

紅蓼·葡萄 병용투여가 면역반응에 미치는 영향

은재순* · 박 훈 · 이경아 · 전용근 · 임재윤 · 신태용 · 소준노¹ · 안문생² · 권 진³

우석대학교 약학대학, 1: 우석대학교 보건복지대학, 2: 한국약선연구소, 3: 한국재활복지대학

Effects of the Combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on Immune Response

Jae Soon Eun*, Hun Park, Kyung A Lee, Yong Keun Jeon, Jae Yoon Leem, Tae Yong Shin, June No So¹, Mun Saeng Ahn², Jin Kwon³

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: College of Health and Welfare, Woosuk University, 2: Institute of Korea Medicated-Diets, 3: Korea National College of Rehabilitation & Welfare

Immunological activities of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus were examined in C57BL/6 mice. Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus were extracted with distilled water or 40% ethyl alcohol. Ginseng Radix Rubra water extracts (GW), the mixture (1:1) of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus water extracts [GVW(1:1)], the mixture (1:3) of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus water extracts [GVW(1:3)], 40% ethyl alcohol extracts of Ginseng Radix Rubra (GE), the mixture (1:1) of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus 40% ethyl alcohol extracts [GVE(1:1)] and the mixture (1:3) of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus 40% ethyl alcohol extracts [GVE(1:3)] were administered *p.o.* once a day for 7 days, respectively. GVW(1:1) and GVW(1:3) decreased the viability of thymocytes increased by GW, but GVE(1:1) and GVE(1:3) increased the viability of thymocytes decreased by GE. GVW(1:1) and GVW(1:3) increased the viability of splenocytes decreased by GW or GE. Also, GVW(1:1) and GVE(1:1) enhanced the population of helper T cell in thymocytes, and GVE(1:1) and GVE(1:3) decreased the population of cytotoxic T cells increased by GE. Furthermore, GVW(1:1), GVW(1:3), GVE(1:1) and GVE(1:3) enhanced the population of B220⁺ cells decreased by GW or GE, and decreased the population of Thy1⁺ cells increased by GW or GE, and decreased the population of splenic CD4⁺ cells increased by GW or GE. In addition, GVW(1:1) and GVW(1:3) decreased the phagocytic activity and the production of nitric oxide in peritoneal macrophages increased by GW, but GVE(1:1) and GVE(1:3) enhanced the phagocytic activity and the production of nitric oxide in peritoneal macrophages decreased by GE. These results suggest that Vitis Fructus has an regulative action on immune response of Ginseng Radix Rubra.

Key words : Ginseng Radix Rubra, Vitis Fructus, cell viability, cell population, nitric oxide, phagocytic activity

서 론

清代 張璐의 『本經逢原』에 의하면 葡萄, 人參 各 一錢. 火酒浸一宿, 侵晨塗手心, 摩擦腰脊, 能助膂力強壯, 若臥時摩擦腰脊, 力能助腎堅強, 服之尤爲得力이라 하였다¹⁾. 즉, 포도, 인삼 각 3.75g을 火酒에 하루밤 담갔다가 새벽녘에 손바닥에 발라 허리뼈를 마찰해주면 膂력이 강해지고, 만일 잠자리에 들기 전에 동일

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2006/01/16 · 수정 : 2006/03/06 · 채택 : 2006/04/06

한 방법으로 마찰해주면 신장이 튼튼해지고, 내복하면 더욱 좋다는 내용이다. 인삼은 脾經과 肺經으로 들어가 모든 장기의 기를 보양하는 효능이 있고, 포도는 주로 식품으로만 사용되어 약용으로 자주 쓰이지는 않지만 脾經, 肺經, 및 腎經으로 들어가 기혈을 보양하고 근골을 강하게 하는 효능이 있다고 알려져 있다²⁾. 이는 脾經과 肺經에 작용하여 기를 보양하는 인삼에 脾經, 肺經 및 腎經으로 들어가 근골을 강하게 하는 포도를 배합하여 신의 기능을 증가시키기 위한 것으로 사료된다. 인체의 장기 중에 면역조절 작용에 주로 관여하는 곳은 脾, 肺, 腎이고 그 중에서도 腎이 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있어³⁾, 홍삼에 포도를 병용

하여 부여하는 것은 인체의 면역기능을 조절할 가능성이 있다고 사료된다.

