

원 저

皂角刺가 생쥐에 이식된 L1210 세포의 증식에 미치는 영향

조선경, 은재순, 김대근, 소준노¹⁾, 오찬호¹⁾, 송정모²⁾
우석대학교 약학대학, 이공대학¹⁾, 한의과대학²⁾

Effect of *Gleditsiae Spina* on Proliferation of Transplanted-L1210 cells in Mice

Sun-Kyung Cho, Jae-Soon Eun, Dae-Keun Kim, June-No So¹⁾, Chan-Ho Oh¹⁾, Jong-Mo Song²⁾

College of Pharmacy, College of Natural Science¹⁾ and College of Oriental Medicine²⁾, Woosuk University

Objectives : Cellular death by apoptosis is an active process, depending on gene transcription and protein synthesis. It was reported that nitric oxide can induce apoptosis in several cancer cell-lines. We have previously observed that proliferation of L1210 cells was inhibited by the administration of *Gleditsiae Spina* water extract (GE). In this present study, the mechanism of inhibitory action on the proliferation of L1210 cells was examined.

Methods : The cell proliferation was determined by MTT assay and DNA fragmentation was determined by a flow cytometry.

Results : The administration of GE decreased proliferation of L1210 cells and enhanced DNA fragmentation in vivo system. DNA fragmentation of L1210 cells was enhanced by co-culture of peritoneal macrophages obtained from GE-administered mice in vitro and it was partly inhibited by L-NMMA, nitric oxide synthetase inhibitor. In addition, GE increased nitric oxide production from peritoneal macrophages of L1210-transplanted mice.

Conclusions : These results suggest that the inhibitory action of GE on proliferation of transplanted-L1210 cells is partly caused by an induction of apoptosis via production of nitric oxide in macrophages. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(4):37-44)

Key Words: *Gleditsiae Spina*, DNA fragmentation, nitric oxide

서 론

조각자 (*Gleditsiae Spina*)는 주엽나무 (*Gleditsia japonica Miquel var. Koraiensis Nakai*)의 가시로써, 辛散하고 溫通하며 작용이 病所까지 닿으므로 托毒排膿, 活血消癰하는 효능이 있어 消瘡, 排膿, 癰疽腫

毒 등의 證을 다스리는데 사용하는 약물이다¹⁾. 조각자 물추출물은 항염증작용이 강력하다고 보고되었으며^{3,4)}, 조각자에 함유된 triacanthine은 심장혈액순환 촉진작용^{5,6)}, 암세포증식 억제작용이⁷⁾, *Gleditsia saponin C*는 HIV replication을 억제하는 작용⁸⁾ 있음이 보고되었다.

최근 강⁹⁾은 조각자 물 추출물을 생쥐에 투여시 복강 macrophage로부터 nitric oxide (NO)의 생성이 촉진됨을 보고하였다. NO는 L-arginine에 NO synthetase (NOS)가 작용하여 생성되며, 생성된 NO

· 접수 : 2001년 8월 6일 · 채택 : 9월 7일
· 교신저자 : 송정모, 전북 전주시 중화산동 2가 5번지 우석대 부속한방병원
(Tel. 063-220-8600, Fax: 063-220-8616, E-mail: soodang@hanmail.net)

는 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. Macrophage에서 생성된 NO는 mitochondria function 및 DNA synthesis를 억제하여 다양한 cytostatic 및 cytotoxic effect를 나타내며¹¹⁾, 또한 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되었다¹²⁾.

한편, 저자들은 감초의 성분인 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid가 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 이식된 암세포의 apoptosis를 촉진함을 이미 보고한 바 있다^{13,14)}.

