J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 16, No. 1, pp 39-45, 2000

팔선양조용수의 세균내독소와 카드뮴에 대한 해독효과(II)

한두석 · 김진선 · 한종현* · 이호섭** · 김지주*** · 강길웅**** · 백승화****
원광대학교 치과대학 구강해부학교실, *한의학전문대학원 약리학교실, **생리학교실
****천연물학교실, ***전북 부안군 상서면 변산 팔선약주협회

Antitoxic Effects of Palsun Brewing Water against Bacterial Endotoxin and Cadmium Induced Cytotoxicity

Du Seok Han, Jin Sun Kim, Jong Hyun Han*, Ho Sub Lee**, Ji Ju Kim***,
Kil Ung Kang**** and Seung Hwa Baek****

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry
**Department of Pharmacology, **Department of Physiology, and*
*****Department of Natural Products, Professional Graduate School of*
Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
****Byunsan Palsun Brewing Association, Sangseomyon,*
Buangun Chonbuk, 570-860, Korea
(Received Janrary 6, 2000)
(Accepted March 14, 2000)

ABSTRACT *: This study was carried out to evaluate antitoxic effects Palsun Brewing Water against cadmium by colorimetric methods. The antitoxic activity of Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide} and SRB (sulforhodamine B protein) assays. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of the treated cells. These results were obtained as follows: The concentration of 10^{-2} mg/ml of Palsun Brewing Water was shown significant antitoxic activity against E. coli endotoxin and Salmonella endotoxin. The number of NIH 3T3 fibroblasts were antitoxin and tend to regenerate. These results suggest that Palsun Brewing Water retains a potential antitoxic activity.*

Key Words *: Antitoxic effect, Palsun Brewing Water, MTT and SRB assays*

I. 서 론

환경오염의 지표가 되는 중금속과 그람음성균에 의한 독성은 인체의 건강에 지대한 영향을 미친다. 카드뮴(cadmium, Cd)은 납이나 아연광산의 광물 용해시 생성되는 부산물로서 산업에 사용하는 곳으로는 합금형성이나 전기도금, 페인트, 도자기 염료, 부식방지제, 카드뮴-니켈 전지, 살균제 등에 다양하게 쓰여지고 있으며, 그 소비량도 산업이 발달함에 따라 증가하고 있는 실정이다(Wilhan and Burson, 1985). 카드뮴은 노출되는 양과 형태(Dudley *et al.*, 1982), 폭로기간(Sendelbach *et al.*, 1988) 및 체내 유입경로 등에 따라 다양한 독성을 나타낸다. Gram 음성균의 대부분은 그 세포막에 복잡한 지질다당을 가지고 있는데 이러한 물질을 내독소(endotoxin)라 한다. 내독소는 가지각색의 병리생리학적 활성을 지니고 있다(Carr, 1982). 내독소를 동물 또는 사람에게 투여하면 대식세포계(macrophage system)에 섭취되어 파괴 또는 중화됨에 따라 발열, 백혈구감소증, 저혈당, 저혈압과 쇼크, 중요기관의 순환장애, C3 보체성분의 활성화, 혈액내 응고 및 사망을 일으킨다(Field, 1979; 고광균 등, 1985).

그람 음성균의 세포벽을 구성하는 성분 중 대표적인 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)는 강력한 면역조절 인자로써 T세포의 분열과 T세포의 분화 및 성숙을 자극하며(Peavy *et al.*, 1970; Gormus *et al.*, 1974; Adorini *et al.*, 1976; Vogel *et al.*, 1983), Con A(Con-canavalin A)에 대한 T세포반응의 증가와 세포독성의 증가(Schmidtke *et al.*, 1975; Naravanan *et al.*, 1978)를 일으킬 뿐만 아니라 활성대식세포에 의하여 interleukin 1(IL-1), interferon α

*To whom correspondence should be addressed

및 β, 그리고 prostaglandin과 같은 면역조절물질을 분비하도록 하고(Gery *et al.*, 1981; Blanchard *et al.*, 1986), pinocytosis를 촉진하며(Schubert *et al.*, 1980). 형질막의 효소를 활성화시켜 보체로 피막된 적혈구를 탐식하도록 자극한다(Nowakowski *et al.*, 1980). 또 tumor cytotoxicity를 유발하며(Ruco *et al.*, 1978), colony stimulating factor (CSF)의 생산을 증가시킨다(Moore *et al.*, 1980).

