

산딸나무열매 추출물의 면역조절기능

김종석[†] · 오찬호* · 전 훈** · 이기승*** · 마상용

우석대학교 생명자원과학부, * 우석대학교 생명공학부, ** 우석대학교 한약학과, ***우석대학교 화학환경화공학부

Immuno-regulatory Property of Fruit-Extracts of *Cornus kousa* Burg.

Jong Suk Kim, Chan Ho Oh*, Hoon Jeon**, Kie Seung Lee*** and Sang Yong Ma

Dept. of Life Resource Science, Woosuk University, Wanju 565-701, korea

* Division of Biotechnology, Woosuk University, Wanju 565-701, korea

** Dept. of Oriental Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, korea

*** Dept. of Chemistry, Woosuk University, Wanju 565-701, korea

ABSTRACT : This study was conducted to investigate the immuno-regulatory effect and apoptosis of L1210 and HL60 leukemia cells of methanol-extracts of *Cornus kousa* Burg(CKB). The proliferation of mouse splenocytes and thymocytes enhanced by the addition of 10 $\mu\text{g/ml}$ of CKB. CKB were administered *p.o.* once a day for 7 days in adult male BALB/c mice. CKB increased the splenic and thymic T lymphocytes, especially the number of T_H cells markedly increased by the treatment of CKB. CKB treatment induced the apoptotic cell death in L1210 mouse leukemia and HL60 human leukemia cells. In addition, CKB also accelerated the phagocytic activity in peritoneal macrophages and increased the production of plaque forming cells. These results suggest that CKB have an various immuno-regulatory property.

Key words : *Cornus kousa* Burg. (CKB), immuno-regulatory, lymphocyte proliferation, subpopulation, phagocytic activity, apoptosis

서 론

산딸나무(사조화; *Cornus kousa* Burg.)는 경기도와 영. 호남지방의 산지에서 흔하게 자라는 층층나무과의 식물로서 높이 5~12 cm의 낙엽교목으로 가지는 층층으로 분지하여 계단상의 수형을 이룬다. 그 열매는 육질인 구형의 취과로서 지름 1~1.5 cm이며 소창(消脹) 및 지사효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(肅, 1994).

면역계는 출생과 더불어 개체가 생존하는 동안 지속적으로 보유하고 있으면서 생체 내, 외부로부터 출현하는 각종 병원체 등의 이물질들을 백혈구가 비자기로 인식하여 그것을 파괴하고, 소멸시켜 개체를 효과적으로 방어

하는 생체방어체계로서, 호중구와 대식세포 등의 식세포와, 종양세포 상해활성을 가진 NK세포 등이 담당하는 선천성 자연면역과 아울러 면역계를 총괄하는 T림프구, 항체생성세포인 B림프구 등이 반응의 주역인 특이 획득면역의 두가지로 대별되며, 후자는 다시 T림프구 등의 면역세포가 반응을 담당하는 세포성 면역과 항체와 각종 세포의 신호전달분자인 cytokine 등의 분자들이 반응을 담당하는 체액성 면역이라 부른다(Roitt 등, 1998).

본 연구에서는 예전부터 소창 및 지사 등의 다양한 생리활성을 가지는 산딸나무의 메탄올추출물을 재료로 하여 각종 면역반응에 미치는 효과를 살펴보고 약간의 지견을 얻었다.

† Corresponding author (Phone) : 063-290-1481, E-mail : jskim@woosuk.ac.kr

Received 11 July 2002 / Accepted 28 November 2002

실험 재료

(1) 실험동물 및 백혈병세포주

본 실험에 사용한 마우스는 BALB/c계통 음성(8 주령, 20 ± 2 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다. 계대배양 세포주로서는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 L1210 (mouse leukemia cell line : KCLB No. 10219)세포 및 HL60 (human acute promyelocytic leukemia cell line : KCLB No. 10240)세포를 사용하였다.

(2) 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), Hank's balanced salt solution (HBSS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), lucigenin, zymosan, Guinea pig complement 등은 Sigma Co., sheep red blood cell (SRBC)은 전북 축산진흥연구소에서 분양받았으며, thioglycolate는 Difco Co., PE conjugated anti-mouse CD4, B220 antibody, FITC conjugated anti-mouse CD8, Thy-1 antibody 등은 Caltag Co., 기타 시약은 특급 시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다. 사용기구로는 culture flask(Nunc), 96well plate(Costar), micrometer (Mitutoyo), inverted microscope(Zeiss), ELISA reader (Dynatech, MR5000), luminometer (Berthold, 96LP), flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), 그 외 centrifuge (VS-15000CF), CO2 incubator, freeze dryer 등은 Vision Scientific Co.의 제품을 사용하였다.

