

감초가 면역반응에 미치는 영향(I)

— 50% 메탄올 엑스의 면역조절작용 —

한중현 · 오찬호* · 은재순**

원광대학교 한의과대학, *전주우석대학 생물공학과, **전주우석대학 약학과

(Received March 9, 1991)

Effect of Glycyrrhizae Radix on the Immune Responses(I)

— Immuno-regulatory Action of 50% Methanol Extract —

Jong-Hyun Han, Chan-Ho Oh* and Jae-Soon Eun**

College of Oriental Medicine, Won-Kwang University, Iri 570-749, Korea

*Dept. of Biotechnology, Chonju Woo-Suk University, Chonju 565-800, Korea

**Dept. of Pharmacy, Chonju Woo-Suk University, Chonju 565-800, Korea

Abstract—These experiments were conducted to investigate the effects of Glycyrrhizae Radix extract(GR) on histamine synthesis, lymphocyte blastogenesis in C57BL/6J mice splenocytes, IL-1 production, Ca^{2+} uptake by macrophage-like P388D₁ cells and plaque forming cell assay against SRBC. Histamine contents, lymphocyte blastogenesis, IL-1 activity, Ca^{2+} uptake and plaque forming cell were determined by enzyme isotope method, [³H]-thymidine incorporation, C3H/HeJ mouse thymocytes proliferation, the addition of 5 μ Ci/ml ⁴⁵Ca²⁺ to P388D₁ cell suspension and assay to sheep red blood cell, respectively. Cytotoxicity, which was expressed as 50% mortality, was occurred by the addition of GR(10⁻³g/ml). Histamine production in mouse spleen cell culture was significantly increased by 48 hour incubation added 0.25 μ g/ml of Con A. Con A-dependent T-lymphocyte proliferation was also enhanced by the addition of 0.25 μ g/ml of Con A. GR depressed histamine contents at 10⁻⁹~10⁻⁴g/ml and Con A (0.25 μ g/ml) dependent T-lymphocyte proliferation at 10⁻⁵~10⁻⁴g/ml. IL-1 activity was significantly decreased by 10⁻⁸~10⁻⁴g/ml of GR. Ca^{2+} uptake was not changed by GR, but antibody production markedly increased at 10.0~50.0 mg/kg of GR. From the above results, it is suggested that GR have immuno-regulatory action; GR decreased cell-mediated immune response and increased antibody production by B lymphocyte at high doses.

Keywords□Glycyrrhizae Radix, immuno-regulatory action, concanavalin A, interleukin-1, histamine, Ca^{2+} uptake, IgM, IgG

甘草(Glycyrrhizae Radix)는 漢醫書인 傷寒論 處方 110 方中 74方に 들어있는 중요한 生藥으로, 주성분은 glycyrrhizin으로서 ammonium염, Ca 염 또는 K 염으로 감초에는 glycyrrhizin이 6~14% 함유되어 있으며 가수분해 되어 glycyrrhetic acid와 2분자의 glucuronic acid로 된다.¹⁾ 감초의 약리작용은 일반적으로 DOC 유사작용,²⁻⁴⁾ 항염작용,⁵⁻⁷⁾ 항괴양작용,⁸⁾ 항알러지작용⁹⁻¹¹⁾ 등과 간염,¹²⁻¹⁷⁾ 동맥경화증,^{18,19)} 항종양효과,^{20,21)} radioprotective effect,^{22,23)} 만성 당뇨

합병증,^{24,25)} 항바이러스 효과,^{26,27)} prostaglandin의 억제효과,^{28,29)} toxicological effect³⁰⁾ 및 immobilization stress 부하 및 LPS 투여시 혈중 corticosterone과 histamine 유리를 억제하는 효과가 있음이 알려져 있다.^{31,32)}

그러나 이와 같이 다양한 약리작용을 가지고 있는 감초의 작용기전은 아직도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 일반적으로 histamine은 다양한 면역조절 작용을 통하여 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며^{33,34)}

Kato 등¹⁸⁾은 감초엑스가 비만세포 내의 c-AMP 농도를 상승시켜 복강내 mast cell(비만세포)에서 histamine 유리를 억제한다고 보고하였다. Histamine은 혈중의 basophil(호염기구)이나 조직의 mast cell의 과립중에 저장되어 있다가 allergen-IgE 항체 복합체 반응에 의하여 세포외로 분비되는 mast cell pool형의 histamine³⁵⁾과 mast cell 이외의 세포에서 생합성되어 분비되는 non-mast cell pool형³⁶⁾의 두 가지 유형이 있다고 보고되고 있다. 또한 T세포의 활성화에는 반드시 macrophage가 필수적으로 관여하는데 macrophage의 기능에는 IL-1 생성, TNF, superoxide(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 collagenase 등을 분비하여 각종 면역반응을 담당하는 것으로 알려져 있으며,³⁷⁾ 특히 macrophage의 활성화에는 세포외에서 흡입되는 Ca²⁺ 양이 중요한 역할을 하고 있다.³⁸⁾ 따라서 저자는 histamine 생성과 T세포의 증식반응이라는 별개의 factor를 동시에 관찰할 수 있는 비장세포계에서 histamine 량을 측정³⁶⁾하여 histamine 생성에 미치는 감초엑스(GR)의 효과를 관찰하고, 또한 세포성 면역반응을 주도하는 T세포의 기능을 관찰하기 위하여 T세포의 활성화제인 Con A를 첨가하여 T세포 증식반응에 미치는 이들 약물의 효과를 검토하였으며 IL-1, Ca²⁺ uptake 및 B세포에서 생산되는 항체(IgM 및 IgG) 생성능력을 검토하여 전반적으로 감초의 immuno-regulatory action을 살펴본 결과 약간의 지연을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험동물—실험에 사용한 동물은 C57BL/6 및 C3H/HeJ 계통의 웅성마우스로 실험에 사용하기까지 동물 사육실에서 사육하여 8~12 주령의 것을 사용하였다. 사육은 온도 22±2°C, 습도 50±10%의 동물실 내에서 마우스용 케이지에 깔집을 깔고 5~6마리씩 넣어 고형 pellet 사료(삼양유지)와 물을 충분히 공급하면서 사용하였다.

