

# 冬蟲夏草의 면역조절 및 항암효과

정한솔 · 권진<sup>1</sup> · 이태규<sup>2</sup> · 이광규 · 오찬호<sup>3\*</sup>

우석대학교 한의과대학, 1 : 군장대학 보건행정과, 2 : 우석대학교 식품영양식품공학부, 3 : 우석대학교 생명공학부

## Immuno-modulatory and Anti-carcinogenic Property of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonicus*

Han Sol Jung, Jin Kwon<sup>1</sup>, Tae Gyu Lee<sup>2</sup>, Kwang Gyu Lee, Chan Ho Oh<sup>3\*</sup>

College of Oriental medicine, Woosuk University, 1: Department of Health Administration, Kunjang College, 2: Division of Food Nutrition and Engineering, Woosuk University, 3: Division of Biotechnology, Woosuk University

The purpose of this research was to investigate the immuno-modulatory effect and anti-carcinogenic property of *Cordyceps militaris*(CM) and/or *Paecilomyces japonicus* (PJ). The proliferation of cultured splenocytes and thymocytes were enhanced by the addition of 10 µg/ml of CM and/or PJ. B lymphocytes subpopulation in splenocytes were increased both CM and/or PJ administered(p.o. for 7 days)-mice. Thymic T lymphocytes, especially TH cells were significantly increased in CM-administered mice. CM and/or PJ treatment inhibited the cell viability of L1210 mouse leukemia and HL60 human leukemia cells and induced the apoptosis of L1210 and HL60 cells. In addition, CM and/or PJ increased the hemagglutination(HA) titer against SRBC. These results suggest that CM and/or PJ have an immuno-modulatory action and anti-carcinogenic property.

Key words : *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces japonicus*, splenocyte, thymocyte, L1210 cell, HL60 cell.

### 서론

동충하초는 버섯의 균사체가 동절기에는 곤충의 유충이나 성충의 체내에 잠복해 있다가 하절기에 곤충의 체내에서 버섯으로 피어나는 모양에서 연유된 것으로 인삼, 녹용과 더불어 예로부터 중국의 3대 보약 중의 하나로 알려져 왔다<sup>1,2</sup>. 서양에서는 동충하초를 "Vegetable Wasps and Plant Worms" 또는 "Cordyceps"로 표기하고 있다. 동충하초의 종류는 전세계적으로 약 300여종이 있으며 대부분이 곤충에 기생하는데 주된 기주곤충은 매미, 나비, 개미, 벌, 잠자리, 딱정벌레 등이며 중국의 동충하초 "코디셉스 시넨시스"는 박쥐나방과의 유충에만 기생하는가 하면, 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 나비목에 속하는 여러 곤충류의 번데기에 기생한다. 이러한 동충하초의 性味는 溫甘하고, 성분은 충초산, 단백질, 비타민B12 등을 함유하고 있으며, 주된 효능으로서 보신증정(補身增精), 지해회담(止咳化痰) 등의 작용과 항균작용, 항암작용, 항피로작용 등을 비롯해서 면역력 증강작용 등도 보고되고 있다<sup>3-6</sup>. 본 연구에서는 동충하초 중 대표적인 번데기 동충하초 *Cordyceps militaris*(CM)와 눈꽃 동충

하초 *Paecilomyces japonicus*(PJ)의 면역조절작용 및 항암 효과를 살펴보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c계통 웅성(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

실험에 사용한 시약은 RPMI1640 media, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), propidium iodide(PI), sheep red blood cell(SRBC), PE conjugated anti-CD4, anti B220 antibody 및 FITC conjugated anti-CD8, anti Thy 1 monoclonal antibody 등을 사용하였다.

#### 3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 동충하초 검액은 배양액을 여과해서 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 (이하

\* 교신저자 : 오찬호, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 생명공학부  
E-mail : choh@woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1431  
· 접수 : 2002/02/07 · 수정 : 2002/03/23 · 채택 : 2002/03/30

CM 또는 PJ라 함) 사용하였다.

4. 생쥐 흉선 및 비장세포의 증식반응 측정

생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 무균적으로 적출하고 각각의 세포를 세정(×3회, DPBS, 1500rpm, 10분)해서 비장 및 흉선세포 부유액을 무균 조제한 후,  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 세포수를 조정하고, 비장세포 부유액에는 LPS(5  $\mu$ g/ml), 흉선세포 부유액에는 Con A(0.5  $\mu$ g/ml)와 각 농도(0.1, 1, 및 10  $\mu$ g/ml)의 CM 또는 PJ를 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기(5%-CO<sub>2</sub>, 95%-air) 내에서 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A(pH 7.4)에 희석된 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가하고, 0.1 N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>7)</sup>.

