

## 황기 부탄올 분획물이 생쥐의 세포성 면역기능에 미치는 영향

김정훈<sup>#</sup> · 문연자 · 이성원 · 이승연 · 박정숙\* · 우원홍  
원광대학교 한의학전문대학원, \*원광대학교 대학원 약학과  
(Received October 22, 2001; Revised November 25, 2001)

### Effects of the Butanol Fraction of Astragali Radix on the Cellular Immune Function in Mice

Joung Hoon Kim<sup>#</sup>, Yeun Ja Mun, Sung Won Lee, Seung Yon Lee,  
Joung Suk Park\* and Won Hong Woo

Department of Newly-Developed Drugs, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University and  
\*Department of Pharmacy, Graduate School of Wonkwang University, Sinyong-dong, Iksan, Chumbuk. 570-749, Korea

**Abstract** — Effects of the butanol fraction of Astragali Radix (BFAR) on the cellular and nonspecific immune responses were investigated in ICR mice. Mice were divided into 4 groups and BFAR at doses of 5, 25 and 125 mg/kg were administered orally to mice daily for 3 weeks, and the normal animals were given vehicle. The results of this study are summarized as follows; the relative weight of thymus was greatly increased by BFAR treatment, compared with that in normal mice. However, the body weight gain was not affected. Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction to sheep red blood cells (SRBC) for cellular immunity was significantly enhanced by BFAR treatment, compared with those in normal mice. In these mice, BFAR also dose-dependently increased activities of phagocyte and natural killer (NK) cells as well as the number of leukocyte resulted from nonspecific immunity. Thus, these results demonstrate that BFAR treatment results in a significant increase in both cellular and nonspecific immune responses to antigen in concentrations that enhance humoral immune function.

**Keywords** □ Astragali Radix, delayed-type hypersensitivity reaction, phagocyte activity, natural killer cell activity, leukocyte, mice

황기(Astragali Radix)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 중북부 지역에서 자생하며, 보기제로써 민간요법으로 널리 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 한방에서는 그 뿌리를 주로 약재로 사용하고 있으며, 보충이기, 탁독 등의 효능이 있고, 내상 노년 및 모든 기쇠허혈증에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 이에 관한 주요한 약리효능 연구로는 혈압강화작용, 강심작용, 간장보호작용, 혈당강화작용 등이 보고되어 있다.<sup>3-6)</sup>

황기의 구성성분으로는 triterpenoide glycoside계통과 flavonoid계통이 주를 이루고 있고,<sup>7-10)</sup> 특히 황기 부탄올 분획물은 그 메탄올 추출물의 여러 성분 중 주로 soyasaponin과 astragalosides가 함유하는 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup>

황기의 면역학적 보고에 따르면 Purmova 등<sup>12)</sup>은 황기의 saponin이 간이나 근육에서 과산화지질형성 억제와 cholesterol

농도를 감소시켰으며 면역기능을 증가시켰다고 보고하였고, Zhao 등<sup>13)</sup>은 방사선에 의해 억제된 T-dependent antigen에 대한 항체 반응이 황기에 의해 회복되었다고 보고하였다. Kim 등<sup>14)</sup>도 황기의 메탄올 추출물이 면역적혈구에 대한 적혈구 응집소( hemagglutination titer) 및 용혈반 형성세포 등 생쥐의 체액성 면역기능을 증가시킨다고 보고하였다. 더욱이 우리는 또한 이전의 보고에서 황기의 부탄올 분획물이 용량에 따라 생쥐의 체액성 면역기능을 증가시킨다고 하였다.<sup>15)</sup>

앞에서 본 바와 같이 황기의 약리작용과 체액성 면역활성에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나, 황기 부탄올 분획물이 여러 가지 용량과의 세포성 및 비특이적 면역반응들과의 상관성에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 저자들은 황기 부탄올 분획물의 용량에 따라 세포성 면역항진작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 실험재료 및 방법

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 063-850-6942 (팩스) 063-850-6840  
(E-mail) jhunkim@wonkwang.ac.kr

실험동물 - 생후 6주령, 암컷 ICR생쥐를 실험동물개발(경기도

오산시)에서 분양 받아 시판사료(신촌 실험동물사료 제품; 조지방 3.5%이상, 조섬유 7.0%이하, 조단백질 22.5%이상, 조회분 9.0%이하, 인 0.5%이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후, 전체를 4군으로 나누어  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 사육하였다.

