

## 오미자가 면역조절작용 및 L1210세포의 apoptosis에 미치는 효과

권진 · 이세진\* · 소준노\* · 오찬호\*  
군장대학 보건행정과, \*우석대학교 생명공학부

### Effects of *Schizandra chinensis fructus* on the Immunoregulatory Action and Apoptosis of L1210 cells

Jin Kwon, Se Jin Lee\*, June No So\* and Chan Ho Oh\*

Department of Health Administration, Kunjang College

\*Division of Biotechnology, Woosuk University

The effects of MeOH extracts of *Schizandra chinensis fructus* (SZX) on the immunoregulatory effect (lymphocyte proliferation, subpopulation, nitric oxide production, phagocytic activity) and apoptosis (sub-G<sub>1</sub> peak) of L1210 cells were examined. The proliferation of splenocytes and thymocytes were enhanced by the addition of 10 µg/mL of SZX. SZX were administered *p.o.* once a day for 7 days in adult male BALB/c mice. SZX resulted in altering subpopulation of splenic B and/or T and thymic T lymphocytes, especially the number of T<sub>H</sub> cells were markedly increased by the treatment of SZX *in vivo* and *in vitro*. SZX treatment induced the apoptotic cell death in L1210 mouse leukemia cells. In addition, SZX accelerated the production of nitric oxide and phagocytic activity in peritoneal macrophages. These results suggest that SZX have an immunoregulatory property and anti-cancer action.

**Key words :** *Schizandra chinensis fructus*, immunoregulatory action, apoptosis, phagocytic activity, nitric oxide

## 서론

오미자(*Schizandra chinensis* BAILLON)는 한국, 중국이 주산지인 것으로 알려져 있는 낙엽덩굴성나무로, 그 열매를 건조시켜 자양, 강장, 지사, 진해제로 사용하는 한편, 구갈증과 주독을 푸는 해독제로도 각광받고 있다. 동의보감에서도 「폐와 신을 보하고 허로, 구갈, 변열, 해소를 고친다」고 소개되고 있으며 주로 오미자차, 오미자주, 오미자화체 등으로 많이 이용되고 있다. 오미자열매는 예전부터 노화를 방지하고 건망증을 예방하는 약재로써 사용되어져 왔으며<sup>(1-3)</sup>, 이러한 오미자에 관한 연구로서는 중추신경계의 반사기능 항진작용<sup>(4)</sup>을 비롯해서 혈당 강하작용<sup>(5)</sup>, 손상된 간기능의 복구효과<sup>(6,7)</sup>, 항균 및 항궤양 작용<sup>(8,9)</sup>, 항암 및 항종양효과<sup>(10,11)</sup>, nitric oxide 생성 촉진작용<sup>(12)</sup> 및 cortisone에 의한 면역억제를 증강시키는 작용<sup>(13)</sup>등의 많은 보고들이 있다. 특히 과실중에서 추출된 lignan화합물은 오미자의 유효성분으로 알려지고 있는데 chamigrene, sesquicarene 등의 sesquiterpenoid와 schizandrin류, gomisins류 등의 dibenzocyclooctadiene lignan 성분들의 화학구조가 밝혀졌으

며<sup>(14,15)</sup>, 그 중 schizandrin C와 gomisins A 등의 성분들이 주된 활성분획으로 연구가 많이 수행되고 있다<sup>(16,17)</sup>.

본 연구는 전술한 많은 생리기능 개선효과를 가진 오미자에 대한 특히 면역계와 암세포에 미치는 영향을 살펴보고자 림프구의 증식반응, T, B림프구의 아집단 변화, 암세포의 apoptosis유도(sub-G<sub>1</sub> peak), 복강대식세포의 탐식능 및 nitric oxide생성능 등에 미치는 영향 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용한 오미자(SZX)는 전북 진안군에서 구입한 오미자열매 2 kg을 70% 메탄올로 실온에서 3일간 교반 추출한 다음, 여과지로 여과하고 여액을 회전진공증발기로 40°C에서 농축하였다. 농축액을 하루 냉동시킨 후 동결건조하여 분말 230 g(회수율 11.5%)을 얻었다. 동물실험에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였으며, 세포실험에는 3차 증류수에 용해시켜 사용하였다.