검약조제—시료로 사용한 감초엑스의 조제는 원광대학교 부속한방병원에서 사용하는 감초(元甘草)를 구입하여, 감초 100g을 50% methanol 500 ml로 수욕상에서 5시간 추출한 뒤, 여과하여 rotary evaporator로 농축하여 33g의 감초엑스를 얻어 필요에 따라 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

시약 및 기기—실험에 사용한 histamine-2HCl과 FCS(fetal calf serum, Lot. No.59F-0730)은 Sigma(USA), concanavalin A는 Pharmacia(Sweden), 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole(DPO) 및 phytohemagglutinin(PHA)는 Difco(USA), [6-³H]thymidine(25Ci/mmol), s-adenosyl-L-[methyl-³H]-methionine(500 mCi/mmol)은 Amershm(England) 제품이었으며, 기타시약은 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 autoclave(Tomy Seiko Co.), deep freezer(Sanyo Co.), CO₂ incubator(Yamato Co.), clean bench(Dalton Co.), centrifuge(Hitachi), DDW apparatus(Millipore), liquid scintillation counter(Hitachi Co.), automated cell harvester(PHD, MA, USA) 등이었다.

세포 세정액 및 배양액—세포 세정액은 인산완충액(PBS; pH 7.2)를, 배양액은 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 각 분말은 2차 증류수에 용해하여 autoclave에서 121°C, 20분간 멸균처리하였으며, RPMI 1640 배지는 실온으로 냉각시킨 후에 여과, 멸균시킨 L-glutamine 0.292 g/l와 별도의 autoclave 조작을 거친 10(w/v)% NaHCO₃ 용액을 첨가하여 pH가 7.1~7.4가 되도록 조정했으며 여기에 penicillin G(100 U/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)을 첨가하였다. Ca²⁺ uptake 측정시 Modified Gey's Buffer(MGB) 용액은 glucose 495.4 mg, NaCl 4.295 mg, KCl 186.4 mg, CaCl₂ 83.27 mg, KH₂PO₄ 129.29 mg, MgSO₄ 18.07 mg, MgCl₂ 47.65 mg 및 Na₂HPO₄ 78.08 mg을 500 ml의 2차 증류수에 용해하여 조제하였으며 각 용액은 4°C에서 저온보관 하였다.

세포주 및 계대배양—마우스의 macrophage-like 세포주인 P388D₁ 세포는 일본 나고야대학 생화학 제어실에서 분양받았으며, 5~10(v/v)%의 FCS(fetal calf serum)을 56°C에서 30분간 열처리하여 불활성시켜 RPMI 1640 배지에 섞어 37°C의 incubator(5% CO₂) 내에서 배양했다. 배양용 plate는 직경 100 mm의 plastic dish(Nunc Co.)를 사용하였다. 계대배양 방법은 dish면에 부착한 세포만을 rubber policeman을 사용하여 물리적으로 박리하였고 이것을 polypropylene tube(Falcon Co.)에 옮기고 원심분리(200×g, 5분, 실온)한 후, 침전분획을 5~10% FCS-RPMI 1640 배지에 현탁하여 이것을 적당량 분주하여 본 실험에 사용하였다.

세포수의 계측—P388D₁ 세포수의 계측은 세포배양 종료시에 PBS(pH 7.2)에 용해시킨 trypsin(최종농도 0.1%) 및 EDTA(최종농도 0.1%)를 첨가하여 다시 30분간 37°C의 CO₂ incubator 내에서 배양을 계속한 다음 pipette tip으로 세포를 부유시킨 후(미리 10% FCS-RPMI 배지를 소량 첨가) 원심분리(200×g, 5분간 실온)하여 침전분획을 10% FCS를 포함한 RPMI 배지에 현탁 회석하여 혈구계산법을 사용하여 세포수를 계측하였다.

세포생존률의 측정—C57BL/6 마우스의 비장세포 부유액을 조제하여 CO₂ incubator 내에서 세포를 배양한 후, 세포생존률의 산정³⁹⁾은 5% FCS-RPMI에 넣은 각 세포의 현탁액을 96 well의 microtiter culture plate에 주입하여 1×10⁶ cell/200 μl/well이 되도록 세포수를 고정한 후 48시간 세포배양을 행하였다. 배양 종료시에 각 well내의 세포를 따로 수집하여 RPMI 1640 배지로 적정량 회석한 후 0.2% trypan blue(Gibco)로 염색한 후 혈구계산판(hemocytometer)을 사용하여 현미경 하에서 세포생존률을 측정하였다.

생세포수/ml=(혈구계산판 정방형내의 평균 생세포수)×(10⁴/ml)×1/회석도

%생세포수=(생세포수)/(생세포수+사세포수)×100%

Histamine의 정량—상술한 방법으로 조제한 C57BL/6 마우스 비장세포 부유액을 microculture plate에서 배양한 후 배양상등액 중의 histamine 양을 enzyme-isotope법⁴⁰⁾으로 측정하였다. 측정용 sample액은 비장세포의 배양상등액을 원심분리(250×g, 5분, 4°C)한 후 그 상등액을 100°C에서 5분간 처리하여 2회 원심분리(18,500×g, 10분, 4°C)한 상등액을 사용하였으며, 효소액으로는 S.D. 계통의 rat kidney를 균질화하여 45~70%(NH₄)₂SO₄로 처리한 침전분획을 3배량의 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)에 현탁하여 이것을 투석 튜브를 이용하여 투석한 후에 다시 0.1 M 인산완충액(pH 7.9)로 20배 희석한 것을 사용하였다. S-Adenosyl-[methyl-³H]-methionine(SAM) 0.1 μCi/μl는 0.1 M 인산완충액(pH 7.9) 150μl에 희석하여 사용하였다. 측정은 SAM 용액 10 μl, 검액 20 μl를 시험관(1.5 ml, Bio-Bik Co.)에 취해서 37°C에서 90분간 배양한 후 1-methyl histamine 5 μg을 함유한 0.8 M

HClO₄ 20 μl를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 10 N NaOH 용액 20 μl 및 chloroform 0.4 ml를 첨가하여 vortex mixer로 30초간 격렬하게 교반한 다음 원심분리(400×g, 2분, 4°C)하여 상부의 수층을 제거한 후 다시 3.3 N NaOH 용액 50 μl를 첨가하고 vortex mixer로 30초간 교반하여 재차 원심분리한 후 상부의 수층을 제거하였다. Chloroform층 0.3 ml를 vial에 옮기고 하루밤 실온에서 암소에 방치하여 증발건고시킨 후 scintillant액(DPO 4g+POPOP 0.1 g/l xylene) 2 ml를 첨가하여 용해시킨 다음 그 방사활성을 liquid scintillation counter(LSC)로 측정하였다. 측정은 triplicate로 행한 후 histamine 2HCl을 이용하여 표준곡선으로부터 histamine량을 산출하였다.