5. 흉선 및 비장세포의 아집단(subpopulation) 측정

생쥐에 7 일 동안 CM 또는 PJ(500 mg/kg)를 각각 경구 투여(p.o)한 다음 생쥐를 경추 탈구시켜 비장 및 흉선을 적출한 후, 세포 부유액을 조제하고  $1 \times 10^6$  cells/well에 PE conjugated-anti B220 및 FITC-anti Thy1 antibody와 PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody(1:40 dilution)로 이중 염색하여 4°C에서 30분간 반응시키고 laser flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 525 nm-FITC, 575 nm-PE)를 이용하여 각각의 세포 중의 lymphocyte의 아집단을 측정하였다<sup>8)</sup>.

6. 암세포의 생존율(viability) 측정

계대배양한 L1210(mouse leukemia)세포 및 HL60(human leukemia)세포를 96 well culture plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 세포를 조정하고, 각 농도(0.1, 1, 및 10  $\mu$ g/ml)의 CM 또는 PJ를 첨가하여 48시간 동안 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기 내에서 배양하고 배양 종료 4시간 전에 MTT용액 20  $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후, 10% SDS 100  $\mu$ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을 차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader를 이용해서 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다<sup>7)</sup>.

7. 암세포 apoptosis 측정

계대배양 중인 L1210세포 및 HL60세포를 96 well culture plate에  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 세포를 조정하고, 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml의 CM 또는 PJ를 첨가하여 24시간동안 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 PI(10  $\mu$ g/ml)를  $20 \mu$ l/ $1 \times 10^6$  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 정량하였다<sup>9)</sup>.

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

계대배양한 L1210세포에 1, 10 및 100  $\mu$ g/ml의 CM 또는 PJ

를 첨가하여 24시간 배양하고 배양이 종료된 후, 각 세포를 수집해서 세포부유액을 조제하고 세정(×3회, PBS)한 후,  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 각 세포를 조정, 원심분리(250 g, 10분)하고 침전시킨 세포분획에 DiOC<sub>6</sub>(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 측정하였다<sup>10)</sup>.

9. SRBC에 대한 적혈구 응집소(HA) 측정

생쥐 8마리를 1군으로 하여 Ha<sup>11)</sup>의 방법에 따라  $1 \times 10^7$ 개/생쥐의 SRBC를 복강주사하여 면역조치(immunization)하고 CM 또는 PJ를 일주일간 경구 투여한 다음, 8 일째에 생쥐를 도살하여 채혈하고 원심분리해서 혈청을 분리한 후, 56°C에서 30분간 incubation해서 보체를 실험시켜 U자형 microtitration tray의 각각의 well에 상기의 혈청을 인산완충액으로 20배 희석하고 2 배씩 단계희석을 행한 20  $\mu$ l와 0.5% SRBC 부유액 50  $\mu$ l를 혼합하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 배양한 후, 적혈구응집을 일으킨 혈청의 최고희석배수를 응집소(log2)로 판독한다.

10. 통계처리

통계처리는 student's t-test로 하였으며, p<0.05이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험 성적

1. CM 또는 PJ가 면역세포 증식에 미치는 효과

동충하초(CM 또는 PJ)가 면역세포의 증식에 미치는 효과는 Table 1과 같다. 생쥐의 비장세포배양계에 CM 0.1, 1 및 10  $\mu$ g/ml를 첨가해서 살펴본 결과(Table 1), 대조군인 LPS(1  $\mu$ g/ml) 단독첨가군에 비하여 10  $\mu$ g/ml의 CM 첨가군에서 비장림프구의 증식이 관찰되었으며, 흉선세포 배양계에서도 Con A(0.1  $\mu$ g/ml) 단독첨가군의 대조군에 비하여 특히 CM 1 및 10  $\mu$ g/ml 첨가군에서 흉선림프구의 증식을 촉진시켰다. 또한 0.1, 1 및 10  $\mu$ g/ml의 PJ 첨가군에서는 비장림프구의 증식에 효과가 없었으나, 흉선세포에서는 10  $\mu$ g/ml의 PJ첨가군에서 흉선림프구의 증식이 촉진되었다.

Table 1. Effect of CM or PJ on the lymphocyte proliferation in cultured splenocytes and thymocytes in vitro.