(3) 검액의 조제

본 실험에 사용한 산딸나무 열매는 500 g을 메탄올로 추출한 후, 여과한 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 41 g을 얻어 (이하 CKB라 함) 동물실험시에는 생리식염수, 세포배양 용에는 멸균 PBS에 용해시켜 사용하였다. 실험동물에는 1군 5마리로 하여 경구투여(500 mg/kg)하였으며 1주일 동안 매일 정해진 시간에 한번씩 투여하였다.

(4) 흉선 및 비장세포의 증식력 측정

MTT법(Mosmann, 1983)에 의해 마우스를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 무균적으로 적출하고 각각의 세포를 세정($\times 3$, DPBS-A, 1500 rpm, 10분)해서 비장 및 흉선세포 부유액을 무균 조건에서 1×10^6 cells /well이

되도록 세포수를 조정하여 다음, 비장세포 부유액에는 LPS($5 \mu\text{g/ml}$), 흉선세포 부유액에는 concanavalin A($0.5 \mu\text{g/ml}$)와 각 농도(0.1, 1, 및 $10 \mu\text{g/ml}$)의 CKB를 첨가하여 48시간 동안 37°C 의 CO₂배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석한 L-MTT용액 $20 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μl 로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 생존율을 백분율로 환산하였다.

(5) 흉선 및 비장세포의 아집단(subpopulation) 측정

Suda 등의 방법으로 마우스에 7 일 동안 CKB(500 mg/kg)를 경구 투여한 다음 마우스를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 비장 및 흉선세포 부유액을 조제하고 1×10^6 세포/well에 PE conjugated-anti mouse B220 antibody 및 FITC conjugated-anti mouse Thy-1 antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 antibody(1 : 40 dilution)로 이중 염색하여 4°C 에서 30분간 반응시키고 flow cytometer (excitation : 488 nm, emission : 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다.

(6) 복강 대식세포의 탐식능 측정

Blair 등의 방법에 의해 마우스 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주사하고 4일 후, 경추 탈구시켜 10 ml의 cold-PBS를 복강에 주입하여 잘 맛사지한 후, 복강 삼출세포를 수집하여 원심분리(1,500 rpm, 5분)한 후, RPMI1640 배지에 부유시켜 petri dish에 넣고 CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한 다음, 부착되지 않은 세포를 제거하고 petri dish 밑면에 부착한 대식세포를 scrapper로 모아 원심 분리(1,500 rpm, 5분)해서 세포수를 1×10^7 cells/ml가 되도록 DME(0.34 g/l NaHCO_3 , 2.6 g/l HEPES , pH 7.2)에 부유시켜 사용하였다. Zymosan용액의 제조는 zymosan 67 mg을 10 ml의 DPBS-A에 넣어 37°C 에서 30분간 방치한 후 동일한 양의 DPBS-A로 2회 세척하고 FBS가 10% 첨가된 10 ml의 DME에 재부유시켜 사용하였다. Lucigenin용액의 10 ml의 DPBS-A에 용해한 후 여과 멸균하여 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용 직전에 DME배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence측정은 37°C 에서 측정용 microplate well(white)에 준비된 세포부유액 50 μl 와 lucigenin 50 μl 를 주입하고 37°C 에서 15분 동안 전

처리한 후, CKB (10 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl 와 zymosan-용액 30 μl 를 첨가하여 luminometer를 이용하여 5분 간격으로 60 분간 chemiluminescence를 측정하였다.

(7) 용혈반 형성세포(PFC) 측정

Cunningham개량법에 의해 마우스에 SRBC 2×10^7 cells/0.3 ml를 복강 내에 주사하고 총 7 일간 CKB (500 mg/kg)를 경구 투여한 후, 마우스의 비장을 적출해서 비장세포 부유액을 조제하고 1×10^7 cells/ml로 조정한다. 세포부유액(1×10^6 cells/100 μl)과 항원으로 사용한 SRBC(1×10^6 cells/100 μl)를 96 well plate에 넣은 후 37°C의 CO₂ 배양기 내에서 4일간 배양하였다. 배양 종료후, 96 well plate를 원심 분리(800 rpm, 5 분)한 다음 RPMI배지 200 μl 를 주입하고 별도의 96 well plate에 보체(complement : Guinea pig serum) 10 μl 와 2배 희석한 SRBC 20 μl 를 주입하고 여기에 4일간 배양해 둔 비장세포 부유액 100 μl 를 가하고 미리 만들어둔 Cunningham chamber에 균일하게 주입하여 chamber의 주위를 paraffin으로 봉입하고 37°C의 CO₂배양기내에 1시간 동안 배양하고 4°C의 cold chamber에 30분간 정지한 후 형성된 plaque(용혈반)를 판독해서 항체생성 세포수를 산정(PFC 수/비장)하였다.