임파구 증식반응—임파구 증식의 측정⁴¹⁾은 경추 탈구하여 도살한 C57BL/6 마우스로부터 비장을 적출하여 곧바로 cold PBS(-) 용액을 넣은 petri dish에 침지시켰다. 적출한 비장은 clean bench 내에서 수술용 가위와 pincette을 사용하여 분절한 후 stainless mesh 상에서 pincette을 이용하여 압박하면서 비장세포를 PBS 용액에 누출시켰다. 다음에 신선한 PBS 용액으로 3회 세정(원심분리 250×g, 5분간, 4°C)한 후 5% FCS-RPMI 배지에 현탁해서 비장세포 부유액을 조제한 다음 microculture plate(96 well, flat bottomed, Nunc Co.)에 각 well당 5×10⁵ 세포가 되도록 조정하여 각 검액을 첨가하였다. 최종액량은 각 well당 200 μl로 조정해서 37°C의 CO₂ incubator(5%, CO₂~95%, O₂) 내에서 48시간 배양한 다음 25 μCi/ml의 [³H]thymidine을 10 μl씩 각 well에 첨가하여 다시 16시간 배양한 후 cell harvester를 사용하여 세포를 수집한 후 세포내에 흡입된 방사활성을 liquid scintillation counter(β-counter)로 측정하였다.

IL-1의 측정—5% FCS를 포함하는 RPMI 1640 배지 중에서 37°C의 CO₂ incubator 내에서 증식시킨 P388D₁ 세포를 PBS로서 1회 세정한 후 rubber policeman을 사용하여 물리적으로 박리한 후 원심튜브(15 ml용)에 넣어 원심분리(200×g, 5분, 실온)하였다. 다음에 침전분획을 GIT 무혈청배지에 현탁하여 세포부유액을 조제하여 이 세포부유액을 직경 35 mm의 plastic dish(Nunc Co.)에 dish당 2.5×10⁵ 세포가 되도록 조정한 후, 각 검액(GR)을 첨가하여 최종액량을 1.0 ml로 해서 37°C의 CO₂ incubator(5%

CO₂) 내에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양상등액을 원심분리(400×g, 5분, 4°C)하여 그 상층액을 eppendorf tube에 주입한 후 측정용에 사용하기까지 -80°C에서 냉동 보관하였다. 냉동보존한 P388D₁ 세포의 배양상등액을 실온에서 해동시킨 후 투석막에 옮겨 4°C의 cold chamber 내에서 투석을 행하였다. 투석은 약 10배량의 PBS 중에서 약 3시간을 행하고 다시 약 25배량의 RPMI 1640배지 중에서 하룻밤 정지시켰다. 투석 후 검액은 millipore filter(직경 0.22 μm)로 여과멸균해서 측정에 사용하였다. IL-1 활성측정⁴²⁾에는 C3H/HeJ 마우스의 흉선세포를 사용하여 PHA 의존성 T임파구의 유약화 반응에 대한 촉진작용을 활성의 지표로 하는 방법을 사용하였다. 경추 탈구시킨 C3H/HeJ 마우스로부터 흉선을 적출해서 cold PBS 용액에 집어 넣었다. 적출한 흉선은 clean bench 내에서 수술용 가위와 pincette를 사용하여 세절한 후 stainless steel mesh(Sigma) 상에서 흉선세포를 누출시켰다. 누출된 흉선세포를 PBS로 2회 세정(원심분리 250×g, 5분간, 4°C)한 후 1.0×10⁷ cell/ml가 되도록 10% FCS-RPMI 1640 배지에 현탁시켜 세포현탁액을 조제하였다. 다음에 microculture plate(96 well, flat bottomed, Nunc Co.)의 각 well에 세포현탁액 100 μl, PHA 10 μl(최종농도 5 μg/ml), 각 검액 50 μl와 RPMI 1640 배지를 첨가하여 최종액량이 200 μl로 되도록 조정후 이것을 37°C의 CO₂ incubator 내에서 48시간 배양했으며, 그 후 50 μCi/ml의 [6-³H]thymidine을 10 μl씩 각 well에 첨가하여 다시 4시간 배양을 계속하였다. 그 후 cell harvester를 사용하여 세포를 수집한 후 세포내로 흡입된 방사활성을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Ca²⁺ uptake의 측정—계대배양한 P388D₁ 세포를 confluent 상태로 포화시킨 후 rubber policeman을 사용하여 세포를 수집하고 원심분리(400×g, 5분, 4°C)하여 세포 침전분획에 1.0×10⁶cell/ml가 되도록 MGB 용액(Modified Gey's physiological buffer)에 현탁하여 세포현탁액을 조제하였으며 사용하기까지 12°C에서 30분~2시간 동안 보존하였다. Ca²⁺ uptake 측정³⁸⁾은 세포현탁액 10 ml(1.0×10⁶ cell/ml)에 5 μCi/ml의 ⁴⁵Ca²⁺를 가한 혼합액 1.0 ml를 취하여 각 약물을 가하고 37°C에서 180분간 배양한 후 각 검액을 주입한 다음 진공펌프를 사용

하여 GF(glass fiber)/C filter(Whatman)상에 수집한 후 각 filter 분획에 ice-cold MGB 용액으로 3회 세정한 후 filter를 vial에 넣고 건조하여 여기에 protosol을 1.0 ml 첨가하고 55°C에서 10분간 shake water bath에서 가온용해를 행한 다음 각 vial에 9.0 ml의 scintillant(DPO 4g+POPOP 0.1 g/l xylene)를 넣어서 혼든 다음 liquid scintillation counter로 측정하였다.

용혈반형성세포(PFC)측정—항체생성 세포로부터 방출되는 항체가 주위의 항원 피복 적혈구에 결합하고 다시 보체가 결합함으로써 항원 피복 적혈구가 용혈을 일으키는 것(용혈반형성)을 지표로 하여 PFC를 산정하였다. 방법으로는 Cunningham chamber를 제작하여 진술한 용혈반형성을 slide glass상에 cover glass를 올려놓고 양면 tape로 접착해 사용하는 Cunningham 법⁴³⁾을 이용하였다. 먼저 적혈구는 신선한 면양적혈구(Sheep Red Blood Cell : SRBC)로서 1.0×10⁹ cell/ml를 0.2 ml씩 ICR 계통의 마우스에 복강내로 주입한 후 0.5~50 mg/kg의 GR을 0.2 ml씩 SRBC를 4일간 복강 주사하였다. 약물투여 5일째에 각 group의 마우스를 경추탈구시켜 죽인 후, 비장을 꺼낸 다음 각각의 비장으로부터 비장세포 현탁액을 조제(PBS로 3회 세척, 250×g, 5분간)하여 MEM으로 2.5×10⁶ cell/ml가 되도록 세포수를 조정하였다. 별도로 항원으로 사용한 SRBC를 PBS로써 50%(v/v) 용액으로 조제하여 eppendorf tube에 50 μl를 넣은 후, 다시 complement(guinea pig 신선혈청) 50 μl를 주입하고, 여기에 미리 조제한 비장세포 현탁액 0.4 ml를 첨가하여 pipette로 혼합시켰다. 간접법의 경우에는 여기에 항 mouse IgG(goat anti mouse IgG serum) 혈청 0.1 ml를 첨가하고, 직접법의 경우는 IgG 혈청 대신에 MEM 0.1 ml를 넣어 혼합시켰다(total 0.6 ml). 이렇게 하여 혼합된 검액을 0.1 ml를 취하여 미리 제작하여 둔 Cunning ham chamber의 3실에 균일하게 주입시켰다. 주입이 끝나면 chamber의 양쪽을 가온용해한 유동 paraffin으로 밀봉한 후, 수평상태를 유지시키면서 37°C의 배양기내에서 1시간 동안 배양하고 곧바로 4°C의 cold chamber에서 30분간 넣어 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 chamber내의 용혈반수 1×10⁶개의 비장세포당 항체 생성세포로 산출하였다.