따라서 본 실험에서는 생쥐 leukemia cell-line인 L1210 세포를 생쥐에 이식하고 조각자 물 추출물을 투여한 뒤 이식된 L1210 세포의 증식에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

실 험

1. 실험재료

1) 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계 수컷 6 주령을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20±2 °C, 습도 50±5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고행사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DME), Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), lipopolysaccharide (LPS, O26:B6), γ interferon (γ -IFN), MTT, proteinase K, RNase A, propidium iodide, sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, lamda DNA Eco RI Hind III digest, N^εmonomethyl L-arginine (L-NMMA), ethidium bromide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovineserum (FBS), trypsin은 Gibco Co., agarose는 Katayama Co. 제품을, 기타 시약은 cell culture 용 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다. 사용기기는 microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), DNA electrophoresis kit (Mupid-2), Imagemaster

VDS (Pharmacia Biotech Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 검액의 조제

본 실험에 사용한 조각자 (Gleditsiae Spina)는 우석대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였으며, 조각자 100 g을 증류수 1,000 ml로 2회 가열추출한 후 여액을 모아 rotary evaporator로 감압농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 7.2 g (이하 GE라 함)을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 세포증식능 측정

L1210 세포의 증식에 미치는 GE의 영향을 알아보기 위해 Mosmann¹⁵⁾이 개발하여 Kotnik¹⁶⁾ 등이 변형시킨 MTT법을 사용하였다. 생쥐 1군을 5마리로 하여 1마리 당 L1210 세포를 2×10⁶ cells 씩 복강에 이식하고 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 GE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 5 ml를 복강에 주입하여 잘 혼합한 후 복강액을 분리하여 원심분리 (1,500 rpm, 5 분, 4 °C) 하였다. 침전된 세포를 petri dish로 옮겨 약 2 시간 동안 배양 한 후, 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 원심분리하였다. 침전된 세포분획을 모아 2×10⁵ cells/ml로 조제하여 96-well plate의 각 well에 100 μ l 씩 분주하고, 37 °C의 CO₂ incubator에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, DMSO 100 μ l로 용해시켜 18 시간 동안은 박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다.

3) DNA fragmentation 측정

실험 2)와 동일한 방법으로 GE를 투여하고 회수한 L1210 세포를 37 °C의 CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후, PI buffer(0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 μ g/ml) 20 μ l

를 넣어 4 °C에서 30분간 염색한 후, flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 620 nm)로 DNA fragmentation (sub-G1 peak)을 측정하였다¹⁷⁾.

4) Agarose gel 전기영동

실험 2)와 동일한 방법으로 GE를 투여하고 회수한 L1210 세포를 eppendorf tube에 넣어 5분간 원심분리 (4 °C, 2,500 rpm)한 후, 세포를 모아 nuclear lysis buffer (50 mM Tris/0.5% SDS/10 mM EDTA) 100 μ l를 가해 세포를 용해시킨 후, 4 °C에서 10분간 방치한 다음 원심분리 (16,000 rpm, 20분) 한다. 상층액을 분리하여 proteinase K (20 mg/ml) 3 μ l 및 RNase (10 mg/ml) 3 μ l를 혼합하여 55 °C water bath에서 2시간 배양하고, 20 μ l의 5M NaCl과 120 μ l의 isopropyl alcohol를 가해 -20 °C에서 over-night 시킨다. 원심분리 (16,000 rpm, 15분)하여 상층액을 제거한 후 TE buffer 20 μ l에 용해시켜, 12 μ l를 취해 0.25% bromophenol blue 3 μ l를 혼합한 다음, 10 μ l를 1.2%(w/v) agarose gel (ethidium bromide 함유)에 loading하고 전기영동 (50 volt, 120 min.)하였다. 이때 marker로는 lambda NDA Eco RI Hind III digest를 사용하였다. Imagemaster VDS로 사진 촬영을 하여 DNA laddering을 관찰하였다¹⁸⁾.