Cell Type ( $\mu$ g/ml) Treatment	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)	
	LPS(-)	LPS(+)	Con A(-)	Con A(+)
CONTROL	83.4±1.7	100.0±2.1	82.1±2.6	100.0±1.7
CM (0.1)		106.4±1.9		101.5±3.4
CM (1.0)		110.7±4.6		115.4±2.6*
CM (10.0)		127.1±3.7*		123.5±3.7*
PJ (0.1)		96.1±1.1		91.5±2.3
PJ (1.0)		105.7±0.9		101.7±0.6
PJ (10.0)		108.1±0.3		128.0±0.9*

CM or PJ(0.1~10  $\mu$ g/ml) was treated to cultured splenocytes or thymocytes for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The data represents the mean±SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

2. CM 또는 PJ가 흉선 및 비장세포 아집단에 미치는 효과

CM 또는 PJ를 투여한 생쥐의 비장 및 흉선세포의 아집단변화는 Table 2와 같다. 비장세포는 대조군에서 B세포가 41.4±2.1%인데 비하여 CM 또는 PJ 투여군에서 각각 49.7±3.5% 및 48.1±3.0%로 특히 B세포의 population이 증가하였으며, 비장 내 T세포는 대조군에 비해 CM 또는 PJ 투여군에서 유의한 효과는 관찰되지 않았다. 또한 흉선세포에서는 대조군의 TH세포가 13.3±0.4%에 비해 CM 또는 PJ 투여군에서 TH세포가 각각 18.2±1.3% 및 15.2±1.1%로서 특히 CM 투여군에서 흉선세포의 TH세포가 증가하였으며, Tc/Ts세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다.

Table 2. Effect of CM or PJ on the subpopulation of murine splenocytes and thymocytes in vivo.

Cell Type	Splenocytes(%)		Thymocytes(%)		
	B cell	T cell		TH	Tc/Ts
		TH	Tc/Ts		
CONTROL	41.4±2.1	22.1±1.5		13.3±0.4	3.9±0.3
		16.7±1.0	5.4±0.2		
CM	49.7±3.5*	25.5±0.4		18.2±1.3*	4.3±0.4
		18.7±1.5	5.2±0.3		
PJ	48.1±3.0*	24.6±1.5		15.2±1.1	3.8±0.2
		17.1±0.7	6.1±0.5		

CM or PJ(500 mg/kg body weight) was administered p.o. once a day for 7 days, there after 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).

3. CM 또는 PJ가 암세포의 생존율에 미치는 효과

백혈병세포주인 L1210세포 및 HL60세포 배양계에 1, 10 및 100 µg/ml 농도의 CM 및 PJ를 첨가해서 암세포의 생존율에 미치는 효과를 관찰하였다(Fig. 1). 결과에서 CM 및 PJ는 in vitro 계에서 암세포의 생존을 농도의존적으로 억제시키는 항암효과가 관찰되었다.

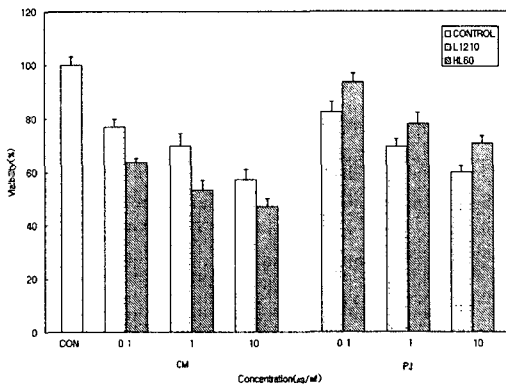


Fig. 1. Effect of CM or PJ on the cell viability of L1210 and HL60 leukemia cells. CM or PJ(0.1~10 µg/ml) was treated to cultured L1210 and HL60 leukemia cells for 48 hours. The cells assayed by MTT method. The data represents the mean±SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

4. CM 또는 PJ가 암세포의 apoptosis에 미치는 효과

생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포 배양계에 0.1, 1 및 10 µg

/ml 농도의 CM을 첨가해서 24시간 동안 배양한 결과는 대조군에 비하여 1 및 10 µg/ml 농도의 CM 첨가군에서 L1210세포의 apoptotic cell death가 촉진되었으며, PJ(0.1, 1 및 10 µg/ml) 첨가군에서는 10 µg/ml 농도에서 L1210세포의 apoptosis가 촉진되는 결과가 나타났다. 한편, 사람의 백혈병세포주인 HL60세포에 CM 또는 PJ를 첨가해서 24시간 배양한 결과, 대조군에 비하여 1 및 10 µg/ml 농도의 CM 또는 PJ첨가에 의해 HL60세포의 apoptosis가 농도의존적으로 촉진되었다(Table 3).

