

초석잠 추출물의 항암 및 면역 효과

†류 병 호·박 법 규·¹송 승 구
경성대학교 식품공학과, ¹부산대학교 화학공학과
(접수 : 2002. 10. 14., 게재승인 : 2002. 12. 23.)

Antitumor Effects of the Hexane Extract of *Stachys Sieboldii* MIQ

Beung-Ho Ryu[†], Bub-Gu Park, and Seung Koo Song¹
Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea
¹Department of Chemical Engineering, National University, Busan, Korea
(Received : 2002. 10. 14., Accepted : 2002. 12. 23.)

The present study was designed to investigate the effects of *Stachys Sieboldii* MIQ as a new natural antitumor agent or immunomodulator. To obtain the above objectives, *Stachys sieboldii* MIQ was extracted with ethanol. *Stachys sieboldii* MIQ accelerated mouse spleen cell growth, but inhibited FM3A/S^o-cell growth. However, no significant difference was found for CD4⁺ / CD8⁺ cells. The growth rates of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells were accelerated more than those normal mouse group. *Stachys sieboldii* MIQ fed mice showed a significant enhancement of IL-2 receptor expression, increased numbers of CD4⁺ T cells, and CD8⁺ T cells. *Stachys sieboldii* MIQ also stimulated the production of NO by peritoneal macrophages and the production of NO by and the growth of mouse spleen cells. On the other hand, lung localization of B16F10 melanoma cells was inhibited by ethanol extract of *Stachys sieboldii* MIQ. These results show that *Stachys sieboldii* MIQ is a useful new functional antitumor agent or immunomodulator.

Key Words : *Stachys sieboldii* MIQ, antitumor effect, immunomodulator

서 론

현대 의학의 발전에도 불구하고 암은 아직도 그 원인 및 치료방법이 분명치 않아 인류의 건강을 위협하는 가장 중요한 인자로 남아 있다. 암의 공포로부터 벗어나기 위하여 오래 전부터 연구가 진행되어 많은 새로운 사실들이 밝혀지고 있으나 현재 암 치료에 이용되고 있는 화학요법, 방사선요법 및 외과적 수술요법 등은 치료적 한계성 및 부작용 등의 불가피성으로 인해 그 이용에 많은 문제점을 가지고 있다(1,2). 이런 관점에서 볼 때 불완전한 기존의 암 치료법에 병행하여 현재에 이르러서는 자연계에 존재하는 천연물로부터 분리한 물질을 생체 방어기준에 이용하여 암을 예방하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있다(3). 최근에 와서는 해양생물(4-6), 버섯류(7-9) 등에서 항암 성분의 연구가 보고 되고 있다. 이러한 항암 성분은 면역기능을 촉진 또는 부활시킴으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있으며 종래의 항암제와는

달리 그 부작용이 현저히 낮고 특히 화학 요법이나 방사선 요법의 병용으로 치료효과를 극대화시킬 수 있어 실용가치를 더욱 높이고 있다(2).

지금까지 암을 효과적으로 치료할 수 있는 약품을 개발하고 있으나, 임상적으로 사용할 때 정상세포의 사멸 내성발현 등 치명적인 부작용을 나타내고 있어 큰 문제점으로 대두되고 있다(1). 이러한 점을 보완하기 위하여 정상세포에 독성이 없고 면역체계를 활성화시킴으로써 암을 정복하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이에 따라 최근에는 각종 천연자원에서부터 새로운 항암성분을 탐색하고 개발하려는 연구보고가 많다.

초석잠은 1년생 풀로서 여름에는 잎이 무성하고, 겨울에는 뿌리가 누에모양을 하고 있어 동충하초와 모양이 비슷하고 약효도 우수하여 식물의 동충하초라고 불리기도 한다. 초석잠은 중국의 중약편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채(長壽菜)로서 옛날부터 애용해 왔다. 일본에서도 정월 요리에 귀하게 쓰이기도 하고 여러 가지 성인병과 만성병 치료에 유용하게 쓰이기도 하였다. 초석잠의 성분중 탄수화물은 감자와 같은 전분이 아니라 올리고당으로 장속의 유익 세균의 생육을 도와 장의 기능을 촉진하기도 한다(10).

