

인삼양영탕이 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 영향

은재순* · 김대근 · 최 훈¹ · 오찬호²

우석대학교 약학과, 1: 우석대학교 한약학과, 2: 우석대학교 생물공학과

Effect of Insamyangyoung-tang on the Specific Immune Response in BALB/c Mice

Jae Soon Eun*, Dae Keun Kim, Hoon Choi¹, Chan Ho Oh²

Department of Pharmacy, 1: Department of Oriental Pharmacy, 2: Department of Biotechnology, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the effects of Insamyangyoung-tang water extract (IYT) on the specific immune response in BALB/c mice. When IYT (500mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days to BALB/c mice, the cell viability of thymocytes and splenocytes was increased. Also, IYT increased the population of CD4⁺ cells in thymocytes and the population of Thy1⁺ cells and CD4⁺ cells in splenocytes. In addition, IYT increased the production of γ -interferon and interleukin-2 from thymocytes and the production of γ -interferon from splenocytes. These results suggest that IYT enhances the specific immune response via activation of Th1 cells in thymocytes and splenocytes.

Key words : Insamyangyoung-tang(人蔘養榮湯), thymocyte, splenocyte, subpopulation, cytokine

서 론

人蔘養榮湯은 『太平惠民和劑局方』에 수록된 처방으로 養은 기르다, 봉양한다는 補한다는 뜻이고, 榮은 純화롭다, 번영한다는 뜻이 있지만 여기서는 營의 의미로 사용되었다. 營은 水穀之精氣이며, 營舍의 뜻이 있으며, 血氣가 所在하는 곳을 가리킨다. 때문에 본 방은 榮血의 부족을 養하는 처방으로 積勞虛損으로 四肢沈滯, 氣息短促, 行動喘啜, 少腹拘急, 腰背強痛, 心虛驚悸, 咽乾脣燥, 飲食無味, 隱陽衰弱, 心憂慘悽, 長期臥床하고, 점차 야위어 五臟의 氣도 竭하여 회복하기 어려운 사람을 치료하는데 사용된다. 처방 약재 중 人蔘, 黃芪, 五味子는 補肺하여 氣로 하여금 生血하게 하고, 甘草, 陳皮, 白朮은 健脾하여 充血하게 하며, 當歸, 白芍藥은 養肝하여 藏血하게 하고, 熟地黃은 滋腎하여 腎精으로 하여금 血을 生하게 하며, 黃芪, 防風은 固表하고, 陳皮, 生薑은 通痰하고, 五味子는 補肺潤津하고, 肉桂는 溫散하고 諸藥을 能導하여 入營生血하게 하며, 大棗는 補營하고, 甘草는 和諸藥하며, 遠志는 腎氣를 能通하여 心에 上達하게 함으로써, 養營의 功效가 있다¹⁾. 인삼양영탕은 종양세포에 대한 직접

적인 세포독성을 나타내고, NK세포와 립프구를 자극하여 면역 기능을 증강시키는 작용이 있으며²⁾, 인삼양영탕에 녹용을 첨가하여 사용하면 면역능을 증강시켜 항암제인 cisplatin에 의한 독성을 경감시킬 수 있다는 보고³⁾들이 있지만 아직도 면역능에 대한 자세한 조절작용의 기전은 규명되지 않았다. 면역반응은 T 및 B-lymphocyte가 관련된 특이적면역 (specific immunity)과 macrophage가 관련된 비특이적면역 (non-specific immunity)으로 분류한다. 본 실험에서는 인삼양영탕이 생쥐의 면역능에 미치는 영향을 관찰하고자, 특이적 면역반응을 주도하는 thymocyte 및 splenocyte의 proliferation, subpopulation 및 cytokine 분비에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷 6주령을 대한 실험동물에서 구입하여, 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, dark/light 12시간의 조건하에서 1주일 이상 실험실에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였다.