**황기 부탄을 조제 및 투여** - 우리의 이전의 보고<sup>15)</sup>에서 실시한 바와 같이, 황기(서울 동대문구 한약유통)를 세말로 한 다음 그 50g을 추출, 여과 및 감압농축 하여 부탄을 분획물 400 mg을 얻었다. 이 황기 부탄을 분획물을 phosphate-buffered saline(PBS: Gibco Co., Grand Island, N. Y., USA)에 녹인 다음 생쥐 체중 kg당 5, 25 및 125 mg을 3주간 1일 1회 동일한 시간에 경구투여 하였고, 정상대조군은 PBS를 위와 같은 방법에 따라 투여하였다.

**체중 및 흉선의 중량계측** - 실험동물의 체중은 시료투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 흉선의 중량은 최종 약물투여 1일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후, 흉선을 각각 적출하여 그 중량을 측정하여 체중에 대한 백분율을 구하였다.

**항원조제** - 면양적혈구(Sheep red blood cells; SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 응성 면양의 경동맥으로부터 heparin처리 주사기로 채혈한 후 동량의 Alserver's액(pH 6.1)을 가하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution(HBSS: Gibco Co.)에 부유시켜 사용하였다.

**면역** - 원심 세척한 SRBC를 Reed 등<sup>16)</sup>의 방법을 참고하여 HBSS에  $1 \times 10^8$  cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml( $1 \times 10^7$  cells)를 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였다.

**비장세포 부유액의 조제** - 비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium(MEM; Gibco Co.)으로 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 세포 덩어리를 제거하였으며, 빙냉 MEM으로  $4^\circ\text{C}$ 에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포수가  $2 \times 10^7$  cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험 때마다 비장세포의 생존을 검사를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 실시하였다. 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 다음 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후, 백혈구 계산관에서 무색인 생세포와 적색으로 염색된 사세포 수를 측정하여 그 백분율을 계산하였다.

**족적종창반응의 측정(Footpad swelling test)** - 지연형과민반응(delayed-type hypersensitivity reaction; DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등<sup>17)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 면역 4일 후에 SRBC 0.05 ml( $1 \times 10^8$  cells)를 생쥐의 좌측 후지족적에 피내주사하였다. 주사한 다음 24시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm급 microcaliper(Mitutoyo Mfg.

Co., Ltd., Japan)로 측정하였으며, 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 3회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등<sup>18)</sup>의 판독기준에 따라 다음과 같이 족적종창지수로 표시하였다.

$$\text{Footpad swelling index} = \frac{\text{총창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

**대식세포활성도의 측정** - 대식세포의 탐식능력을 측정하고자 본 실험에서는 Biozzi 등<sup>19)</sup>이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종약물투여 2일 후에 Rotring ink<sup>®</sup>를 1% gelatin 수용액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여  $37^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소 현탁액을 생쥐 체중 g당 0.01 ml씩 꼬리정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부 정맥혈관총(retro-orbital plexus)을 heparin처리된 capillary tube( $20 \mu\text{l}$ : microhematocrit)로 천자하여  $20 \mu\text{l}$ 의 혈액을 10, 20 및 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate 용액 2 ml가 든 test tube에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient와 corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B : Body weight

L : Liver weight

S : Spleen weight

K : Phagocytic coefficient(측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot한 graph곡선)