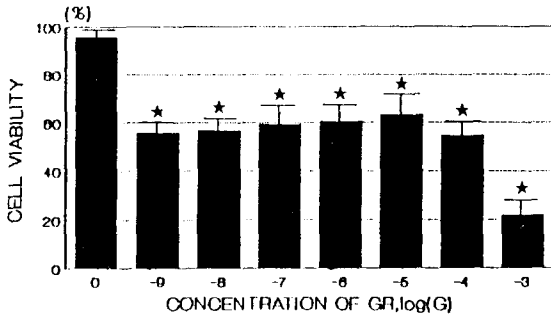


Fig. 1—Effect of Glycyrrhizae Radix extract (GR) on the cell viability in cultured mouse spleen cells. Spleen cells obtained from 2 to 3 month-old C57BL/6 mice of both sexes were cultured in flat-bottomed microtiter plates in RPMI 1640 containing 5% fetal calf serum. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ incubator. After 48 hr. of incubation, cell viability was determined by trypan blue dye staining. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.

★ : (P < 0.05); Significantly different from RPMI 1640 medium-treated control group

항체생성세포 = 용혈반수 × 0.6 (총액량) / 0.1
(실제측정량) × 비장세포 회석률

통계분석—실험은 각각 3반복으로 수행하여 평균치 S.E.로 표시하였으며 유의차 검정은 Student's t-test⁴⁴⁾로 행하였다.

결과 및 고찰

비장세포 생존률에 미치는 효과—Fig. 1은 비장세포 배양계에 GR을 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 세포생존률을 검토한 것이다. GR은 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ 및 10⁻³ g/ml의 농도에서 각각 55.9 ± 4.9, 56.9 ± 5.4, 59.5 ± 6.3, 60.5 ± 5.0, 63.3 ± 5.9, 54.8 ± 6.9 및 21.9 ± 4.6%의 세포생존률을 나타냈다. 이상의 결과에서 비장세포 배양계에 미치는 영향은 GR은 10⁻³ g/ml에서 세포생존률이 50% 이하로 현저히 억제되었으며, 이는 고농도에서 세포독성을 나타내고 있는 것으로 추정된다. 따라서 본 실험에서는 GR은 10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ g/ml의 농도에서 실험을 수행하였다.

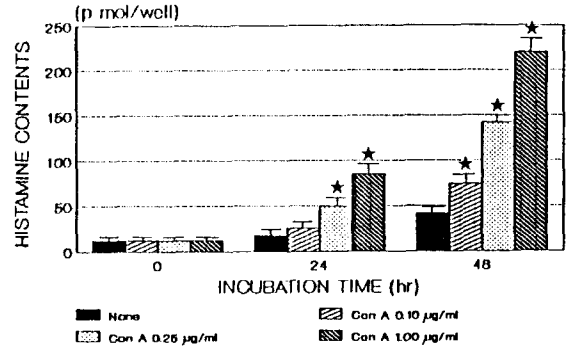


Fig. 2—Effect of Concanavalin A on histamine content in the cultured C57BL/6 mouse splenocytes. Spleen cells (5 × 10⁵ cells/well) were cultured in a serum free synthetic GIT medium. The cells were cultured at 37°C in a humid CO₂ incubator and harvested by centrifugation at 250 × g, 5 min. Histamine contents in the culture medium were assayed by enzymatic-isotopic method. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.

★ : (P < 0.05); versus Con A-stimulated groups

비장세포의 histamine 생성에 미치는 효과—Fig. 2는 마우스 비장세포의 배양계를 이용하여 24 및 48 시간 동안 배양한 후의 histamine 생성량을 측정된 결과로 비장세포 배양계에 Con A 0.1 µg/ml를 첨가하면 histamine량은 24 및 48시간에서 각각 26 ± 3.0 및 74 ± 6.3 pmol/well로, Con A 0.25 µg/ml에서는 50 ± 4.2 및 142 ± 7.8 pmol/well 그리고 Con A 1.0 µg/ml에서 85 ± 6.8 및 220 ± 12.5 pmol/well로 농도와 시간경과에 따라 histamine량이 증가됨을 알 수 있으며, Con A의 농도가 0.25 µg/ml 이상에서 histamine량이 유의성 있게 증가되었으며, 48시간 배양시 더욱 증가되었기에 Con A의 농도를 0.25 µg/ml로 하였고 배양시간은 48시간으로 하여 실험조건을 정하였다.

Fig. 3은 Fig. 2와 같은 배양계에 있어서의 histamine 생성에 미치는 감초엑스의 영향을 검토한 성적이다. 비장세포 배양계에 Con A 0.25 µg/ml를 첨가하였을 때 histamine량은 35.0 ± 1.0 (cpm × 10⁻³/well)이었으며 GR 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml 각 농도에 의한 histamine량은 각각 25.5 ±

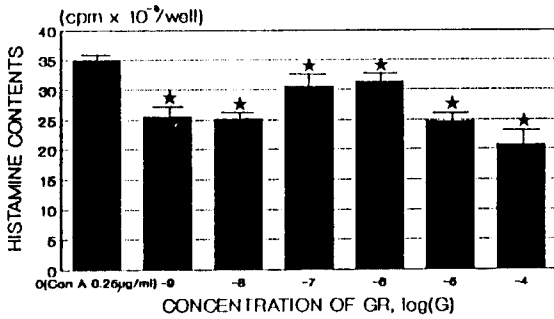


Fig. 3—Effect of GR on histamine production in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells, 5×10^5 cells/well were cultured in 24 well culture dish with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.25 µg/ml) was added with varying doses of GR at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% O₂-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, histamine contents were determined by enzymatic-isotopic assay. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.

