

녹용 에탄올 분획의 면역조절작용

서 정 숙* · 권 진

*전주기전여자대학 식품·영양계열, 서해대학 식품영양과

Immunoregulative Action of Ethyl Alcohol Fraction of *Cervus nippon*

Jeong-Sook Suh* and Jin Kwon

*School of Food and Nutrition, Chonju Kijeon Woman's College, Chonju 560-701,
Korea and Department of Food and Nutrition, So Hae College, Kun San 573-717, Korea

Abstract

Immunoregulative action of 70% ethyl alcohol fraction of *Cervus nippon* was investigated *in vitro*. The fraction enhanced the proliferation of thymocytes and the population of CD4⁺CD8⁻ single-positive cells in thymocytes. CN-E enhanced [Ca²⁺]_i, the production of TNF- α and IL-1 β , and phagocytosis in peritoneal macrophages. The fraction did not induce the proliferation of splenocytes and DNA fragmentation in thymocytes. These results indicate that 70% ethyl alcohol fraction of *Cervus nippon* regulates immunological action by stimulating murine thymocytes and macrophages.

Key words : *Cervus nippon*, CD4, CD8, DNA fragmentation, TNF- α , IL-1 β , [Ca²⁺]_i.

서 론

녹용(*Cervus nippon*)은 한방에서 기력이 떨어지는 것을 막고 북돋워주며 정신력을 강건케 하고 늙지 않고 오래 장수할 수 있게 해 준다고 하여 오래 전부터 신체의 전반적인 면역기능을 증진시킬 것이라는 기대 하에 많은 연구가 진행되어 왔다¹⁾. 기아 mouse 세망 내피계의 탐식능이 녹용 투여에 의해 증가되고²⁾, 항원에 대한 항체 생산을 촉진하며³⁾, 녹용을 에탄올로 추출하고 남은 잔사에서 얻은 분획을 투여하였을 때 macrophage의 면역 보체 제거능이 촉진되고⁴⁾, 녹용 약침액의 투여로 glucocorticoid에 의해 억제되었던 B 세포를 증가 시켜 항체 생성을 촉진하고 T세포의 증식을 촉진한다고 보고되었다⁵⁾. 한편으로 macrophage는 항원의 자극에 의해 활성화한 Th 임파구가 생성하는 γ -interferon (IFN- γ)의 작용을 받아서 활성화하며 phagocytosis가 항진한다⁶⁾.

녹용의 70% ethyl alcohol fraction (CN-E) 100 mg/kg를 생쥐에 경구투여 했을 때 thymocytes의 세포생존율, thymocytes와 splenocytes 중 helper T 세포의 population 및 IFN- γ 를 증가시키고⁷⁾, [Ca²⁺]_i 증가와 nitric oxide 생성 억제제를 통하여 macrophage의 phagocytosis가 증가됨을 보고하였다⁸⁾. 본 실험에서는 녹용의 70% ethyl alcohol fraction이 *in vitro*에서 생쥐의 thymocyte와 macrophage의 활성과 macrophage의 활성화에 의해 생성되는 TNF- α 와 IL-1 β 의 양을 측정하여 면역조절작용을 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

경동시장 건재상에서 구입한 매화록(*Cervus nippon*) 175g을 실온에서 hexane, chloroform, 70% ethyl alcohol로 계통 분획한 후 70% ethyl alcohol fra-

* Corresponding author : Jeong-Sook Suh

ction을 감압 농축하고 동결 건조한 분말 (9.1g)을 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

BALB/c계 $18 \pm 2g$ 의 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 $22 \pm 2^\circ C$, 습도 $55 \pm 5\%$, light/dark 12시간의 사육 조건에서 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고형 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 시약 및 기구

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, 026:B6), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), penicillin-streptomycin, concanavalin A (Con A)는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., (PE) α -CD4 monoclonal antibody, (FITC) α -CD8 monoclonal antibody는 Molecular probes Co., mouse Tumor necrosis factor- α (TNF- α) immunoassay kit, mouse Interleukin-1 β (IL-1 β) immunoassay kit는 R&D Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 세포 배양용 및 1급 시약을 사용하였다.