(8) Flow cytometer에 의한 암세포의 apoptosis 측정

Nicoletti 등의 방법으로 계대배양 중인 L1210세포 및 HL60세포에 0.1, 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 CKB를 첨가한 후, 24시간 및 48시간 동안 배양한 다음, 세포를 수집, 세정($\times 3$ 회, 1,500 rpm, 5분)한 후, 침전시킨 세포분획에 PI(10 $\mu\text{g/ml}$)를 20 μl / 1×10^6 cells의 농도로 염색(4°C, 30분간 반응)한 다음 flow cytometer (Coulter, EPICS XL; excitation : 488 nm emission : 620 nm)를 이용해서 DNA fragmentation (sub-G1 peak)을 정량하였다. 단편화된 DNA의 확인은 상기의 검체에 100 μl 의 nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 4°C에서 10 분간 방치한 후, 16,000 rpm으로 20 분간 원심 분리한 다음 상층액을 별도의 원심관에 취한다. RNase A(20 mg/ml) 2 μl 를 가해 37°C에서 1시간 배양한 후 다시 20 mg/ml의 proteinase K액 2 μl 를 가하여 37°C에서 1시간 배양하고 여기에 5M NaCl 20 μl 와 isopropyl alcohol 120 μl 를 가해 -20 °C에서 over night시키고 16,000 rpm으로 20 분간 원심 분리해서 상층액을 제거한 다음 TE buffer 20 μl 에 용해하여 1.2% agarose gel 전기영동(minigel : Mupid-II, 50V, 2 시간)을 해서 ethidium bromide(10 $\mu\text{g/ml}$)로 염색한 다음 단편화된 DNA를 정성적으로 확인

하고 gel documentation reader로 판독하였다.

(9) 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다(Dowdy 등, 1983).

결과 및 고찰

(1) CKB가 면역세포 증식에 미치는 효과

CKB에 대한 면역세포 증식에 미치는 효과는 Table 1과 같다. 마우스의 비장세포에서 대조군인 LPS(5 $\mu\text{g/ml}$) 단독 첨가군을 $100.0 \pm 3.1\%$ 로 했을 때 CKB 10 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 $117.0 \pm 3.7\%$ 로 비장세포가 증식되었으며, 흉선세포에서도 Con A(0.5 $\mu\text{g/ml}$) 단독 첨가군의 대조군에서 $100.0 \pm 4.1\%$ 인데 비하여 특히 CKB 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 첨가군에서 $128.0 \pm 3.5\%$ 로 흉선림프구의 증식을 촉진시키는 효과를 나타내었다. 이는 CKB가 면역세포의 활성을 증가시키는 효과를 지니고 있음을 확인하는 결과이며 체내에서 B, T림프구 및 대식세포등의 주요 면역세포를 보유하는 말초 면역장기의 대표인 비장과 T림프구의 분화장소인 흉선조직 내의 세포들을 활성화시키고 있다는 점에서 주목된다.

Table 1. Effect of CKB on the lymphocyte proliferation of splenocytes and thymocytes in mice

| Cell Type ($\mu\text{g/ml}$) | Splenocytes(%) | | Thymocytes(%) | |
|-----------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | LPS(-) | LPS(+) | Con A(-) | Con A(+) |
| Treatment | | | | |
| CONTROL | 83.4 ± 4.7 | 100.0 ± 3.1 | 81.9 ± 5.2 | 100.0 ± 4.1 |
| CKB(0.1) | | 104.4 ± 3.9 | | 101.5 ± 3.4 |
| CKB(1) | | 107.7 ± 4.6 | | 109.4 ± 2.6 |
| CKB(10) | | $117.0 \pm 3.7^*$ | | $128.0 \pm 3.5^*$ |

CKB(0.1~10 $\mu\text{g/ml}$) was treated to cultured splenocytes or thymocytes for 48 hrs. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 579 nm with a microplate ELISA reader.

