대한영양사협회 학술지 11(1):44-50, 2005
Journal of the Korean Dietetic Association

율무 추출물이 마우스 면역세포 활성에 미치는 영향

류혜숙* · 김현숙†
숭의여자대학 식품영양과 · 숙명여자대학교 식품영양학과*

Effects of *Job's Tear(Yul-Moo)* Extracts on Mouse Immune Cell Activation

Hye-Sook Ryu* · Hyun-Sook Kim†
Dept. of Food & Nutrition, Sungeui Women's College
*Major in Food & Nutrition, Sookmyung Women's University**

ABSTRACT

Natural products are increasingly appreciated as a lead for drug discovery and development. A number of investigators have studied various activities of natural products and have found that they have not only nutritional effects but also beneficial properties to cure various diseases and to maintain good health. *Job's Tear(Yul-Moo)* is a grass crop that have long been used in traditional medicine and a nourishing food. *Job's Tear* has been reported to exhibit anti-inflammatory, stomachic, antiallergic activity, and antispastic effects and has been used in China for the treatment of warts, rheumatism, and neuralgia although its mechanism remains unclear. Previous results in our laboratory demonstrated that the ethanol extract and water extract of *Job's Tear* exerted an immune regulatory function on mice cells *in vitro*. The present study was performed to investigate the *ex vivo* effect of *Job's Tear* on immune function. Seven to eight weeks old mices(Balb/c) were fed ad libitum on chow diet and water extract of *Job's Tear* were orally administrated every other day for two or four weeks at two different concentrations(50 and 500mg/kg B.W.). Proliferation of mice spenocytes and antibody production to sheep red blood cells(SRBC) using hemolytic plague forming cell assay were used to indicate the immune activity. Splenocytes proliferation of *Job's Tear* with mitogen stimulation such as Con A and LPS was enhanced at 50mg/kg B.W. concentrations compared to those of control group. In case of antibody production to sheep red blood cells, the number of antibody-secreting cells was increased by administration of 50mg/kg B.W. concentration in mice immunized as a T-dependent antigen. From the present study, *Job's Tear* water extracts may be suggested to stimulate the mice immune response by enhancing the splenocytes proliferation and the number of plague forming cells.

Key Words : splenocytes proliferation, plague forming cells, antibody production, immune activity

서 론

최근 식품 성분들이 소유한 기존의 영양적 역할 외에 다양한 생리조절 작용을 밝히려는 노력이 여러 각도에서 이루어지고 있다. 이러한 추세에 부응하여 천연식물자원을 대상으로 노화방지, 면역증강 효과 등에 대한 연구가 항체생성 및 항산화 효과와 같은 각종생리활성을 나타내는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3).

율무는 식용과 약용으로 이용되고 있으며(4), 율무의 면역능에 대한 연구는 미미한 수준이나 기존의 많은 연구에서 밝혀진 생리활성 물질로는 항암작용 성분인 coixenolide (5)와 유리지방산(6), 배란유발 성분으

This research was supported by the Sookmyung Women's university 2004 Research grants.
접수일 : 2004년 12월 6일, 채택일 2005년 1월 10일
†Corresponding author : Hyun-Sook Kim, Major in Food & Nutrition, College of Life Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
Tel : 02)701-9469, Fax : 02)707-0195, E-mail : hskim@sookmyung.ac.kr

로 phytosterol 유도체(7), 혈당강화 성분으로 glycan인 coixans A, B, C (8)가 알려져 있으며, 항보체 활성 성분으로 glucan 및 heteroglucan인 CA-1, CA-2가 알려져 있고(9), 왕겨로부터 trypsin 저해제인 단백질이 분리되었다(10). 그 밖에 율무는 항동맥 강화작용(11)이 알려져 있으며 α-amylase 저해제가 분리되었으며(12) 기능성 식품소재로서의 가능성이 크다.