### 실험 동물

실험동물로서는 생후 8주령된 BALB/c 계통의 웅성마우스를 대한실험동물에서 구입하여 사육하였으며, 온도 22±2°C, 습도 55±10%, light/dark 12시간의 사육조건에서 일주일 동안

Corresponding author : Chan-Ho Oh, Division of Biotechnology, Woosuk University, Wanju 565-701  
Tel: 82-63-290-1431  
Fax: 82-63-290-1512  
E-mail: choh@core.woosuk.ac.kr

적용시킨 후 사용하였고 고형사료와 물을 자유로이 섭취시켰다.

### 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 RPMI1640, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), agarose, triton X-100, sodium dodesyl sulfate(SDS), 3-[4-(5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) (이 상, Sigma), PE(phycoerythrin)/FITC(fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-B220 및 anti-Thy1, anti-CD4, anti-CD8 antibody(Caltag) 등이며, 실험기기는, laser flow cytometer (Coulter, EPICS-XL), inverted microscope(Nikon Co.), microplate reader(Dynatech, MR5000), luminometer(Berthold, 96LP), 전기영동장치(minigel, Mupid-II)등을 사용하였다.

### 비장 및 흉선림프구 증식반응 측정

BALB/c 마우스를 경추 탈골시켜 비장 및 흉선을 무균적으로 적출하고 각각의 세포를 세정( $\times 3$ 회, PBS, 1500 rpm, 10 분)에서 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하였다.  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 조정된 다음, 비장세포 부유액에는 lipopolysaccharide(LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 흉선세포 부유액에는 concanavalin A (Con A, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 각 농도(1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 오미자추출물(SZX)을 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>, 95% air)내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/mL농도로 PBS(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu\text{L}$ 로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>(18)</sup>.

### 림프구아집단 분석

BALB/c 마우스 7마리를 1군으로 하여 7일 동안 SZX를 0.1 mg/mL/mouse로 경구 투여한 다음 마우스를 경추 탈골시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 각 세포부유액을 조제하고  $1 \times 10^6$  cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30분간 반응시키고 flow cytometer(excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 림프구의 아집단을 측정하였다<sup>(19)</sup>.

### In vivo and in vitro DNA단편화의 측정

BALB/c 마우스 7마리를 1군으로 하여 미리  $5 \times 10^6$  cells/mL의 L1210세포를 복강 내에 주사한 다음, 0.1 mg/mL/mouse의 SZX를 7 일간 경구 투여한 후, 마우스복강에서 L1210세포를 무균적으로 수집하였다. 세포부유액을 세정( $\times 3$ 회, PBS)한 후,  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 조정, 원심분리(250 $\times$ g, 10 분)한 세포분획에 PI(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 20  $\mu\text{L}/1 \times 10^6$  cells로 염색 (4°C, 30분)한 다음 flow cytometer(Coulter, EPICS XL; excitation: 488 nm, emission: 620 nm)를 이용해서 DNA단편화(sub-G<sub>1</sub> peak)를 정량하였다<sup>(20)</sup>. In vitro 실험은 계대배양한 L1210세포를  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 세포수를 조정한

후, 1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 SZX를 첨가해서 24시간 또는 48시간 동안 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집하여 상기의 in vivo 실험과 동일한 방법으로 DNA단편화를 측정하였다.

### 대식세포의 phagocytic activity 측정

BALB/c 마우스의 복강에 3% thioglycollate 2 mL를 주사하고 3일 후, 경추 탈골시켜 5 mL의 cold-PBS를 복강에 주입하여, 복강삼출세포를 수집하여 원심분리(1,500 rpm, 5분)하였다. RPMI1640배지에 부유시켜 CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양한 다음, petri dish 밑면에 부착한 대식세포를 scraper로 수집하여 원심분리해서, 세포수를  $1 \times 10^7$  cells/mL가 되도록 DME(0.34 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 g/L Hepes, pH7.2)에 부유시켜 사용하였다. Zymosan용액은 zymosan 67 mg을 10 mL의 PBS에 넣어 37°C에서 30분간 방치한 후 동일한 양의 PBS로 2회 세척하고 10 mL의 10% FBS-DME배지에 재부유시켜 사용하였다. Lucigenin 용액은 10 mL의 PBS에 용해한 후, 여과 멸균하여 -20°C에서 보관(stock solution)하면서 사용직전에 DME배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence측정은 luminometer를 이용하여 측정용 microplate well (white)에 세포부유액 50  $\mu\text{L}$ 와 lucigenin 50  $\mu\text{L}$ 를 주입하고 37°C에서 15분간 전처리한 후, SZX를 1, 10 및 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도로 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 zymosan용액 30  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 최종량이 200  $\mu\text{L}$ 가 되도록 한 후, 5분 간격으로 60 분간 chemiluminescence를 측정하였다<sup>(21)</sup>.