Table 3. Effect of CM or PJ on the apoptosis of L1210 and HL60 leukemia cells.

Cell Type	Apoptosis (%)	
	L1210 cells	HL60 cells
Treatment(µg/ml)		
CONTROL	16.5±1.1	17.2±1.7
CM (0.1)	17.8±2.9	23.5±2.4
CM (1.0)	26.7±2.6*	41.2±3.7*
CM (10.0)	37.1±3.9*	57.2±3.9*
PJ (0.1)	16.4±1.4	20.1±1.2
PJ (1.0)	20.8±1.9	33.8±3.7*
PJ (10.0)	38.0±3.1*	41.9±2.8*

CM or PJ(1.0-100 µg/ml) was treated with cultured L1210 or HL60 cells, and incubated for 24 hours, and then cells were collected and the sub-G1 peak was measured by a flow cytometer staining with propidium iodide. The data represents the mean±SE of 3 experiments. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

5. CM 또는 PJ가 암세포의 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)에 미치는 효과

세포사의 과정 중 mitochondria의 swelling이 일어나기 전 단계에서 mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)의 감소가 선행되어 일어난다<sup>10)</sup>. 본 실험에서 1 및 10 µg/ml 농도의 CM 또는 PJ를 첨가해서 암세포의 apoptosis가 일어날 때 ΔΨm의 감소가 되고 있는지를 검토하였다. 결과를 Table 4에 나타내었는데 L1210세포의 apoptosis가 유도되었을 때 대조군에 비하여 CM 또는 PJ처리군에서 ΔΨm의 감소가 일어나고 있음을 확인하였다.

Table 4. Effect of CM or PJ on the mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm) of cultured-L1210 leukemia cells

	Mitochondrial transmembrane potential(ΔΨm)(%)	
	C M	P J
CONTROL	78.1±2.1	81.3±3.7
1.0 µg/ml	67.3±3.1*	75.8±4.3
10.0 µg/ml	59.9±3.9*	64.2±4.1*

CM or PJ(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. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

6. CM 또는 PJ가 적혈구 응집소(HA)에 미치는 효과

생쥐에 SRBC를 복강주사해서 면역조치(immunization)하고 1일 1회씩 CM 또는 PJ(500 mg/kg)를 7 일간 경구 투여한 다음 경추 탈구해서 도살하고 혈청을 취한 후, 적혈구응집소(log2), 즉 총 항체기에 미치는 CM 또는 PJ의 효과를 관찰한 결과를 Table 5에 나타내었다. 생쥐의 SRBC에 대한 총 항체기는 대조군의 3.1±0.3인데 비하여 CM 투여군은 4.9±0.4, PJ투여군은 3.9±0.3으로 HA가 항진되었다.

**Table 5. Effect of CM or PJ on the production of hemagglutination (HA) titer.**

Samples	HA titers (log <sub>2</sub> )
Control	3.1±0.2
CM	4.9±0.4*
PJ	3.9±0.3*

Hemagglutination(HA) titers were assayed at 7 days after SRBC sensitization. CM or PJ (500 mg/kg) was administered p.o. once a day for 7 days. The data represents the mean±SE of 5 mice. \*: Significantly different from control group(p<0.05).