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학
E-mail : jseun@core.woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1569
· 접수: 2002/06/03 · 수정: 2001/07/15 · 채택 : 2002/08/02

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, 055:B5), γ -interferon (γ -IFN, Hu γ -IFN), MTT는 Sigma Co., mouse γ -IFN immunoassay kit, mouse IL-2 immunoassay kit, mouse IL-4 immunoassay kit는 R&D Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon seiyaku Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), Microplate-Reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 인삼양영탕의 처방은 方藥合編¹⁾에 준하였으며, 약재는 우석대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 인삼양영탕 3첩을 종류수 1,000 ml로 3 시간 동안 2회 가열 추출한 후, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 28.5 g을 얻어(이하 IYT라 칭함), 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

Table 1. Prescription of Insamyangyoung-tang

韓藥名	生 藥 名	重 量 (g)
白芍藥	Paeoniae Radix	8
當 歸	Angelicae gigantis Radix	4
人 麥	Ginseng Radix Alba	4
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4
黃 茯(蜜灸)	Astragali Radix	4
肉 桂	Cinnamomi Cortex Spissus	4
陳 皮	Aurantii nobilis Pericarpium	4
甘 草(炙)	Glycyrrhizae Radix	4
熟地黃	Rehmanniae Radix Vapratum	3
五味子	Schizandrae Fructus	3
防 風	Ledebouriellae Radix	3
遠 志	Polygalae Radix	2
生 薑	Zingiberis Rhizoma	2
大 薑	Zizyphi Fructus	2
Total		51

4. Thymocytes 및 splenocytes의 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Wysocki⁴⁾ 및 Mizel⁵⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 IYT 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 적출한 혈액 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멀균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), thymocytes 및 splenocytes 부유액으로 하였다. 생쥐 thymocytes 및 splenocytes는 RPMI 1640 배

지를 사용하였으며, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

5. 증식능 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 IYT의 영향은 MTT법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann⁶⁾이 개발하여 Kotnik 등⁷⁾이 변형시킨 방법으로, 96-well plate의 각 well에 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 96-well plate에 1 \times 10⁷ cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes는 concanavalin A(Con A) 1 μ g/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO₂ incubator에서 48시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 μ l를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

6. Subpopulation 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다⁸⁾.

7. Cytokines 측정

동일한 방법으로 분리한 thymocytes 및 splenocytes를 2 \times 10⁷ cells/ml로 조제하여 96 well plate에 200 μ l 씩 분주한 후, 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 원심분리 (2,500rpm, 2분, 4°C) 한 다음, 상등액 50 μ l를 취하여 mouse immunoassay kit를 이용하여 cytokines를 측정하였다. 즉 sample 50 μ l에 assay diluent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 2 시간 동안 incubation한 후 4회 세척하였다. 세척 후 anti-mouse cytokines conjugated concentrate 100 μ l를 가하여 실온에서 2 시간 incubation한 후, 5회 세척하고 substrate solution 100 μ l를 혼합하여 30분 동안 실온에서 배양하였다. Stop solution 100 μ l를 가하여 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후, 미리 작성한 검량선에 의해 cytokines의 양을 환산하였다.

8. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean \pm SE로 나타내었고 통계처리는 student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Thymocyte의 증식에 미치는 효과

대조군의 thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A (Con A)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 $126.5 \pm 2.1\%$ 로 증가하였으며, IYT를 투여하고 분리한 thymocytes에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 $109.7 \pm 2.3\%$ 로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 $137.8 \pm 2.7\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다(Table 1).

Table 1. Effect of the administration of Insamyangyoung-tang water extract (IYT) on the viability of thymocytes in BALB/c mice

Samples	Cell viability (%)	
	Con A (-)	Con A (+)
Control	100.0 ± 2.5	126.5 ± 2.1
IYT	$109.7 \pm 2.3^*$	$137.8 \pm 2.7^*$

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with concanavalin A, an activating mitogen. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p<0.05$). Con A (-): Concanavalin A non-treated group, Con A (+): Concanavalin A treated group

2. Splenocyte의 증식에 미치는 효과

대조군의 splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 $123.4 \pm 2.6\%$ 로 증가하였으며, IYT를 투여하고 분리한 splenocytes에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 $113.5 \pm 2.2\%$ 로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 $141.2 \pm 2.9\%$ 로 대조군에 비해 증가하였다(Table 2).

Table 2. Effect of the administration of IYT on the viability of splenocytes in BALB/c mice

Samples	Cell viability (%)	
	LPS (-)	LPS (+)
Control	100.0 ± 2.4	123.4 ± 2.6
IYT	$113.5 \pm 2.2^*$	$141.2 \pm 2.9^*$

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with lipopolysaccharide, an activating mitogen. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p<0.01$). LPS (-): Lipopolysaccharide non-treated group, LPS (+): Lipopolysaccharide treated group

3. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4⁺) 세포는 $12.2 \pm 0.4\%$ 이었으며, CD8 single positive (CD8⁺) 세포는 $3.4 \pm 0.2\%$ 이었다. IYT를 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4⁺ 세포는 $14.5 \pm 0.6\%$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, CD8⁺ 세포는 $3.0 \pm 0.3\%$ 로 대조군과 별 차이가 없었다(Table 3).

4. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220 positive 세포 (B220⁺)는 $29.5 \pm 2.3\%$ 이었으며, Thy1 positive 세포 (Thy1⁺) 세포는 $18.5 \pm 1.5\%$ 이었다. IYT를 투여하고 분리한 생쥐 splenocytes 중 B220⁺ 세포는 $27.6 \pm 2.4\%$ 로 Thy1⁺ 세포는 $24.4 \pm 1.4\%$ 로 대조군에 비해

Thy1⁺ 세포의 population이 증가하였다. Splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4⁺ 세포는 $13.6 \pm 1.2\%$, CD8⁺ 세포는 $4.2 \pm 0.4\%$ 이었으나, IYT를 투여하고 분리한 생쥐 splenic T-lymphocytes 중 CD4⁺ 세포는 $17.5 \pm 1.5\%$ 로, CD8⁺ 세포는 $3.9 \pm 0.3\%$ 로 CD4⁺ 세포의 population이 대조군에 비해 증가되었다(Table 4).

Table 3. Effect of the administration of IYT on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Thymocytes Subpopulation (%)	
	CD4 ⁺ CD8 ⁻ cell	CD4 ⁺ CD8 ⁺ cell
Control	12.2 ± 0.4	3.4 ± 0.2
IYT	$14.5 \pm 0.6^*$	3.0 ± 0.3

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p<0.05$).

Table 4. Effect of the administration of IYT on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Splenocytes Subpopulation (%)		
	B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻
Control	29.5 ± 2.3	18.5 ± 1.5	13.6 ± 1.2
IYT	27.6 ± 2.4	$24.4 \pm 1.4^*$	$17.5 \pm 1.5^*$

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p<0.05$).

5. Thymocytes의 cytokines 분비에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 γ -interferon의 양은 522.3 ± 13.2 pg/ml 이었으며 IYT를 투여한 군은 597.3 ± 12.5 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였으며, interleukin-2의 양은 대조군에서 202.7 ± 11.6 pg/ml 이었으나, IYT를 투여한 군은 267.5 ± 12.7 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 79.8 ± 8.9 pg/ml 이었으며 IYT를 투여한 군은 88.3 ± 7.9 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 5).

Table 5. Effect of the administration of IYT on the production of cytokines from murine thymocytes

Samples	Cytokines (pg/ml)		
	γ -interferon	interleukin-2	Interleukin-4
Control	522.3 ± 13.2	202.7 ± 11.6	79.8 ± 8.9
IYT	$597.3 \pm 12.5^*$	$267.5 \pm 12.7^*$	88.3 ± 7.9

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 hours in CO₂-incubator. The production of cytokines was determined with ELISA kit. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p<0.05$).

6. Splenocytes의 cytokines 분비에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 γ -interferon의 양은 321.9 ± 10.8 pg/ml 이었으며 IYT를 투여한 군은 397.3 ± 11.2 pg/ml로 대조군에 비해 증가하였다. Interleukin-2의 양은 대조군에서 385.4 ± 12.8 pg/ml 이었으나, IYT를 투여한 군은 365.4 ± 11.7 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다. Interleukin-4의 양은 대조군에서 145.2 ± 8.9 pg/ml 이었으며 IYT를 투여한 군은 135.8 ± 8.5 pg/ml로 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 6).

Table 6. Effect of the administration of IYT on the production of cytokines from murine splenocytes

Samples	Cytokines (pg/ml)		
	γ -Interferon	Interleukin-2	Interleukin-4
Control	321.9±10.8	385.4±12.8	145.2±8.9
IYT	397.3±11.2*	365.4±11.7	135.8±8.5

IYT (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days, and the separated splenocytes (2×10^7 cells/ml) were cultured for 72 hours in CO₂-incubator. The production of cytokines was determined with ELISA kit. The data represents the mean±SE of 5 mice. *: Significantly different from control group (p<0.05).