따라서 본 연구에서는 면역 증진능을 갖는 천연 식품소재로서의 율무의 면역세포 활성 효과를 검정하여 율무의 면역증진 식품으로서의 가능성을 확인하고자 한다. *In vitro* 실험에서는 율무의 물 추출물과 에탄올 추출물 첨가에 의한 마우스 비장세포 증식능 변화를 통해 농도에 따른 율무의 면역 활성효과를 검증하고자 하였다. *Ex vivo* 실험에서는 율무의 물을 추출하여 실험동물에 2주, 4주간 직접 투여함으로써 율무가 마우스 생체내에서 면역능에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 시료추출 및 실험동물

율무 추출물은 Fig. 1의 방법으로 제조하였다. 동결건조된 시료를 증류수 또는 에탄올로 환류 냉각시키면서 80℃ 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압농축하여 물 추출물과 에탄올 추출물을 얻었다.

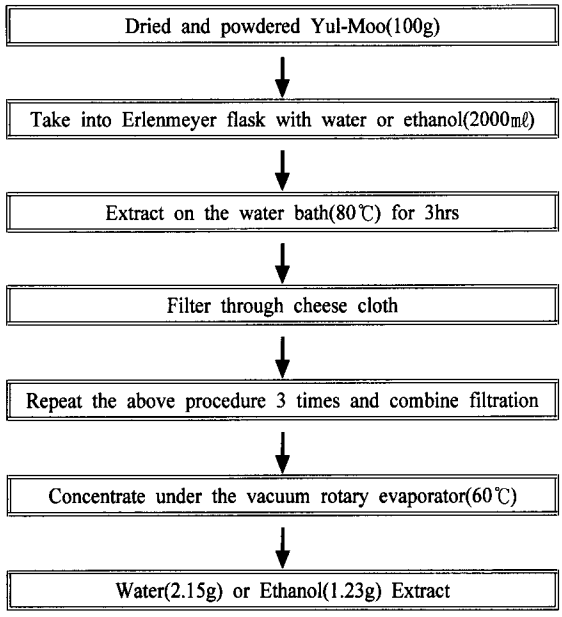

Fig. 1. Flow diagram for water or ethanol extraction procedure

본 연구에 사용된 동물은 7~8주령된 암컷 Balb/c mouse를 (주)대한실험동물센터로부터 분양받아 고형사료와 물을 자유로이 공급하면서 7~8일 정도 실험동물실에서 적응시킨 후 체중이 15g 내외인 마우스를 실험에 사용하였다. 실험 동물실 온도는 22±2℃, 습도는 40~60%로 유지하였고, 명암주기(Light and dark cycle)는 12시간 단위로 조절하였다.

2. 시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지는 RPMI medium 1640의 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS), lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A(Con A), thioglycollate, sodium bicarbonate, ammonium chloride, TRIZMA®base, TRIZMA®hydrochloride, trypan blue solution(0.4%), DMSO(dimethyl sulfide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

3. 율무 추출물의 투여

In vitro 실험에서는 율무 에탄올 추출물 및 물 추출물을 세포배양액(10% FBS-RPMI 1640 ; GIBCO)에 용해시킨 다음 실험하고자 하는 농도가 되도록 희석하여 세포배양시 첨가하였다.

Ex vivo 실험에서는 율무 물 추출물을 멸균 증류수로 용해시킨 후 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스를 임의 배치법에 의해 대조군과 투여군으로 나누었으며, 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 대조군에는 생리 식염수를, 투여군에는 검액을 각각 50mg/kg B.W./day과 500mg/kg B.W./day씩 2주, 4주간 격일로 경구 투여하였다.

4. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스 비장세포의 분리는 Mishell 등(13)의 방법에 의해 실행하였다. 경추 탈골법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 용액으로 씻

은 다음 멸균 유리봉으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 200 mesh stainless steel sieve(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시킨후 50ml의 원심관에 넣고 4℃, 3000rpm에서 10분간 원침시킨 후 cell pellet을 lysing buffer(Tris-buffered ammonium chloride ; 0.87% NH_4Cl, pH 7.2)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI로 2회 원심 세척한 다음, 10%-FBS RPMI 1640으로 5.0×10^6cell/ml의 농도로 희석하여 96-well plate에 90μl 씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 사용하였다.