**Natural killer cell activity 활성도의 측정** - 약물투여 최종일로부터 2일 후에 생쥐를 치사시켜 전술한 방법으로 비장세포를 분리하여 RPMI 1640배지에  $2 \times 10^7$  cells/ml의 농도를 현탁시켜 작동세포로써 이용하였다. 표적세포로는 YAC-I cell을 이용하였으며, Kiesseling 등<sup>20)</sup>의 방법으로 sodium chromate  $^{51}\text{Cr}$ (에너지연구소에서 분양)를 labelling한 후,  $2 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 부유시켜 사용하였다. 이때 세포생존율이 95%이상 되게 하여, 작동세포와 표적세포의 비율은 100:1로 하였다.  $^{51}\text{Cr}$ 이 표식된 표적세포( $2 \times 10^5$  cells/ml) 100  $\mu\text{l}$ 와 작동세포( $1 \times 10^7$  cells/ml) 100  $\mu\text{l}$ 를 96 well tissue culture plate(Flow Lab., USA)의 각 well에 혼합한 후,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator(Forma, USA)에서 5시간 배양하였다. 이 tissue culture plate를  $500 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리한 후, 상층액 100  $\mu\text{l}$ 씩 취하여 gamma counter(Beckman, USA)로 방사능을 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며, percent specific lysis를 다음의 식에 의하여 산출하였다.

% Specific lysis = [(c.p.m. in experiment - c.p.m. spontaneous release)/(c.p.m. maximum release - c.p.m. spontaneous release)] × 100

여기에서 c.p.m. experiment release는 실험군의 상중액 100 ml의 방사선량, c.p.m. spontaneous release는 작동세포가 들어 있지 않고 표적세포만 들어있는 대조군의 상중액 100 ml의 방사선량이고, c.p.m. maximal release는 표적세포(10<sup>4</sup> cells in 100 ml) 1% Triton X-100용액 100 μl를 가하여 얻었으며, 표식된 방사능의 95% 이상이 되게 하였다. C.p.m. spontaneous release는 c.p.m. maximal release의 10%이내가 되게 하였다.

**말초순환백혈구수의 측정** - 생쥐의 안구 정맥총으로부터 말초혈액을 채혈하고 Türk액(1% gentian violet 수용액 1 ml를 증류수 100 ml에 녹인 용액)으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후 백혈구 총수를 측정하였다.

**통계학적 분석** - 모든 자료는 mean ± standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 Student's t-test로 행하였다.

### 실험결과 및 고찰

황기 부탄을 분획물이 생쥐의 세포성 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향에 대한 실험의 결과와 고찰은 다음과 같다.

**체중의 변화** - 각 군의 체중변화는 Fig. 1과 같다. 정상대조군의 체중증가율이 26.78 ± 2.30%인데 비해 황기 부탄을 분획물 투여군 모두에서 거의 변화가 없었다.

**흉선의 중량변화** - 각 군의 흉선의 중량변화는 Fig. 2와 같다. 흉선의 중량비는 정상대조군이 0.08 ± 0.01%인데 비해 황기 부탄을 분획물 5, 25 mg/kg 투여군에서는 흉선의 중량변화가 없었

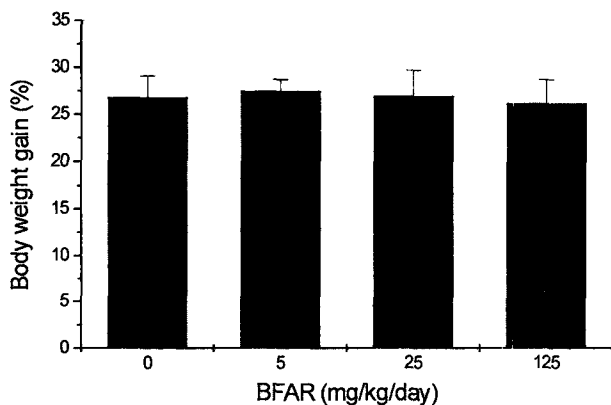


Fig. 1 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the body weight gain in mice. The butanol fractions of Astragali Radix (BFAR; 5, 25 and 125 mg/kg, respectively) were administered orally to mice daily for 21 consecutive days. Mice were immunized i.v. with 10<sup>7</sup> SRBC 5 days prior to each measurement. Each column represents the mean ± SE of results obtained from 6 to 7 mice.

