 protein kinase의 activator인 PMA 처리군에서도 43.11 μM 로 저하하였고 protein kinase inhibitor인 staurosporin과 sphingosine 처리시에도 각각 61.75 μM , 59.84 μM 로 대조군에 비하여 저하된 반응질소 대사산물 생성을 나타냈다. 또한 calmodulin antagonist인 sulfonamide 처리시에도 반응질소 대사산물 생성은 약간 감소가 있었지만, PSG의 정보전달이 calmodulin 의존적이 아니어서 PSG의 반응질소 대사산물 생성 유도는 calcium에 의존하는 정보전달경로를 거치지 않는 것이 분명하였다. 그러나 calcium channel blocker인 verapamil 처리시에는 78.13 μM 로 유의한 반응질소 대사산물의 생성증가 ($p < 0.001$)를 보였다. 또한 cyclic AMP 생성을 촉진하는 adenylate cyclase의 activator인 forskolin 처리시 76.98 μM 로 대조군보다 증가된 반응질소 대사산물의 생성을 보였다 ($p < 0.001$).

반응질소 대사산물 생성과 cGMP와의 연관성을 알아보기 위하여 cGMP stimulator인 sodium orthovanadate을 처리하였으나 반응질소 대사산물 생성은 61.95 μM 을 나타내어 cGMP는 영지버섯 다당체의 반응질소 대사산물 생성을 위한 정보전달과는 무관함을 알 수 있었다. PSG의 반응질소 대사산물 생성 정보가 phosphatidyl inositol계를 경유하는지 여부를 알아보기 위해서 phosphodiesterase inhibitor인 IBMX 및 phospholipase C inhibitor인 neomycin sulfate로 처리하여도 유의한 변화를 보이지 않아 반응질소 대사산물 생성 정보전달경로와 무관함을 알 수 있다. 결과적으로 PSG에 의한 TIB 71 세포에서 반응질소 대사산물 생성촉진은 calcium 혹은 phosphatidyl inositol계 의존적이 아님은 분명하였으나 칼슘유입을 억제할 때와 cAMP 생성 증가시 반응질소 대사산물 생성이 증가됨만은 확인할 수 있어 영지버섯 다당체의 반응질소 대사산물 생성기전과 이들의 생

생성기전을 정확하게 구명하기 위해서는 또 다른 연구가 시도되어야 한다고 생각된다.

본 실험결과 활성화된 대식세포주 TIB 71 세포에서 PSG의 처리에 의해 반응질소 대사산물 생성을 증강시켰음을 확인할 수 있었지만 이에 대한 사전 연구보고가 전혀 없기 때문에 좀더 다양한 대식세포주를 대상으로 대식세포 활성화를 위한 BCG나 IFN- γ 의 처리조건 등을 조절함과 동시에 그 생성기전을 구체적으로 규명하기 위한 연구가 병행되어야 영지버섯 다당체가 반응질소 대사산물 생성에 미치는 효과를 밝힐 수 있으리라 생각된다.

요 약

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)으로부터 분리 배양한 균사체를 알칼리추출하여 얻은 다당체가 활성화된 마우스의 대식세포에서 반응질소 대사산물의 생성을 자극함으로써, 항미생물작용 및 항종양작용을 증가시키는 효과와 그 생성기전을 실험하였다. 실험결과 영지버섯 다당체 단독처리는 대식세포에서 반응질소 대사산물의 생성에 영향을 미치지 못하였고, 대식세포에서 반응질소 대사산물의 생성유발인자로 알려져 있는 BCG 또는 IFN- γ 을 단독으로 각각 처리할 때에도 대조군에 비하여 미세한 증가 경향은 있었으나 유의성있는 증가를 보이지 않았으나 BCG 및 IFN- γ 을 동시 처리한 군에서는 Fig. 2와 Table 2에서와 같이 약 7~8배의 nitrite 생성증가를 보였고, 영지버섯 다당체와 BCG 및 IFN- γ 을 모두 함께 동시에 처리한 군에서는 더욱 증가된 결과를 보였다. 따라서 영지버섯 다당체가 반응질소 대사산물 생성능에 미치는 signal 전달경로를 알기 위해 BCG와 IFN- γ 및 여러 종류 시약을 사용하여 실험한 결과 BCG와 IFN- γ 을 유발인자로 한 영지버섯 다당체의 반응질소 대사산물 생성기전은 calcium dependent signal transduction pathway에 의존하지 않으며 calcium channel blocking과 cyclic AMP의 증가시에 반응질소 대사산물 생성은 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 보면 영지버섯 균사체 배양물로부터 추출 분리한 다당체의 항암작용은 대식세포로부터 분비되는 물질에 의한 직접적인 세포독성과 대식세포 활성화에 따른 숙주에의 면역조절 작용에 의해 숙주의 면역기능이 활성화되어 면역능을 높이는 작용에 의한 것이라고 생각된다. 반응질소 대사산물 생성촉진은 calcium 혹은 phosphatidyl inositol계 의존적이 아님은 분명하였으나 칼슘유입을 억제할 때와 cAMP 생성 증가시 반응질소 대사산물 생성이 증가됨만은 확인할 수 있어 영지버섯 다당체의 반응질소 대사산물 생성기전과 이들의 생