5. 비장세포 증식능 측정

각 군별로 마우스 비장세포 현탁액을 5.0×10^6cell/ml이 되도록 희석하여 96 well plate의 각 well에 90μl 씩 분주하고 각 군당 mitogen으로 Con A(5μg/ml), LPS(15μg/ml)를 10μl씩 분주하고 대조군에는 배지를 동량으로 분주하였다. 각 plate는 37℃, 5% CO_2 incubator(Sanyo)에서 44시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 배양후 MTT를 10μl 가하고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태에서 4시간 동안 다시 배양한 후 formazan crystal 형성을 유도하였다. 4℃, 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 각 well에 150μl의 DMSO를 가하여 10분간 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 다음의 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{Proliferation Index} = \frac{\text{Sample의 흡광도}}{\text{Control의 흡광도}}$$

6. 비장세포 중의 IgM 항체 생성 세포수 측정

비장세포의 IgM 항체 생성 세포수(plaque forming cell ; PFC)를 측정하기 위한 항원으로, 한국 유니온 랩에서 구입한 면양적혈구(Sheep red blood cell, SRBC)를 4℃에서 보관하여 2주일 이내에 사용하였다. 사용직전 PBS용액으로 3회 원심세척(2500rpm, 5min., 4℃)한 후, 면양적혈구(Sheep red blood cell, SRBC) 농도가 2×10^9cell/ml가 되도록 PBS용액으로 조정하여 이 부유액 0.2ml를 실험 4일전에 모든 실험군의 마우스 복강내에 주사하였다.

비장세포의 PFC수는 Cunningham(1968)의 방법을 약간 변형시킨 방법을 이용하여 PFC를 측정하였다. 즉 비장세포 현탁액은 면역일로부터 4일후에 실험동물군의 비장을 적출하여 빙냉의 RPMI 1640에 넣고 teflon pestle을 이용하여 200 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer를 가한 후 원심분리(3,000rpm, 10min, 4℃)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 일정액의 RPMI 1640 용액을 가하여 viable cell을 trypan blue exclusin method(Mischell와 Shiigi, 1980)로 측정하여 1×10^6 cells/ml의 비장세포 현탁액을 만들었다. SRBC 부유액은 냉장보관된 면양 혈액을 사용 직전에 RPMI 1640 용액으로 3회 원심세척(2,500rpm, 5min, 4℃) 한 후 5×10^9cells/ml의 농도로 부유시켜 만들었다. SRBC 부유액(5×10^9cells/ml) 0.5ml, guinea pig complement 0.3ml, 10%의 불활성화된 FBS를 함유한 RPMI 1640 용액 2.0ml을 혼합하였다. 이 혼합액 0.5ml와 비장세포 현탁액(1×10^6cells/ml) 50μl를 혼합하여 microchamber에 35μl씩 주입하고 vaseline과 paraffin(1:1) 혼액으로 밀봉하여 incubator에 1시간 방치한 후 형성되는 항체 생성 세포수를 현미경하에서 측정하였다. 측정된 PFC수를 비장세포 10^6개중의 IgM 항체 생성 세포수로 환산하여 나타내었다(Fig. 2).

$$\text{PFC}/10^6 \text{ splenocytes} = (N_{plaque} / C_{spleen}\times V_{mixture}\times A)\times10^6$$

A : 1(incubation mixture 중의 splenocyte suspension의 비율)

N_{plaque} : the number of plaque observed in a microchamber

C_{spleen} : the count of splenocytes in 1㎖ of splenocyte suspension

$V_{mixture}$: volume of incubation mixture filled into microchamber

7. 통계분석

모든 실험결과의 자료는 SAS(Statistic Analysis System) 통계 프로그램을 이용하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 각 군간의 평균치의 차이는 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)및 Duncan's multiple range