LPS는 성상세포를 자극하여 충분한 양의 prostaglandin E를 분비토록 함으로써 시험관내에서 흉선의 분화를 억제하고, 신경교세포와 신경교종세포를 자극하여 면역반응성 endorphin(Ir-endorphin)과 adrenocorticotrophin(ACTH)의 분비를 유도한다. 활성대식세포와 신경교종세포에서 분비하는 IL-1은 시상하부에서 corticosterone releasing factor (CRF)의 분비를 촉진하고 하수체전엽에서 ACTH의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있고(Gahring *et al.*, 1984; Scollay *et al.*, 1988), 최근에는 그람 음성균으로부터 다양한 내독소 또는 체외독소(exotoxin)을 분리해 내고 있다 (Singh and Sharma, 1998; Malik *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1992; Caprioli *et al.*, 1982).

본 연구는 팔선양조용수에 카드뮴과 그람음성균에서 분리한 내독소에 대한 해독효과를 측정할 목적으로 배양 NIH 3T3 섬유모세포에 카드뮴과 내독소 IC_{50}량을 투여하고 동시에 팔선양조용수를 투여한 후 독성시험에 가장 많이 이용되고 있는 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법으로 세포독성을 측정하였고 형태학적 관찰을 실시하여 수복효과를 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 검액조제

실험에 사용한 약재는 부안군 상서면에 자생하거나 재배한 4본 4근을 채취하여 음건한 4본 4근 8가지 약재를 4본은 1 kg씩을, 4근은 500 g씩을 지하수에 넣고 24시간 중간불로 달였다. 약 달이기는 75 *l*의 물이 졸아서 25 *l* (1/3)가 될 때까지 달여서 차게 식힌 후, 이 추출액(100 m*l*)을 여과지로 여과하고 여액을 감압농축하여, 흑갈색 추출물(1.31 g)을 얻었다(Han *et al.*, 1999)(Table 1).

Table 1. Prescription of materials of Palsun Brewing Water

四本名	生藥名	科名
오갈피	*Acanthopanax sessiliflovas*	두릅나무과
마가목(정공등)	*Sorbus commixta*	장미과
말오줌때(음정목)	*Euscaphis japonica*	고추나무과
개오동(노나무)	*Catalpa ouata*	능도화과
창출(삽주)	*Atractyodes japonica*	국화과
위령선	*Clematis florida*	미나리 아재비과
쇠무릎(우슬)	*Achyranthes japonica*	비름과
석장포	*Acorus gramineus*	천남성과

이창복, 1980; 신민교 등, 1997.

2. 시약

세포배양에 사용한 MEM(Minimum essential medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT 정량과 SRB 정량에 사용한 시약 카드뮴 *E. coli*(No L8274) 및 *Salmonella* endotoxin(No L6511)는 Sigma사에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

3. 실험기기

세포의 배양은 CO_2 incubator(Shellab Co., U.S.A.)를 사용하였으며. 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 이용하였다. MTT 정량, SRB 정량시 사용한 ELISA reader (SPECTRA max 250, Molecular Devices, U.S.A.)를 사용하였다.

4. 세포배양

세포독성을 측정하기 위하여 원광대학교 의과대학에서 분양받은 NIH 3T3 섬유모세포를 10% fetal bovine serum (Gibco, U.S.A.)과 penicillin G(25 unit/m*l*)를 첨가하여 사용하였다.

세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO_2 incubator, Shellab, U.S.A.)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

5. MTT 정량분석법

Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 각 well에 4×10^4 cells을 넣고 24시간 배양 후 카드뮴과 내독소 IC_{50}을 각각 넣은 후 동시에 팔선양조용수를 농도별(10^{-2}~10^{-5} mg/m*l*)로 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 μg/m*l*가 포함된 배양액을 well당 1 m*l*씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 m*l*/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A. 550 nm)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. SRB 정량분석법

Skehan *et al.*의 방법(1988)에 따라 세포를 각 well에 4×10^4 cells을 넣고 24시간 배양 후 카드뮴과 내독소 IC_{50}을 각각 넣은 후 동시에 팔선양조용수 10^{-2}~10^{-5} mg/m*l* 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B protein(SRB)를 200 μ*l*씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM tris base[tris(hydroxymethyl)aminomethane]로 결합된 protein stain을 녹인 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A. 550 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

7. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경적 관찰을 위하여 NIH 3T3 섬유모세포 및 인체 구강유상피암종세포는 각각 세포분주 후 팔선양조용수를 처리하여 MTT, SRB를 처리하기 전에 도립현미경(Inverted microscope olympus, Japan)으로 관찰하였다.

8. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에서는 팔선양조용수를 조제하여 카드뮴과 *E. coli*와 *Salmonella* endotoxin에 대한 해독효과를 측정하기 위하여 1차 검색방법인 비색 분석방법 중 가장 민감하고 안정한 방법인 MTT 정량 및 SRB 정량 분석법을 이용하여 실험한 결과는 Table 2-7과 같다.

NIH 3T3 섬유모세포를 여러 농도의 카드뮴으로 처리한 후, MTT 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 마이크로 몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, MTT 및 SRB의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며, IC(inhibitory concentraion)$_{50}$인 MTT_{50}은 33.04 μM 및 SRB_{50}은 54.72 μM이었다(Han *et al.*, 1998). NIH 3T3 섬유모세포에 MTT_{50} 농도인 33.04 μM의 카드뮴과 4종류(10^{-2} mg/m*l*~10^{-5} mg/m*l*)의 팔선양조용수 농도를 동시에 처리한 후, MTT 흡광도를 측정하여 MTT_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 팔선양조용수의 10^{-2} mg/m*l* 농도에서 통계적으로 유의성($p<0.05$)이 관찰되었으나, 다른 분석농도에서 통계적으로 유의성있는 해독효과를 관찰할 수 없었다(Table 2).

Table 2. The MTT absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT_{50})

Concentration (mg/m*l*)	MTT quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	3.60±0.02	100.0
IC_{50}	2.02±0.14	56.0
10^{-2}	2.44±0.09	67.6[b]
10^{-3}	2.06±0.01	57.2
10^{-4}	1.64±0.06	45.6
10^{-5}	1.42±0.06	39.2

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA

[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.

Significantly different from the control value. [b]$P<0.05$ (Student's t-test).

핵 내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여 SRB량을 측정한 결과, NIH 3T3 섬유모세포에 IC_{50} 농도인 54.72 μM의 카드뮴과 4종류(10^{-2} mg/m*l*~10^{-5} mg/m*l*)의 팔선양조용수를 동시에 처리한 후, SRB 흡광도를 측정하여 SRB_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 팔선양조용수의 10^{-2} mg/m*l*과 10^{-3} mg/m*l* 농도에서 통계적으로 84.5%($p<0.01$)과 73.1%($p<0.05$)로 유의성있는 해독효과를 나타냈으나, 다른 분석농도에서는 통계적으로 유의성있는 해독효과를 관찰할 수 없었다(Table 3). 이는 카드뮴 IC_{50} 농도에 대하여 팔선양조용수 10^{-2} mg/m*l* 농도에서 유의성있는 해독효과가 나타난 것으로 판단할 수 있다.

E. coli endotoxin과 4종류(10^{-2} mg/m*l*~10^{-5} mg/m*l*)의 팔선양조용수를 처리한 후, MTT 흡광도를 측정하여 MTT_{50}군(2.13±0.11)의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 모든 분석농도에서 통계적으로 유의성($p<0.05$)있는 해독효과를 나타냈으나, SRB 흡광도를 측정하여 SRB_{50}군(10.85±0.18)의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 팔선양조용수의

Table 3. The SRB absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (SRB_{50})

Concentration (mg/m*l*)	SRB quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	2.98±0.06	100.0
IC_{50}	1.68±0.24	56.3
10^{-2}	2.52±0.02	84.5[b, *]
10^{-3}	2.18±0.09	73.1[b]
10^{-4}	2.07±0.05	69.3
10^{-5}	2.04±0.01	68.6

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA

[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.