4. Thymocytes 및 splenocytes의 분리

Wysocki⁹⁾ 및 Mizel¹⁰⁾ 등의 방법을 이용하여 마우스를 경추탈골하여 적출한 흉선과 비장을 각각 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 2회 세척한 다음, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 세포를 DPBS-A에 재부유시켜 3회 반복 세척한 후 분리한 thymocytes와 splenocytes의 생존을 및 총세포수를 trypan blue exclusion법으로 측정하였다.

5. Thymocytes 및 splenocytes의 cell viability 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 48시간 배양하고 세포생존율을 MTT법^{11,12)}으로 측정하였다. 세포 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96 well plate에 1.2×10^6 cells/ml 농도로 접종하였다. Thymocytes는 concanavalin A (Con A) $1 \mu g/ml$ 를, splenocytes는 lipopolysaccharide (LPS) $10 \mu g/ml$ 를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 $37^\circ C$ 의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가하였다. 배양 종료 시 0.01 N HCl에 용해시킨 10% SDS $100 \mu l$ 를 각 well에 첨가하고 차광 상태에서 18시간 방치한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate

reader로 570nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

6. Thymocytes 및 splenocytes의 아군집 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1×10^6 cells/ml 농도로 분주하였다. Thymocytes는 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody로, splenocytes는 PE-anti B220/FITC-anti Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 $4^\circ C$ 에서 반응시킨 다음, flow cytometer (excitation: 488nm, emission: 525nm-FITC, 575nm-PE)를 이용하여 아군집을 측정하였다¹³⁾.

7. Thymocytes 및 splenocytes의 apoptosis 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes (5×10^5 cells/ml)에 PI buffer (0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide ($10 \mu g/ml$) $20 \mu l$ 를 넣어 빙냉하에서 30분간 염색한 후 flow cytometer로 sub-G1 peak를 관찰하였다¹⁴⁾.

8. Peritoneal macrophage의 분리

멸균한 3% thioglycollate 2ml를 복강에 투여하고, 3일 후 마우스를 경추탈골하여 도살시킨 후 복강에 cold PBS 5ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. $4^\circ C$ 에서 1,300rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 2시간 후에 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage를 분리하였다¹⁵⁾.

9. Peritoneal macrophage의 [Ca²⁺]_i 측정

분리한 macrophage에 HEPES에 녹인 $2 \mu M$ fura-2/AM을 넣고 실온에서 30분 동안 배양한 후 2회 세척하였다. HCO⁻-buffered solution (in mM): NaCl 110, KCl 4.5, NaH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 1.0, CaCl₂ 1.5, HEPES-Na 5, HEPES free acid 5, D-glucose 10 (equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂ to give a pH 7.4)에 재부유하였다. Ca₂⁺ free solution은 CaCl₂를 제거하고 1mM EGTA를 첨가하였다. Macrophages를 coverslip에 붙이고, spectrofluorometry (Photon technology International, Brunswick, NJ, USA)로 510 nm에서 측정하여 F340/308 ratio로 [Ca²⁺]_i를 측정하였다¹⁶⁾.

10. TNF- α 및 IL-1 β 의 측정

분리한 macrophages를 2×10^6 cells/ml 농도로 조제하여 96 well plate에 $200 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 48시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500rpm, 5분, 4°C)한 다음 상등액 $50 \mu\text{l}$ 를 취하여 mouse TNF- α immunoassay kit 및 mouse mL-1 β immunoassay kit를 이용하여 450nm에서 microplate reader로 측정하였다.