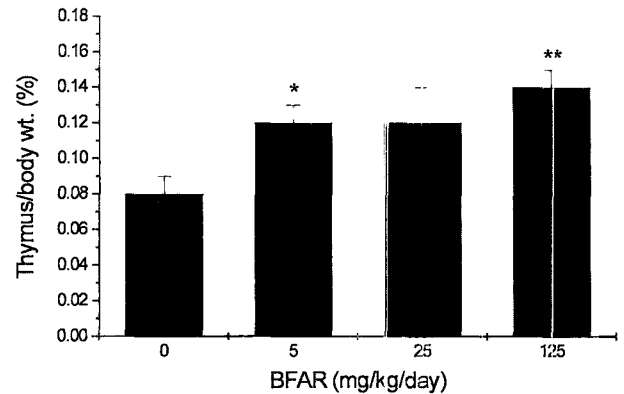


Fig. 2 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the thymus weight in mice. Abbreviations: butanol fraction of Astragali Radix, BFAR. Other legends and methods are the same as described in Table 1. Each column represents the mean ± SE of results obtained from 6 to 7 mice. Asterisks denote a significant difference compared with the values in normal mice not fed BFAR (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01).

으나, 125 mg/kg 투여군은 0.14 ± 0.01%로 현저한 증가를 보였다. 이는 흉선이 중추 임파조직으로 T임파구의 분화와 깊이 관여하고 있다고 잘 알려져 있고, 또한 황기디 매탄올 엑스 투여시 흉선의 중량이 증가했다는 Kim 등<sup>14)</sup>의 보고와 유사한 점으로 미루어, 황기 부탄을 분획물의 용량에 따라 세포성 면역반응에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

**자연형 과민반응에 미치는 영향** - 세포성 면역반응인 족저종창 반응에 의해 측정된 자연형 과민반응은 감각임파구에 의한 lymphokine의 화학적 전달인자의 유리에 의해서 성립되며 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 정상대조군에 비해 황기의 부탄을 분획물 5, 25 및 125 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 3). 이는 myocarditis에 걸린 생쥐에게 황기 투여시 항염작용이 있었다는 Yang<sup>21)</sup>의 보고와 *in vitro*에서 황기가 interferon의 유도를 증가시켰다는 Hou<sup>22)</sup>의 보고로 미루어, 황기의 부탄을 분획물 투여시 lymphokine의 생성과 macrophage의 활성을 촉진시킴으로서 세포성 면역을 증가시킨 것으로 사료된다.

**대식세포의 활성에 미치는 영향** - 대식세포의 활성은 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukin의 분비에 중요한 역할을 하며, 그 탐식능이 망상조직내피계에 얼마나 영향을 미치는가를 알기 위한 지표로 이용된다. 본 실험에서 황기의 부탄을 분획물 5, 25 및 125 mg/kg 투여군은 정상대조군의 3.86 ± 0.25에 비해 5.21 ± 0.28, 6.32 ± 0.35 및 6.52 ± 0.32로 용량에 따라 유의 있는 증가를 보였다(Fig. 4). 이는 황기의 물추출물에서 얻은 polysaccharide가 생쥐의 복강에 있어 macrophage의 대식세포의 활성을 증가시켰다는 Fang 등<sup>10)</sup>의 보고와 생쥐비장에 있어서도 또한 macrophage의 활성을 촉진시켰다는 Chen 등<sup>23)</sup>의 보고와 황기 매탄올추출물이 생쥐의 대식세포기능을 항진시켜 interleukin-1을 증가시켰다는 Sugiura

등<sup>24)</sup>의 보고와 유사한 점으로 미루어, 황기의 부탄올 분획물의 주 성분인 saponin 등이 직접적으로 macrophage의 활성을 유의하게 증가시킨 것으로 생각된다.