★ : (P<0.05); Significantly different from Con A-treated control group

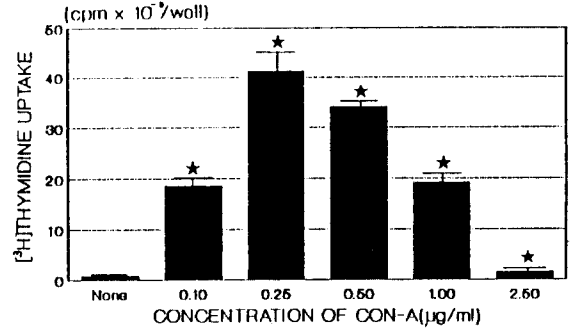


Fig. 4—Effect of Concanavalin A on blastogenesis in cultured C57BL/6 mouse splenocytes. Mouse spleen cells (5×10^5 cells/well) were cultured in a 5% FCS-RPMI 1640. Con A added with various doses of 0.1~2.5 µg/ml at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂-incubator. After 48 hr of incubation, 10 µl of 0.5 µCi [6, ³H] thymidine was added for overnight pulsing. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of 3 assays.

★ : (P<0.05); control versus Con A-stimulated groups

1.5, 25.2 ± 1.0, 30.6 ± 1.8, 31.3 ± 1.1, 24.7 ± 1.2 및 20.7 ± 2.3 (cpm × 10⁻³/well)이었다. 이상의 결과는 GR이 비장세포 배양계의 histamine 생성을 억제하였는데 이는 T세포 및 macrophage의 활성을 억제하여 면역 억제작용을 나타내고 있음을 시사하며, 이는 glucocorticoid가 비장세포 배양계에서의 histidine decarboxylase 유도에 의하여 생성된 내인성의 histamine을 억제한다는 보고⁴⁵⁾와 유사한 결과로서 GR의 corticoid-like effect가 아닌가 추정된다.

임파구증식 반응에 미치는 효과—Fig. 4는 마우스 비장세포 배양계를 이용하여 임파구 증식반응을 검토한 것으로, 본 실험에서는 임파구 증식반응에 미치는 T임파구 mitogen(활성화제)인 Con A의 농도를 정하기 위해 Con A를 사용하여 [³H]-thymidine uptake의 양을 측정된 결과, [³H]-thymidine uptake의 양이 Con A 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 및 2.5 µg/ml를 첨가하면 각각 18.5 ± 2.4, 41.2 ± 3.2, 34.0 ± 1.1, 19.2 ± 1.8 및 1.5 ± 0.2 (cpm × 10⁻³/well)이었다. 따라서 Con A의 optimum dose를 0.25 µg/ml로, suboptimum dose를 0.1 µg/ml로 정하여 다음의 실험을 행하였다.

Fig. 5에는 임파구 증식반응에 미치는 GR의 효과를 나타낸 것으로 비장세포 배양액에 Con A 0.25 µg/ml를 첨가하였을 때 [³H]-thymidine uptake는 71.4 ± 1.3 (cpm × 10⁻³/well)이었으며, GR은 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml의 농도에서 76.4 ± 2.4, 72.1 ± 3.2, 75.0 ± 3.8, 68.8 ± 1.5, 63.5 ± 3.2 및 59.1 ± 1.0 (cpm × 10⁻³/well)로 10⁻⁵ g/ml 이상의 농도에서 [³H]-thymidine uptake를 감소시켰다. 이 결과는 GR이 Con A 의존성 임파구 증식반응을 지표로 한 세포성 면역능을 억제시키고 있는 것으로 사료되며, 또한 Con A 0.1 µg/ml를 첨가하였을 때 [³H]-thymidine uptake는 28.7 ± 1.3 (cpm × 10⁻³/well)이었으나 GR의 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml 농도에서 각각 32.7 ± 1.7, 28.3 ± 1.8, 28.3 ± 1.9 및 30.2 ± 2.8 (cpm × 10⁻³/well)로서 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 6).

IL-1 활성에 미치는 효과—IL-1은 주로 macrophage에서 생성되어 T세포의 활성화에 영향을 미치는 cytokine으로 알려져 있다.⁴⁵⁾ Fig. 7은 macrophage-like cell line인 P388D₁ 세포에서 생성되는 IL-1 활성에 미치는 GR의 영향을 검토한 것이다. P388D₁

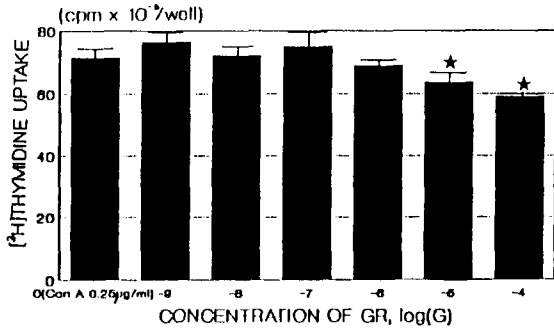


Fig. 5—Effect of GR on the optimum dose of Con A (0.25 µg/ml)-dependent lymphocyte blastogenesis in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells were cultured in flat-bottomed microtiter plates with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.25 µg/ml) was added with varying doses of GR at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% air-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, 10 µl of [6. ³H] thymidine (0.5 µCi) was added for overnight pulsing. The cells were harvested on a cell harvester and cell-associated radio activity was counted in a liquid scintillation counter. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.

★ : (P<0.05); Significantly different from Con A-treated control group

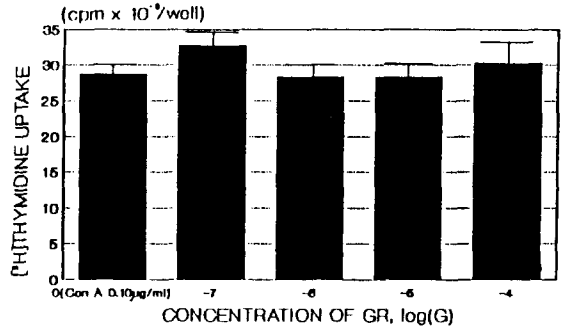


Fig. 6—Effect of GR on the suboptimum dose of Con A (0.1 µg/ml)-dependent lymphocyte blastogenesis in cultured mouse spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells, 5 × 10⁵ cells were cultured in flat-bottomed microtiter plates with 5% FCS-RPMI 1640. Con A (0.1 µg/ml) was added with varying doses for GR at the beginning of the culture. The plate was incubated at 37°C in a humid atmosphere of 95% air-5% CO₂. After 48 hr. of incubation, 10 µl of [6. ³H] thymidine (0.5 µCi) was added for overnight pulsing. The cells were harvested on a cell harvester and cell-associated radio activity was counted in a liquid scintillation counter. Each point with vertical bar represents the mean ± S.E. of three assays.