### Nitric oxide 측정

BALB/c마우스 5마리를 1군으로 하여 3% thioglycollate 2 mL를 복강내 투여하여 3일 후복강삼출세포를 수집하고 원심분리(4°C, 1,500 rpm, 10분)하였다. RPMI1640배지로 세척한 다음, petri dish에 부착시켜 부착한 세포만 수집하여  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하였다. 각 well에 SZX를 농도별(1, 10 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하고 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와  $\gamma$ -interferon 25 units/mL를 첨가하고 24시간 후에 생성된 nitric oxide양을 Griess법으로 측정하였다<sup>(22)</sup>. 배지100  $\mu\text{L}$ 와 Griess reagent(1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO양을 측정하였다.

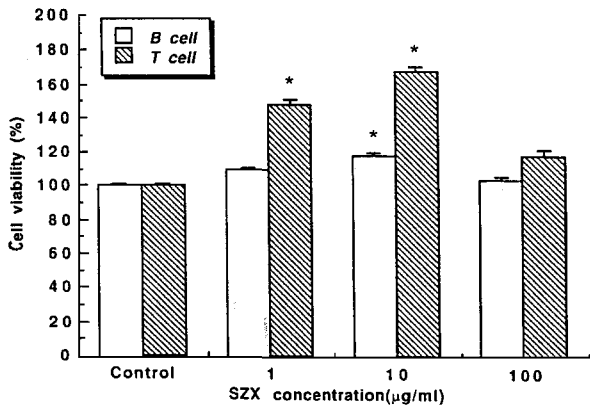
### 통계처리

유의성검정은 student's t-test 방법을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 마우스 비장 및 흉선림프구 증식에 미치는 효과

오미자추출물(SZX)에 대한 면역세포 증식에 미치는 효과는 Fig. 1과 같다. 마우스비장세포에서 대조군인 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 단독첨가군에 비하여 특히 SZX 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군에서 비장림프구를 증식시켰으며, 흉선세포배양계에서는 Con A(0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 단독첨가군의 대조군에 비하여 1 및 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 SZX 첨가군에서 흉선림프구의 증식을 현저하게 촉진시키는 효과



**Fig. 1. Effect of SZX on the lymphocyte proliferation in cultured mouse splenocyte and thymocyte *in vitro***  
 Cells were cultured with SZX(1-100 µg/mL) in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 48 h. The OD of each well was measured at 570 nm by ELISA reader. Each bar represents the mean ± S.E. from three experiments. \*Significantly different from non-treated control group(p<0.05)

를 나타내었다. 이는 오미자가 특히 T 및 B림프구의 증식을 촉진하여 생체의 면역능을 증강시키는 효과를 가지고 있음을 시사하며 오미자의 자양강장제로서의 기능과 아울러 면역력을 증강시키는 이른바 immuno-potentiator로서의 개발가능성이 기대된다.

**비장 및 흉선세포 아집단변화에 미치는 효과**

7일간 SZX를 경구 투여한 마우스 비장 및 흉선세포의 아집단변화는 Table 1과 같다. 비장세포는 대조군에서의 B, T 세포에 비하여 SZX투여군에서 B세포 및 T세포의 수가 유의하게 증가하였으며, 비장내 T세포의 T<sub>H</sub>세포와 T<sub>C</sub>/T<sub>S</sub>세포 중 특히 T<sub>H</sub>세포가 SZX투여에 의해 유의성있게 증가하였다. 흉선세포에서도 SZX투여에 의해 T<sub>H</sub>세포의 수가 증가하였다. 또한 *in vitro* 세포배양계의 결과는 Table 2와 같다. 비장세포는 대조군에 비하여 SZX 첨가군에서 B세포가 현저하게 증가하였고 T세포는 1 및 10 µg/mL의 SZX첨가군에서 증가하였다. 비장내의 T세포 중 T<sub>H</sub>세포가 특히 1 및 10 µg/mL의 SZX첨가에 의해 유의성있게 증가하였으며, 흉선내 T<sub>H</sub>세포는 SZX 1 µg/mL처리군에서 증가하였다. 이상의 결과에서 SZX는 비장 및 흉선 내의 B, T림프구의 수를 증가시켰으며, 특히 T세포 아집단분석 결과 T<sub>H</sub>세포의 population을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 오미자가 생체의 면역반응을 총괄하고 있는 T<sub>H</sub>세포의 활성을 조절하는 효과를 가지고 있다는 점에서 매우 흥미있는 결과라 할 수 있다.