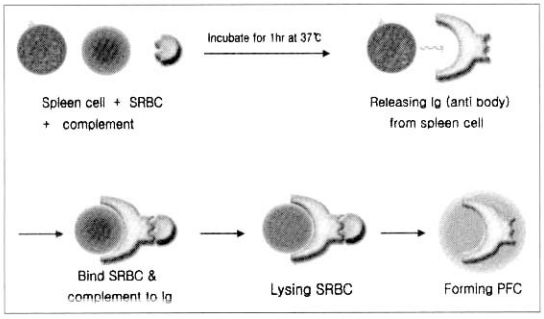

Fig. 2. Process of Plague Forming Cell

test를 사용하여 α=0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

Table 1. Proliferation index of mice splenocyte cultured with water or ethanol extracts of *Job's Tear* and mitogens

Conc.	Proliferation index[1]		Mitogen	
(μg/㎖)	Water	Ethaonl	Con A	LPS
C	1.00±0.00[2]	1.00±0.00[cbd]	1.268±0.60	1.103±0.14
10	1.467±0.04[b]	0.708±0.02[e]		
50	1.203±0.06[d]	0.906±0.08[cd]		
100	1.051±0.09[e]	0.836±0.23[ed]		
250	1.007±0.11[e]	1.149±0.03[b]		
500	1.759±0.03[a]	1.469±0.08[a]		
1000	1.340±0.01[c]	1.065±0.09[cb]		

[1] Proliferation index = $\frac{\text{mean of O.D. in test wells}}{\text{mean of O.D. in control wells}}$

[2] Means with different letters(a, b) within a column significantly different from each other at α=0.05 as determined by Duncan's multiple range test(a>b)

연구결과 및 고찰

1. 율무 추출물이 마우스 면역활성에 미치는 영향 : *In vitro* 실험

1) 율무 추출물이 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

율무 추출물을 10, 50, 100, 250, 500, 1000μg/ml의 농도로 첨가하여 배양하였고, 음의 대조군(negative control)으로는 율무 추출물 대신 배양액(10% FBS-RPMI 1640)을 첨가하고 양의 대조군(positive control)으로는 Con A(5μg/ml)와 LPS(15μg/ml)를 첨가하여 배양하였다. Con A는 T세포를 LPS는 B세포를 선택적으로 증가시키고 이들의 mitogen effect는 농도 의존적이어서 본 실험에서는 선행연구(14)에서 가장 높은 증식능을 보였던 농도인 5μg/ml(Con A)와 15μg/ml (LPS)를 첨가하였다. 비장세포 증식능은 배양액 10% FBS-RPMI 1640을 넣은 대조군의 흡광도를 1로 하여 비교하였다.

율무 물 추출물과 에탄올 추출물의 첨가가 비장세포 증식능에 미치는 영향에 대한 검색 결과는 Table 1과 같다. Con A와 LPS를 첨가하여 배양한 경우 율무 추출물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 세포 증식능이 1.268±0.60, 1.103±0.14로 상승하였다. 율무 물 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 10, 50, 100, 250, 500, 1000μg/ml에서 각각 1.467±0.04, 1.203±0.06, 1.051±0.09, 1.007±0.11, 1.759±0.03, 1.340±0.01로, 에탄올 추출물을 첨가하여 배양한 경우 농도 250, 500, 1000μg/ml에서 각각 1.149±0.03, 1.469±0.08, 1.065±0.09로 비장세포 증식이 높은 경향을 보였다. 이는 고들빼기 물 추출물에서 100, 250, 500μg/ml 농도에서 유의적인 증식능을 나타낸(15) 연구와 유사한 결과라 할 수 있다. 이 등(16)의 연구에서도 솔잎의 계통별 추출물 중 물 추출물을 첨가하여 배양한 경우 5~500μg/ml의 모든 농도에서 비장세포 증식을 촉진하는 것으로 나타났으며, 맨드라미 분획 추출물에 의한 비장세포 증식능 효과를 관찰한 결과 역시 물 층에서 대조군에 비해 가장 높은 증식을 보인 것으로 확인(17)되었다. 또한 50μg/ml의 저농도와 500μg/ml 이상의 고농도에서 증식능이 감소되는 경향을 보인 생강의 면역활성 연구(18)와도 유사한 결과를 나타내었다.

따라서 50~500μg/ml 농도의 율무 추출물은 비장세포의 활성을 촉진시키거나 면역 반응을 증가시킬 수 있는 면역활성 물질이 있으리라 사료된다.