11. Peritoneal macrophage의 phagocytosis 측정

부착한 macrophage를 scrapper로 모아 원심분리 (1,500 rpm, 5분, 4°C)하여, 세포수 (1×10^6 cells/ml)를 DME (without phenol red)에 부유시켜 37°C 에서 15 분 동안 전처리하였다. 측정용 microplate (white)의 각 well에 macrophage 부유액 $100 \mu\text{l}$ 를 넣고 lucigenin 용액 $50 \mu\text{l}$ 와 zymosan 용액 $10 \mu\text{l}$ 을 첨가하여 volume이 $200 \mu\text{l}$ 가 되도록 한 다음, 5분 간격으로 60 분 동안 흡취된 zymosan의 정도를 phagocytosis로 하여 chemiluminescence를 luminometer로 측정하였다 (17,18).

12. 통계처리

모든 실험 결과들은 Mean \pm SE로 나타내었고 통계 처리는 student *t*-test를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

1. Thymocytes 및 splenocytes의 cell viability에 미치는 효과

Thymocytes에서 Con A를 처리한 대조군의 세포 생존율을 $100 \pm 1.5\%$ 로 하였을 때, Con A를 처리하지 아니한 대조군의 세포생존율은 $75.9 \pm 1.0\%$ 로 감소하였으나, CN-E (10, 1, $0.1 \mu\text{g/ml}$)을 처리하고 con A를 처리했을 때 대조군에 비해 세포생존율이 모두 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 1). Splenocytes에 LPS를 처리한 대조군의 세포생존율을 $100 \pm 1.5\%$ 로 하였을 때, LPS를 처리하지 아니한 대조군의 세포생존율은 $92.7 \pm 0.7\%$ 로 감소하였으며, CN-E를 처리한 splenocytes에서는 LPS를 처리하거나 처리하지 않았을 때 모두 대조군과 비교하여 세포생존율의 변화가 없었다 (Fig. 2). 이는 CN-E가 *in vitro*에서 흉선세포의 증식을 촉진하는 작용이 있음을 의미하는 것이다.

2. Thymocytes 및 splenocytes의 아군집에 미치는 효과

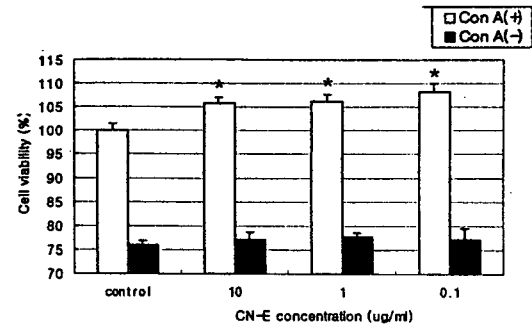


Fig. 1. Effects of 70% EtOH fraction of *Cervus nippon* (CN-E) on the proliferation of mouse thymocytes *in vitro*. Thymocytes obtained from BALB/c mice were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS. CN-E was added with Con A ($1 \mu\text{g/ml}$) or not in 96-well plate. The cells were plated at a density of 1.2×10^6 cells/ml and then incubated with the indicated concentrations of CN-E and medium alone (control) for 44 h. MTT was mixed and cultured for 4 h. At the termination of the culture, added $100 \mu\text{l}$ of 10% SDS and then the cells were cultured for 18h. The OD of each well was measured at 570nm with a microplate reader. Each bar represents the mean \pm SE from 8 experiments.

*: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

생체에 있어서 면역작용을 가지는 면역세포들은 종류가 다양하지만, 그 중에서 가장 중심적인 역할을 하는 세포는 T 림파구로 알려져 있다. T 세포는 골수에서 생성되어 흉선을 거치는 동안 분화를 거듭하면서 T_H 및 T_C/T_S 등의 각 subtype으로 나누어지는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 그 중에서도 T_H 세포는 생체 면역 기능을 관장하는 중심 세포로서 각종 cytokine을 생성하고, 특히 macrophage의 활성화, 식세포의 탐식 기능 증진 및 B 세포로부터의 항체 생성을 촉진시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. CN-E를 thymocytes에 처리하여 thymocytes의 subpopulation에 미치는 영향을 고찰한 결과, 대조군에서 $CD4^+CD8^-$ (helper T) 세포는 $6.7 \pm 0.3\%$, $CD4^-CD8^+$ (cytotoxic T) 세포는 $3.2 \pm 0.3\%$ 이었으며, CN-E $10 \mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 thymocytes의 $CD4^+CD8^-$ 세포는 $12.8 \pm 2.0\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 $CD4^-CD8^+$ 세포는 대조군에 비해 차이가 없었다.