인삼^{4,5)}과 그 함유 성분인 ginsenosides^{6,7)} 및 홍삼^{8,9)}이 면역능을 조절한다는 보고와 포도에 항고혈압작용¹⁰⁾, 항산화작용¹¹⁾ 및 혈관확장작용¹²⁾이 있다는 보고는 많이 있었으나, 홍삼에 포도를 병용하여 실험한 연구 보고는 없었다. 따라서 본 실험에서는 면역능을 증강시킬 수 있는 기능성식품을 개발하고자 홍삼 및 포도를 증류수 또는 40% ethyl alcohol로 각각 추출한 후, 생쥐에 1 : 1 및 1 : 3으로 혼합하여 투여한 다음, 특이적 면역반응을 주도하는 thymocytes 및 splenocytes와 비특이적 면역반응을 주도하는 복강 macrophages에 대한 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 6 주령 C57BL/6계 수컷을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20 ± 3 °C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약은 lipopolysaccharide, γ -interferon, lucigenin, MTT, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, zymosan, RPMI 1640은 Sigma Co.에서, fetal bovine serum, trypsin은 Gibco Co.에서, PE-conjugated anti-CD4 antibody, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220 antibody, FITC-conjugated anti-Thy1 antibody는 Dainippon seiyaku Co.에서, FITC-conjugated *E. coli* particles은 Molecular Probes Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (Berthold 96LP) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 홍삼 및 포도는 시중에서 구입하여 사용하였으며, 홍삼 및 포도 각 100g을 증류수와 40% ethyl alcohol로 50 °C water bath에서 가끔 진탕하면서 48시간씩 2회 추출하였다. 추출액을 농축한 다음, 동결건조하여 건조분말을 얻어 실험에 사용하였다 (Table 1). 실험군은 대조군, 홍삼 물추출물 500 mg/kg 투여군 (이하 GW라 함), 홍삼 물추출물 500 mg/kg 및 포도 물추출물 500 mg/kg을 혼합한 투여군 [이하 GVW(1:1)라 함], 홍삼 물추출물 500 mg/kg 및 포도 물추출물 1,500 mg/kg을 혼합한 투여군 [이하 GVW(1:3)라 함], 홍삼 40% ethyl alcohol 500 mg/kg 투여군 [이하 GE라 함], 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물 500 mg/kg 및 포도 40% ethyl alcohol 추출물 500 mg/kg을

혼합한 투여군 [이하 GVE(1:1)라 함], 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물 500 mg/kg 및 포도 40% ethyl alcohol 추출물 1,500 mg/kg을 혼합한 투여군 [이하 GVE(1:3)라 함]으로 하였다.

Table 1. Yield of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus extracted with water or 40% ethyl alcohol at 50°C

Samples	Yield (%)	
	Water	40% Ethyl alcohol
Ginseng Radix Rubra	38.5	36.0
Vitis Fructus	11.4	11.3

4. Thymocytes, splenocytes 및 macrophages 분리

생쥐의 thymocytes 및 splenocytes 분리는 Mizel¹³⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 각 sample 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음 8일째 생쥐를 경추 탈골하여 도살하였다. 적출한 흉선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻었다.

Macrophage의 분리는 위와 동일한 방법으로 약물을 7일간 투여한 후 분리하였다. 약물 투여 4일째 생쥐 복강에 3% thioglycollate 2 ml를 주입하고, 8일째 경추탈골하여 도살시킨 다음, 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집하였다. 수집한 세포를 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양시키고 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거한 다음, 부착한 macrophage를 분리하여 사용하였다.

5. 세포증식능 측정

분리한 thymocytes 및 splenocytes의 증식에 미치는 각 sample의 영향은 MTT법으로 측정하였다^{14,15)}. 96-well plate의 각 well에 thymocytes 및 splenocytes를 각각 RPMI 1640 배지로 희석하고 각 well에 1 × 10⁷ cells/ml 농도로 분주하여 thymocytes는 concanavalin A 5 µg/ml를, splenocytes는 lipopolysaccharide 10 µg/ml를 첨가한 후, 37 °C의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTT 시약을 가하였다. 배양 종료 시 0.1N-HCl에 용해시킨 10% SDS 100 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader로 570 nm에서 측정하였다.

6. Thymocytes 및 splenocytes의 subpopulation 측정

분리한 T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로, T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다¹⁶⁾.

7. 복강 macrophage로부터 phagocytic activity 측정

분리한 macrophage를 2×10^6 cells/ml가 되도록 DME (without phenol red)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37 °C에서 측정하였다^{17,18}. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 μ l와 lucigenin 용액 50 μ l 및 zymosan 용액 30 μ l를 첨가하여 최종 volume이 200 μ l가 되도록한 후, 37 °C 에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

8. 복강 macrophage의 engulfment 측정

FITC-conjugated E. coli particle을 HBSS에 1 mg/ml 농도로 현탁시켜 sonification한 후 사용하였다. 각 sample을 투여하고 분리한 macrophage를 RPMI1640 배지로 1×10^5 cells/ml 되도록 조정한 후, 100 μ l를 96 well에 분주하고 E. coli 현탁액 25 μ l를 가하여 1 시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 extracellular fluorescence를 억제하기 위해 trypan blue 100 μ l를 첨가하여 inverted fluoromicroscope로 관찰하였다¹⁹.