5) Co-culture에 의한 DNA fragmentation 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 GE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 최종 투여 3일 전에 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고, 3일 후에 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 10 ml를 복강에 주입하여 복강세포를 수집하고, 4 °C에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리한 다음, RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 2시간 배양 후 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다. 분리한 macrophage를 24-well plate에 1×10⁶ cells/well로 분주하고, 1 시간 후에 L1210 세포를 well당 1×10⁵ cells씩 transwell에 넣어 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37

°C CO₂ incubator에서 24 시간 co-culture 하였다. Co-culture 후 L1210 세포를 수거하여 위와 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였다. NOS inhibitor 처리시에는 L-NMMA 0.5 mM/well을 사용하였다.

6) Nitric oxide의 측정

위와 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24-well plate에 1×10⁶ cells/well로 분주한 후, 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37 °C, CO₂-incubator에서 24 시간 배양한 후 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess 시약으로 측정하였으며¹⁹⁾, NOS inhibitor 처리시에는 L-NMMA 0.5 mM/well을 사용하였다. 측정시에는 배지 100 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-Naphthylethylenediamine · 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

7) 통계처리

모든 실험결과들은 mean±SE로 나타내었고 통계 처리는 student's *t*-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. L1210 세포의 증식능에 미치는 효과

GE를 투여한 생쥐에 L1210 세포를 이식한 후 회수하여 세포생존율을 측정된 결과, 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때 GE 투여군은 78.7±3.8%로 대조군에 비해 세포생존율이 감소하였다 (Fig. 1).

2. L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐 복강에 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에서 23.5±3.7% 이었으나, GE 투여군에서는 39.7±4.2%로 증가하였다 (Fig. 2, Fig 3). DNA 전기영동 사진에서도 DNA laddering이 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

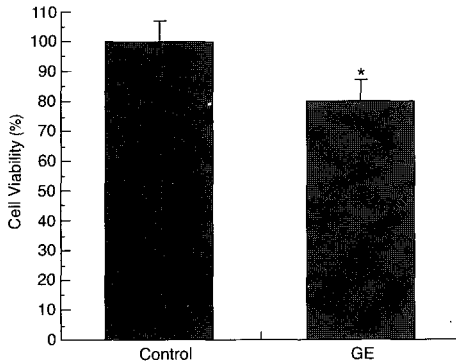


Fig. 1. Effect of *Gleditsiae Spina* water extract (GE) on the proliferation of transplanted-L1210 cells in mice. L1210 cells (2×10^6 cells/ml) were transplanted to BALB/c mice and *Gleditsiae Spina* water extract (GE, 500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The data represents the mean \pm SE from 5 mice.
*: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

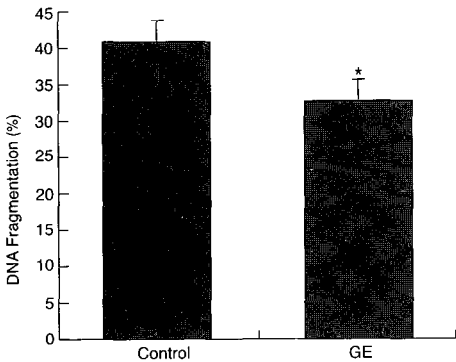


Fig. 2. Effect of GE on DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells in mice. L1210 cells (2×10^6 cells/ml) were transplanted to BALB/c mice and GE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The collected L1210 cells were stained with propidium iodide and DNA content was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE from 5 mice.
*: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

3. 복강 macrophage와 L1210 세포의 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐의 복강 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 DNA fragmentation

