

산수유의 면역조절작용

이원범 · 정한솔 · 권진¹ · 오찬호² · 이광규*

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 군장대학 보건행정과, 2: 우석대학교 생명공학부

Immunoregulatory Action of Cornus officinalis Sieb.et Zucc

Won Bum Lee, Han Sol Jung, Jin Kwon¹, Chan Ho Oh², Kwang Gyu Lee*

Department of Pathology, College of Oriental medicine, Woosuk University,

1: Department of Health Administration, Kunjang College, 2: Division of Biotechnology, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the immunoregulatory effect, apoptosis of L1210 leukemia cells of *Cornus officinalis* Sieb.et Zucc. The proliferation of cultured splenocytes and thymocytes were enhanced by the addition of SSY. Splenic, thymic and mesenteric lymph node-T lymphocytes, especially TH cells was significantly increased in SSY-administered (p.o. for 7 days) mice. SSY treatment induced the apoptosis of L1210 mouse leukemia cells. In addition, SSY accelerated the phagocytic activity and nitric oxide production in peritoneal macrophages. These results suggest that SSY have an immuno-regulatory property and anti-cancer effect.

Key words : *Cornus officinalis* Sieb.et Zucc., splenocyte, thymocyte, lymph node cell, macrophage.

서론

산수유는 층층나무과의 Cornaceae에 속하는 낙엽교목으로 열매에 malic acid, tartaric acid가 함유되어 산미가 있고 gallic acid 등이 있어 짙은 맛과 loganin, sweroside 등 고미(苦味)를 나타내는 성분이 함유되어 있다. 과육연질부에는 morroniside, ursolic acid, cornin, saponin 등과 vitamin A도 들어 있다. 잎에는 flavonoid가 있고 종자에는 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid가 함유되어 있다. 과피가 붉은색으로 변하면 채취해서 약간 삶아 핵인을 제거하고 건조시킨 열매는 동의보감에 의하면 보신장양(補身壯陽), 신장요계통 및 당뇨, 고혈압, 관절염, 어린이 오줌싸개, 사은 땀을 흘리거나 손발이 잘 때나 월경과다조절 등의 부인병 등 각종 성인병에 면역기능을 강화시켜 장기복용하면 큰 효과를 보는 것으로 알려져 있으며, 또한 in vitro 실험에서 복수암세포를 억제한다는 보고도 있다¹⁻⁴⁾. 본 실험에서는 이러한 산수유의 특히 면역계에 미치는 영향을 살펴보고자 비장 및 흉선세포의 증식능, subpopulation change, L1210세포의 apoptosis, 복강 대식세포의 탐식능, 및 복강 대식세포에서의 NO생성 등을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 동물

* 교신저자 : 이광규, 전북 삼례읍 후정리 491, 우석대학교 한의과대학
E-mail : kwang1@core.woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1562
· 접수: 2002/01/29 · 수정: 2002/03/06 · 채택: 2002/03/23

생쥐는 BALB/c계통 음성(8주령, 20±2 g)을 대한실험동물(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2℃, 습도 55±5%, dark/light(12 시간)조건 하에서 고품질 pellet사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), lucigenin, zymosan, LPS, γ-IFN 등은 Sigma Co., thioglycolate는 Difco Co., PE conjugated anti-CD4, FITC conjugated anti-CD8, PE-anti B220, FITC-anti Thy 1 antibody 등은 Caltag Co., 기타 특급시약을 사용하였다. 실험기구는 culture flask(Nunc), 96well microtiter plate(Costar Co.), inverted microscope(Zeiss), ELISA reader(Dynatech, MR5000), luminometer (Berthold, 96LP), flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), centrifuge (VS-15000CF), CO₂ incubator, freeze dryer(Vision Scientific Co.)등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

산수유는 시중 건재상에서 구입하여 정선해서 사용하였으며, 열매 500 g을 증류수 2000 ml로 3시간씩 2회 가열 추출한 후, 여과한 여액을 rotary evaporator로 농축하고, freeze dryer로 동결건조하여 분말 51 g을 얻어(이하 SSY라 함) 실험에 사용하였다.