9. 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성량 측정

분리한 macrophage를 24 well plate에 well당 2×10^6 cells 을 분주한 후 macrophage로 부터 생성되는 nitric oxide의 양을 Griess법²⁰으로 측정하였다. 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 24 시간 배양한 후, 배양액 100 μ l와 Griess 시약 100 μ l를 혼합하여 96 well module에 넣고, 37 °C에서 10분 간 방치한 후 570 nm에서 microplate-reader로 흡광도를 측정하였다.

10. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean \pm S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. Thymocytes의 증식에 미치는 효과

대조군의 thymocytes에 concanavalin A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 Con A를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, GW를 투여한 군은 Con A를 처리한 대조군에 비해 증가하였다. GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE를 투여한 군은 Con A를 처리한 대조군에 비해 감소하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 1).

2. Splenocytes의 증식에 미치는 효과

대조군의 splenocytes에 lipopolysaccharide를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존

율이 증가하였으며, GW를 투여한 군은 LPS를 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 증가하였다. GE를 투여한 군은 LPS를 처리한 대조군에 비해 감소하였다. GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 2).

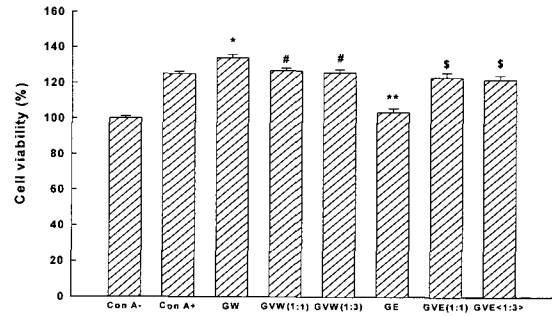


Fig. 1. Effects of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on the cell viability of concanavalin A treated-thymocytes in mice. Samples (500 mg/kg) were administered p.o. once a day for 7 days, and the separated thymocytes (1×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with concanavalin A (Con A), an activating mitogen of thymocyte. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control (Con A+) group ($p < 0.05$, **; $p < 0.01$). #; Significantly different from GW group ($p < 0.05$). §; Significantly different from GE group ($p < 0.01$).

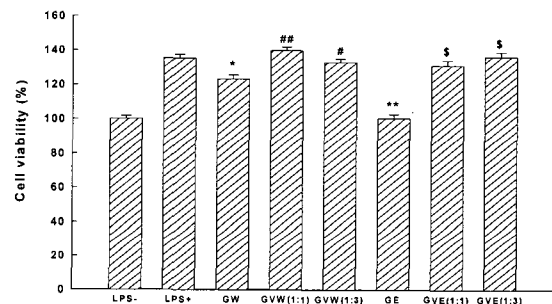


Fig. 2. Effects of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on the cell viability of lipopolysaccharide treated-splenocytes in mice. The data represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control (LPS+) group ($p < 0.05$, **; $p < 0.01$). #; Significantly different from GW group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$). §; Significantly different from GE group ($p < 0.001$). LPS-; Lipopolysaccharide-nontreated group. LPS+; Lipopolysaccharide-treated group.

3. Thymocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 thymocytes 중 CD4 single positive (CD4⁺) 세포의 population은 $11.2 \pm 0.7\%$ 이었으며, CD8 single positive (CD8⁺) 세포의 population은 $3.6 \pm 0.3\%$ 이었다. GW, GVW(1:1), GVW(1:3)을 각각 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4⁺ 세포는 대조군에 비해 GVW(1:1) 투여군의 population이 증가하였으며, CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 GVW(1:1) 투여군의 population이 증가하였다. GE, GVE(1:1), GVE(1:3)을 각각 투여하고 분리한 생쥐 thymocytes의 CD4⁺ 세포는 대조군에 비해 GVE(1:1) 투여군의 population이 증가하였으며, CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 GE 투여군은 증가하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)

투여군의 population이 GE 투여군에 비해 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Effects of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on the subpopulation of murine thymocytes

Samples	Thymocytes Subpopulation (%)	
	CD4 ⁺ CD8 ⁻ cell	CD4 ⁺ CD8 ⁺ cell
Control	11.2 ± 0.7	3.6 ± 0.3
GW	12.9 ± 1.2	3.2 ± 0.2
GVW(1:1)	15.9 ± 0.7 ^a	5.6 ± 0.4 ^a
GVW(1:3)	13.5 ± 1.4	3.6 ± 0.3
GE	12.4 ± 1.2	4.7 ± 0.2 ^c
GVE(1:1)	18.9 ± 1.5 ³³⁵	3.4 ± 0.3 ³⁵
GVE(1:3)	13.8 ± 1.3	3.6 ± 0.2 ⁵

The separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4 °C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. ; Significantly different from control group (p<0.05). ^a; Significantly different from GW group (p<0.001). ³; Significantly different from GE group (^c; p<0.05, ³⁵; p<0.01, ³³⁵; p<0.001).