The data represents the mean \pm SE of 3 experiments.

*, Significantly different from control group($p < 0.05$).

LPS : lipopolysaccharide, Con A : concanavalin A

(2) CKB가 흉선 및 비장세포의 아집단에 미치는 효과

7 일간 CKB를 경구 투여한 마우스 비장 및 흉선세포의 아집단변화는 Table 2와 같다. 비장세포는 대조군에 비하여 CKB 투여군에서 Thy-1⁺세포인 T세포의 population이 유의성있게 증가하였으며, B220⁺세포인 B세포는 변화가 없었다. T세포 아집단분석에서 CD4⁺세포

인 T_H 세포의 비율이 $CD8^+$ 세포인 T_C/T_S 세포에 비하여 현저하게 증가하였다. 흉선세포에서도 대조군에 비하여 T_H 세포의 비율이 CKB 투여에 의해 유의성있게 증가하였다. 이러한 결과는 CKB가 비장내 B, T림프구 중 특히 T림프구의 활성을 증가시키며, T세포의 pool인 흉선 내

에서도 면역계의 중추세포로 알려져 있는 T_H 세포의 비율을 크게 증가시키고 있는데 이는 특히 세포성 면역능을 증강시키고 있다는 것을 의미한다. 흉선은 골수로부터 이행해 들어온 전흉선세포를 성숙 T림프구로 분화, 성숙시키는 장기로서 흉선 수질에서 T_H 세포 및 T_C/T_S 세포 등으로 최종 분화가 진행된다면 비장 등의 말초면역 장기로 이동해서 면역력을 행사하게 된다(Miceli 등, 1993).

Table 2. Effect of CKB on the subpopulation of splenocytes and thymocytes in CKB-administered mice

| Cell Type | Splenocytes(%) | | Thymocytes(%) | | |
|-----------|----------------|--------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| | B cell | T cell | | T_H | T_C/T_S |
| | | T_H | T_C/T_S | | |
| CONTROL | 28.9±2.1 | 18.8±1.5 13.9±0.8 5.1±0.2 | | 12.4±0.3 | 3.9±0.2 |
| CKB | 29.7±1.9 | 24.0±2.1* 17.8±0.4* 6.3±0.3 | | 16.8±1.1* | 4.6±0.3 |

CKB(500 mg/kg) was administered *p.o* once a day for 7 days, thereafter the cells were collected and the subpopulation was measured by a laser flow cytometer staining with anti-mouse B 220/Thy1 antibody or anti-mouse CD4/CD8 monoclonal antibody.

The data represents the mean ± SE of 5 mice.

*, Significantly different from control group($p < 0.05$)

(3) CKB가 복강 대식세포의 탐식능에 미치는 효과

마우스로부터 복강 대식세포를 수집하고 1 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 CKB를 첨가하여 lucigenin chemiluminescence 측정법을 이용하여 대식세포의 탐식능을 살펴본 결과 (Fig. 1), zymosan만 처리한 대조군에 비하여 CKB 첨가군에서 대식세포의 탐식작용이 증가하였다. 이 결과는 CKB가 생체 내에 침입해 들어온 이물질을 탐식하는 주된 세포의 하나인 대식세포의 탐식활성을 증가시키는 작용을 의미하며, 대식세포는 생체 내에서 T, B림프구와 더불어 항원제공기능, 탐식작용, 불필요하게 된 세포의 제거, 림프구의 활성화 등의 중요한 면역력을 발휘하는 세포(Blair 등, 1988)로 알려져 있으며 CKB가 이러한 대식세포의 활성을 증강시키는 작용은 이른바 선천성 자연면역계의 활성을 증가시키는 결과라 추정된다.