**L1210세포의 apoptosis에 미치는 효과**

마우스백혈병세포주인 L1210세포를 마우스의 복강에 이식하고 SZX를 7일간 경구 투여한 다음 복강에 이식된 L1210 세포를 수집하여 sub-G<sub>1</sub> peak를 측정 한 결과, 대조군은

**Table 1. Effect of SZX on the lymphocyte subpopulation change in SZX-administered mouse splenocytes and thymocytes**

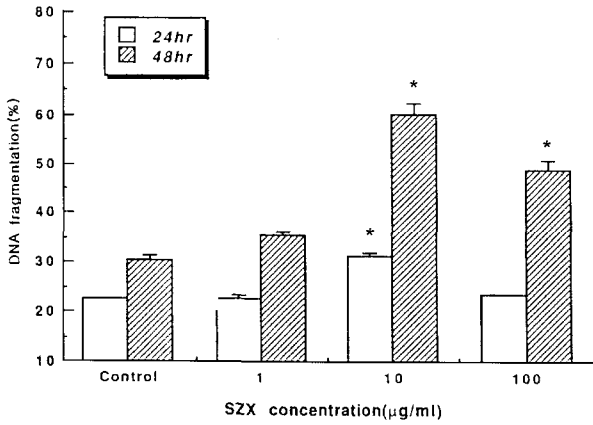
Treatment	Cell Type	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)		
		B cell	T cell		T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub> /T <sub>S</sub>
			<sup>1</sup> T <sub>H</sub>	<sup>2</sup> T <sub>C</sub> / <sup>3</sup> T <sub>S</sub>		
Control	21.9 ± 1.2	16.2 ± 0.4		11.7 ± 1.2	4.9 ± 0.6	
		11.7 ± 0.5	4.5 ± 0.7			
SZX	29.7 ± 1.4*	27.5 ± 1.1*		17.8 ± 1.1*	5.1 ± 0.5	
		18.7 ± 1.1*	6.7 ± 1.1			

Each data represents the mean±S.E. from three experiments.  
 \*Significantly different from non-treated control group(p<0.05)  
<sup>1</sup>T<sub>H</sub>: helper T lymphocyte, <sup>2</sup>T<sub>C</sub>: Cytotoxic T lymphocyte, <sup>3</sup>T<sub>S</sub>: suppressor T lymphocyte

**Table 2. Effect of SZX on the lymphocyte subpopulation change in cultured mouse splenocytes and thymocytes *in vitro***

SZX (µg/mL)	Splenocytes(%)			Thymocytes(%)	
	B	T		T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub> /T <sub>S</sub>
		T <sub>H</sub>	T <sub>C</sub> /T <sub>S</sub>		
0	24.9 ± 1.1	20.1 ± 0.3		12.0 ± 0.7	2.5 ± 0.2
		13.1 ± 0.6	4.3 ± 0.1		
1	41.9 ± 1.4*	27.8 ± 1.2*		15.8 ± 0.8*	3.5 ± 0.4
		19.3 ± 1.1*	10.8 ± 0.1*		
10	44.6 ± 0.6*	29.9 ± 1.2*		13.2 ± 1.1	2.7 ± 0.1
		18.8 ± 0.5*	9.8 ± 0.3*		
100	38.6 ± 0.4*	19.8 ± 0.1		11.3 ± 0.4	2.3 ± 0.1
		15.3 ± 0.8	6.5 ± 0.1		

Each data represents the mean ± S.E. from three experiments.  
 \*Significantly different from non-treated control group(p<0.05)