4. Splenocytes의 subpopulation에 미치는 효과

대조군의 splenocytes 중 B220⁺의 population은 48.8 ± 1.0% 이었으며, Thy1⁺의 population은 22.0 ± 1.2% 이었다. GW, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 각각 투여하고 분리한 splenocytes 중 B220⁺ 세포의 population은 GW를 투여한 군은 대조군에 비해 감소하였으며, GVW(1:1), GVW(1:3)을 투여한 군은 GW를 투여한 군에 비해 증가하였다. Thy1⁺ 세포는 GW를 투여한 군은 대조군에 비해 증가하였으며, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 투여한 군은 GW를 투여한 군에 비해 감소하였다. GE, GVE(1:1), GVE(1:3)을 각각 투여하고 분리한 B220⁺ 세포의 population은 GE를 투여한 군은 대조군에 비해 감소하였으며, GVE(1:1), GVE(1:3)을 투여한 군은 GE를 투여한 군에 비해 증가하였다. Thy1⁺ 세포는 GE를 투여한 군은 대조군에 비해 증가하였으며, GVE(1:1), GVE(1:3)을 투여한 군은 GE를 투여한 군에 비해 감소하였다.

Table 3. Effects of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on the subpopulation of murine splenocytes

Samples	Splenocytes Subpopulation (%)			
	B220 ⁺	Thy1 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁺
Control	48.8 ± 1.0	22.0 ± 1.2	19.4 ± 0.9	10.3 ± 0.8
GW	38.7 ± 1.3 ^{**}	28.5 ± 1.5 ^c	25.9 ± 1.3 ^{**}	12.5 ± 0.8
GVW(1:1)	48.3 ± 1.6 ^{**}	22.3 ± 0.8 ^a	21.2 ± 1.0 ^e	11.8 ± 0.7
GVW(1:3)	46.8 ± 1.2 [#]	22.7 ± 1.1 ^a	23.5 ± 1.2	10.7 ± 0.6
GE	41.4 ± 1.3 ^c	27.6 ± 1.1 ^c	29.9 ± 1.1 ^{**}	12.4 ± 0.7
GVE(1:1)	47.5 ± 1.5 ⁵	23.1 ± 1.2 ⁵	22.5 ± 1.0 ⁵	11.3 ± 0.8
GVE(1:3)	47.3 ± 1.2 ⁵	22.6 ± 1.4 ⁵	20.3 ± 0.8 ³⁵	10.5 ± 0.5

The separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody. The data was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. ; Significantly different from control group (; p<0.05, ; p<0.01). ^a; Significantly different from GW group (^c; p<0.05, ^{**}; p<0.01). ⁵; Significantly different from GE group (⁵; p<0.05, ³⁵; p<0.01).

대조군 CD4⁺의 population은 19.4 ± 0.9% 이었으며, CD8⁺의 population은 10.3 ± 0.8% 이었다. GW, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)

을 각각 투여하고 분리한 splenocytes 중 CD4⁺ 세포는 GW를 투여한 군은 대조군에 비해 증가하였으며, GVW(1:1)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 감소하였다. CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다. GE, GVE(1:1), GVE(1:3)을 투여하고 분리한 splenocytes 중 CD4⁺ 세포는 GE를 투여한 군은 대조군에 비해 증가하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 감소하였다. Splenocytes 중 CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다 (Table 3).

5. 복강 macrophage의 phagocytic activity에 미치는 효과

Chemiluminescence(CL)은 phagocytosis가 진행되는 동안 생성되는 oxygen radical에 의해 발생되며, lucigenin에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 복강 macrophages로부터 생성되는 CL 양은 GW 투여군은 대조군에 비해 증가하였으며, GVW(1:1), GVW(1:3)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 감소하였다(Fig. 3). GE 투여군은 대조군에 비해 감소하였으며, GVE(1:1), GVE(1:3)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 4). FITC-conjugated *E. coli* particle를 이용하여 macrophages에 uptake되는 양을 inverted fluoromicroscope로 관찰하였을 때도 동일한 결과를 나타내었다 (Fig. 5).

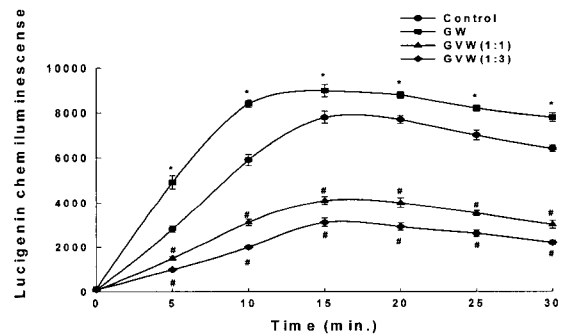


Fig. 3. Effects of the combined-administration of water extract of Ginseng Radix Rubra and water extract of Vitis Fructus on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. The chemiluminescence was measured for 30 min with luminometer. Each bar represents the mean ± SE of 5 mice. ; Significantly different from control group (p<0.001). ^a; Significantly different from GW group (p<0.001).