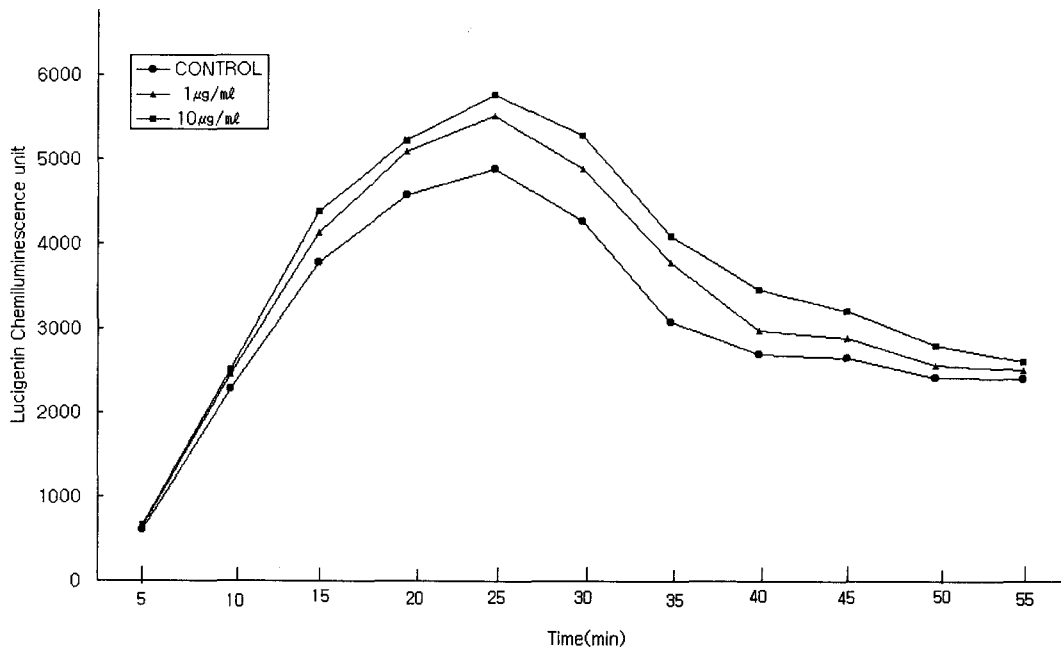


Fig. 1. Effect of CKB on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophage.

Mouse peritoneal macrophages were collected, and cultured in RPMI1640 media mixed with opsonized zymosan, and added to CKB (1-10 $\mu\text{g/ml}$), lucigenin chemiluminescence was measured 5 min. intervals for 60 minutes. The data represents the mean of 5 experiments.

(4) CKB가 용혈반 형성세포(PFC : 항체생성 세포)에 미치는 효과

SRBC에 대한 항체생성세포(PFC : plaque forming cell)를 산정하기 위해 Cunningham 개량법으로 시행한 PFC생성에 미치는 CKB의 효과를 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 본 실험은 항체생성세포로부터 방출된 항체가 주위의 항원피복 적혈구에 결합하고 여기에 보체가 결합함으로써 항원 피복적혈구가 용혈을 일으키는 것을 원리로 하며, 단세포 부유액을 사용해서 plaque(용혈반)형성능을 판정하면 출현한 용혈반은 항체생성 세포수와 동일한 결과를 나타내며 이것은 체액성 면역능을 파악하는데 중요한 지표가 된다. 본 실험결과에서 대조군의 750±45개/비장에 비해 CKB 투여군에서는 1460±72개/비장으로 PFC생성이 현저하게 증가되었다. 이는 CKB가 항체생성을 담당하는 형질세포의 활성을 증가시켜 체액성 면역능을 촉진하는 것을 의미한다.

Table 3. Effect of CKB on the production of plaque forming cell(PFC) against SRBC

| Samples | PFC(cells/spleen) |
|---------|-------------------|
| Control | 750±45 |
| CKB | 1460±72* |

SRBC(2×10^7 cells/0.3ml) injected to peritoneal cavity(i.p.), and CKB(500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The data calculated for total PFC/spleen. The data represents the mean±SE of 5 mice. *, Significantly different from control group(p < 0.05).

(5) CKB가 암세포의 apoptosis에 미치는 효과

마우스의 백혈병세포주인 L1210세포를 계대배양하여 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 CKB를 첨가해서 24시간 및 48시간 동안 배양한 결과(Table 4, Fig. 2), 24시간 동안 배양한 후의 apoptosis는 대조군에 비하여 10 및 100 µg/ml 농도의 CKB 첨가군에서 L1210세포의 apoptotic cell death가 촉진되었으며 48시간 배양한 결과도 대조군에 비하여 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 CKB 첨가군에서 유의하게 L1210세포의 apoptosis가 촉진되었다. 또한 사람의 백혈병세포주인 HL60세포 배양계에서도 24시간 동안 배양한 결과, 대조군에 비하여 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 CKB 첨가군에서 HL60세포의 apoptosis가 촉진되었다. Apoptosis는 생체 내의 신경계와 면역계세포의 생성, 분화 및 기능발현에 중요하게 작용하는 능동적세포사의 개념으로서(Kerr, 1972, Nagata, 1995), apoptosis기전에 이상이 발생하면 암, 자가면역질환, 퇴행성질환 및 AIDS 등의 질환을 초래하는 결과로

이행된다고 알려져 있다(Dive, 1992, D'Amico, 1994, Telford, 1991). CKB는 백혈병세포의 apoptosis를 유도하는 효과가 있으며 따라서 장차 백혈병 등의 치료에 적용할 가치가 있는 것으로 추정된다.