4. 흥선 및 비장세포의 증식반응 측정

생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흥선을 무균적으로 적출하고 각각의 세포를 세정(×3회, DPBS, 1500rpm, 10분)해서 비장 및 흥선세포 부유액을 무균 조제한 후, 1×10^6 cells/well이 되도록 세포수를 조정한다. 비장세포 부유액에는 LPS(5 μ g/ml), 흥선세포 부유액에는 Con A(0.5 μ g/ml)와 각 농도(0.1, 1, 및 10 μ g/ml)의 SSY를 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO₂배양기(5%-CO₂, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100 μ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다⁵⁾.

5. 흥선세포, 비장세포 및 장간막 림프절세포의 아집단(Subpopulation) 측정

생쥐에 7 일 동안 SSY(500 mg/kg body weight)를 경구 투여(p.o)한 다음 생쥐를 경추 탈구시켜 비장과 흥선 및 장간막 림프절을 무균적으로 적출한 후, 각각의 세포 부유액을 조제하고 1×10^6 cells/well에 PE/FITC conjugated-anti B220 및 Thy1 monoclonal antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:40 dilution)로 이중 염색하여 4°C에서 30분간 반응시키고 raser flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다⁶⁾.

6. L1210세포의 apoptosis 측정

계대배양한 L1210세포(mouse leukemia)세포를 96well culture plate에 1×10^6 cells/well이 되도록 세포를 조정한다. 다음, 0.1, 1, 10 및 100 μ g/ml의 SSY를 첨가하여 24시간 또는 48시간 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 PI(10 μ g/ml)를 20 μ l/ 1×10^6 세포의 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 정량하였다⁷⁾. 또한 단편화된 DNA의 확인은 상기의 검체에 100 μ l의 nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 4°C에서 10분간 방치한 후, 16,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 다음 상층액을 별도의 원심관에 취하여 RNase A(20 mg/ml) 2 μ l를 가해 37°C에서 1시간 배양한 후 다시 20 mg/ml의 proteinase K액 2 μ l를 가하여 37°C에서 1시간 배양하고 여기에 5M NaCl 20 μ l와 isopropyl alcohol 120 μ l를 가해 -20°C에서 over night시킨다. 16,000 rpm으로 20분간 원심분리해서 상층액을 제거한 다음 TE buffer 20 μ l에 용해하고 1.2% agarose gel 전기영동(minigel: Mupid-II, 50V, 2시간)을 해서 ethidium bromide(10 μ g/ml)로 염색한 다음 단편화된 DNA를 정성적으로 확인하고 gel documentation reader로 판독하였다⁸⁾.

7. Mitochondrial transmembrane potential($\Delta\Psi$ m) 측정

L1210세포를 96 well culture plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 조정한다. 다음, 0.1, 1, 10 및 100 μ g/ml의 SSY를 첨가하여 24시간 또는 48시간 배양하고 배양이 종료된 후, 세포를 수집하고 세포부유액을 조제해서 세정(×3회, PBS)한 후, 침전시킨 세포분획(1×10^6 cells/ml)에 DiOC₆(최종농도: 40nM)로 염색시켜 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm)에서 mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$ m)을 측정하였다⁹⁾.