**NK cell의 활성화에 미치는 영향** - NK cell의 활성화는 종양의 성장에 대해 저항하는 대과립성 림프구의 일종으로 종양면역 기능에 중요하며,<sup>25-30)</sup> 특히 숙주의 비특이적 면역능의 부활여

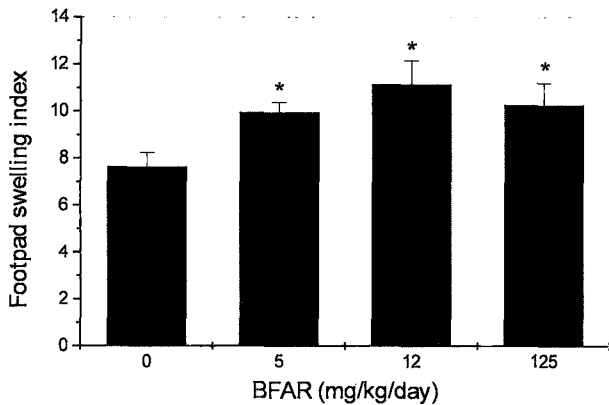


Fig. 3 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the delayed-type hypersensitivity reaction in mice. Abbreviations: butanol fraction of Astragali Radix, BFAR. DTH reaction was determined by footpad swelling test. Footpad swelling is shown as the difference between the thickness of the footpads challenged with SRBC and saline, respectively. Other legends and methods are the same as described in Table 1. Each column represents the mean  $\pm$  SE of results obtained from 6 to 7 mice. Asterisks denote a significant difference compared with the values in normal mice not fed BFAR (\* $p$ <0.05).

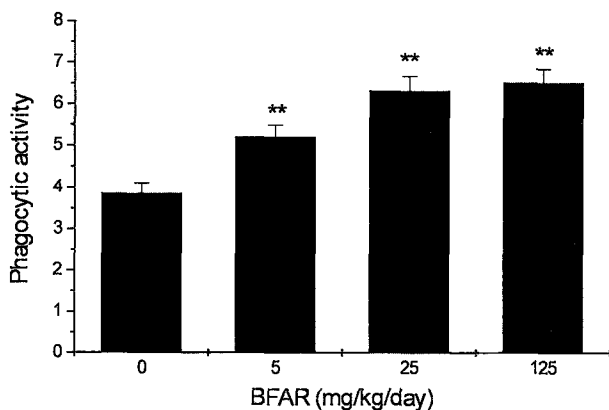


Fig. 4 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the phagocytic activity in mice. Abbreviations: butanol fraction of Astragali Radix, BFAR. Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of liver and spleen weight to body weight. Other legends and methods are the same as described in Table 1. Each column represents the mean  $\pm$  SE of results obtained from 6 to 7 mice. Asterisk denotes a significant difference compared with the values in normal mice not fed BFAR (\*\* $p$ <0.01).

부를 확인하기 위하여 실시하는데, 본 실험에서 황기의 부탄올 분획물 5, 25 및 125 mg/kg 투여군은 정상대조군의  $19.08 \pm 1.04$ 에 비해  $22.33 \pm 1.01$ ,  $23.33 \pm 1.45$  및  $25.00 \pm 2.02$ 로 용량에 따라 유의한 증가를 보였다(Fig. 5). 이는 황기의 swainsonine을 생쥐에 투여시 B16-F10 melanoma cell의 전이를 억제하고 NK cell의 활성을 증가시켰다는 Humphries<sup>31)</sup>의 보고와 황기추출물과 interferon- $\alpha$ 이 NK cell의 활성을 현저히 촉진시켰다는 Jing 등<sup>32)</sup>의 보고, 황기의 항종양작용에 대한 Sun