초석잠의 효능을 보면 맛이 달며 담백하고 독이 없어 풍을

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, College of Engineering, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea
Tel : +82-51-620-4712, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : bhryu@star.ksu.ac.kr

쫓고 어혈, 적혈을 풀며 기를 내리게 하고 신체의 조화를 이루게 하여 무병장수에 기여한다고 기록되어 있다. 또 사지무력증, 마비증, 전신 골절통, 관절염, 신경통 등을 치유하고 초석잠 즙액으로 눈병을 낫게 하고 간을 좋게 하는 작용이 있어 황달을 낫게 한다. 모든 중독증상에 초석잠이 좋다고 하였고 자양강장에 효과가 있어 허약증이나 감기에 달여 먹으면 기운을 찾게 되고 기침도 멎는다고 하였다(10).

본 연구는 이와같이 많은 효능에도 불구하고 아직까지 항암활성이나 생리활성 물질에 대한 연구가 진행되지 않은 초석잠으로부터 항암 효과에 대하여 실험하였다.

재료 및 방법

재 료

경남 밀양시 산외면에서 직접 재배하여 사용하였다.

초석잠 추출물의 조제

초석잠의 추출은 환류 냉각관을 부착시킨 flask내에 500 g의 시료를 넣고 시료중량의 10배량의 75% 에탄올을 가하여 60°C의 수욕상에서 12시간 동안 2회 반복 추출한 후 감압여과장치로 여과하였다. 여액을 rotary vacuum evaporator (Eyela N-N-series, Japan)를 사용하여 농축하고 이를 동결건조한 후 밀봉하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험 동물

5-6 주령의 수컷, C57 BL/6계 마우스를 대한실험동물센터(충북 음성)에서 구입하여 사용하였다. 온도는 $20 \pm 2^\circ$, 명암 주기가 12시간 단위로 유지하며 고품사료와 물을 충분히 공급하였다. 실험전 마우스를 동일한 조건하에서 사육하여 동물실 환경에서 적응시켰다. 사료는 삼양유지 사료사와 항생제 무첨가 마우스용 펠릿을 공급하였다.

초석잠 추출물의 마우스에 대한 공급

초석잠 추출물 10 mL에 수돗물 100 mL로 희석하여 급수병에 담아 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다(케이지당 5마리). 초석잠 추출물의 공급은 21일 동안 하였으며 총량은 3 g/5마리/21일이 되도록 하였다.

공시세포: 비장으로부터 림프구의 분리는 다음과 같이 시행하였다. 마우스로부터 얻은 비장은 Hanks' balanced salt solution(HBSS, Sigma, St. Louis, Mo)에서 두 장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 림프구를 비장으로부터 유리시켰다. 이 속에 포함된 적혈구는 멸균된 림프구 증류수를 사용하여 hypotonic shock로 제거하며 분리된 림프구는 완전 배지에 부유시켰다. 복강대식세포는 Yoon등(11)의 방법에 따라 분리하였다. 마우스의 복강내에 Brewer's thioglycollate broth(Difco laboratory, detroit, MI) 3 mL를 주사한 3일 후, 1% fetal calf serum(FCS), 10 mM HEPES, 그리고 페니실린(100 µg/mL) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL)이 첨가된 10 mL HBSS(calcium 및 magnesium 무첨가)를 이용하여 복강 삼출 세포를 수집하였다. 이를 RPMI 1640 완전배지에 재부유시켜 37°C에서 3시간 배양한 후 부착되지 않은 세포들을 인산 완

충액으로 세척하여 제거하고 부착세포들은 2.5 mM pyrophosphate와 rubber policeman로 수집하여 복강대식세포로 사용하였다. 암 세포주로는 mouse mammary carcinoma 세포와 mouse leukemia 세포, human histocytic lymphoma를 사용하였다.