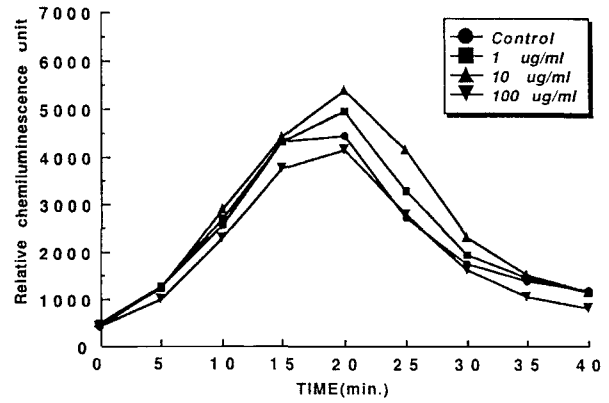
**Fig. 2. Effect of SZX on the apoptosis induction of cultured L1210 cells**

L1210 mouse leukemia cells were cultured with the indicated concentration of SZX in a CO<sub>2</sub> incubator. After 24 or 48 h, collected cells were sedimented by centrifugation and lysed in a hypotonic solution containing 10 µg/mL of PI. DNA content(sub-G<sub>1</sub> peak) of the nuclei was analysed by flow cytometer. Each bar represents the mean ± S.E. from three experiments. \*Significantly different from non-treated control group (p<0.05)

7.0±0.5%인데 비해 SZX를 투여한 군에서는 10.2±1.3%로 큰 변화가 없었다(data not shown). 또한 *in vitro*계에서 L1210세포 배양기에 각 농도의 SZX를 첨가해서 24시간 및 48시간 동안 배양한 결과(Fig. 2), 특히 10 µg/mL의 SZX첨가로 L1210세포의 apoptotic cell death가 현저하게 촉진되었다. 이 결과는 SZX가 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용을 가지고 있음을 나타내고 있다. Apoptosis는 생체의 특히 신경계와 면역계세포의 생성, 분화 및 기능발현에 중요하게 작용하고 있는 능동적세포사의 개념<sup>(23-25)</sup>이다. 그러나 이러한 apoptosis기전에 이상이 발생하면 암 발생, 자가면역질환, 퇴행성 질환 및 AIDS 등의 질환을 초래하는 결과로 이행된다고 알려져 있다. 최근에 사용되고 있는 각종 항암제들은 이러한 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용을 보유하는 것으로 알려져 있으며<sup>(26)</sup> 이러한 암세포의 apoptosis유도를 일으키는 천연물의 동정은 매우 의의있는 일이라 할 수 있다. 또한 본 실험결과에서 *in vivo*와 *in vitro* 실험의 결과가 일치하지 않는 것은 각 실험계의 차이에 기인하고 있는 것으로 추정되며 *in vivo* 실험계를 보다 세밀히 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

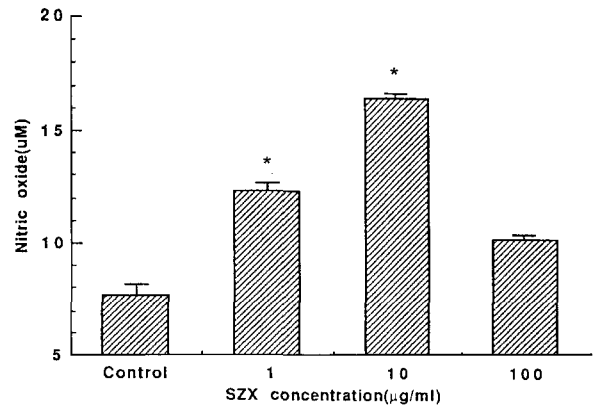
**복강대식세포의 탐식능에 미치는 효과**

마우스로부터 복강 대식세포를 수집하고 1, 10 및 100 µg/mL의 SZX를 가하여 lucigenin chemiluminescence측정법을 이용하여 대식세포의 탐식능을 살펴본 결과(Fig. 3), zymosan만 처리한 대조군에 대하여 SZX첨가군 중 1 및 10 µg/mL군에서 대식세포의 탐식작용이 증가하였다. 대식세포는 생체내에서 T, B림프구와 더불어 항원제공세포, 탐식작용, 불필요하게 된 세포의 제거<sup>(27)</sup>, 림프구의 활성화 등의 중요한 면역력을 발휘하는 세포로 알려져 있는 면역세포로서 SZX가 이러한 대식세포의 활성을 증강시키는 작용을 보유하고 있다는 결과는 SZX의 면역조절제로서의 가능성을 시사한다.