8. 복강 대식세포의 탐식능 측정

생쥐의 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주사하고 4일 후, 경추 탈구시켜 10 ml의 cold-PBS를 복강에 주입하여 잘 혼합한 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 NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH7.2)에 부유시켜 사용하였다. Zymosan용액의 제조는 zymosan 67 mg을 10 ml의 DPBS-A에 넣어 37°C에서 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°C에서 보관하면서 사용하였다(stock solution). Lucigenin stock solution은 사용 직전에 DME배지에 1/10로 희석하여 사용하였다. Chemiluminescence측정은 luminometer를 이용하여 37°C에서 측정용 microplate well (white)에 준비된 세포부유액 50 μ l와 lucigenin 50 μ l를 주입하고 37°C에서 15분 동안 전처리한 후, SSY(0.1, 1 및 10 μ g/ml)를 각 50 μ l씩 넣고 zymosan용액 30 μ l를 첨가하여 최종량이 200 μ l가 되도록 한 후, 5분 간격으로 60 분간 chemiluminescence를 측정하였다¹⁰⁾.

9. 복강 대식세포에서의 nitric oxide(NO) 측정

생쥐의 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 복강주사하고 4일 후에 생쥐를 경추 탈구하여 복강 내에 cold PBS 10 ml를 주입, 복강삼출세포를 수집하고 4°C에서 1,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 RPMI1640 배지로 2회 세척한 다음, petri dish에 부착시켜 부착한 세포만 cell scraper로 모아 24 well culture plate에 1×10^6 cells/well로 분주하였다. 각 well에 SSY(1, 10 및 100 μ g/ml)를 첨가하고 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 배양하고 배양 24시간 후에 생성된 NO양을 Griess법으로 측정하였다¹⁰⁾. 배지100 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96 well에 넣고 570 nm에서 microplate-ELISA reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO양을 산정하였다.

10. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.05이하를 기준으로 유의성여부를 판정하였다.

결 과

1. SSY가 면역세포의 증식에 미치는 효과

산수유에 대한 면역세포 증식에 미치는 효과는 Table 1과 같다. 생쥐의 비장세포에서 대조군인 LPS(1 µg/ml) 단독첨가군을 100.0±1.8%로 했을 때 SSY 1, 10 및 100 µg/ml 첨가군에서 각각 95.1±2.9, 117.9±5.5 및 124.5±4.7%로 10 및 100 µg/ml의 SSY 첨가군에서 비장림프구의 증식이 관찰되었으며, 흉선세포 배양계에서도 Con A(0.1 µg/ml) 단독첨가군의 대조군이 100.0±2.1%인데 비하여 SSY 1, 10 및 100 µg/ml의 첨가군에서 각각 92.7±1.4, 112.4±3.6 및 118.2±3.7%로 특히 SSY 10 및 100 µg/ml 첨가군에서 흉선림프구의 증식을 촉진시키는 효과를 나타내었다. 이 결과는 산수유가 면역세포인 비장 및 흉선세포의 증식을 촉진시키는 작용을 시사한다.

Table 1. Effect of SSY on the lymphocyte proliferation in cultured murine splenocytes and thymocytes.

Treatment	Cell Type (µg/ml)	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)	
		LPS(-)	LPS(+)	Con A(-)	Con A(+)
CONTROL		81.7±4.3	100.0±1.8	84.9±2.7	100.0±2.1
SSY(1.0)			95.1±2.9		92.7±1.4
SSY(10)			117.9±5.5*		112.4±3.6*
SSY(100)			124.5±4.7*		118.2±3.7*

SSY(1~100 µg/ml) was treated to cultured splenocytes or thymocytes for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The OD of each well was measured at 570nm with a microplate reader. The data represents the mean±SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(p<0.05).

2. SSY가 흉선 및 비장세포 아집단에 미치는 효과

SSY를 1주일 간 투여한 생쥐의 비장, 흉선 및 장간막 림프절 세포의 아집단변화에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. 비장세포는 대조군에 비하여 SSY 투여군에서 B세포 및 T세포의 population이 유의하게 증가하였으며, 비장 내 T세포의 TH세포 대 Tc/Ts세포의 비율도 대조군에 비해 특히 TH세포가 SSY 투여에 의해 크게 증가하였다. 흉선세포에서도 대조군에 비해 SSY 투여군에서 특히 TH세포가 현저하게 증가하였다. 또한 장간막 림프절 중의 림프구의 subpopulation에 미치는 효과는 SSY 투여에 의해 특히 T세포가 유의하게 증가되었다. 이는 SSY가 특히 비장, 흉선 및 림프절 등의 주요 면역장기 내의 B세포 및 T세포의 population을 증가시키는 면역증강작용을 보유하고 있으며 비장 및 흉선 내의 T세포 중에서는 특히 TH세포의 population을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of SSY on the subpopulation change of murine splenocytes, thymocytes and lymph node cells in vivo.