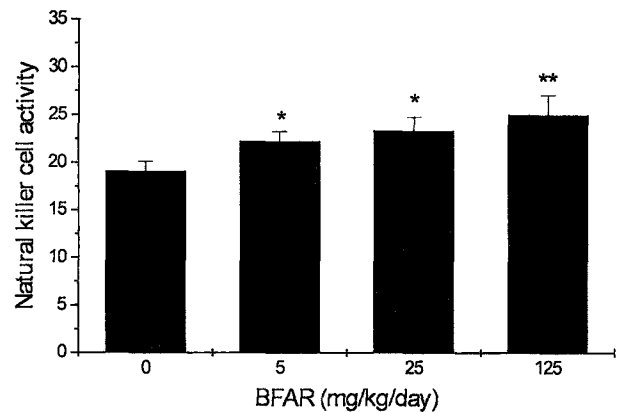


Fig. 5 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the natural killer cell activity in mice. Abbreviations: butanol fraction of Astragali Radix, BFAR. The percentage lysis was determined by a standard 4 h  $^{51}\text{Cr}$  release assay and effector to target ratio was 100:1. Other legends and methods are the same as described in Table 1. Each column represents the mean  $\pm$  SE of results obtained from 6 to 7 mice. Asterisks denote a significant difference compared with the values in normal mice not fed BFAR (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).

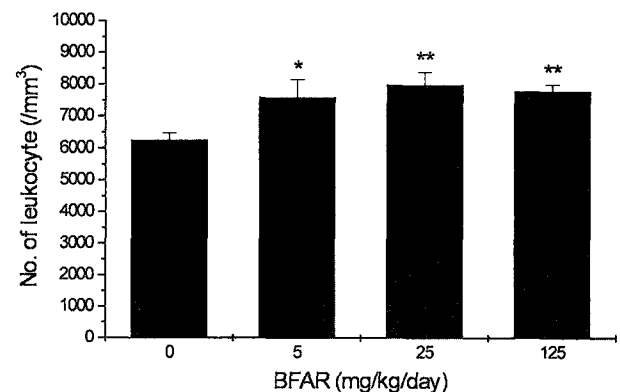


Fig. 6 - Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the number of circulating leukocyte in mice. Abbreviations: butanol fraction of Astragali Radix, BFAR. Blood samples for measuring leukocyte in mice were collected from the retro-orbital plexus immediately before assay. Other legends and methods are the same as described in Table 1. Each column represents the mean  $\pm$  SE of results obtained from 6 to 7 mice. Asterisks denote a significant difference compared with the values in normal mice not fed BFAR (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).

등<sup>33)</sup>과 Chu 등<sup>34)</sup>의 보고가 있으며, 또한 황기가 *in vitro*에서 recombinant interleukin-2에 의한 lymphokine-activated killer cell의 항암효과를 강화시켰다는 Wang 등<sup>35)</sup>의 보고로 미루어 볼 때, 황기 부탄을 분획물이 T cell 또는 macrophage활성을 촉진함으로써 NK cell의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. 특히 황기 부탄을 분획물에 의한 NK cell의 활성 증가는 항종양 작용에 대해 다양한 효과가 기대가 되지만, 이에 대한 정확한 기전을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

**말초순환백혈구수에 미치는 영향** - 말초순환백혈구수는 정상대조군에 비해 황기의 부탄을 분획물 5, 25 및 125 mg/kg 투여군 모두에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 6). 이는 이상의 세포성 면역반응의 결과 등과 종합해 볼 때, 황기의 부탄을 분획물이 임파구 활성화에 영향을 미쳐 백혈구의 생산을 촉진하여 백혈구수가 증가한 것으로 사료된다.

따라서 황기 부탄을 분획물은 감염성 질환이나 면역기능의 이상으로 인한 질환의 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 결 론

황기 부탄을 분획물(5~125 mg/kg, 경구투여)이 생쥐의 세포성 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 황기 부탄을 분획물 투여군은 정상대조군에 비해 흉선의 중량비를 유의성 있게 증가시켰으나, 체중증가율에는 영향을 주지 않았다.