정상 면역 세포의 증식에 미치는 초석잠 잎 추출물의 영향 측정

상기에서와 같이 준비한 세포를 flat bottomed 96 well plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 여러 농도의 초석잠 잎 추출물을 가하여 총량이 0.2 mL씩 되도록 조정하고 37°C, 5% CO₂배양기에 넣고 72시간 배양하였다. 이 때 배양세포의 ³H-thymidine(³H-TdR, specific activity: 2.0 Ci/mmol, ICN Biomedicals, High Wycombe, Bucks, England) pulse는 0.5µCi의 ³H-TdR을 각 well에 배양종료 18시간 전에 가하여 실시하고, ³H-TdR incorporation의 측정은 cell harvester로 glass fiber에 세포를 수확한 후 β-counter을 이용하였다.

암세포 및 정상 면역세포에 대한 세포독성 측정

MTT를 이용한 방법을 변형하여 실시하였다(12). MTT를 PBS용액에 5 mg/mL의 농도가 되도록 녹인 다음, 무균 여과하여 4°C의 어두운 곳에 보관하였고, 보관된 지 3주 이내의 것을 검사에 사용하였다. 배양 중인 microplate의 각 well에서 상층의 배지를 조심스럽게 160 µL씩 첨가하였다. 이때 세포를 함유하지 않은 well에도 MTT 희석액을 가해 주었다. 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양한 후 상층의 배지를 제거하여 세포 손실을 막기 위해 약 40 µL 정도는 남겼다. 각 well에 100 µL의 DMSO를 가한 후 실온에서 plate shaker로 약 20-30분간 흔들어 준 다음 ELISA reader (Micro plate EL311)를 사용하여 570 nm 및 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

T림프구 아형

T림프구 아형의 구성비는 phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD4(L3T4) mAb와 FITC conjugated rat anti-mouse CD8(Ly-2)mAb를 이용하고 IL-2 수용체는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD25 mAb를 이용하여 분석하였다.

대식세포에 의한 Nitric Oxide (NO)생산 측정

복강대식세포를 세포배양판에 5×10^5 /mL의 농도가 되도록 재부유하여 IFN-γ (10 U/mL)와 LPS (1 µg/mL)의 자극하에 48시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess[13]반응에 의해 측정하였다. 즉 100 µL의 배양 상층액에 1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride(60% acetic acid) 혼합액 100 µL를 가하여 실온에서 방치하였다. 20분 후 ELISA 판독기 (Bio Tek Instruments Inc, model EL311 SL)를 사용하여 800 µg/mL의 유지 농도에서 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tumor necrosis factor의 역가 측정

Tumor necrosis factor(TNF)의 측정은 ELISA kit(Genzyme, Boston, MA)를 사용하여 시행하였다. 즉 24시간 동안 항 TNF 항체를 96well plate에 부착시킨 뒤 세척하고 여기에 검체 100 µL를 넣고 1시간 동안 96 well plate에서 반응시켰다.

Table 1. Effects of *Stachys Sieboldii* extract on the proliferation of spleen cells and cancer cells

<i>Stachys Sieboldii</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CPM*			
	Spleen cells	FM3A/S ^b	P388/S ^c	U937/S ^d
0	3081	6769	6564	6790
250	100,134	5230	4401	4875
500	100,360	3890	3843	2330
1000	3864	1060	1034	979

Mouse spleen cells($2 \times 10^6/\text{mL}$) and FM3A/S^b, P388/S^c, U937/S^d ($1 \times 10^4/\text{mL}$) were cultured with various concentrations of *Stachys Sieboldii* extracts for 48 hr in a 5% CO₂ environments, and pulsed with ³H-TdR(0.5 uCi/well) for the last 16 hrs. *Count per minute.

Table 2. Effect of *Stachys Sieboldii* extract on Splenocytes Viability

<i>Stachys Sieboldii</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Viability(%)		
	FM3A/S ^b	P388/S ^c	U937/S ^d
0	46.8	46.6	47.2
100	52.8	50.9	53.8
250	48.6	48.7	50.7
500	51.4	46.0	50.2
1000	43.9	40.4	46.3

Splenocytes($2 \times 10^6/\text{mL}$) were cultured with various concentrations of *Stachys Sieboldii* for 48h in a 5% CO₂ incubator. Viable cells were counted in a hemacytometer by trypan blue dye exclusion. Viability of splenocytes at culture initiation is 96%.