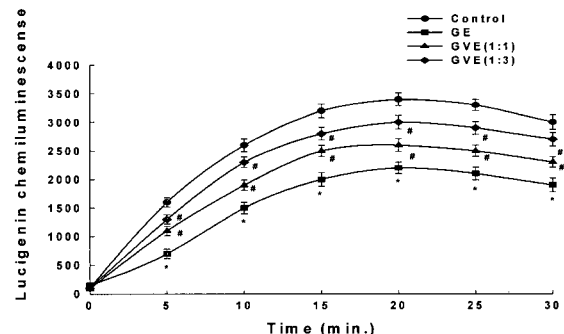


Fig. 4. Effect of the combined-administration of 40% ethyl alcohol extract of Ginseng Radix Rubra and 40% ethyl alcohol extract of Vitis Fructus on lucigenin chemiluminescence in murine peritoneal macrophages. Each bar represents the mean ± SE of 5 mice. ; Significantly different from control group (p<0.001). ^a; Significantly different from GE group (p<0.001).

6. 복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 생성에 미치는 효과
 대조군의 macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때 NO 생성량은 $2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 이었으며, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량은 48 시간 후에 $12.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 로 증가하였다. GW 투여군은 LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때 NO 생성량이 대조군에 비해 증가하였으나, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 각각 투여한 군은 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE 투여군은 대조군에 비해 감소하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 각각 투여한 군은 GVE(1:1) 투여군에서 GE 투여군에 비해 증가하였다 (Fig. 6).

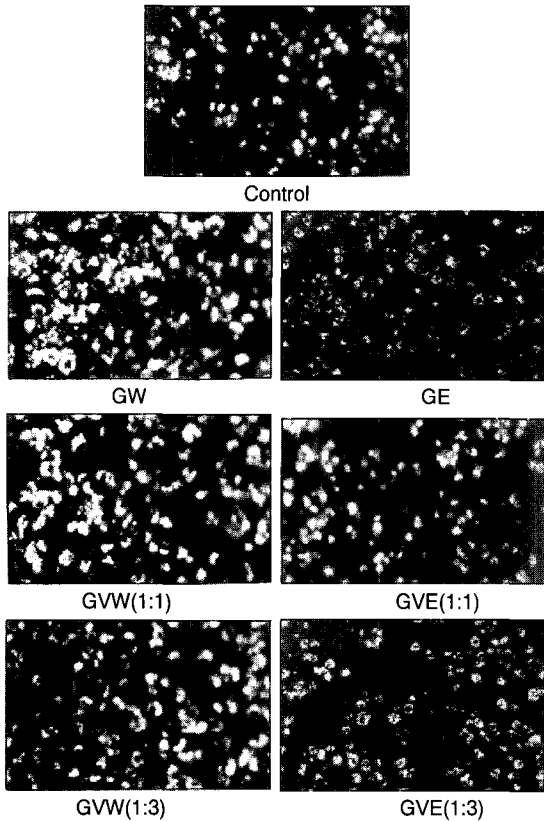


Fig. 5. Photomicrographs (taken at $200 \times$ magnification) of the engulfment of FITC-conjugated *E. coli* particles in peritoneal macrophages obtained from the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus administered mice.

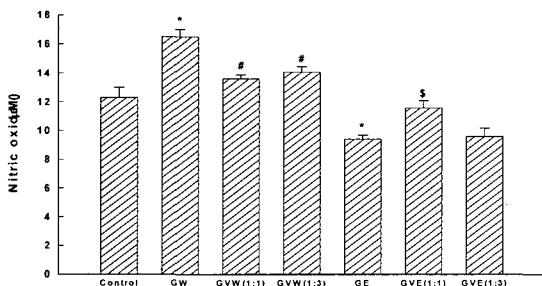


Fig. 6. Effects of the combined-administration of Ginseng Radix Rubra and Vitis Fructus on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophage. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$). #: Significantly different from GW group ($p < 0.001$). §: Significantly different from GE group ($p < 0.01$).