2. 황기 부탄을 분획물 투여군은 정상대조군에 비해 세포성 면역과 관계되는 SRBC에 대한 지연형과민반응을 유의하게 증가시켰다.

3. 황기 부탄을 분획물 투여군은 정상대조군에 비해 비특이적 면역과 관계되는 대식세포의 활성, 자연살해세포의 활성 및 백혈구 수를 용량 의존적으로 현저히 항진 시켰다.

이상의 결과로 보아, 황기 부탄을 분획물은 체액성 면역기능을 증가시키는 농도에서 세포성 및 비특이적 면역을 용량 의존적으로 증가시켰다.

## 문 헌

1) Sun, T., Chang, Y. H. and Uy, G. Q. : Effect of Fu-Zheng therapy

in the management of diseases. *Chin. Med. J.* **61**, 97 (1981).

2) Tu, G. S. : *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, p. 109 (1988).

3) Kim, Y. S. and Park, K. H. : Screening method for antihepatotoxic activity using CCl<sub>4</sub>-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 51 (1995).

4) Park, K. H., Kim, Y. S. and Kyung, J. S. : Screening for inhibitory effect of solvent fractions prepared from herbal drugs on CCl<sub>4</sub>-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes and evaluation of antihepatotoxicity *in vivo*. *Yakhak Hoeji* **40**, 52 (1996).

5) Zhang, Y. D., Wang, Y. L., Shen, J. P. and Li, D. X. : Hypotensive and antiinflammatory effects of *Astragalus* saponin I. *Acta Pharm. Sin.* **19**, 333 (1984).

6) Zhou, Q. J. : Chinese medicinal herbs in the treatment of viral hepatitis. In: Chang, H. M., Yeung, H. W., Tso, W. W. and Koo, A., ed., *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. World Scientific, Singapore, p. 215 (1985).

7) Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M. and Yoshikawa, H. : Saponin and sapogenol. XXXVI. Chemical constituents of *Astragali Radix*, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. 3. Astragalosides III, V and VI. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 709 (1983).

8) Cui, B., Inoue, J., Takeshita, T., Kinjo, J. and Nohara, T. : Triterpene glycosides from the seeds of *Astragalus sinicus* L. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3330 (1992).

9) Chen, M. H. and Liu, F. S. : Studies on chemical constituents of *Astragalus complanatus* R. Brown. II. *Acta Pharm. Sin.* **23**, 218 (1988).

10) Fang, S. D., Chen, Y., Xu, X. Y., Ye, C. Q., Zhai, S. K. and Shen, M. L. : Studies of the active principles of *Astragalus mongholicus* Bunge. I. Isolation, characterization and biological effect of its polysaccharides. *Org. Chem.* **26** (1982).

11) Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M., Takagi, A. and Yoshikawa, M. : Saponin and sapogenol. XXXV. Chemical constituents of *Astragali Radix*, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. 2. Astragalosides I, II and IV, cetylastragaloside I and isoastragalosides I and II. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 698 (1983).

12) Purmova, J. and Opletal, L. : Phytotherapeutic aspects of diseases of the cardiovascular system. V. Saponins and possibilities of their use in prevention and therapy. *Ceska. Slov. Farm. (B2Q)* **44**, 246 (1995).

13) Zhao, K. S., Mancini, C. and Doria, G. : Enhancement of the immune response in mice by *Astragalus membranaceus* extracts. *Immunopharmacology* **20**, 225 (1990).

14) Kim, J. H., Park, J. S., Chae, B. S., Kang, T. W., Park, C. B. and Ahn, Y. K. : Immunobiological studies on doses of methanol extract of *Astragali Radix*. *Yakhak Hoeji* **40**, 326 (1996).