Splenocytes의 subpopulation은 대조군에서 $B220^+$ 세포는 $16.9 \pm 1.6\%$, $Thy-1^+$ 세포는 $7.4 \pm 0.4\%$ 이었

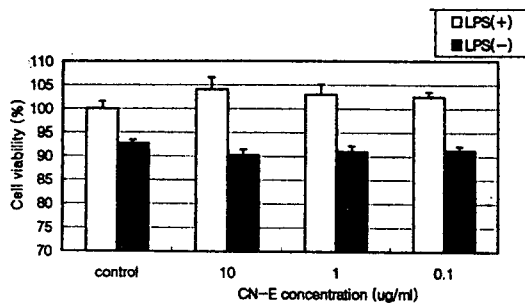


Fig. 2. Effects of 70% EtOH fraction of *Cervus Nippon* (CN-E) on the proliferation of mouse splenocytes *in vitro*. Splenocytes obtained from BALB/c mice were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS. CN-E was added with LPS (10 μ g/ml) or not in 96-well plate. The cells were plated at a density of 1.2×10^6 cells/ml and then incubated with the indicated concentrations of CN-E and medium alone (control) for 44h. MTT was mixed and cultured for 4h. At the termination of the culture, added 100 μ l of 10% SDS and then the cells were cultured for 18h. The OD of each well was measured at 570 nm with a microplate reader. Each bar represents the mean \pm SE from 8 experiments.

*: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

며, CN-E를 처리하였을 때 B220⁺ 세포는 대조군과 차이가 없었으나, Thy-1⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였다. 또한 대조군의 splenic T-lymphocyte의 CD4⁺CD8⁻ 세포는 $11.8 \pm 0.2\%$, CD4⁻CD8⁺ 세포는 $3.9 \pm 0.1\%$ 이었다. CN-E 10 μ g/ml를 처리하였을 때 $13.0 \pm 0.4\%$ 로 대조군 보다 증가하였으나 CD4⁻CD8⁺ 세포는

대조군에 비해 차이가 없었다 (Table 1). 이는 CN-E가 T lymphocytes 중 helper T 세포의 population을 증가 시켜 면역조절작용을 가지고 있음을 의미하는 것이다.

3. Thymocytes의 apoptosis에 미치는 효과

흉선은 미성숙한 T 임파구의 증식과 분화를 담당하고 있는 중요한 면역장기의 하나로 골수에서 생성된 hematopoietic stem cell이 유입되어 하루에 5,000만개 이상의 세포가 생성되며, 이중에서 95% 이상의 세포는 apoptosis에 의해 제거되고 단지 1~2%의 세포만이 더 분열해서 성숙한 T 세포(CD4⁺CD8⁻ 또는 CD4⁻CD8⁺ single positive cell)가 되어 흉선에서 방출된다. 한편, 미성숙 T 세포(CD4⁻CD8⁻ or CD4⁺CD8⁺)

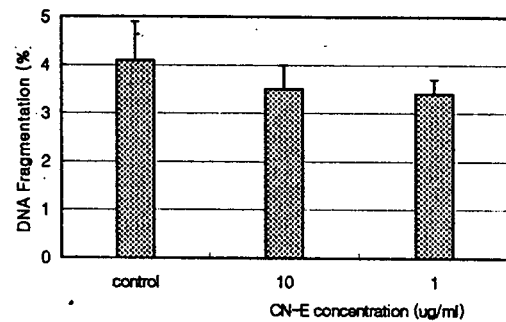


Fig. 3. Effects of CN-E on DNA fragmentation of mouse thymocytes *in vitro*. Thymocytes (5×10^5 cells/ml) obtained from BALB/c mice were treated with the indicated concentrations of CN-E and medium alone (control). DNA fragmentation was analyzed by flow cytometer staining with propidium iodide. Each bar represents the mean \pm SE from 3 experiments.