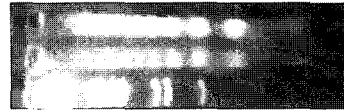


Fig. 3. Histogram of fragmented DNA of transplanted-L1210 cells

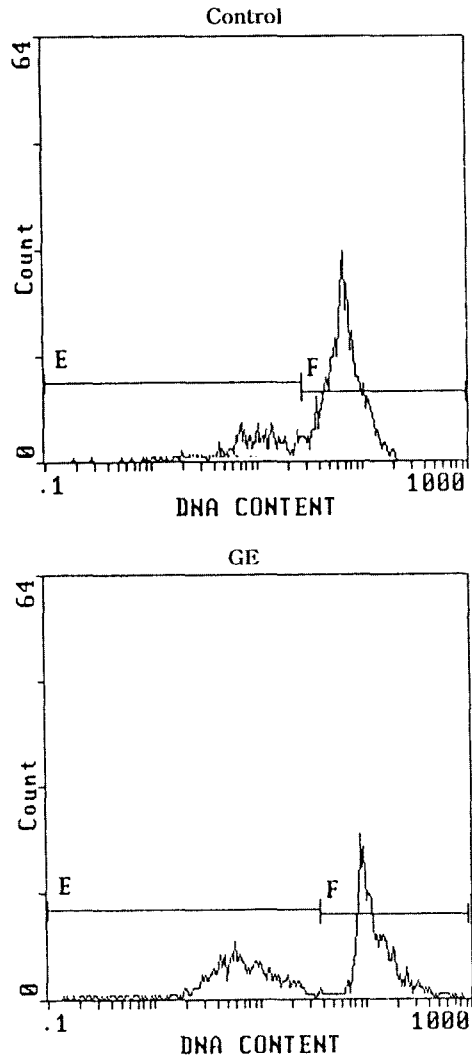


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of DNA in transplanted-L1210 cells. The cells were collected from mice treated without (lane 1) or with GE (lane 2). Genomic DNA was then purified and subjected to gel electrophoresis. DNA was electrophoresed in a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed by UV illumination.
M; marker (λ DNA Eco RI Hind III digest)

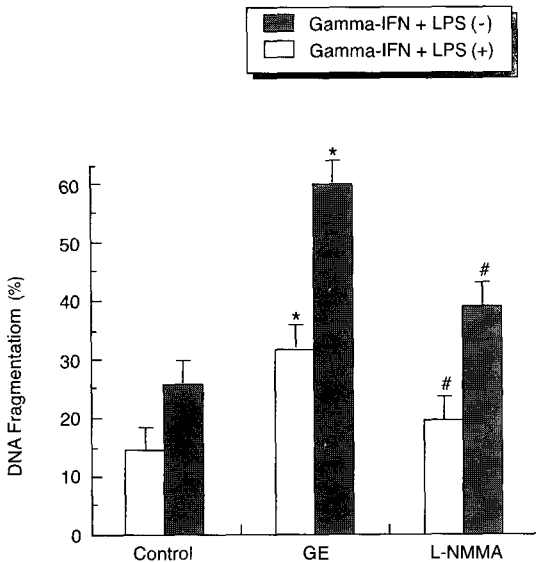


Fig. 5. Effect of co-culture of L1210 cells and peritoneal macrophages obtained from GE-administered mice in vitro. GE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days and peritoneal macrophages were separated from mice. The macrophages were cultured in 24 well plate and L1210 cells were co-cultured with transwell for 24 h in the presence or absence of LPS and γ -IFN. Each bar represents the mean \pm SE from 5 mice. Gamma-IFN + LPS (-); γ -interferon and lipopolysaccharide non-treated group, gamma-IFN + LPS (+); γ -interferon and lipopolysaccharide treated group. *; significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$). #; significantly different from GE-administered group ($p < 0.05$). L-NMMA; 0.5 mM/well.

은 대조군에서 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 $13.5 \pm 1.8\%$ 이었으나, LPS와 γ -IFN을 처리한 경우 $25.2 \pm 2.6\%$ 로 증가하였으며, GE 투여군에서는 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 $31.7 \pm 2.2\%$ 이었으나, LPS와 γ -IFN을 처리한 경우 $59.7 \pm 3.4\%$ 로 증가하였다. 이때 L-NMMA를 처리하면 각각 $19.5 \pm 2.4\%$ 및 $37.8 \pm 3.8\%$ 로 DNA fragmentation이 감소하였다 (Fig. 5).