15) Kim, J. H., Mun, Y. J., Lee, S. W., Im, S. J., Park, J. S. and Woo,

- W. H. : Effects of the butanol fraction of Astragali Radix on the humoral immune function in mice. *Yakhak Hoeji* 45(6), 679 (2001).
- 16) Reed, N. D., Crowle, P. K. and Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immunodeficient animals. *B. Ssaordeted. Karger Baselip.* 184 (1984).
- 17) Yoshikai, Y., Miake, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunology* 38, 577 (1979).
- 18) Sugimoto, M., Kojima, A. M., Yaginuma, K. and Gashira, Y. E. : Cell-mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 28, 32 (1975).
- 19) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpen, B. N. : Etude quantitative du l activity granulopexique du system reticulo-endothelial. *C. R. Soc. Bio. Paris* 148, 431 (1954).
- 20) Kiesseling, R., Kleing, E. and Wigzell, H. : Natural killer cell in mouse. *Eur. J. Immunol.* 5, 112 (1975).
- 21) Yang, Y. Z. : Treatment of experimental Cox-sackie B-3 viral myocarditis with *Astragalus membranaceus* in mice. *Chin. Med. J.* 103, 14(1990).
- 22) Hou, Y. D. : Interferon induction and lymphocyte transformation stimulated by *Astragalus membranaceus* in mice spleen cells. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* 1, 137 (1981).
- 23) Chen, L. J., Shen, M. L., Wang, M. Y., Zhai, S. K. and Liu, M. Z. : Effect of *Astragalus* polysaccharides on phagocytic function in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 2, 200 (1981).
- 24) Sugiura, H., Nishida, H., Inaba, R. and Iwata, H. : Effects of exercise in the growing stage in mice and of *Astragalus membranaceus* on immune functions. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 47, 1021 (1993).
- 25) Hanna, N. and Fidler, I. J. : Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 801 (1980).
- 26) Harmon, R.C., Clark, E. A. O. and Toole, G. : Resistance of H-2 heterozygous mice to parental tumors. I. Hybrid resistance and natural cytotoxicity to EL 4 are controlled by the H-2D-Hh-I region. *Immunogenetics* 4, 601 (1977).
- 27) Petrany, G., Kiessling, R. and Povey, S. : The genetic control of natural killer cell activity and its association with *in vitro* resistance against a Moloney lymphoma isograft. *Immunogenetics* 3, 15 (1976).
- 28) Hanna, N. : Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice in correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 26, 675 (1982).
- 29) Hanna, N. and burton, R. C. : Definitive evidence that natural killer cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J. Immunol.* 127, 1754 (1981).
- 30) Kiessling, R., Petrany, G., Klein, G. : Non-T-cell resistance against a mouse Moloney lymphoma. *Int. J. Cancer* 17, 272 (1972).
- 31) Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L., Molyneux, R. J. and Olden, K. : Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. *Cancer Res.* 48, 1410 (1988).
- 32) Jing, J. P. and Lin, W. F. : Preliminary study on effects of mechanism of human umbilical cord blood derived interferon- $\alpha$  and of *Astragalus membranaceus* on neutral killer toxicity. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* 3, 293 (1983).
- 33) Sun, Y., Hersh, E. M., Talpaz, M., Lee, S. L., Wang, W., Loo, T. L. and Mavligit, G. M. : Immune restoration and/or augmentation of local graft versus host reaction by traditional Chinese medical herbs. *Cancer* 52, 70 (1983)
- 34) Chu, D. T., Wang, W. L. and Mavligit, G. M. : Immunotherapy with Chinese medical herbs. I. Immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractioned *Astragalus membranaceus in vitro*. *J. Clin. Lab. Immunol.* 25, 119 (1988).
- 35) Wang, Y., Qian, X. Y., Hadley, H. R. and Lau, B. H. : Phytochemicals potentiate interleukin-2 generated lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against murine renal cell carcinoma. *Mol. Biother.* 4, 143 (1992).