2. 율무 물 추출물의 경구투여가 마우스 면역기능에 미치는 영향 측정 ; *Ex vivo* 실험

시험관 내(*In vitro*) 실험에서 율무 물 추출물이 비장세포 증식능을 촉진하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 생체 외 실험에서는 율무 물 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능과 마우스 항체 생성능에 어떠한 영향을 미치는지 관찰함으로써 생체 외에서 율무 물 추출물의 면역활성효과를 검증하고자 하였다.

1) 율무 물 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향

식이섭취가 생체에 미치는 영향을 알아보기 위해 식이를 섭취한 실험 동물의 장기로부터 세포 증식능이나 채혈을 통한 효소활성능 등이 면역지표로서 사용되고 있다(19-20).

본 실험에서는 율무 열수 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 증식능에 미치는 영향을 검색하기 위한 지표로 MTT assay를 이용하여 비장세포 증식능을 측정하였고, 이는 세포증식능 측정 도구로서 가장 적합한 ^{3}H-thymidine uptake의 결과와 비교적 유사한 것으로 보고되고 있다(21). 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

율무 물 추출물을 2주동안 투여한 경우 50mg/kg B.W./day과 500mg/kg B.W./day 투여군에서 대조군에 비해 증식능에 큰 변화를 보이지 않았으나, Mitogen에 대한 반응을 보면, 세포성 면역과 관련있는 T세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 Con A 첨가시 2주간의 투여시에 50mg/kg B.W./day와 500mg/kg B.W./day 농도군에서 두 농도 모두 대조군에 비해 변화를 보이지 않았다. 그러나 체액성 면역과 관련이 있는 B세포를 선택적으로 증식시키는 mitogen인 LPS 첨가시 50mg/kg B.W./day 투여군에서 대조군 보다 높은 증식능을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

2) 율무 물 추출물의 경구투여가 마우스 비장세포 중의 IgM 항체 생성 세포수에 미치는 영향

시험관 내(*in vitro*) 실험에서 생강 열수 추출물이 B세포 면역 반응을 활성화 시키고, B세포 미토젠의 성질을 포함할 가능성이 제시되었다. 이러한 시험관 내 실험 결과로 율무 열수 추출물의 경구 투여를 통해 마우스 비장세포가 면양적혈구(Sheep red blood cell : SRBC) 항원에 대한 일차 체액성 면역 반응(Primary humoral immune response)에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 일차 체액성 면역 반응은 항원에 접촉되었을 때 일어나는 반응으로 주로 IgM이 생성된다. 따라서 비장세포 중의 IgM 항체 생성 세포수 측정은 항체를 생성할 수 있는 세포가 항원과 접촉하여 IgM 항체를 방출하고 방출된 항체가 항원 및 보체와 결합하여 용혈현상을 일으키는 것을 이용한다. 즉 마우스를 SRBC로 면역시킨 후 비장세포를 취하여 항원(SRBC) 및 보체와 반응시키고 이때 생성되는 항체(plaque)의 수를 측정하여 B세포의 항체 생성능을 관찰하는 방법이다. IgM 항체 생성 세포수는 SRBC로 1차 면역 후 4일째 최고에 도달하므로(22) 항원 주사 후 4일째에 비장세포 중의 PFC(plaque forming cell) 수를 측정하였다.

그 결과는 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 2주동안 율무 열수 추출물을 투여한 경우 비장세포 10^{6}개당 PFC 수는 50mg/kg B.W.과 500mg/kg B.W.의 농도에서

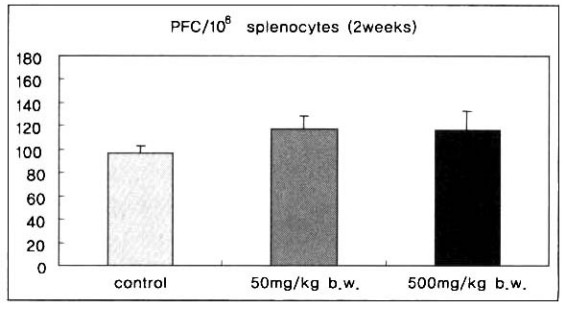

Fig. 4. The plaque forming cell number of mice orally administered with water extract of *Job's Tear* for 2 weeks