Table 1. The subpopulation of thymocytes and splenocytes treated with CN-E

Samples	Thymocytes (%)			Splenocytes (%)		
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	B220 ⁺	Thy-1 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺
Control	6.7 ± 0.3	3.2 ± 0.3	16.9 ± 1.6	7.4 ± 0.4	11.8 ± 0.2	3.9 ± 0.1
10 μ g/ml	$12.8 \pm 2.0^*$	4.8 ± 1.4	14.0 ± 0.8	$10.3 \pm 0.7^*$	$13.0 \pm 0.4^*$	4.3 ± 0.3
1 μ g/ml	8.7 ± 2.0	3.80 ± 0.9	14.8 ± 2.3	8.3 ± 1.0	14.4 ± 1.5	5.2 ± 0.5
0.1 μ g/ml	7.5 ± 0.3	3.0 ± 0.2	18.9 ± 1.5	8.8 ± 0.7	$13.1 \pm 0.3^*$	3.8 ± 0.3

Thymocytes and splenocytes were treated with CN-E for the indicated concentrations. The subpopulation of thymocytes and splenocytes were measured with a flow cytometer after staining with CD4/PE, CD8/FITC, B220/PE and Thy-1/FITC mAbs. Other procedures were described in detail in the materials and method section.

The data represent a mean \pm SE of 5 mice.

* Significantly different from control group ($p < 0.01$).

는 apoptosis에 의해 배제되며, 이때 Fas 유전자의 발현이 중요하다고 알려져 있다¹³⁾. 약물을 투여하지 않은 대조군의 thymocytes의 DNA fragmentation과 CN-E 10, 1 µg/ml를 처리한 thymocytes의 DNA fragmentation을 비교하였을 때 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig. 3). 이는 CN-E가 TH 세포의 population을 증가 시켰다는 앞의 결과와 비교할 때, CN-E가 미성숙 T 세포의 apoptosis 보다는 T 세포의 활성화에 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

4. Peritoneal macrophage로부터 TNF-α 및 Interleukin-1β 양에 미치는 효과

In vivo system에서 CN-E를 투여할 경우 TH1 임파구 중 TH1 아군이 증가하고, 여기에서 분비되는 IFN-γ가 증가되었다는 본 연구자들의 연구 결과를 토대로⁷⁾, 본 연구에서는 CN-E를 처리할 경우 macrophage 활성을 고찰하고자 활성화된 macrophage에서 분비되는 cytokine인 TNF-α와 IL-1β를 측정하였다. CN-E 10, 1 µg/ml를 처리할 경우 약물을 처리하지 않은 대조군 (control)과 비교할 때 복강 macrophages로부터 분비되는 TNF-α와 IL-1β 모두 유의성 있게 증가하였다 (Table 2). 이는 CN-E가 macrophage 활성화에 관여하고 있음을 시사하는 것이다.

5. Peritoneal macrophage의 [Ca²⁺]_i에 미치는 효과
CN-E를 마우스에 7일 동안 경구투여 한 마우스 peritoneal macrophage의 [Ca²⁺]_i 증가는 extracellular Ca²⁺이 cytosol로 influx됨을 확인하였고 macrophage에서의 [Ca²⁺]_i 증가는 phagocytosis를 촉진함을 보고하였다⁸⁾. 본 연구에서는 in vitro system에서 약물을 처리하지 않은 macrophage (control)와 비교할 때 CN-E 10 µg/ml을 처리하였을 때 역시 CN-E에 의해

Table 2. TNF-α and IL-1β in peritoneal macrophages treated with CN-E

Samples	Concentration (µg/ml)	mTNF-α (pg/ml)	mIL-1β (pg/ml)
Control	-	72.0±1.3	170.5±2.2
CN-E	10	174.5±2.4*	365.7±5.4*
	1	150.2±4.6*	359.4±6.7*

Murine peritoneal macrophages (2×10⁶ cells/ml) were incubated for 48 h in the presence of 10 or 1 µg/ml CN-E. mTNF-α and mIL-1β were determined with ELISA kit.