4. L1210 세포 이식시 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성에 미치는 효과

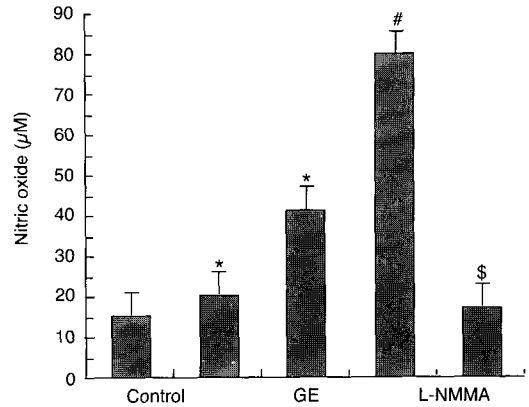


Fig. 6. Effect of GE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages. L1210 cells (2×10^6 cells/ml) were transplanted to BALB/c mice and GE (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The peritoneal macrophages were separated from mice injected with 3% thioglycollate for 3 days. The macrophages obtained after 2 h adherence period were cultured in the presence of LPS and γ -IFN.

The production of nitric oxide was determined with a Griess reagents. L1210; L1210-transplanted group, GE; GE-administered group, L1210 + GE; GE-administered group in L1210-transplanted mice, L-NMMA; L-NMMA (0.5 mM/well) treated group in L1210 + GE group. The data represents the mean \pm SE from 5 mice.

; Significantly different from control group (; $p < 0.05$, **; $p < 0.001$). #; Significantly different from L1210-transplanted group ($p < 0.001$). \$; Significantly different from L1210 + GE group ($p < 0.001$)

GE 투여에 의해 복강 macrophage로부터 NO가 생성되는 양을 측정하기 위해 LPS 및 γ -IFN을 처리하여 NO양을 측정하였다. 대조군에서 생성되는 NO양은 $12.8 \pm 1.4 \mu$ M 이었으나, L1210 세포를 이식한 군은 $22.4 \pm 2.5 \mu$ M로, GE 투여군은 $40.5 \pm 3.5 \mu$ M로 증가하였으며, L1210 세포를 이식하고 GE를 투여한 군은 $78.3 \pm 3.8 \mu$ M로 현저히 증가하였다. 이때 L1210 세포를 이식하고 GE를 투여한 군에 L-NMMA를 처리하면 $14.5 \pm 2.1 \mu$ M로 NO양의 생성이 차단되었다 (Fig. 6).

고 찰

皂角刺는 癰疽腫毒이 未成한 때는 消散시키며, 已成한 때는 潰하도록 하는 外科 常用 藥물이다. 瘡癰 初起에는 金銀花, 甘草 등의 藥물을 배합하면 消腫毒 作用이 있게 되지만, 만약 瘡瘍癰腫이 장차 潰하려고 하면서도 미처 潰하지 아니한 때는 黃芪, 乳香, 甘草 등의 藥물을 배합하여 복용함으로써 內托瘡毒을 촉진하여 早潰시킬 수 있는 藥물이다¹⁾. 이러한 조각자의 약리작용 때문에, 주로 항염작용에 대한 연구가 진행되었으나^{3,4)}, 암에 대한 연구는 별로 보고된 바가 없다. 따라서 본 실험에서는 조각자의 항암작용을 관찰하고자 암세포를 생쥐에 이식한 후 조각자를 경구 투여하여 암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

세포사(cell death)에는 necrosis와 apoptosis의 두 가지 경로가 있다. Necrosis는 ischemia, sustained hyperthermia 또는 물리적, 화학적 상해 등의 급격한 손상으로 고유의 homeostasis를 상실하여 원형질막의 주요 부위가 손상되고 삼투압 조절 능력이 상실되어, 세포가 팽창되어 파괴되면서 괴사가 일어나는 것이다. 한편, apoptosis는 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 DNA가 180~200개의 염기로 절단(DNA fragmentation)되는 것이다. Apoptosis는 programmed cell death에 동반하여 관찰되는 cell death의 형태이지만 항암제 또는 방사선 등과 같은 외부의 요인에 의해서도 유도된다^{20,21)}.