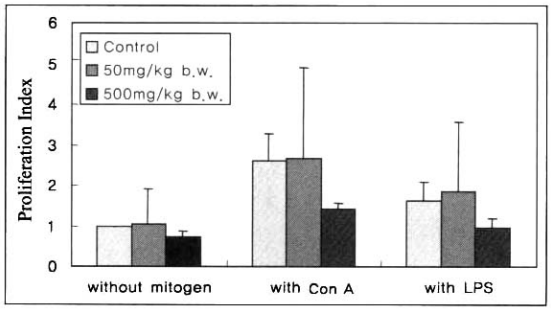

Fig. 3. Proliferation index of splenocyte from mice orally administered with water extract of *Job's Tear* for 2 weeks

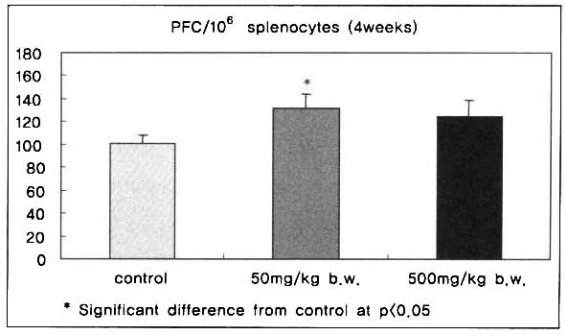

Fig. 5. The plaque forming cell number of mice orally administered with water extract of *Job's Tear* for 4 weeks

대조군에 비해 50, 500mg/kg B.W.의 농도에서는 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 4주 동안 율무 열수 추출물을 투여한 경우에는 비장세포 10^6개당 PFC수가 50mg/kg B.W.와 500mg/kg B.W.의 농도 모두에서 대조군보다 50, 500mg/kg B.W.의 농도에서 보다 증가하였으며, 50mg/kg B.W.의 농도에서는 유의성있게 증가하였다($p<0.05$).

2주 투여군과 4주 투여군을 비교해 보면 4주 투여군에서 PFC수가 유의적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 따라서 율무 열수 추출물의 2주와 4주간의 투여가 항원인 SRBC(Sheep red blood cell)에 대한 일차 체액성 면역반응을 활성화시키는 것으로 예측된다. 이러한 결과는 율무 열수 추출물의 장기 투여가 면역기능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결론 및 제언

율무 물 추출물 및 에탄올 추출물에 대한 *in vitro* 실험으로 비장 증식능을 검색한 결과, 물 추출물의 10~500μg/ml의 농도를 첨가했을 때 비장세포 증식능을 촉진하는 효과가 있는 것으로 나타났다. *In vitro* 실험을 근거로 실시된 *ex vivo* 실험은 다음과 같다.

2주간 격일로 50mg/kg B.W./day와 500mg/kg B.W./day의 농도로 율무 추출물을 마우스에게 직접 경구투여한 후 비장세포 증식능과 2주와 4주간 격일로 50 mg/kg B.W./day와 500mg/kg B.W./day의 농도로 항체 생성능을 측정하였다. 그 결과 율무 추출물은 50 mg/kg B.W./day에서 비장세포 증식을 촉진하는 것으로 보였으며, 항체 생성능은 2주와 4주 동안의 50mg/kg B.W./day과 500mg/kg B.W./day 농도 모두에서 증가하는 경향을 보였다. 특히 4주 동안의 50mg/kg B.W./day 농도에서는 유의적으로 높은 증식능을 보였다.