고찰

본 실험에서는 생쥐의 특이적 면역반응에 미치는 IYT의 영향을 관찰하기 위해, 생쥐에 IYT를 경구로 투여하고 thymocyte 및 splenocyte의 면역반응에 대한 변화를 관찰하였다. IYT를 투여하고 분리한 thymocytes의 생존율은 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 증가하였으며, splenocytes의 세포생존율도 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 대조군에 비해 증가되었다. 이는 IYT가 생체에 투여되었을 때 thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율을 증가시킴으로써, 생체의 세포성 면역능을 증강시킬 수 있음을 시사하는 것이다. Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (Th) 및 cytotoxic T lymphocyte (Tc)로 분화되며, 분화된 Th1 cell은 γ -interferon (γ -IFN) 및 interleukin-2 (IL-2)를, Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine을 분비하여 다른 T 세포, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다⁹. 대조군의 thymocytes 중 Th (CD4 single positive cell) 세포는 12.2%, Tc (CD8 single positive cell) 세포는 3.4%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4⁺CD8⁻ cells은 약 12%, CD4⁺CD8⁺ cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며¹⁰, IYT 투여시 CD4⁺ 세포는 14.5%로 대조군에 비해 증가하였다. 대조군의 splenocytes 중 B220⁺ 세포는 29.5%, Thy1⁺ 세포는 18.5% 이었으나, IYT를 투여하였을 때는 B220⁺ 세포는 27.6%, Thy1⁺ 세포는 24.4%로 Thy1⁺ 세포의 population이 대조군에 비해 증가되었다. 대조군의 splenic T-lymphocytes 중 CD4⁺CD8⁻ 세포는 13.6%, CD4⁺CD8⁺ 세포는 4.2% 이었으나, IYT를 투여하였을 때 CD4⁺CD8⁻ 세포는 17.5%, CD4⁺CD8⁺ 세포는 3.9%로 CD4⁺CD8⁻ 세포의 population이 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 IYT가 thymocytes의 Th 세포의 population을 증가시키고, splenocytes의 Thy1⁺ 세포 중 Th 세포의 population을 증가시켜 면역능을 증강시킬 수 있음을 의미하는 것이다. Th 세포는 Th1 및 Th2 세포로 분화되어 다양한 cytokine들을 분비하기 때문에 IYT가 Th 세포 중 어느 쪽을 활성화하는지를 관찰하기 위해, Th1 세포에서 분비되는 γ -IFN과 IL-2, Th2 세포에서 분비되는 IL-4의 양을 측정하였다. IYT 투여시 thymocytes에서 γ -IFN 및 IL-2의 양은 대조군에 비해 증가하였으나, IL-4의 양은 대조군과 별 차이가 없었으며, splenocytes에서는 γ -IFN의 양은

대조군에 비해 증가하였으나, IL-2 및 IL-4의 양은 대조군에 비해 별 차이가 없었다. Th1 세포에서 분비되는 γ -IFN은 대식세포를 활성화하여 살균력을 증강시키고 숙주반응을 조절하는 것으로 알려져 있다¹¹. 따라서 IYT가 thymocytes 및 splenocytes의 helper T 세포 중 Th1 세포를 활성화하여 γ -IFN의 분비를 촉진하였다는 결과는 IYT가 macrophage를 활성화하여 비특이적 면역반응도 증강시켜 염증을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

결론

인삼양영탕 (IYT)은 생쥐에 경구로 투여되었을 때, thymocytes 및 splenocytes의 세포생존율을 증가시키고, helper T 세포 중 Th1 세포를 활성화하여 특이적 면역반응을 증가시킬 수 있는 탕제라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구됨.

참고문헌

- 申載鏞: 方藥合編解說, 成輔社, 韓國, p.42, 1988.
- Ha, Jee-Yong and Jo Sung-Yeon: Experimental studies on anti-tumor and immunomodulatory effects of Insamyangyoung-tang. Kor. J. Oriental Medical Pathology, 12(1), 60-71, 1998.
- 金甫燮: 人蔘養榮湯鹿茸과 鹿茸이 cisplatin으로 誘發된 白鼠의 腎毒性 및 免疫細胞減少에 미치는 影響. 慶熙大學校 韓醫科大學 碩士學位論文, 2001.
- Wysocki, L.J. and Sato, V.L.: Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844-2848, 1978.
- 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, 1497-1503, 1979.
- Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65, 55-63, 1983.
- Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr.: A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods, 129, 23-30, 1990.
- Suda, T. and Nagata, S.: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994.
- Miceli, M.C. and Parnes, J.R.: The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. Advances in Immunology, 53, 59, 1993.

10. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S.: Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A. 1994.
11. Janeway, C.A., Travers, P. and Walport, M.: The immune system in health and disease. 4ed, Garland, p.296-299, 1999.