고찰

인삼은 phagocytic activity의 증가작용²², NK 세포의 활성화 작용⁴), 세포성면역증강작용²³ 및 체액성면역증강작용⁵), 항산화 작용²⁴), nitric oxide 생성 촉진작용²⁵), lymphocytes 증식촉진작용²⁶) 등 면역증강작용에 대한 연구가 많이 보고되었다. 인삼의 면역증강작용은 인삼에 함유된 ginsenoside에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 함유된 성분 중 ginsenoside Rg1은 helper T 세포를 활성화시키며^{6,7}), phagocytic activity를 증가시키고²⁷), ginsenoside Rb1은 stress에 의해 저하되는 면역증을 증강시킨다고 보고²⁸)되었다. 홍삼은 상처치유 촉진작용²⁹), interleukin-1 β 생성 촉진작용³⁰), 간재생작용³¹) 등이 있음이 알려져 있다. 한편, 포도는 항산화작용^{10,11,32}), 혈관확장작용^{12,33}), 암세포증식억제작용³⁴) 등이 있음이 보고되었으며, 알코올에 의해 감소되는 면역능을 회복시키는 작용도 있음이 보고되었다³⁵). 포도는 유럽종인 *Vitis vinifera*와 미국종인 *Vitis labrusca*가 있는데, 본 실험에서는 우리나라에서 주로 재배되고 있는 *Vitis vinifera* L.를 사용하였다.

Thymocytes에 T-lymphocyte mitogen인 concanavalin A를 처리하였을 때, Con A를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가하였으며, GW를 투여하고 분리한 thymocytes의 세포생존율은 Con A를 처리한 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이는 인삼이 lymphocytes의 증식촉진작용이 있다는 Wilasrusmee의 보고²⁶)와 세포성면역기능을 증가시킨다는 See의 보고²³)와도 동일한 결과라고 추정된다. 한편, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 투여하고 분리한 thymocytes의 세포생존율은 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE를 투여하고 분리한 thymocytes의 세포생존율은 Con A를 처리한 대조군 (Con A⁺)에 비해 유의성 있게 감소하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여하고 분리한 thymocytes의 세포생존율은 GE 투여군에 비해 증가하였다. 홍삼 물추출물 투여에 의해 thymocytes의 세포생존율이 증가되고, 40% ethyl alcohol 홍삼추출물 투여에 의해 thymocytes의 세포생존율이 감소되었다는 결과는 홍삼 물추출물과 40% ethyl alcohol 추출물에 함유되어 있는 성분에 차이가 있음을 시사하는 것이다. 한편, 홍삼 물추출물에 의해 증가된 thymocytes의 세포생존율이 홍삼 및 포도 물추출물에 의해 감소되고, 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물에 의해 감소된 thymocytes의 세포생존율이 홍삼 및 포도 40% ethyl alcohol 추출물에 의해 증가되었다는 결과는 포도가 홍삼의 면역능을 조절하고 있음을 의미하는 것이다.

Splenocytes에 B-lymphocyte mitogen인 lipopolysaccharide를 처리하였을 때, LPS를 처리하지 않은 대조군 (LPS-)에 비해 세포생존율이 증가하였으며, GW를 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 LPS를 처리한 대조군 (LPS+)에 비해 유의성 있게 감소하였으며, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 GW 투여군에 비해 증가하였다. GE를 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 LPS를 처리한 대조군 (LPS+)에 비해 유의성 있게 감소하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여하고 분리한 splenocytes의 세포생존율은 GE 투여군에 비해 증가하였다. 홍삼 물추출물에 의해 감

소된 splenocytes의 세포생존율이 홍삼 및 포도 물추출물에 의해 증가되고, 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물에 의해 감소된 splenocytes의 세포생존율이 홍삼 및 포도 40% ethyl alcohol 추출물에 의해 증가되었다는 결과는 포도가 홍삼투여에 의해 감소되는 B 세포의 면역능을 회복시켜 줄 수 있음을 시사하는 것이다.