로부터의 IL-1 activity는 대조군(PHA 5 µg/ml)에서 4.9 ± 0.6(cpm × 10⁻³/well)이었고, GR 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴ g/ml 농도에 의한 IL-1 활성은 1.7 ± 0.2, 1.7 ± 0.1, 2.5 ± 0.3, 2.0 ± 0.3 및 2.4 ± 0.2 (cpm × 10⁻³/well)로 Gr의 전농도에서 IL-1 활성이 유의성 있게 억제되었다. GR이 macrophage에서 생성되는 IL-1을 억제시킨다는 것은 전술의 T세포에 의한 세포성 면역능 억제효과와 관련이 있는 것으로 사료되며, 결과적으로 T세포의 기능을 억제시켜 면역억제 작용을 나타내는 것으로서 이 결과 또한 hydrocortisone 등이 T세포에 의한 IL-1 활성억제 효과가 있다는 보고⁴⁶⁾와 관련이 있는 것으로 추정된다.

Ca²⁺ uptake에 미치는 효과—Macrophage의 각종 면역기능에 영향을 미치는 요인의 하나로 세포외액으로부터의 Ca²⁺이 세포내로 유입됨으로서 signal이 된다고 알려져 있다.⁴⁷⁾ P388D₁ 세포로 유입되는 Ca²⁺

uptake는 6.8 ± 0.4(cpm × 10⁻⁴/well)이었으며 GR 10⁻⁹, 10⁻⁶ 및 10⁻⁴ g/ml 농도에 의한 Ca²⁺ uptake는 각각 5.7 ± 0.7, 6.8 ± 0.7 및 4.7 ± 0.4(cpm × 10⁻⁴/well)이었다(Fig. 8). Macrophage 활성화 경로에는 세포외로부터 세포내로의 Ca²⁺ 유입량이 증가됨이 알려져 있는데, GR은 Ca²⁺ 유입량에 큰 영향을 미치지 못했다. 이는 macrophage 활성화의 또다른 경로인 protein kinase C(PKC)의 활성화⁴⁸⁾와 관련이 있는 것으로 추정되나 추후 더 검토가 요망된다.

용혈반형성세포에 미치는 효과—본 실험은 GR의 항체생성 능력에 미치는 영향을 검토하기 위하여 용혈반형성세포측정 방법으로 IgM과 IgG를 동시에 측정하여 표시하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 IgM은 생리식염수만을 첨가한 대조군(1 × 10⁶ 비장세포)에서 57 ± 14개에 비하여 GR 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 및 50.0 mg/kg 투여군에서의 IgM은 각각 52 ± 21, 32 ± 11, 33 ± 7, 250 ± 45 및 126 ± 15개로 10.0 및 50.0 mg/kg을 투여한 군에서 항체생성이 유의하게 증가되었으며 1.0

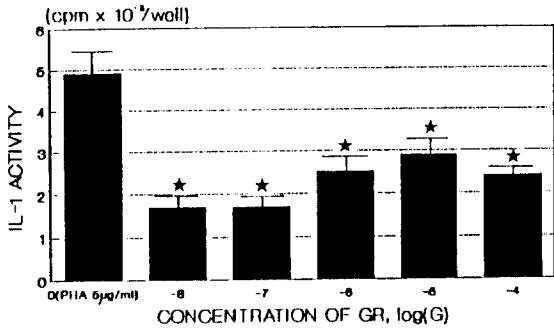


Fig. 7—Effect of GR on interleukin-1 production in macrophage-like P388D₁ cells. P388D₁ murine macrophage cell line, 2.5×10⁶ cells/ml/well were cultured in a φ 35 mm culture dish with 5% FCS-RPMI 1640. Various dose of GR were added to culture plate. The plate was incubated at 37°C CO₂ incubator. After 24 hr. of incubation, cell-free supernatant was used by IL-1 sample. IL-1 activity assayed for stimulation of C3H/HeJ mouse thymocyte proliferation. Each point with vertical bar represents the mean±S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from PHA-treated control group

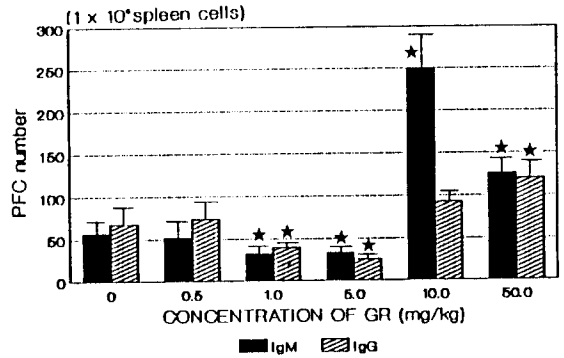


Fig. 9—Effect of GR on direct or indirect hemolytic plaque assay. Mice were injected i.p. with 2.0 ×10⁸ cells/0.2 ml of SRBC and injected i.p. with GR of 0.5-50 mg/kg/day for 4 days. After 5 days, the mice were decapitated and the spleen removed quickly, spleen cells were suspended in 10% FCS-RPMI 1640 medium for the hemolytic plaque assay. Values are mean±S.E. of 3 mice.
★ : (P<0.05); Significantly different from saline-treated control group

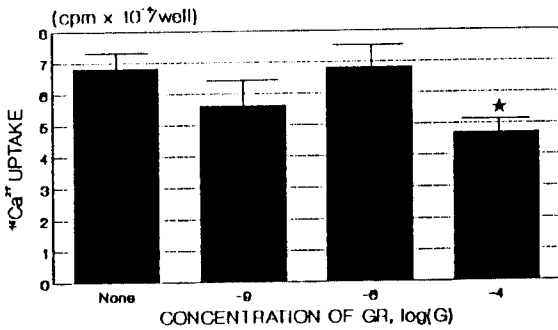


Fig. 8—Effect of GR on ⁴⁵Ca²⁺ uptake to a P388D₁ cells. Net ⁴⁵Ca²⁺ uptake by P388D₁ cells (1×10⁶ cells/well) was determined by the addition of 5 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ to a cell suspension. At confluency, the adherent cells were harvested in modified Gey's buffer solution at 4°C. Cells were kept at 4°C until used. ⁴⁵Ca²⁺ efflux was measured by rapidly warming the cells to 37°C, the addition of sample or MGB only. Each point with vertical bar represents the mean ±S.E. of three assays.
★ : (P<0.05); Significantly different from MGB-treated control group

및 5.0 mg/kg 투여군에서는 항체생성이 유의성 있게 억제되었다. IgG는 대조군 68±18개에서 약물의 용량에 따라 각각 74±17, 40±4, 25±3, 93±15 및 120±17개로서 50.0 mg/kg을 투여한 군에서 유의한 상승이 관찰되었으며 1.0 및 5.0 mg/kg을 투여하면 오히려 억제되었다. 이상의 결과, GR은 10.0 mg/kg 이상의 고농도 투여군에서 유의하게 항체생성을 촉진시키며, 1.0 및 5.0 mg/kg 투여군에서 IgG 항체생성을 억제하였다. 이는 감초 성분에 항체생성억제 능력이 있다는 보고⁴⁹⁾와 약간 상이한 결과를 나타내고 있으나 본 연구 결과에 의하면 항체 생성증강 능력도 일부 보유하고 있다고 추정된다.