*In vivo*계에서 암세포인 L1210 세포를 이식하고 GE를 투여하였을 때 이식된 L1210 세포의 세포생존율은 대조군에 비해 약 20% 억제되었다. 이식된 L1210 세포의 생존율 감소에 대한 기전을 규명하고자 L1210 세포의 DNA fragmentation을 측정하였다. GE 투여시 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation이 대조군에 비해 약 16% 증가시켰다는 것은 GE가 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하여 세포의 증식을 억제하고 있음을 의미하는 것이다. 생체 내에서 GE에 의한 L1210 세포의 apoptosis 유도작용에 대한 기전을 규명하고자, 생체 내에서 암세포의

apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 nitric oxide에 대한 실험을 실시하였다. GE를 투여하고 분리한 복강 macrophage를 transwell을 이용하여 L1210 세포와 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에 비해 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않은 경우에도 증가하였고, LPS와 γ -IFN을 처리한 경우에는 더욱 증가하였으며, NOS inhibitor인 L-NMMA를 처리시 DNA fragmentation이 현저히 감소하였으나 완전히 감소되지는 않았다. 이는 GE가 생체 내에서 macrophage를 자극함으로써 분비되는 NO에 의해 apoptosis를 주로 유도되고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있으나, 또 다른 factor가 존재할 수 있음을 의미하는 결과이기도 하다.

Exogenous NO는 농도의존적으로 종양세포의 apoptosis를 유도하며²²⁾, 복강 macrophage로부터 생성된 NO도 종양세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다^{23,24)}. 따라서 GE 투여에 의해 복강 macrophage로부터 NO가 생성되는지의 여부를 관찰하기 위해 LPS 및 γ -IFN을 처리하여 NO양을 측정할 결과, L1210 세포를 이식한 군 및 GE 투여군은 대조군에 비해 NO 생성이 증가하였으며, L1210 세포를 이식하고 GE를 투여한 군은 NO 생성이 현저히 증가하였고, L-NMMA 처리시 NO 생성이 거의 차단되었다. 이러한 결과는 GE 투여에 의해 생성된 NO가 이식된 L1210 세포의 apoptosis에 주 요인으로 관여하고 있음을 강력히 시사하는 것이며, antitumor agents인 flavone-8-acetic acid와 xantherone-4-acetic acid가 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 항암작용을 나타낸다는 실험 결과²⁵⁾ 및 생쥐에 BCG를 투여하고 macrophage를 분리하여, LPS를 첨가하고 배양하면 종양세포의 증식이 억제되며, L-NMMA를 가하면 항암작용이 없어진다는 실험결과²⁶⁾와도 비슷한 결과를 할 수 있다. 생체에서 암세포의 apoptosis를 유도하는 것은 NO 뿐만 아니라, TNF- α 와 같은 물질들도 관여하고 있기 때문에 자세한 기전은 다양한 apoptotic biomaker를 이용하여 추후 연구되어야 할 과제이다.

결론

생쥐 leukemia cell-line인 L1210 세포를 생쥐 복강에 이식하고 조각자 물 추출물 (GE)을 경구투여한 뒤 이식된 L1210 세포의 증식에 대한 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 조각자는 이식된 L1210 세포의 세포생존율을 감소시켰다.
2. 조각자는 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation 및 DNA laddering을 증가시켰다.
3. 조각자를 투여하고 분리한 복강 macrophage와 L1210 세포를 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation이 증가되었으며, L-NMMA에 의해 DNA fragmentation이 일부 억제되었다.
4. 조각자는 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 증가시켰다.