Thymocyte는 thymus의 피질 및 수질에서 증식 및 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte 및 cytotoxic T lymphocyte로 분화되며, Th 세포로 분화된 세포들은 각종 cytokine을 분비하여 다른 T, B 세포 및 macrophage의 증식과 분화를 촉진하며, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다³⁶⁾. 대조군의 thymocytes 중 Th 세포는 11.2%, Tc 세포는 3.6%로 정상 생쥐 흉선에서 CD4⁺CD8⁻ cells은 약 12%, CD4⁺CD8⁺ cells은 약 3%로 보고된 내용과 비슷한 결과를 나타내었으며³⁷⁾, GW를 투여하였을 때 CD4⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, GVW(1:1)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 증가하였다. GE를 투여하였을 때 CD4⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, GVE(1:1)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 증가하였다. 이는 포도가 미성숙 T 세포를 활성화하여 홍삼의 helper T 세포에 대한 작용을 증강시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 이러한 결과는 인삼의 성분인 Rg1이 helper T 세포의 비율을 증가시킨다는 Lee의 보고⁷⁾와 비교하였을 때, 본 실험에서 사용한 sample이 total extract이기 때문에 약리작용에 차이가 나타난 것이 아닌가 추정된다. GW를 투여하였을 때 CD8⁺ 세포는 3.2%로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, GVW(1:1)을 투여한 군은 GW 투여군에 비해 증가하였으며, GE를 투여하였을 때 CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였으나, GVW(1:1)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 감소하였다. 이 결과는 포도 물추출물은 홍삼 물추출물의 cytotoxic T 세포에 대한 작용을 증강시키나, 포도 40% ethyl alcohol 추출물은 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물의 cytotoxic T 세포에 대한 작용을 감소시킴을 의미하는 것이다. 이 또한 홍삼 물추출물과 40% ethyl alcohol 추출물에 함유되어 있는 성분에 차이가 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. 대조군의 splenocytes 중 B220⁺ 세포는 48.8%, Thy1⁺ 세포는 22.0% 이었으나, GW를 투여하였을 때 B220⁺ 세포는 대조군에 비해 감소하였으며, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 각각 투여하였을 때 GW 투여군에 비해 증가하였다. GE를 투여하였을 때 B220⁺ 세포는 대조군에 비해 감소하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 각각 투여하였을 때 GE 투여군에 비해 증가하였다. GW를 투여하였을 때 Thy1⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였으며, GVW(1:1) 및 GVW(1:3)을 각각 투여하였을 때 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE를 투여하였을 때 Thy1⁺ 세포는 대조군에 비해 증가하였으며, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 각각 투여하였을 때 GE 투여군에 비해 감소하였다. 이 결과는 GW 및 GE를 각각 투여하였을 때 B 세포의 population은 감소하고 T 세포의 population은 증가하나, GVW 및 GVE를 투여하였을 때 이들 작용이 정상 상태로 회복되고 있음을 의미하는 것이다. 대조군의 splenocytes 중 Th 세포는 19.4%, Tc 세포는 10.3%로 나타났으며, GW를 투여하였을 때 CD4⁺ 세포는 대조군에 비해 증

가하였다. 이는 인삼 추출물이 splenocytes의 helper T 세포 population을 증가시킨다는 Han 등의 보고³⁸⁾와 인삼의 성분인 Rg1이 helper T 세포의 population을 증가시킨다는 Kenarova 등의 보고⁸⁾와도 동일한 결과이다. 한편, GE 투여군은 대조군에 비해 더욱 증가하였고, GVE(1:1) 및 GVE(1:3)을 투여한 군은 GE 투여군에 비해 감소하였다. GW 및 GE를 투여하였을 때 CD8⁺ 세포는 대조군에 비해 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 홍삼에 의한 splenic T 세포의 population 증가는 주로 helper T 세포에 기인된 것이며, 포도에 의한 population 억제도 주로 helper T 세포에 기인된 것이라 추정된다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 macrophages가 활성화되어 phagocytosis가 촉진된다³⁹⁾. 본 실험에서 사용한 phagocytic activity를 측정하는 방법은 macrophages가 particle를 phagocyte하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정하는 것이다¹⁸⁾. Macrophage로부터 생성되는 chemiluminescence (CL)양을 측정할 결과 GW 투여군은 대조군에 비해 증가하였다. 이는 인삼 추출물이 phagocytosis를 증가시킨다는 Song 등의 보고⁴⁰⁾와도 동일한 결과이다. 한편, GVW(1:1) 및 GVW(1:3) 투여군은 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE 투여군은 대조군에 비해 CL 양이 감소하였으나, GVE(1:1) 및 GVE(1:3) 투여군은 GE 투여군에 비해 증가하였다. 이 결과는 홍삼 물추출물을 투여하면 phagocytic activity가 증가하나, 포도 물추출물을 병용 투여하면 감소되며, 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물을 투여하면 phagocytic activity가 감소하나, 포도 40% ethyl alcohol 추출물을 투여하면 증가되었다. 이는 포도주가 알코올에 의해 감소되는 면역기능을 회복시킬 수 있다는 Percival 등의 보고³⁵⁾와도 동일한 결과이다. 이러한 결과는 홍삼 물추출물은 비특이적 면역반응을 증가시키나 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물은 비특이적 면역반응을 억제시킴을 의미하는 것이다. 또한, 홍삼 물추출물 및 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물의 작용이 서로 상반된다는 결과는 이들 추출물에 함유된 성분에 차이가 있음을 확인하여 주는 결과라 할 수 있다.