Significantly different from the control value: [b]$P<0.05$, ***$P<0.001$ (Student's t-test)

Table 4. The MTT absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with *E. coli* endotoxin (MTT_{50})

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D [a]	% of control
Control	4.15±0.00	100.0
$Endo(E)_{50}$	2.13±0.11	51 4
10^{-2}	2.62±0.24	63 3*
10^{-3}	2.62±0.01	63.1*
10^{-4}	2.46±0.16	59.3*
10^{-5}	2.36±0.07	57.0*

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA.
[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.
Significantly different from the control value: *P<0.05 (Student's t-test)

Table 5. The SRB absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with *E. coli* endotoxin (SRB_{50})

Concentration (mg/ml)	SRB quantity	
	Mean±S.D [a]	% of control
Control	2.93±0.06	100.0
$Endo(E)_{50}$	0.85±0.18	29.0
10^{-2}	2.08±0.36	71.0***
10^{-3}	1.42±0.23	48.4**
10^{-4}	1 24±0.26	42.4*
10^{-5}	0.90±0 26	30.8

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA.
[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.
Significantly different from the control value: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Student's t-test).

Table 6. The MTT absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with *Salmonella* endotoxin (MTT_{50})

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	3.88±0.01	100.0
$Endo(S)_{50}$	2.10±0.06	54 2
10^{-2}	2.54±0.04	65.4*
10^{-3}	2.20±0.11	56.6
10^{-4}	2.16±0.07	55.7
10^{-5}	2.11±0.05	54 4

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA.
[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.
Significantly different from the control value: *P<0.05 (Student's t-test).

Table 7. The SRB absorbance on Palsun Brewing Water in NIH 3T3 fibroblasts treated with *Salmonella* endotoxin (SRB_{50})

Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	4.15±0.00	100.0
$Endo(S)_{50}$	2 58±0 15	61.1
10^{-2}	3.49±0.01	84.3***
10^{-3}	2.18±0 09	80.5*
10^{-4}	2.07±0.05	79.9
10^{-5}	2.04±0.01	79.8

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA.
[a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments.
Significantly different from the control value: *P<0.05, ***P<0.001 (Student's t-test)

10^{-2} mg/ml, 10^{-3} mg/ml, 10^{-4} mg/ml 농도에서 통계적으로 71%(p<0.001), 48%(p<0.01), 42%(p<0.05)로 유의성있는 해독효과를 나타냈으며, 10^{-5} mg/ml 농도에서는 통계적으로 유의성있는 해독효과를 관찰할 수 없었다(Tables 4, 5). *E. coli* endotoxin에 대한 팔선양조용수의 해독효과는 카드뮴에 대한 해독효과보다 높다는 것을 의미한다.

Salmonella endotoxin과 4종류(10^{-2} mg/ml~10^{-5} mg/ml)의 팔선양조용수를 처리한 후, MTT 흡광도를 측정하여 MTT_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 모든 분석 농도에서 통계적으로 10^{-2} mg/ml 농도에서 유의성(p<0.05)있는 해독효과를 관찰할 수 있었으나, SRB 흡광도를 측정하여 SRB_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 팔선양조용수의 10^{-2} mg/ml 농도와 10^{-3} mg/ml~10^{-5} mg/ml에서 통계적으로 84%(p<0.001)와 약 80%(p<0.05)로 유의성있는 해독효과를 관찰할 수 있었다(Tables 6, 7).

세포의 광학현미경적 관찰에서는 NIH 3T3 섬유모세포를 well에 넣고 24시간 배양하면 여러형태의 세포들이 층을 이룬다(Photos 1, 4). 카드뮴 IC_{50}량을 투여(Photo 2)하

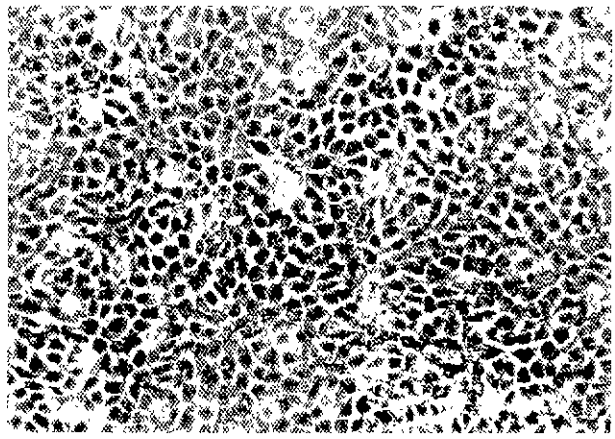

Photo 1. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 cells treated with MTT for an additional 3 hrs incubation medium (control) for 2 days ×200. Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.