Tween 20이 10%가 되게 첨가된 인산완충액(PBS)으로 세척 후 90분 동안 항 TNF 단세포균 항체와 반응시켰다. 이를 세척한 후 60분 동안 peroxidase가 결합된 항 IgG 항체를 반응시키고 다시 세척한 다음 orthophenylene diamine용액을 15분간 반응시켰다. 0.5 N HCl용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 TNF용액을 3200, 1600, 800, 400, 200, 100 및 50 pg/mL의 농도로 조절하여 함께 측정하고 표준용액에서 측정된 흡광도를 근거로 polynomial standard regression curve를 작성하고 작성된 곡선 방정식을 기준으로 검체내에 포함된 TNF의 양을 구하였다(14).

대식세포의 탐식능 측정

복강대식세포의 탐식능은 fluorescent microbead를 이용하여 flow cytometer로 측정하였다(15).

흑색종 세포(B16F10)의 폐전이 실험

본 실험에 공시한 암세포주는 B16F10 마우스 흑색종 세포(Tumor Repository of the National Cancer Institute, Bethesda, MD)로서 10% 우태이혈청, sodium pyruvate, nonessential amino acids 및 L-glutamine이 함유된 RPMI1640 배지에 유지하였다. 암세포의 준비는 대수증식기의 암세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액으로 수집하여 2회 수세하여 PBS를 농도를 조정하였다. B16F10 세포(2×10^5)를 마우스 미정맥을 통하여 주사한 후 14일째에 폐를 제거하여 흑색종의 수를 관찰하여 산정하였다(16).

결과 및 고찰

초석잠 추출물이 세포증식에 미치는 영향

비장 세포 및 암세포를 배양하면서 배양초기에 초석잠 추출물을 첨가한 후 각 세포의 증식양상을 산정한 결과 Table 1과 같았다. 초석잠 추출물의 농도 증가에 따라 증식능이 비장세포의 경우 현저하게 증가하였으나 암 세포주에서는 그

증식능이 다소 억제됨을 알 수 있었다. 초석잠의 알코올 추출물이 각종 암세포에 의하여 저지작용을 가질 수 있음을 나타내었으며, 아울러 생체의 면역계가 다른 생체기관들과 상호 유기적으로 연관되어 있음을 고려할 때 초석잠 추출물이 면역반응 조절자(immuno response modifier)로서의 작용 가능성도 고려된다(15). Table 2에서 초석잠 추출물이 림프구의 증식반응에 미치는 영향을 살펴 본 결과 비장세포의 증식이 어느 정도 항진되었다. 이는 초석잠 추출물이 T 또는 B 세포를 선택적으로 증식시키는 polyclonal activity로서 작용할 수 있음을 증명한다고 하겠다. 따라서 초석잠 추출물이 T 또는 B 세포에 대한 선택적 polyclonal activity로서 활성화에 대하여는 T 또는 B 세포를 순수 분리하여 증식반응을 측정하든지 초석잠 추출물의 생체내 및 시험관내 효과를 Thy-1, 2 및 막 IgM을 비롯한 T 또는 B 세포특이 분자에 대한 단클론 항체를 이용한 flow cytometric analysis 실시함이 보다 분명하게 구명되리라 사료된다(15). 또한, 초석잠 추출물을 비장세포 배양초기에 첨가하고 48시간에 세포 생존율을 검사한 결과 Table 2와 같이 직접적인 세포 독성활성(direct cytotoxic activity)을 관찰할 수 없었다. 또한 마우스 lymphoma cell의 증식반응은 억제되었는데 이러한 차이는 trypan blue dye exclusion에 의한 세포 생존검사로 확인한 결과 Table 2에서 나타낸 바와 같이 초석잠 추출물이 각 세포에 대한 직접적인 세포 독성의 차이에 기인하지는 않는 것으로 생각된다.