결 론

50% 메탄올로 추출한 감초 엑스(GR)의 면역조절 작용에 미치는 효과를 검토하기 위하여 C57BL/6 마우스 비장세포에서의 histamine 생성과 T세포의 증식반응, macrophage-like P388D₁ 세포로부터 interleukin-1 활성과 Ca²⁺ uptake 측정 및 B세포로부터의 항체(IgM, IgG) 생성능력을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GR 10^{-3} g/ml 이상의 농도에서 비장세포를 48 시간 배양하였을 때의 세포생존률은 50% 이상의 세포독성을 나타내었다.

2. 비장세포 배양시의 histamine 생성량은 Con A 0.25 μ g/ml를 가하여, 48시간 배양하였을 때 유의성 있게 증가하였다.

3. Con A 의존성 T세포 증식반응은 Con A 0.25 μ g/ml에서 가장 촉진되었다.

4. GR은 histamine 생성을 전농도(10^{-9} ~ 10^{-4} g/ml)에서 유의성 있게 억제하였고, Con A(0.25 μ g/ml) 의존성 T임파구 증식반응은 GR 10^{-5} g/ml 이상의 고농도에서 억제되었으며, macrophage에서의 IL-1 생성을 전농도에서 유의성 있게 억제시켰다. 또한 GR은 macrophage로의 Ca^{2+} uptake에 영향을 미치지 못했으며, GR은 10.0 mg/kg 이상의 농도에서 항체생성을 유의성 있게 증가시켰으나 1.0 및 5.0 mg/kg의 농도에서는 억제시켰다.

이상의 결과 감초엑스는 T세포가 주도하는 세포성 면역 반응을 억제시켰고, B세포의 항체생성 능력을 농도차에 의하여 조절하였다.

감사의 말씀

본 실험을 수행하는데 협조하여 주신 일본 나고야 대학 생화학제어실 Nakano 박사에게 감사드립니다.

문헌

- Sotomatsu, S., Takaishi, Y., Hiroi, J., Namikata, A. and Okano, N.: Glycyrrhizin and skin. *Skin and Urology* **21**, 138(1955).
- Kumagai, A., Yano, S., Otomo, M. and Takeuchi, K.: Study on the corticoid-like action of Glycyrrhizin and the mechanism of its action. *Endocrinol. Japan* **4**, 17(1957).
- Kumagai, A., Asanuma, Y., Yano, S., Takeuchi, K., Morimoto, Y., Uemura, T. and Yamamura, Y.: Effect of Glycyrrhizin on the suppressive action of cortisone on the pituitary adrenal axis. *Endocrinol. Japan* **13**, 234(1966).
- Kumagai, A., Nishino, K., Yamamoto, M., Nanaboshi, M. and Yamamura, Y.: An inhibitory effect of glycyrrhizin on metabolic action of cortisone. *Endocrinol. Japon.* **13**, 416(1966).
- Finney, R.S.H. and Somers, G.F.: The antiinflammatory activity of Glycyrrhetic acid and derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **10**, 613(1958).
- Finney, R.S.H. and Tarnoky, A.L.: The Pharmacological properties of Glycyrrhetic acid hydrogen succinate. *J. Pharm. Pharmacol.* **11**, 49(1958).
- Tnagri, K.K., Seth, P.K., Surendra, Parmar, S. and Bhargava, K.P.: Biochemical study of antiinflammatory and antiarthritic properties of Glycyrrhetic acid. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1277(1965).
- Takagi, K. and Ishii, Y.: Peptic ulcer inhibiting properties of a new fraction from Licorice root(F_M 100). *Arzneimittel Forschung*, **18**, 53(1968).
- Fujisawa, K., Watanabe, Y. and Kimura, K.: Therapeutic approach to chronic active hepatitis with Glycyrrhizin. *Asian Med. J.* **23**, 745(1980).
- Iso, T., Nakajima, N., Suda, H., Yamauchi, H. and Uda, K.: Passive anaphylaxis in rat conjunctiva and topical effects of anti-allergic agents hypersensitivity in conjunctiva and drug efficacy. *Ophthalmic Res.* **12**, 9(1980).
- Inoue, H., Mori, T., Shibata, S and Saito, H.: Pharmacological activities of Glycyrrhetic acid derivatives: Analgesic and antitype IV allergic effects. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3888(1987).
- 鈴木 廣, 太田 康幸, 龍野 辰朗, 藤澤 例, 平山千里, 清水直容, 麻生芳朗: 慢性 肝炎に對する 治療効果. *醫學* **102**, 562(1977).
- 態谷 郎: Glycyrrhizin의 作用 に對する機序. *Minophagen Med. Rev.* **23**, 181(1978).
- 淺沼 克次, 植村 泰三, 藤井 隆: Glycyrrhizin の生理·藥理作用. *日生病院 醫學雜誌* **4**, (1976).
- Yamamoto, S. and Maekawa, A.: Rhinshi Naika Shonica(Clinical Medicine and Pediatrics) **13**, 73 (1958).
- Abe, N., Ebina, T. and Ishida, N.: Interferon induction by Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.* **26**, 535 (1982).
- Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiya, M., Tanaka, T. and Minamoto, S.: Effects of saponins from ginseng and bupleurum, extracts from XIAO-CHAI-HU-TANG and GUI-ZHI-FU-LING-WAN, on blood lipoproteins, apoproteins and pros-