Treatment	Cell Type	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)		Lymph node cells(%)	
		B cell	T cell TH TC/TS	TH	TC/TS	B cell	T cell
CONTROL		43.9±2.3	26.5±1.7 21.9±0.6	15.0±1.3	6.5±0.5	23.4±0.7	10.1±0.2
SSY		52.7±2.9*	36.1±2.7* 27.7±1.3*	31.8±2.1**	7.6±0.4	25.8±1.1	17.5±1.3*

SSY(500 mg/kg body weight) 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 PE/FITC conjugated anti-B220/Thy1 or CD4/CD8 monoclonal antibody. The data represents the mean±SE of 5 mice. *: Significantly different from control group(*p<0.05, **p<0.01).

3. SSY가 암세포의 apoptosis에 미치는 효과

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포 배양계에 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 SSY를 첨가해서 24시간 및 48시간 동안 배양한 결과(Table 3), 24시간 동안 배양한 결과는 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 SSY 첨가군에서 L1210세포의 apoptotic cell death가 현저하게 촉진되었으며 48시간 배양한 결과도 대조군에 비하여 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 SSY를 첨가한 군에서 유의하게 L1210세포의 apoptosis가 촉진되었다. 이러한 결과는 SSY가 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용을 가지고 있음을 나타내고 있다.

Table 3. Effect of SSY on the apoptosis of L1210 leukemia cells.

Treatment (µg/ml)	Cell Type	
	L1210 cell (%)	
	24hr	48hr
CONTROL	17.5±1.2	28.3±2.1
SSY (0.1)	26.5±1.8	33.6±3.2
SSY (1.0)	31.2±2.7*	45.7±3.5*
SSY (10)	38.1±2.9**	54.1±4.7**
SSY (100)	43.4±3.1**	54.5±3.8**

SSY(0.1-100 µg/ml) was treated with cultured L1210 cells, and incubated for 24 or 48 hours, and then cells were collected and (A) sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. (B) Agarose gel electrophoresis pattern of fragmented DNA from L1210 cells cultured for 48 hours with SSY(1: none, 2: 1 µg/ml, 3: 10 µg/ml, 4: 100 µg/ml) The data represents the mean±SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group (*p<0.05, **p<0.01).

4. SSY가 암세포의 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)에 미치는 효과

세포사의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데 mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단계에서 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)의 감소가 선행되어 일어난다는 보고⁹⁾를 확인하기 위하여, SSY(1-100 µg/ml)를 처리해서 암세포의 apoptosis가 유도되었을 때에 ΔΨm의 감소가 일어나고 있는지를 검토하였다. 결과는 Fig 1에 표시하였는데 대조군에 비하여 mitochondria의 transmembrane potential이 감소되는 결과를 나타내고 있다.

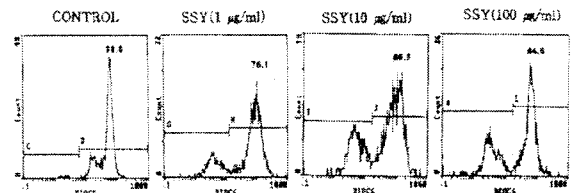


Fig. 1. Effect of SSY on the mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) of cultured-L1210 leukemia cells. SSY(1-100 µg/ml) was treated with cultured L1210 cells, and incubated for 48 hours, and then cells were collected and the ΔΨm was measured by a flow cytometer staining with DiOC6(40nM). The data represents the mean ± SE of 3 experiments.