체내 역할에 대해서는 좀더 다양한 대식세포주를 대상으로 대식세포 활성화를 위한 BCG나 IFN- γ 의 처리조건 등을 조절하면서 구체적인 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 중부대학교 교내 학술연구비지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Franz, G. : Polysaccharides in pharmacy; current applications and future concepts. *Planta Med.*, **55**, 493 (1989)
2. 천연물화학연구회 : 천연물 화학. 진명출판사, 서울, p.28 (1979)
3. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan(pachyman). *Nature*, **225**, 943(1970)
4. 김성환, 김을상, 김영식 : 영지버섯에서 분리한 항암성다당체의 연구. *한국영양식량학회지*, **24**, 147(1995)
5. 김성환, 김을상 : 영지버섯 다당체의 마우스 대식세포 면역증강 효과. *한국식품영양과학회지*, **26**, 148(1997)
6. 현진원, 최응칠, 김병각 : 한국산 고등균류의 성분연구 (제67보): 영지버섯 자실체의 항암성분. *한국균학회지*, **18**, 58(1990)
7. 이준우, 정훈, 정천희, 이권행 : 영지균사체의 알카리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. *한국균학회지*, **18**, 137(1990)
8. 水野卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子 : マンネンタケ(靈芝)の水溶性多糖類の分畫, 構造, 抗腫瘍活性について. *日本農藝化學會誌*, **58**, 871(1984)
9. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. : Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked(1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 988(1990)
10. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **141**, 2407(1988)
11. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, A., Skipper, Jr, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrite and(¹⁵N)nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 313(1982)
12. Stuehr, D. J. and Nathan, C. F. : Nitric oxide : a macro-

- phage product for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **169**, 1543(1989)
13. Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Gross, S. S., Thiel, B. A., Levi, R. and Nathan, C. F. : Synthesis of nitrogen oxide from L-arginine by macrophage cytosol: Requirement for inducible and constitutive components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 420(1989)
14. Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. and Wishnok, J. S. : Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate : Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**, 8706(1988)
15. Nathan, C. F. and Hibbs J. B. Jr. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opinion. Immunol.*, **3**, 65(1991)
16. Liew, F. Y. and Cox, F. E. G. : Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide nonspecific defence. Elsevier Science, New York, p.A17(1991)
17. Kwon, N. S., Stuehr, D. S. and Nathan, C. F. : Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **174**, 761 (1991)
18. Green, L. C., Luzuriaga, K. R., Wagner, D. A. and Rand, W. : Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7764(1981)
19. Snyder, S. H. and Bredt, D. S. : Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, p.28(1992)
20. Henry, W. M. and Rachel, F. T. : L-Arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.*, **27**, 513(1992)
21. Marodi, L., Kalmar, A. and Karmazsin, L. : Stimulation of the respiratory burst and promotion of bacterial killing in human granulocytes by intravenous immunoglobulin preparations. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**, 164 (1990)
22. Hay, R., Macy, M., Chen, T. R., McClintock, P. and Reid, Y. : American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas. 6th ed., American Type Culture Collection, Maryland, p.254(1988)
23. 채서일, 김범중 : SPSS/PC+를 이용한 통계분석. 법문사, 서울, p.61(1989)
24. Liew, F. Y., Li, Y. and Millott, S. : Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.*, **145**, 4306(1990)
25. Stuehr, D. J. and Marletta, M. A. : Induction of nitrite/nitrate synthesis in marine macrophages by BCG Infection, Lymphokines or Interferon- γ . *J. Immunol.*, **139**, 518 (1987)

(1997년 10월 8일 접수)