이상의 실험결과 조각자 물추출물 (GE)은 복강 macrophage로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하여 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 일부 유도함으로써 L1210 세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 辛民教. 原色臨床本草學, 서울, 南山堂. 1986;473-4.
2. 韓國生藥學教授協議會. 本草學, 서울, 大韓藥師會. 1994;586.
3. Park, E.H., Shin, M.J. Anti-inflammatory activity of aqueous extract from *Gleditsia spina*. *Yakhak Hoeji*. 1993;37(2):124-128.
4. 朴涌基. 조각자의 소염작용에 대한 연구. 동국대학교 대학원 한의학박사학위논문, 1996.
5. Khaidarov, K.K. Effect of alkaloid triacanthine on coronary circulation and oxygen consumption by myocardium. *Farmakol. Toksikol.* 1966;29(2):184-6.
6. Foussard, B.O., Quevauviller, A., Bretaudeau, J. Pharmacodynamic study of the cardiac effects of triacanthine, a natural derivative of adenine and a synthetic derivative, 7-demethylaminoethyladenine.

Ann. Pharm. Fr. 1969;27(4):257-9.

7. Foussard, B.O., Giraud, D.C., Bretaudeau, J., Narcisse, G. Research on triacanthine: influence on wound healing and development of cancerous tumors in animal experimentation. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1971;165(1):154-8.
8. Konoshima, T., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M., Lee, K.H. Anti-AIDS agents, 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *Gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation. *J. Nat. Prod.* 1995;58(9):1372-7.
9. 康城溶. 수종 생약이 간암세포주 (Hep G2), 마우스 복강 macrophage 및 human polymorphnuclear cells에 미치는 영향. 우석대학교대학원 박사학위논문. 1997.
10. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987;235:473-4.
11. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB, J.* 1992;6:3051-4.
12. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., Reichner, J. S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1993;150:5080-4.
13. Eun, J. S., Kwon, J., Oh, C. H. Effect of glycyrrhizin on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji.* 1998;42(3):324-9.
14. Eun, J. S., Kwon, J., Yum, J. Y., Oh, C. H. Effect of glycyrrhetic acid on the cell death of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji.* 1998;42(6):583-8.
15. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.* 1983;65:55-61.
16. Kotnic, V., Fleischmann, W. R. Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.* 1990;129:23-8.
17. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C. A. Rapid and simple method for mesuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 1991;139:271-9.
18. Nakashima, I., Zhang, Y.H., Rahman, S.M.J., Yoshida, T., Isobe, K., Ding, L., Iwamoto, T., Hamaguchi, M., Ikezawa, H., Taguchi, R. Evidence of synergy between Thy-1 and CD3/TCR complex in signal delivery to

- murine thymocytes for cell death. *J. Immunology*. 1991;147:1153-62.
19. Rocket, K. A., Awburn, M. M., Cowden, W. B. and Clark, I. A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*. 1991;59(9):3280-5.
 20. Kaufmann, S. H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionally note. *Cancer Res*. 1989;49:5870-6.
 21. Bertand, R., Sarang, M. and Jenkin, J. Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res*. 1991;51:6280-6.
 22. Motomu, S., Tetsuya, I., Akitoshi, O., Nobuyuki, T., Takashi, M., Takashi, H., Ikuto, Y. NOC, A nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophage. *Biochem. and Biophys. Res. Commun*. 1995;209(2):519-24.
 23. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., Reichner, J. S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol*. 1993;150(11):5080-6.
 24. Shijun, C., Jonathan, S. R., Romeo, B. M., Jroge. J. A. Activated Murine Macrophages Induce apoptosis in tumor cells through Nitric oxide-dependent or independent machanisms. *Cancer Res*. 1994;54:2462-7.
 25. Thomsen, L. L., Ching, L. M., Baguley, B. C. Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. *Cancer Res*. 1991;51:6073-7.