거나 *E. coli* 또는 *Salmonella* endotoxin IC_{50}량을 투여(Photo 5)하면 세포수의 감소와 퇴행성변화가 뚜렷하고 카드뮴 IC_{50}량과 팔선양조용수 10^{-2} mg/ml을 동시에 투여

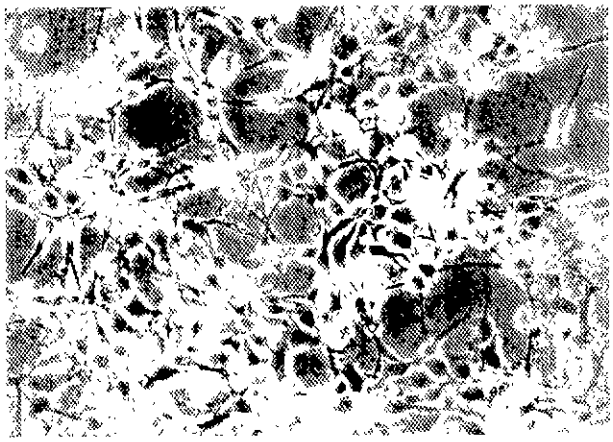

Photo 2. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in IC_{50} of cadmium containing medium for 2 days ×200. Number of cells were decreased and NIH 3T3 cells showed round shape

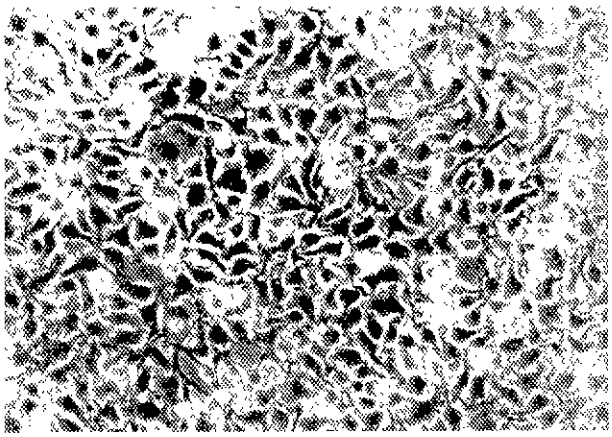

Photo 3. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 Cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation cadmium IC_{50} plus Palsun Brewing Water 10^{-2} mg/ml containing medium for 2 days ×200. Most cells showed regeneration and formed spindle cell.

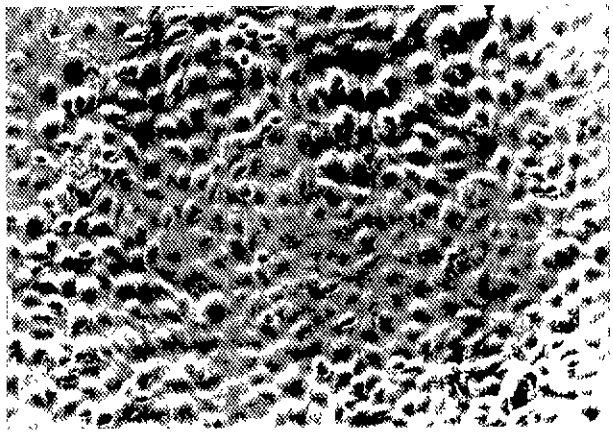

Photo 4. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 cells treated with MTT for an additional 3 hrs incubation medium (control) for 2 days ×150. Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.

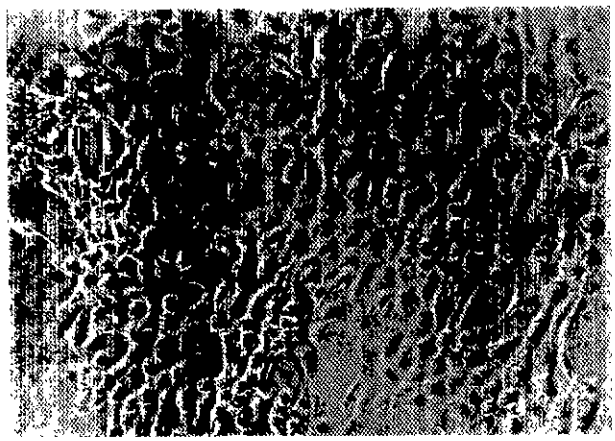

Photo 5. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in IC_{50} of *E coli* endotoxin containing medium for 2 days ×150. Number of cells were decreased and most cells showed degenerative change.