초석잠 및 추출물 투여가 T세포아군의 변화에 미치는 영향

정상 대조군에 비하여 초석잠 및 추출물 급식군의 경우에 CD4⁺ T세포 및 CD8⁺ T세포의 비율이 증가하였다. 그러나 CD4⁺/CD8⁺ 비는 대조군 4.3에 비하여 초석잠 추출물은 4.7로 양군간의 차이를 관찰할 수 없었다(Table 3). 초석잠 추출물을 마우스에 투여한 후 비장세포의 T 세포아형의 변화에서는 helper T(CD4⁺) 세포 및 suppressor T(CD8⁺) 세포의 증가는 보였으나 CD4⁺/CD8⁺ T 세포의 비는 변하지 않았으므로, 생체내에서도 면역계를 활성화시킬 수 있음을 보여주는 결과로 생각된다.

Table 3. Effect of *Stachys Sieboldii* feeding on T cell subsets of spleen in mice

	Percent of single positive cells		
	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (L3T4 ⁺)	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (Lyt2 ⁺)	Ratio of CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Normal control	20.4	5.5	4.3
<i>Stachys Sieboldii</i> -fed	30.2	7.4	4.7

Spleen cells were stained with FITC-anti Lyt2 mAb and phycoerythrin-anti L3T4 mAb. Dual parameter direct immunofluorescence of CD4 and CD8 cells were analyzed by flow cytometry. *Stachys Sieboldii* feeding protocols are described in the Materials and Methods. Data are from a representative experiment of three.

Table 4. Nitrite production from normal mice peritoneal macrophages

Stimuli ^{a)}	NO ₂ ⁻ concentration (uM)
Media only	12±0.4
<i>Stachys Sieboldii</i>	28±0.6
LPS+γ-IFN	38±0.3
LPS+γ-IFN+ <i>Stachys Sieboldii</i>	37.3±0.4

Macrophage were incubated for 48 hrs with the reagents indicated. NO₂⁻ concentration was determined spectrophotometrically at 570 nm after reaction with an equal volume of the culture suspensions(100 uL) and Griess reagent at room temperature for 10 minutes. Each value in the table represents the mean±SD of three cultures. ^{a)} The concentration used were γ-IFN 10 U/mL, LPS 1 μg/mL, *Stachys Sieboldii* solution 500 μg/mL.

Table 5. Nitrite production from peritoneal macrophages stimulated with various concentration of *Stachys Sieboldii* extract

<i>S. sieboldii</i> (μg/mL)	NO ₂ ⁻ concentration(uM)
0	4.57±0.3
50	12.4±0.2
250	16.0±0.1
500	22.0±0.2
1000	17.0±0.2

Macrophages were incubated for 37°C for 48 hrs with the *Stachys Sieboldii* concentrations indicated. NO₂⁻ concentration was determined spectrophotometrically at 540 nm after reaction with an equal volume of the culture supernatants(100 μL) and Griess reagent at room temperature for 10 min. Each value in the Table represents the mean±SD of three cultures.

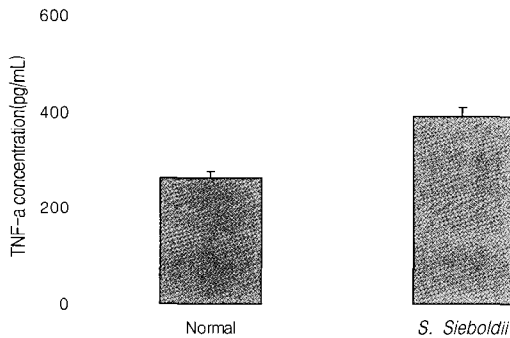


Figure 1. Effect of *Stachys sieboldii* solution feeding on TNF-α production in mice. *Stachys Sieboldii* group of mice intaked *Stachys sieboldii* extracts solution in tap water (3 g/200 mL/5 mice) for 21 days. All groups of mice were bled by heart puncture. Sera were prepared and assayed for TNF-α by ELISA reader. TNF-α concentrations were 262 pg/mL (Normal control) and 443 pg/mL (*Stachys Sieboldii* solution group). *p<0.05.