5. SSY가 복강 대식세포의 탐식능에 미치는 효과

생쥐의 복강세포를 수집해서 SSY(1-10 µg/ml)을 첨가하여 lucigenin chemiluminescence측정법을 이용하여 복강 대식세포의 탐식능을 살펴본 결과(Fig. 2), zymosan만 처리한 대조군에

비하여 SSY 투여군에서 대식세포의 탐식작용이 농도의존적으로 증가하였다.

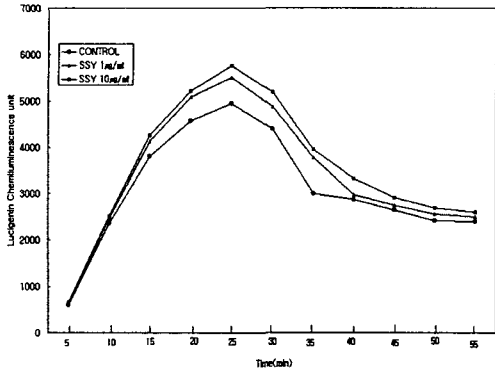


Fig. 2. Effect of SSY on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophage. Mouse peritoneal macrophages were collected, and cultured in RPMI1640 media mixed with opsonized zymosan, and added to SSY(1-10 µg/ml), lucigenin chemiluminescence was measured 5 min. intervals for 60minutes. The data represents the mean of 3 experiments.

6. SSY가 복강대식세포의 NO생성에 미치는 효과

생쥐의 복강 대식세포를 수집해서 in vitro계에서 LPS와 γ -interferon을 첨가, 배양하면서 SSY(1~100µg/ml)를 가하여 대식세포가 생성하는 nitric oxide(NO)양을 살펴본 결과(Table 4), 대조군(LPS와 γ -interferon만 첨가)에 비하여 10 및 100 µg/ml의 SSY 첨가에 의해 NO생성이 증가하였다.

Table 4. Effect of SSY on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophage in vitro.

Samples	Dose (µg/ml)	Nitric oxide(µ M/2 × 10 ⁶ cells)
Control	—	11.5 ± 0.9
	1	10.7 ± 0.7
SSY	10	14.8 ± 1.2*
	100	15.9 ± 1.3*

Peritoneal macrophages obtained after 2 hours adherence period were cultured in RPMI 1640 media with LPS(1 µg/ml) and γ -interferon(25 units/ml). Cells(2 × 10⁶ cells/ml) were cultured with SSY(1-100 µg/ml) in a 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 hours. The production of nitric oxide was determined by Griess method. The data represents the mean ± SE of 3 experiments. *: Significantly different from control group(*p<0.05)

고찰

면역계는 개체가 생존하는 동안 지속적으로 보유되고 있으며 생체내, 외부로부터 출현하는 각종 병원체 등의 이물질의 공격으로부터 개체를 효과적으로 방어하는 생체방어체계로서, T림프구 등의 면역세포가 주체가 되는 세포성면역과 항체와 신호전달분자인 cytokine 등이 반응주체인 체액성면역으로 분류된다¹²⁾. 본 연구에서는 보신장양, 면역력 개선효과 등의 작용을 가지는 산수유가 면역세포의 활성 조절능력을 살펴보고자 비장 및 흉선세포의 증식, 각종 면역장기 중의 면역세포 아집단변화, 대식세포의 탐식활성 및 NO생성 등을 관찰하였다. 실험 결과, 산수유는 비장 및 흉선 림프구의 증식을 촉진하였으며 비장, 흉선 및 장간막 림프절 등의 림프구 아집단 중, 특히 T림프구의 population을 증가시켰으며 그 중 TH세포의 population을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 사료된다. 또한 대식세포의