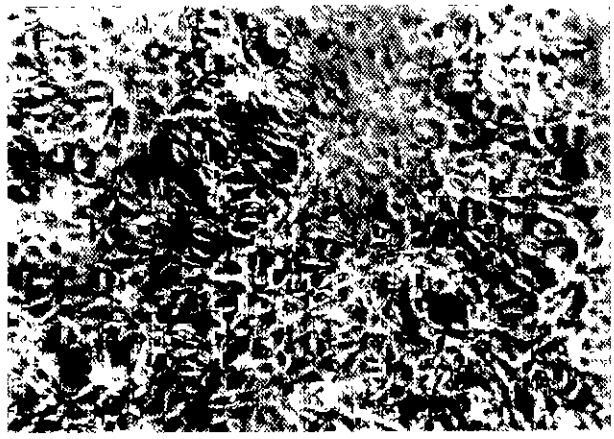

Photo 6. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation *E. coli* endotoxin IC_{50} plus Palsun Brewing Water 10^{-2} mg/ml containing medium for 2 days ×150. Most cells showed regeneration.

(Photo 3)하거나 *E. coli* 또는 *Salmonella* endotoxin IC_{50}량과 팔선양조용수 10^{-2} mg/ml을 동시에 투여(Photo 6)하면 세포수의 증가와 재생현상이 뚜렷하게 나타났다. 카드뮴, *E. coli* endotoxin 및 *Salmonella* endotoxin에 대한 팔선양조용수의 해독효과는 4본 4근 중 개오동의 약리효과로 인정할 수 있으나(이창복, 1980년; 신민교 등, 1997) 개오동 나무에 대한 약리효과 뿐만 아니라 나머지 4본 4근에 대하여 각각에 대한 약리효과도 계속 연구할 계획이다.

IV. 요 약

카드뮴, *E. coli* endotoxin과 *Salmonella* endotoxin이 NIH 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, 카드뮴 IC_{50}(MTT_{50} 및 SRB_{50})에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬

유모세포를 해독시킬 수 있는 물질을 창출할 목적으로 본 연구를 수행하였다. 실험은 배양액만으로 배양한 군을 대조군, 세포독성실험에 의하여 결정된 IC_{50} 농도의 카드뮴과 4종류의 팔선양조용수를 각각 배양액에 넣어 배양한 군을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 군은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT량 및 SRB량을 측정하고 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 팔선양조용수는 *E. coli* endotoxin에 대하여 해독경감효과가 높게 나타났고, 카드뮴과 *Salmonella* endotoxin에 대하여도 10^{-2}mg/ml 농도와 10^{-3}mg/ml 농도에서 유의한 해독효과를 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 전라북도후원, 의약자원연구센터의 연구지원(98-16-01-04-A-3)과 BK 21 사업지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사한다.

참고문헌

Adorini, L., Ruco, L., Uccini, S., Soravito de Francescha, G., Baroni, C.D. and Doria, G. (1976): Biological effect of *Escerichia coli* lipopolysaccharide (LPS) *in vivo*. II. Selection in the mouse thymus of PHA and Con A responsive cells, *Immunology.*, **31**, 225-232.

Blanchard, D.K., Djeu, J.Y., Klein, T.W., Friedman, H. and Stewart, W.E. (1986): Interferon-γ induction by lipopolysaccharide: defence on interleukin 2 and macrophages, *J. Immunol.*, **136**, 963-970.

Carr, D.B. (1982): Endotoxin-stimulated opioid peptide secretion, *Science.*, **217**, 845-848.

Caprioli, A., D'Agnolo, G., Falbo, V., Roda, L.G. and Tomasi, M. (1982): Isolation of salmonella wien heatlabile enterotoxin, *Microbiologic.*, **5**, 1-10.

Dudley, R.E., Svovoda, D.J. and Klaassen, C.D. (1982): Acute exposure to cadmium causes serve liver injury in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**, 302-313.

Field, M. (1979): Modes of action of enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*, *Rev. Infect. Dis.*, **1**, 918-926.

Gahring, L.C., Baltz, M., Pepys, M.B. and Daynes, R.A. (1984): Effect of ultraviolet radiation on production of epidermal cell thymocyte-activating factor interleukin 1 *in vivo* and *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 1198-1202.