초석잠 추출물이 복강대식세포의 NO 및 TNF-α 생산에 미치는 영향

복강 대식세포로부터의 NO 및 TNF-α의 생산능에 미치는 초석잠 추출물의 영향을 측정한 결과 Table 4와 같다. 초석잠 추출물은 NO 생산을 약간 자극함을 알 수 있었으며 TNF-α 생산도 어느 정도 항진시킬 수 있음을 관찰할 수 있었다 (Figure 1). 탐식기능이 있는 단핵 탐식세포계 세포를 활성화시킬 수 있는 세포가 생산하는 림포카인들의 자극을 받으면 탐식세포는 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 반응성 산소중간물질(reactive oxygen intermediate : ROI)이나 NO와 같은 반응성 질소중간물질(reactive nitrogen intermediate: RNI)을 생성하여 탐식한 세포내 미생물을 사멸시키거나 증식을 억제한다(5,10). NO는 산화를 통하여 효소의 작용을 조절하고 혈소판의 기능과 신경전달기능 및 림프구 증식을 변화시켜 암세포와 미생물에 대한 대식세포의 세포독성을 매개한

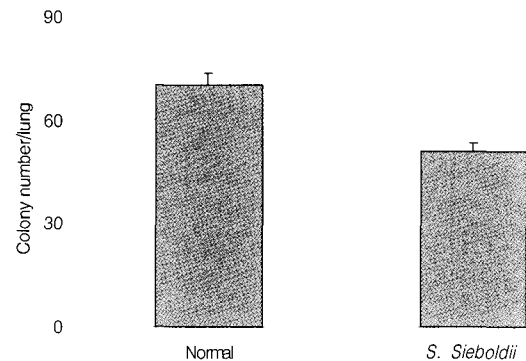


Figure 2. Inhibition of lung colonization by *Stachys Sieboldii* group of mice fed *Stachys Sieboldii* for 21 days. All groups of mice were injected intravenously with 2×10⁵ B16F10 melanoma cells on day. Lungs were removed on day 21, and the number of surface colonies was counted.

다. 또한, NO 생산에 대한 초석잠 잎 추출물의 약량반응곡선을 알아 본 바 지적 자극농도는 250 μg/mL이었다(Table 5). 또한 TNF-α는 활성화된 대식세포로부터 생산되는 물질로서 특정 암 세포주에 대한 세포 독성과 항바이러스 작용이 있고 급성 및 만성 염증 질환에서 일어나는 생체반응에도 중요한 역할을 하는 사이토카인이다(17).

초석잠 잎 추출물이 암세포의 폐전이에 미치는 영향

초석잠 추출물 급식군에서 대조군에 비하여 B16F10 세포의 폐전이는 숫적으로 감소하였으며 전이된 암세포 집락의 크기도 초석잠 추출물 급식군에서 현저하게 작아 초석잠 추출물이 암세포의 전이 뿐만 아니라 일단 전이된 암세포의 증식도 억제함을 알 수 있었다(Figure 2). 이는 T 세포에 의한 IL-2 및 IFN-γ 그리고 본 실험 결과 항진되었던 TNF-α와 NO 외에도 복강대식 세포로부터의 IL-12, IL-15 등의 생산을

항진시켜 이에 의한 대식세포를 비롯한 면역계의 효과 세포들의 기능이 항진된 결과로 생각된다(18). 본 연구 결과 초석잠 추출물을 이용한 항암제 또는 면역기능의 강화를 위한 면역반응 보조제로서의 개발 가능성이 기대되며 이를 기본 자료로 하여 이러한 기작들에 관한 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이다.