The data represent a mean±SE of 5 mice.

* Significantly different from control group (p<0.01).

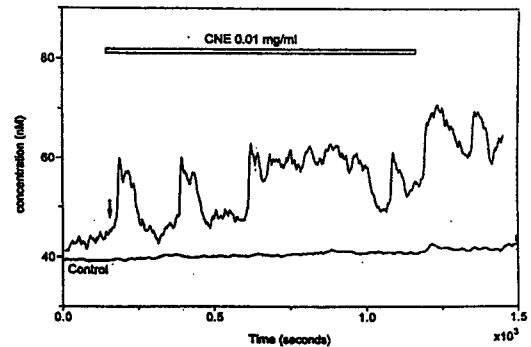


Fig. 4. The [Ca²⁺]_i response of peritoneal macrophage in the treatment of CN-E in vitro. Record shows [Ca²⁺]_i changes derived cells within an intact fura-2-loaded macrophage. CN-E (10 µg/ml) was added to a single cell. Representative of five experiments.

서 [Ca²⁺]_i 증가를 확인하였다 (Fig. 4). 이는 in vivo system에서 뿐만 아니라 in vitro system에서도 CN-E가 macrophage를 활성화하여 [Ca²⁺]_i 증가가 촉진됨을 확인하였다.

6. Peritoneal macrophages의 phagocytosis에 미치는 효과

마우스 복강에서 수거한 세포들을 petri dish에서 2시간 동안 부착하여 부착된 세포만을 수거하여 복강 macrophage를 얻었다. 수거된 macrophage (1×10⁶

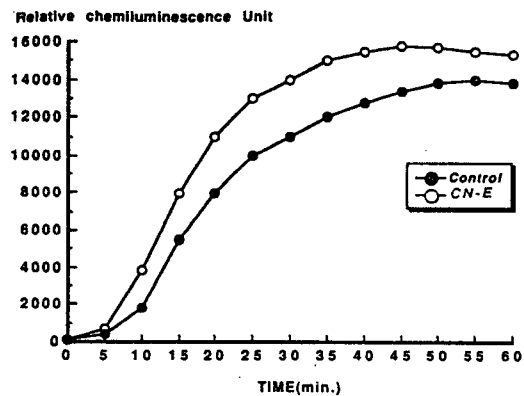


Fig. 5. Effects of CN-E on the phagocytosis of mouse peritoneal macrophages in vitro. Peritoneal macrophages obtained after 2h adherence period were cultured in DEM medium (without phenol red) with lucigenin and opsonized zymosan. Chemiluminescence was measured at 5min intervals for 60min. Each point represents the mean±SE from 3 experiments.

cells/ml)에 CN-E (10 µg/ml)를 *in vitro*에서 처리한 후 lucigenine chemiluminescence를 측정된 결과 약물을 처리하지 않은 대조군 (control)에 비해 CN-E를 처리했을 때 증가하였다 (Fig. 5). 이는 CN-E에 의해 활성화된 macrophage에서 생성된 superoxide와 lucigenine이 결합하여 chemiluminescence를 발현하는 것으로^{21,22)} CN-E가 phagocytosis를 증가시킴을 의미한다.