활성을 lucigenin chemiluminescence로 측정하였는데 chemiluminescence는 식작용이 진행되는 동안 oxygen radical이 생성되어 발생하는 것으로 lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 대식세포는 생체 내에서 T, B림프구와 더불어 항원제공세포, 탐식작용, 불필요하게 된 세포의 제거, 림프구의 활성화 등의 중요한 면역력을 발휘하는 세포로 알려져 있다. 또한 NO는 생체내에서 vasodilating agent, neuro-transmitter로서의 작용 외에 세균이나 암세포에 대한 비특이적 면역반응의 효능물질로 잘 알려져 있으며, 생쥐에서는 특히 대식세포와 호중구 등의 탐식작용을 가지는 세포에서 분비하고 있는 것으로 알려져 있다^{18,19)} 산수유는 이러한 대식세포의 탐식활성 및 NO생성을 증가시키는 작용도 있으며 이러한 결과로 보아 산수유는 각종 면역세포의 활성을 향진시키는 면역증강능력이 관찰되었다. 한편, apoptosis는 생체의 특히 신경계와 면역계세포의 생성, 분화 및 기능발현에 중요하게 작용하고 있는 능동적세포사의 개념^{15,16)}이다. 그러나 이러한 apoptosis기전에 이상이 발생하면 암, 자가면역병, 퇴행성질환 및 AIDS 등의 질환을 초래한다^{17,19)}. 본 실험에서도 in vitro 세포배양계에서 관찰한 결과, 산수유는 L1210세포의 apoptosis를 유도하는 항암작용이 있음을 관찰하였다.

결론

산수유(SSY)는 비장 및 흉선 림프구의 증식을 촉진시켰으며, in vivo 실험에서 비장, 흉선 및 장간막 림프절의 T세포를 유의하게 증가시켰는데 특히 TH세포가 증가하였으며, L1210세포의 apoptosis를 농도의존적으로 촉진시켰고 mitochondrial transmembrane potential($\Delta \Psi$ m)을 감소시켰다. 또한 SSY는 복강 대식세포의 탐식능 및 NO생성을 촉진시켜 면역 조절작용 및 암세포의 apoptosis를 촉진시키는 항암작용이 관찰되었다.

감사의 글

이 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Testolin, R., Cipriani, G., Gottardo, L and Costa. G., Valutazione de selezioni maschilidi actinidia come impollinatori per la cv. "Hayward" Riv. Frutticoltura 57(4): 63-68, 1995.
2. Bensky, D and Andrew, G., Chinese herbal medicine, Materia Medica. Seattle, Washington. Eastland Press Inc. 1993.
3. Holmes, P. Remedies, J., A chinese herbal reference for the west, Vol I & II. Snow Lotus Press, Inc. Boulder, Colorado, 1996.
4. Ishikawa, M. and Sakai, A., Extraorgan freezing in

- wintering flower buds of *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. *Plant, Cell and Environment* 8: 333-338, 1985.
5. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods* 65: 55-63, 1983.
 6. Telford, W.G., King, L. E. and Fraker, P.J., Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif.* 24: 447-459, 1991.
 7. Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E. and Wyllie, A.H., Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1133: 275-285, 1992.
 8. Willie, A.H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556, 1980.
 9. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L. Petit, P.P.X. and Kroemer, G., Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, 181, 1661-1672, 1995.
 10. Kondo, Y. and Takano, F., Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.*, 17(5), 759-761, 1994.
 11. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174: 259-263, 1994.
 12. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Poper, J.S., Cellular and molecular immunology. 2: 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A, 1994.
 13. Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V., Nitric oxide; a pathogenic factor in autoimmunity. *Immunology Today*, 13: 157, 1992.
 14. 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, 1988.
 15. Nagata, S., Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365, 1997.
 16. D'Amico, A.V. and McKenna, W.G., Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiotherapy & Oncology* 33(1): 3-10, 1994.
 17. Kerr, J.F.K., Wyllie, A.H. and Currie, A.H., Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-245, 1972.
 18. Willie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R., The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, 1980.
 19. 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.