요 약

초석잠의 항암효과 및 면역조절자로서의 기능을 알아보기 위하여 마우스를 이용하여 실험한 결과, 마우스 비장세포의 증식반응은 항진시켰으나 YAC-1 세포주의 증식능은 억제시켰다. CD4⁺ T세포 및 CD8⁺ T세포의 비율이 정상대조군 마우스의 그것에 비하여 증가하였으나 CD4⁺/CD8⁺ 비는 차이가 없었으며 비장세포에서 IL-2수용체의 발현이 항진되었다. 또한, 복강대식세포로부터의 nitric oxide와 TNF- α 생산을 항진시켰으며, 복강대식세포는 탐식능이 현저하게 항진되었고 B16F10 흑색종의 폐전이 억제됨을 알 수 있었다. 따라서, 초석잠의 항암제 및 면역반응 조절자로서의 개발 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 농림부 농림기술 관리센터의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Hebert, J. R., J. Barone., M. M. Reddy, and J. C. Backlund (1990) Natural killer cell activity in dietary fat intervention trial. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **54**, 103-116.
2. Goldin, A., I. Kline, Z. P. Sofina, and A. B. Syrkin (1980), Experimental evaluation of antitumor drugs in the USA and USSR clinical correlation. NIH. 33~44.
3. Miturka, B. M. (1981), Clinical biochemical and hematological reference values in experimental animals and humans. Massion, N. Y., p.31.
4. Kamiya, H., Y. Endo, K. Muramoto, N. A. Uchida, and U. Raj (1987) Antitumor activity of the macromolecular fraction from a Fijan tunicate *Didemnum varians*. *Nippon Suisan Gokkaishi* **53**, 493-504.
5. Sasaki, T., N. A. Uchida, N. Takasuka, Y. Tachihana, K. Nakamich. Y. Endo, and H. Kamiya (1987) Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Nippon Suisan Gokkaishi* **53**, 267-273.
6. Ryu, B. H., D. S. Kim, and D. B. Sin (1989) Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**, 595-603.
7. King, C. Y., M. J. Shim, E. C. Choi, Y. N. Lee, and B. K. Kim (1981) Studies on antitumor components of Korean Basidiomycetes. Mycelial culture and antitumor components of *Ganoderma lucidum*, *Kor. Biochem. J.* **14**, 100-109.
8. Kim, B. K., E. K. Park, and M. J. Shim (1979) Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXIV), Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (lex Fr.) Qule. *Pleurotus ostreatus* (Fr.) kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145-151.
9. Park, D. W., M. J. Shim, and B. K. Kim (1979) Studies on constituents of higher fungi of Korea (XVII). Production of antineoplastic components by the submerged culture of *Lentinus edodes*, *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **4**, 199-210
10. Yamahara, G. (1990) Studies on the *Stachys sieboldii* *MIQ, Med, Mega*, **110**, 932-935.
11. Yoon, H. L., K. P. Singh, S. Ratner, and J. J. Reiners Jr. (1996) Phorbol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic T cell activities of SSIN mice : a strain deficient in CD8⁺ T cells. *Carcinogenesis* **17**, 2617-2624.
12. Yoon, H. L., C. B. Marcus, and R. W. Pfeifer (1993) Infection of superoxide by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetone and Tapsigargin, a non-phorbol ester-type tumor promoter, in peritoneal macrophages elicited from SENCAR and B6C3F1 mice:A permissive role for the arachidonic acid cascade in signal transduction. *Mol. Carcinog* **7**, 116-125.
13. Griess, L. C., D. A. Wagner., J. Glogowski., P. L. Skipper., J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum (1982) Analysis of nitrite, nitrite and 15N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
14. Webb, G. C. and D. D. Haplin. (1990) Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J. Immunol.* **145**, 1278-1285.
15. Klein, J. (1990) *Immunology*. pp1-16, Blackwell Scientific Publications, New York
16. Higuchi, M. M., N. Higashi, H. Taki, and T. Osawa (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages: Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425.
17. Haberhausen, G., J. Pinsh, C. C. Kuhn, and C. M. Hahn (1998) Compatative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 628-633.
18. Lee, S. Y., C. D. Jun, K. I. Park, and H. T. Chung (1996) Inhibition of phagocytic activity by nitrite oxide in murine peritoneal macrophages. *Kor. J. Immunol.* **18**, 625-634.
19. Segal, A. W. (1989) The Electron transfer chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* **83**, 1785-1793.