Table 4. Effect of CKB on the apoptosis of L1210 and HL60 leukemia cells

| Treatment (µg/ml) | L1210 cell(%) | | HL60 cell(%) |
|-------------------|---------------|-----------|--------------|
| | 24hr | 48hr | 24hr |
| CONTROL | 18.7±1.5 | 37.6±2.1 | 22.5±1.2 |
| CKB (0.1) | 19.4±1.7 | 44.2±3.2 | 27.7±2.4 |
| CKB (1) | 23.9±2.8 | 51.6±4.5* | 30.4±2.7* |
| CKB (10) | 28.1±1.8* | 58.0±4.7* | 29.9±3.1* |
| CKB (100) | 27.4±2.1* | 63.2±3.9* | 39.5±3.6* |

CKB(0.1-100 µg/ml) was treated with cultured L1210 or HL60 cells, and incubated for 24 or 48 hours, and then cells were collected and the sub-G₁ peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±SE of 5 experiments. *, Significantly different from control group(p < 0.05).

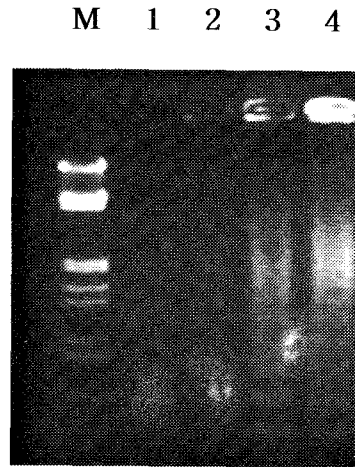


Fig. 2. Effect of CKB on the DNA fragmentation of L1210 leukemia cells.

CKB(1-100 µg/ml) was treated with cultured L1210 cells, and incubated for 48 hours, and genomic DNA was then purified and subjected to agarose gel electrophoresis. DNA was electrophoresed in a 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide and photographed by UV illumination. Lane 1 : Control, Lane 2 : CKB 1 µg/ml, Lane 3 : CKB 10 µg/ml, Lane 4 : CKB 100 µg/ml.

결 론

CKB는 마우스의 비장 및 흉선세포의 증식을 촉진시켰으며, in vivo 실험에서 비장 및 흉선내 T림프구를 유의성있게 증가시켰고 그 중 특히 TH세포가 증가되었으며, 계대배양 L1210세포와 HL60세포의 apoptosis유도를 촉진시켰고 복강 대식세포의 탐식작용을 촉진시켰다. 또한, CKB는 항체생성 세포수를 증가시키는 효과가 관찰되었다. 이상의 실험 결과, CKB는 세포성 및 체액성 면역능을 증강시켰으며, 아울러 암세포의 apoptosis유도를 촉진하는 다양한 면역조절효과가 관찰되었다.

감사의 글

본 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

LITERATURE CITED

藤培根. 1994. 중국본초도감 제 2권, p. 148. 동국대학교 한의대 본초학회 번역. 여강출판사

Roitt I, Brostoff J, Male D. 1998. Immunology, 4th edition, Mosby, London

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods 65 : 55-63

Suda T, Nagata S. 1994. Purification and characterization of the

Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179 : 873-879

Dowdy S, Weardon S. 1983. Statistics for research. p. 262. Wiley, New York

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani G, Riccardi CA 1991. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 139 : 271-279

Miceli MC, Parnes JR. 1993. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology 53 : 59-64

Blair AL, Cree IA, Beck JS, Hating MJG. 1988. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. J. Immunol. Methods 112 : 163-168

Cunningham AJ, Szenberg A. 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. Immunology 14 : 559-564

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26 : 239-245

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88 : 355-365

Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis(programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochimica et Biophysica Acta 1133 : 275-285

D'Amico AV, McKenna WG. 1994. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. Radiotherapy & Oncology 33(1) : 3-10

Telford WG, King LE, Fraker PJ. 1991. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. Cell Prolif. 24 : 447-459