**Fig. 3. Effect of SZX on the phagocytic activity from mouse peritoneal macrophage**

3% thioglycollate were injected i.p. for 3 days. Peritoneal macrophages obtained after 2 h adherence period were cultured in RPMI1640 media. Cells were incubated in DME media containing 1-100 µg/mL of SZX in presence opsonized zymosan(1 mg/mL). The chemiluminescence was measured at 5 min. intervals for 40 min.



**Fig. 4. Effect of SZX on the production of nitric oxide from mouse peritoneal macrophage**

Peritoneal macrophages obtained after 2 h adherence period were cultured in RPMI1640 media with LPS(1 µg/mL) and γ-IFN(25 units/mL). Cells were cultured with SZX(1-100 µg/mL) in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 24 hours. The OD of each well was measured at 570 nm with ELISA reader. NO standard curve were measured with NaNO<sub>2</sub>. Each bar represents the mean ± S.E. from three experiments. LPS(lipopolysaccharide), γ-IFN(γ-interferon) \*Significantly different from control group(p<0.05)

**대식세포의 nitric oxide생성에 미치는 효과**

마우스의 복강대식세포를 수집해서 LPS와 γ-interferon을 첨가, 배양하면서 각 농도의 SZX를 가하여 대식세포가 생성하는 nitric oxide(NO)양을 살펴본 결과(Fig. 4), 대조군(LPS와 γ-interferon만 첨가)에 비하여 1, 10 및 100 µg/mL의 SZX첨가에 의해 NO생성이 증가하였다. NO는 생체내에서 vasodilating agent, neurotransmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 면역반응의 효능물질로 잘 알려져 있으며, 마우스에서는 특히 대식세포와 호중구 등의 탐식작용을 가지는 세포에서 분비하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>(12,28)</sup>. 본 실험에서 SZX가 복강대식세포로부터의 NO생성을 촉진한 결과는 NO가 생체 내에서 암세포를 공격해서 상해시키는 면

역계의 effector로서의 역할을 하고 있다는 연구보고<sup>(29)</sup>와 유사한 결과라 할 수 있으며 이렇게 해서 면역조절작용을 하는 것으로 추정된다.

## 요 약

오미자의 면역조절작용에 미치는 효과를 살펴본 결과, 오미자(SZX)는 T 및 B세포의 증식을 유의성있게 촉진시켰으며, *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 비장내의 T 및 B림프구를 증가시켰고, T세포 중 특히 T<sub>H</sub>세포를 증가시켰다. 또한 흉선 T림프구 중의 T<sub>H</sub>세포의 수를 증가시키는 작용을 나타냈다. 아울러 SZX는 *in vitro*계에서 L1210세포의 apoptosis를 유도하였으며, 복강대식세포에서의 탐식능 및 nitric oxide(NO)생성을 촉진시켰다. 이 결과는 복강대식세포로부터 생성된 NO가 L1210세포의 apoptosis를 유도하는데 중개역할을 하고 있을 가능성을 시사한다. 이상의 결과 오미자는 T, B림프구 및 대식세포 등의 면역세포의 활성을 증강시키는 작용을 보유하고 있으며, 암세포의 apoptosis를 유도하는 기능을 가지고 있음으로써 면역조절제로서의 역할을 가지는 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년도 우석대학교 학술연구조성비지원에 의하여 수행되었음.