이상의 결과에 의하면, 율무 물 추출물 및 에탄올 추출물은 비장세포 증식능과 비장세포중의 항체생성세포수를 증가시킴으로서 면역기관의 주요 기능을 증진시키는 것으로 사료된다. 따라서 이와 같은 마우스 실험을 근거로 임상실험을 통한 기능성 식품의 개발과 면역식단 개발에 기초자료로 활용하여 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. Pyo MY, Su MH. Effects of *Phellinus linteus* Extracts on the Humoral Immune Response in Normal and Cyclophosphamide-treated Mice. *J Applied Phamcology* 9:194-200, 2001
2. Park JS, Chyun JH. Effects of Low Fat Diet and Saturated Fat Supplementation on the Immune Status of BALB/c Mouse. *Korean J Nutrition* 26(5):578-585, 1993
3. Wagner H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure & Appl. Chem.* 66. 7. 1271. 1990
4. Yoo TJ. Sikpoombogam Moonundang, Seoul, pp.288-290, 1998
5. Tanimura A. Studies on the anti-tumor component in the seeds of *Coix lachryma jobi l.* var. ma-yuen Stapf. Ⅱ. The structure of coixenolide, *Chem Phar Bull* 9:47-53, 1961
6. Numata MA, Yamamoto M, Yamada H. Antitumor components isolated from the Chinese herbal medicine *Coix lachryma-jabi L, Planta Med* 60:356-359, 1994
7. Kond YK, Nonno C, Hikino H. Isolation of ovulatory-active substances from crops of *Job's tears(Coix lachryma jobi l.* var. ma-yuen Stapf). *Che pharm Bull* 36:3147-3152, 1998
8. Takahashi M, Konno CH. Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C glycans of *Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf seeds. *Planta Med Fed* 1:64-65, 1986
9. Yamada H, Yanahira S, Kiyohara H, Cyong JC, Otsuka Y. Water- soluble glucans from the seed of *Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen seeds. *Phytochem* 25:129-132, 1986
10. ARY MB, Shewry PR, Richardson M. The amino acid sequence of a cereal Bowman-Birk type trypsin inhibitor from seeds of *Job's tear. FEBS Lett* 229:111-118, 1988
11. Park Y, Suzuki H. Lee YS. Effect of coxi on plasma, liver and fecal lipid components in the rat fed on lard or soybean oil-cholesterol diet. *Biochem Med Metab Biol* 39:7-1, 1988
12. Ary MB, Richardson M, Shewry PR. Purification and characterization of an insect alpha-amylase inhibitor/endochitinase from seeds of *Job's tears. Biochem Biophys Acta* 999:260-266, 1988
13. Mishell BB and Shigi SM. Selected methods in cellular

immunology. 1st ed. San Francisco. *WH Freeman and Co.* 4. 1980

14. Choi SE. Effect of needle extracts on mouse splenocyte proliferation and cytokine production by activated mouse peritoneal macrophage. Master's thesis. Sookmyung Women's university, 2000
15. Park HA. Enhancing effect of *Ixeris sonchifolia* Hance *Oenanthe javanica*, and. *Fagopyrum escluentum Moench* on Mouse Immune Cell Activation. Master's thesis. Sookmyung Women's university, 2003
16. Lee JH. Effect of pine needle extracts and powder on modulation of immunocompetence in mice and human subjects. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's university, 2001
17. Lee Y. A study of immunomodulating effects and Production of nitric oxide by C. cristata L. extracts in mice. Master's thesis. Sookmyung Women's university, 2001
18. Ryu HS, Kim HS. Effect of *Zingiber Officinale Roscoe* Extracts on Mice Immune Cell Activation. *Korean J Nutrition* 37(1):23-30, 2004
19. Kim SH. Effect of *Phlomis umbrosa Turcz* ethanol extract on mouse splenocyte proliferation and cytokine production by activated peritoneal, pp.59-60, 2000
20. Kim J. Enhancing effect of Paeonia japonica, Houttuynia cordata, and Aster scaber extracts on the immunoreactivity *in vivo* in mice. Ph.D. Dissertation Sookmyung Women's university, 2003
21. Toshiaki M, Takahiko O, Eri M, and Gisho H. Inhibitory Effect of Perilla frutescens and its Phenolic Constituents on Cultured Murine Mesangial Cell Proliferation. *Planta Medica* 64:541,1998
22. Robert, I. and Richard, W. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. Science 153, pp. 1004-1005, 1996