## 고찰

면역계는 각종 병원체 등의 이물질의 공격으로부터 개체를 효과적으로 방어하는 생체방어체로서, 면역계를 총괄하는 T림프구, 항원물질에 대응하는 주된 분자인 항체를 생성하는 B림프구 등의 면역세포가 주된 방어임무를 수행하고 있으며 T림프구 중 특히 CD4<sup>+</sup>세포(helper T: TH)는 비자기인 항원을 인식하여 그 정보를 B림프구에 전달하고, 그 항원에 대하여 특이한 항체를 혈청 속에 만들어 내도록 촉진하는 중요한 기능을 가지고 있다<sup>12)</sup>. 예로부터 동충하초는 보신증정, 지해화담, 항균, 항암, 항피로 작용 등을 비롯해서 면역력 증강작용이 있는 것으로 보고되어져 왔는데<sup>1-6)</sup> 본 실험에서는 총 8종류의 동충하초를 스크리닝해서 예비실험을 한 후 그 중에서 특히 밀리타리스 및 눈꽃 동충하초의 면역작용에 미치는 효과를 재 검증하였다. 본 연구에서는 동충하초가 어떤 면역세포의 활성을 조절하는지를 살펴보고자 비장 및 흉선세포의 증식, 면역세포 아집단에 미치는 효과, 적혈구 응집소가 등을 관찰하였는데 밀리타리스 및 눈꽃 동충하초는 비장 및 흉선세포의 증식을 촉진하였으며, 비장 및 흉선세포의 아집단 분석 결과, 비장내 B림프구의 population을 증가시켰으며 특히 밀리타리스 동충하초는 흉선 T림프구 중 TH세포의 population을 증가시켜 생체면역력을 조절하는 것으로 추정된다. 또한 밀리타리스 및 눈꽃 동충하초는 적혈구 응집소(항체가)를 증가시키는 작용도 관찰되었는데 이 결과는 생체내에서 면역작용에 가장 중심적인 역할을 수행하는 T림프구의 증식을 촉진하는 작용 및 B림프구의 항체생성을 촉진하는 작용을 보유하고 있는 점이 주목된다. 한편, apoptosis는 생체의 신경계와 면역계세포의 생성, 분화 및 기능발현에 중요하게 작용하고 있는 자발적세포사의 개념<sup>13-14)</sup>으로서 세포괴사인 necrosis와는 크게 구별된다. Apoptosis기전에 이상이 발생하면 암 발생, 자가면역 질환, 퇴행성질환 및 AIDS 등의 질환을 초래하는 결과로 이행된다고 알려져 있다. 최근에 사용되고 있는 각종 항암제들은 이러한 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>15-17)</sup>. 본 실험에서도 밀리타리스 및 눈꽃 동충하초를 검액으로 하여 세포배양계에서 관찰한 결과, 생쥐의 백혈병세포주인 L1210세포와 인체 백혈병세포주인 HL60세포의 생존율을 현저하게 억제시켰으며 암세포의 apoptosis를 유도하는 작용을 관찰하였으며 이러한 결과는 동충하초의 암세포의 증식 억제 및 apoptosis를 촉진하는 이른바 항암능을 보유하고 있음을 재확인 하였으며, 이는 동충하초의 기능성 항암제로서의 개발가능성을 시사하지만 추후 in vivo실험을 통하여 보다 구체적으로 확인할 필요가 있다.

## 결론

이상의 실험 결과에서 동충하초(CM 또는 PJ)는 in vitro 배양계에서 비장 및 흉선 림프구의 증식을 촉진시켰고 in vivo 실험에서 비장내 B세포를 유의하게 증가시켰으며, 특히 CM은 흉선세포 중의 TH세포를 증가시켰다. 또한 CM과 PJ는 백혈병세포주인 L1210세포와 HL60세포의 생존율을 현저하게 억제시켰고, 상기 암세포의 apoptosis를 촉진시켰으며 mitochondrial transmembrane potential( $\Delta\psi_m$ )을 감소시켰고 적혈구 응집소가(HA)를 항진시키는 이른바 면역조절작용과 항암력을 보유하고 있는 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 논문은 2002년 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. 진준인 : 도설 한방의약대사전 III(중국약학대전), 강담사, 동경, 170, 1982.
2. 이상인 : 본초학, 수서원, 서울, 142, 1981.
3. Chen, D.M. : Effects of natural cordyceps and the cultured mycelia of Cordyceps sinensis on murine immune organs and functions of mononuclear phagocyte system. Chin. J. Integr. Trad. West. Med., 5: 42, 1985.
4. 김미려 : Carbon tetrachloride와 백화사설초 및 동충하초의 병용투여가 간장 및 혈청성분에 미치는 영향. The J. East-West Med. 19: 3, 5-14, 1994.
5. 성재모 이현경, 양근주 : 동충하초(Cordyceps)속균의 형태적인 특징과 단백질pattern에 의한 계통분류. Kor.J. Mycol., 23: 92-104, 1995.
6. Park, J.P., Jung, S.H., Song, C.H. and Yun, J.W. : Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer prouduction by Cordyceps militaris. Lett. Appl. Microbiol., 32: 1-6, 2001.
7. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods 65: 55-63, 1983.
8. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. 179: 873-879, 1994.
9. 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.
10. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L. Petit, PP.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.
11. 하대유, 박영민, 최태훈, 이정호, Naloxane에 의한 면역반응 변조. *대한면역학회지*, 11: 129-145, 1989.
  12. Abbas, A.K., Lichman, A.H. and Poper, J.S., *Cellular and molecular immunology*. 2: 241-260, W.B. Saunders Co., U.S.A., 1994.
  13. Willie, A.H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556, 1980.
  14. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
  15. 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.
  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. 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.