## 문 헌

- Li, S.Z.(Ming dynasty) "Ben-Cao Gong-Mu," Peoples Health Publisher, p.1711 (1978)
- Nishiyama, N., Chu, P.J. and Saito, H. An herbal prescription, S-113m, consisting of biota, *ginseng* and *schizandra*, improves learning performance in senescence accelerated mouse. Biol. Pharm. Bull. 19(3): 388-393 (1996)
- Hsieh, M.T., Tsai, M.L., Peng, W.H. and Wu, C.R. Effects of *Fructus schizandrae* on cycloheximide-induced amnesia in rats. Phytother Res. 13(3): 256-257 (1999)
- Zhang, L. and Niu, X. Effects of schizandrol A on monoamine neurotransmitters in the central nervous system. Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao 13(1): 13-16 (1991)
- Molokovskii, D.S., Davydov, V.V. and Tiulenev, V.V. The action of adaptogenic plant preparations in experimental alloxan diabetes. Probl. Endokrinol.(Mosk) 35(6): 82-87 (1987)
- Zhu, M., Lin, K.F., Yeung, R.Y. and Li, R.C. Evaluation of the protective effects of *Schizandra chinensis* on Phase I drug metabolism using a CCl<sub>4</sub> intoxication model. J. Ethnopharmacol. 67(1): 61-68 (1999)
- Ip, S.P., Che, C.T. and Ko, K.M. Structure-activity relationship of schizandrins in enhancing liver mitochondrial glutathione status in CCl<sub>4</sub>-poisoned mice. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao 19(4): 313-316 (1998)
- Li, X.J., Zhao, B.L., Liu, G.T. and Xin, W.J. Scavenging effects on active oxygen radicals by schizandrins with different structures and configurations. Free Radic. Biol. Med. 9(2): 99-104 (1990)
- Hernandez, D.E., Hancke, J.L. and Wikman, G. Evaluation of the anti-ulcer and antisecretory activity of extracts of *Aralia elata* root and *Schizandra chinensis* fruit in the rat. J. Ethnopharmacol. 23(1): 109-14 (1988)
- Nomura, M., Nakachiyama, M., Hida, T., Ohtaki, Y., Sudo, K., Aizawa, T., Aburada, M. and Miyamoto, Y. Gomisins A, a lignan component of *Schizandra frucus*, inhibits development of preneoplastic lesions in rat liver by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Lett. 76(1): 11-18 (1994)
- Ohtaki, Y., Hida, T., Hiramatsu, K., Kanitani, M., Ohshima, T., Nomura, M., Wakita, H., Aburada, M. and Miyamoto, K.I. Deoxycholic acid as an endogenous risk factor for hepatocarcinogenesis and effects of gomisins A, a lignan component of *Schizandra fructus*. Anticancer Res. 16(2): 751-755 (1996)
- Panossian, A.G., Oganessian, A.S., Ambartsumian, M., Gabrielian, E.S., Wagner, H. and Wikman, G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. Phytomedicine 6(1): 17-26 (1999)
- Long, Z.Z. and Xie, S.S. Experimental study on the enhancement of the immunosuppressive effect of cortisone by wurenchun, an extract of *Schizandra chinensis* BAILL. Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 5(6): 361-362 (1985)
- Ohta, H. and Hirose, Y. New sesquiterpenoides from *Schizandra chinensis*. Tetrahedron Lett. 12: 2483-2485 (1968)
- Ikeya, Y., Taguchi, H., Yoshioka, I. and Kobayashi, H. The constituents of *Schizandra chinensis* BAILL I. Isolation and structure determination of five new lignans gomisins A, B, C, F and G and the absolute structure of schizandrin. Che. Pharmacol. Bull. 27:1383-1394 (1979)
- Xie, J.X., Zhou, J., Zhang, C.Z., Yang, J.H. and Chen, J.X. Studies on antihepatic drugs. Total synthesis of (+/-)schizandrin C and its analogs. Sci. Sin.[B] 26(12): 1291-1303 (1983)
- Mizoguchi, Y., Kawada, N., Ichikawa, Y. and Tsutsui, H. Effect of gomisins A in the prevention of acute hepatic failure induction. Planta Med. 57(4): 320-324 (1991)
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63 (1983)
- Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179: 873-879 (1994)
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, G. and Riccardi, C.A. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 139: 271-279 (1991)
- Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods 112: 163 (1988)
- Rockett, K.A., Auburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. Infect. Immunity 59(9): 3280-3283 (1991)
- Kerr, J.F.K., Wyllie, A.H. and Currie, A.H. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26: 239-245 (1972)
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365 (1997)
- Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E. and Wyllie, A.H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochimica et Biophysica Acta 1133: 275-285 (1992)
- D'Amico, A.V. and McKenna, W.G. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. Radiotherapy & Oncology 33(1): 3-10 (1994)
- Telford, W.G., King, L. E. and Fraker, P.J. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. Cell Prolif. 24: 447-459 (1991)
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu. Rev. Biochem. 63: 175-195 (1994)
- Isobe, K. and Nakashima, I. Abundant production of nitric oxide from murine macrophages by direct stimulation of tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192(2): 499-503 (1993)