Gery, I., Davied, P., Derr, J., Krett, N. and Barranger, J.A. (1981): Relationship between production and release of lymphocyte activating factor (interleukin 1) by murin macrophages. I. Effects of various agent cell, *Immunol.*, **64**: 293-303.

Gromus, B.J., Crandall, R.B. and Shands, J.W. (1974): Endotoxin-stimulated spleen cells: mitogenesis, the occurrence of the C3 receptor and the production of immunoglobulin, *J. Immunol.*, **112**, 770-775.

Han, D.S., Han, J.H., Yu, H., Kim, J.J., Kang, K.U. and Baek, S.H. (1999): The cytotoxicity and antitumor activity of Palsun Brewing Water, *J. Pharm. Soc. Korea*, **43**, 173-179.

Malik, P., Sharma, V.D. and Thapliyal, D.C. (1996): Partial purification and characterization of salmonella cytotoxin, *Vet. Microbiol.*, **49**, 11-19.

McMenamin, D.H., Smith, E.M. and Blalock, E. (1985): Bacterial lipopolysaccharide induction of Leukocyte-derived corticotrophin and endophins, *Infection and Immunity.*, **48**, 813-817.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63.

Naravanan, P.R., Kloehn, D.B. and Sundharadas, G. (1978). Immune response alloantigens *in vitro*, amplication of the development of cytotoxic T-lympocytes by lipopolysaccharide and polyadenylic: polyadenylic acid, *J. Immunol.*, **121**, 2502-2508.

Nowakowski, M., Edelson, P.J. and Bianco, C. (1980): Activation of C3H-HeN macrophages by endotoxin, *J. Immunol.*, **105**, 2189-2194.

Peavy, D.L., Adler, W.H. and Smith, R.T. (1970): The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes, *J. Immunol.*, **105**, 1453-1458.

Rahman, H., Singh V.D. and Sharma, V.D. (1994): Purification and characterization of entertoxic moiety present in cell-free culture supernatant of salmonella typhimurium, *Vet. Microbiol.*, **39**, 245-254.

Ruco, L.P., Meltzer, M.S. and Rosenstreich, D.L. (1978): Macrophage activation for tumor cytotocixity: Control macrophage tumor-cidal capacity by the LPS gene, *J. Immunol.*, **121**, 543-548.

Schmidtke, J.R. and Najarian, J.S. (1975): Synergistic effects of DNA synthesis of phytohemaglutinin or concanavalin A and lipopolysccharide in human peripheral blood lymphocytes, *J. Immunol.*, **114**, 742-746.

Schubert, R.D. and David, J.R. (1980): Stimulation of guinea pig macrophage pinocytosis by lipopolysaccharides (LPS): evidence that LPS acts directly on the macrophage cell. *Immunol.*, **55**, 166-173.

Scollay, Wilson, R., Amico, A.D., Kelly, A., Egerto, K., Pearse, M., Liwu, M. and Shortman, K. (1988): Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murin thymocytes, *Immunol. Rev.*, **10**, 81-120.

Sendelbach, L.E. and Klaassen, C.D. (1988): Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 95-102.

Sharma, V.D., Singh, S.P. and Taku, A. (1992): Purification of salmonella stanley enterotoxin and its immunology and dermatotoxicity, *Indian J. Exp. Biol.*, **30**, 23-25.

Singh, Y. and Sharma, V.D. (1998): Isolation and characterization of Salmonella enterica Weltevreden cytotoxin, *Indian J. Exp. Biol.*, **36**, 298-303.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visteca, D., Warren, J.T., Bokesch. H., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1988): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112.

Vogel. S.N., Hilfiker, M.L. and Caulfield, M.J. (1983).: Endotoxin-induced T-lymphocyte proliferation, *J. Immunol.*, **130**, 1774-1779.

Williams, P.L. and Burson, J.L. (1985): Industrial Toxicalogy. (eds) Van Nostrand Reinhold, pp. 197-210

고광균외 24인 공저 (1985): Review of Medical Microbiology. 의학미생물학., **16**. pp. 273-275.

이창복: 대한식물도감, 향문사 (1980).

신민교, 김창민, 안덕균, 이경순: 증약대사전, 도서출판 정담 (1997).

한두석, 이기남, 이종섭, 백승화 (1998): 포공령의 카드뮴에 대한 세포독성 억제효과, 약학회지., **42**, 307-311.