- tanoids and on hepatic lipids in experimental hyperlipidemia. *和漢醫藥學會誌* **2**, 377(1985).
- 18) Kato, M., Marumoto, M., Hayashi, M., Maeda, T. and Hayashi, E.: Pharmacological studies on Saiko-Prescriptions. V. Effect of SHO-SAIKO-TO on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Yakugaku Zasshi* **104**, 798(1984).
- 19) Yamamoto, M., Takeuchi, N., Kotani, S. and Kumagai, A.: Effects of glycyrrhizin and cortisone on cholesterol metabolism in the rat. *Endocrinol. Japon.* **17**, 339(1970).
- 20) Okamoto, H., Yoshida, D., Saito, Y. and Mizusaki, rhizae Radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**(1), 37(1989).
- 32) 殷載淳, 崔東成, 全 焄, 安文生: 甘草엑스의 抗炎 및 抗潰瘍 作用에 대한 機轉. 全州又石大學論文集 **11**, 31(1989).
- 33) Busse, W. and Sosman, J.: Decreased H2 histamine response of glanulocyte of asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* **56**, 1080(1977).
- 34) Hosoda, S., Ikedo, I. and Sato, T.: Praomys(Mastomys) natalensis: animal model for study of histamine-induced duodenal ulcers. *Gastroenterol.* **80**, 16(1981).
- 35) Leoutsakos, A. and Pearce, F.L.: The effect of adenosine and its analogues on cyclic AMP changes and histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated by various ligands. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1373(1986).
- 36) Oh, C.H., Suzuki, S., Nakashima, I., Yamashita, K. and Nakano, K.: Histamine synthesis by non-mast cells through mitogen-dependent induction of histidine decarboxylase. *Immunol.* **65**, 143(1988).
- 37) Evans, R. and Alexander, P.: *In Immunology of the macrophage*, Nelson D.S.(ed). Academic press, p.535(1976).
- 38) Hyslop, P.H., Hinshaw, D.B., Schraufstaetter, I.V., Sklar, L.A., Spragg, R.G. and Cohran, C.G.: Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D₁ cells. *J. Cell. Physiol.* **129**, 356(1986).
- 39) 今井 勝行, 川口 進, 原田 孝之: 細胞免疫實驗造作法. 理工學社, 東京, p.15(1979).
- 40) Shaff, R.E. and Beaven, M.A.: Increased sensitivity of the enzyme isotope assay of histamine; Measurement of histamine in plasma and serum. *Anal. Biochem.* **94**, 425(1979).
- 41) Janossy, G., Greaves, M.F., Doenhoff, M.J. and Snajdr, J.: Lymphocyte activation V. Quantitation of the proliferative response to mitogens using defined T and B cell populations. *Clin. Exp. Immunol.* **14**, 581(1973).
- 42) Mizel, S.B., Openhein, J.J. and Rosenstreich, D.L.: Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) production by macrophage cell line P388D₁. *J. Immunol.* 120(1949).
- 43) Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol.* **14**, 599 (1968).
- 44) Dowdy, S. and Wearden, S.: *Statistics for research*. Wiley, New York, p.262(1983).
- 45) Oh, C.H. and Nakano, K.: Inhibition by glucocorticoids of mitogen-dependent histamine biosynthesis S.: Inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis by sweetening agent and related compounds *Cancer Letters* **21**, 29(1983).
- 21) Okamoto, H., Yoshida, D. and Mizusaki, S.: Inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced induction in epstein-barr virus early antigen in Raji cells. *Cancer Letters* **19**, 27(1983).
- 21) Hosokawa, Y., Megumi, T. and Kinoshita, S.: Radio-protective effects of ANCHU-SAN and its constituents on survival of mice. *Annual Report of the radiation center of Osaka Prefecture* **25**, 59(1985).
- 23) Takagi, K. and Harada, M.: Pharmacological studies on herb pacony root. I. Central effects of paeoniflorin and combined effects with Licorice component F_M 100. *Yakugaku Zasshi* **89**, 879(1969).
- 24) Aida, K., Shindo, H., Tawata, M. and Onaya, T.: Inhibitor of aldose reductase activities by KAMPO medicines. *Planta Medica* **53**, 131(1987).
- 25) Aida K., Tawata M., Shindo H., Onaya T. and Sasaki H.: The existence of aldose reductase inhibi-

- tors in some KAMPO medicines oriental herb prescription. *Planta Medica* **55**, 22(1989).
- 26) Pompei, R., Flore, O., Marcciaalis, M.A., Pani, A. and Loddo, B.: Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* **281**, 689(1979).
- 27) Nakashima, H., Matsui, T., Yoshida, O., Isowa, Y., Kido, Y., Motoki, Y., Shigeta, S., Mori, T. and Yamamoto, N.: A new antihuman immunodeficiency virus substance, Glycyrrhizin sulfate: Endowment of Glycyrrhizin with reverse transcriptase inhibitory activity by chemical modification. *JPN. J. Cancer Res.(GANN)* **78**, 767(1987).
- 28) Inoue, H., Saito, H., Koshihara, Y. and Murota, S.: Inhibitory effect of Glycyrrhetic acid derivatives on lipooxygenase and prostaglandin synthetase. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(2), 897(1986).
- 29) Inoue, H., Mori, T., Shibata, S. and Koshihara, Y.: Inhibitory effect of Glycyrrhetic acid derivatives on arachidonic acid induced mouse ear oedema. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 272(1988).
- 30) Tanaka, S., Takahashi, A., Onoda, K., Kawashima, K., Nakaura, S., Nagao, S., Ohno, Y., Kawanishi, T., Nakaji, Y., Kobayashi, K., Suzuki, S., Naito, S., Uchida, O., Yasuhara, K., Tatada, K., Saito, M., Sekita, S., Ozaki, Y., Suzuki, H., Takanaka, A., Tobe, M. and Harada, M.: Toxicological studies on biological effects of the herbal drug extracts in rats and mice. *Yakugaku Zasshi* **1060**, 671(1986).
- 31) Eun, J.S., Oh, C.H. and Han, J.H.: Effect of Glycyrrhizin caused by histidine decarboxylase in cultured mouse spleen cells and peritoneal adherent cells. *Immunol.* **65**, 433(1988).
- 46) Tracey, D.E., Hardee, M.H., Richard, K.A. and Paulay, J.W.: Pharmacological inhibition of interleukin-1 activity on T cells by hydrocortisone, cyclosporine, prostaglandins and cyclic nucleotides. *Immunopharmacol.* **15**, 47(1988).
- 47) Somers, S.D., Weifl, J.E., Hamilton, T.A. and Adams, D.O.: Phorbol esters and calcium ionophore can prime peritoneal macrophages for tumor cell destruction. *J. Immunol.* **136**, 4199(1986).
- 48) Shinomiya, H. and Nakano, M.: Calcium ionophore A23187 does not stimulate lipopolysaccharide non responsive C3H/HeJ peritoneal macrophages to produce interleukin-1. *J. Immunol.* **139**, 2730(1987).
- 49) 中島松一, 李天培, 大浦彦吉: “甘草成分の抗體生産抑制” 第3回 和漢藥 Symposium 記録, 東京, p.98-103(1969).