결론

어떤 약물이 면역기전에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 macrophage의 활성화 및 항원제시능력, B 세포에 있어서는 항체생성능력과 증식능 그리고 T 세포에 있어서는 증식 및 lymphokine 분비 측정 등 일련의 면역체계에 미치는 parameter의 측정이 선행되어야 한다. 그리하여 녹용 70% ethyl alcohol 분획 (CN-E)이 면역기전에 미치는 영향을 고찰한 결과, CN-E가 thymocytes의 세포생존율과 thymocytes와 splenocytes 중 helper T 세포의 population를 증가시켰다. 그리고 macrophage을 활성화하여 활성화된 macrophage에서 분비되는 TNF- α 와 IL-1 β 가 증가하였고 [Ca²⁺]_i가 증가하였으며 또한 활성화된 macrophage에 의한 phagocytosis가 촉진되었다. 이상의 결과는 CN-E가 상처치료와 외부물질의 침입에 대한 보호 등 면역조절작용에서 중요하게 작용할 것으로 기대된다. 현재 CN-E에 함유된 T-lymphocyte 활성화 및 macrophage 활성화 성분을 분리 정제하고 있는 중이다.

참고문헌

1. Wang, B. X., Zhao, X. H., Qi, S. B., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. : Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice, *Chem. Pharm. Bull.*, 36(7), 2587~2592 (1988).
2. 손낙원, 신민규, 이학인 : 기아 mouse의 세망내피계 탐식능에 미치는 녹각의 영향, *대한한의학회지*, 7(2), 174~183 (1986).
3. 김남주 : 녹각 추출액이 대장균 항체 생산에 미치는 영향, *대한한의학회지*, 6, 119~132 (1985).
4. 趙全成, 孫曉波, 永井隆之, 松本司, 清原寬章, 丁宗鐵, 山田陽城 : 鹿茸の免疫複合體除去能促進活性と作用物質, *和漢醫藥學會誌*, 7(3), 544~545 (1990).
5. 김용우 : 중완, 삼초유의 녹용약침이 mouse의 면역기능 회복에 미치는 영향, 동국대학교 박사학위논문 (1996).
6. 中島泉, 吳贊鎬 : 면역학 입문, 지구문화사, 서울, p.67 (1998).
7. 전길자, 서정숙, 오찬호, 염정렬, 은재순 : 녹용 에탄올 분획이 생쥐의 T-Lymphocyte에 미치는 영향, *생약학회지*, 29(4), 312~317 (1998).
8. Suh, J. S., Eun, J. S., So, J. N., Seo, J. T. and John, G. J. : Phagocytic activity of ethyl alcohol fraction of deer antler in murine peritoneal macrophage, *Biol. Pharm. Bull.*, 22(9), 932~935 (1999).
9. Wysocki, L. J. and Sato, V. L. : Planning for lymphocytes: A method for cell selection, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 2844~2847 (1978).
10. Mizel, S. B., Openheim, J. J. and Rosensteich, D. L. : Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the macrophage cell line P388D1, *J. Immunol.*, 120, 1497~1501 (1979).
11. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55~63 (1983).
12. Kotnic, V. and Fleischmann, W. R. Jr. : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity, *J. Immunol. Methods*, 129, 23~28 (1990).
13. Suda, T. and Nagata, S. : Purification and characterization of the Fasligand that induces apoptosis, *J. Exp. Med.*, 179, 873~879 (1994).
14. 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).
15. Jhon, E. C., Ada, M. K., David, H. M., Ethan, M. S. and Warren, S. : Current protocols in immunology, Vol. 1, Wiley Interscience, p.35~37 (1991).
16. Grinkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. : *J. Biol. Chem.*, 260, 3440~3450 (1985).
17. 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, 163~165 (1988).
18. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. : Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line, *J. Immunol. Methods*, 174, 259~261 (1994).
19. Miceli, M. C. and Parnes, J. R. : The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation, *Advances in Immunology*, 53, 59~122 (1993).
20. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Poper, J. S. : Cellular and molecular immunology, 2nd edition, 208, 241 W. B. Saunders Co., U.S.A (1994).
21. Cheson, B. D., Christensen, R. L., Sperling, R., Kohler, B. E. and Babior, B. M. : *J. Clin. Invest.*, 58, 789~792

(1976).

Exp. Pathol., 65, 231~235 (1984).

22. Holt, M. E., Ryall, M. E. T. and Campbell, A. K. : *J.*

(2001년 3월 2일 접수)