본 실험에서 LPS와 γ -interferone을 처리하지 않은 대조군에서 분비되는 NO 양은 2.5 μ M 이었으나, LPS와 γ -interferone을 처리하였을 때는 12.3 μ M로 증가하였으며, GW 투여군은 16.5 μ M로 LPS와 γ -interferone을 처리한 대조군에 비해 증가하였다. 이는 인삼이 NO 생성을 촉진한다는 Gillis의 보고²⁴⁾와 Friedl 등의 보고²⁵⁾와도 동일한 결과이다. 한편, GVW(1:1) 및 GVW(1:3) 투여군은 13.6 및 14.1 μ M로 GW 투여군에 비해 감소하였다. GE 투여군은 9.4 μ M로 LPS와 γ -interferone을 처리한 대조군에 비해 감소하였으나, GVE(1:1) 투여군은 11.6 μ M로 GE 투여군에 비해 증가하였다. 이 결과는 홍삼 물추출물은 macrophages가 주도하는 비특이적 면역반응을 증가시키나, 홍삼 40% ethyl alcohol 추출물은 비특이적 면역반응을 억제시키고, 포도를 병용하면 이들 작용이 정상으로 회복될 수 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과들은 포도가 홍삼의 면역능을 조절할 수 있다는 것을 의미하는 것이며, 홍삼 및 포도를 병용하여 투여할 때

는 물로 추출하는 것 보다는 ethyl alcohol 로 추출하여 병용투여 하는 것이 바람직하다고 사료된다.

결 론

홍삼과 포도를 병용투여하였을 때 생쥐의 면역능에 미치는 영향은 다음과 같다.

Thymocytes의 생존율은 홍삼 물추출물을 투여하면 증가되거나 포도를 병용하면 감소되며, 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 감소되거나 포도를 병용하면 증가되었다. Splenocytes의 생존율은 홍삼 물추출물을 투여하면 감소되거나 포도를 병용하면 증가되며, 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 감소되거나 포도를 병용하면 증가되었다. Thymocytes의 CD4⁺ cell population은 홍삼 물추출물 및 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 별 차이가 없었으나, 포도를 병용하면 증가되었다. CD8⁺ cell의 population은 홍삼 물추출물을 투여하면 별 차이가 없었으나 포도를 병용하면 증가되었고, 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 증가되었으나 포도를 병용하면 감소되었다. Splenocytes의 B220⁺ cell population은 홍삼 물추출물 및 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 감소되었으나, 포도를 병용하면 증가되었으며, Thy1⁺ cell population은 홍삼 물추출물 및 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 증가되었으나, 포도를 병용하면 감소되었다. Splenocytes의 CD4⁺ cell population은 홍삼 물추출물 및 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 증가되었으나 포도를 병용하면 감소되었으며, CD8⁺ cell population은 홍삼 물추출물 및 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 별 차이가 없었다. 복강 macrophages의 phagocytic activity는 홍삼 물추출물을 투여하면 증가되거나 포도를 병용하면 감소되며, 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 감소되거나 포도를 병용하면 증가되었다. 복강 macrophages에서 생성되는 nitric oxide는 홍삼 물추출물을 투여하면 증가되거나 포도를 병용하면 감소되며, 홍삼 ethyl alcohol 추출물을 투여하면 감소되거나 포도를 병용하면 증가되었다.

이상의 실험결과 포도는 홍삼의 면역능을 조절하는 작용이 있었다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(전북대학교 헬스케어사업단).

참고문헌

1. 江蘇新醫學院編: 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p 2315, 1978.
2. 강병수 외: 한의학대사전, 서울, 도서출판 정담, p 1282, 1698, 1998.
3. 劉正才 外: 中醫免疫, 重慶, 重慶出版社, pp 15-20, 1983.
4. Kim, J.Y., Germolec, D.R. and Luster, M.I. Panax ginseng as

- a potential immunomodulator: studies in mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol., 12(2):257-276, 1990.
5. Liou, C.J., Huang, W.C. and Tseng, J. Long-term oral administration of ginseng extract modulates humoral immune response and spleen cell functions. Am. J. Chin. Med., 33(4):651-661, 2005.
6. Kenarova, B., Neychev, H., Hadjiivanova, C. and Petkov, V.D. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from Panax ginseng. Jpn. J. Pharmacol., 54(4):447-454, 1990.
7. Lee, E.J., Ko, E., Lee, J., Rho, S., Ko, S., Shin, M.K., Min, B.I., Hong, M.C., Kim, S.Y. and Bae, H. Ginsenoside Rg1 enhances CD4(+) T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation. Int. Immunopharmacol., 4(2):235-244, 2004.
8. Xiaoguang, C., Hongyan, L., Xiaohong, L., Zhaodi, F., Yan, L., Lihua, T. and Rui, H. Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. J. Ethnopharmacol., 60(1):71-78, 1998.
9. Kaneko, H. and Nakanishi, K. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. J. Pharmacol. Sci., 95(2):158-162, 2004.
10. Soares, D.M.R., Costa, V.F.S., Souza, M.A., Kovary, K., Guedes, D.C., Oliveira, E.P., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Oliveira, R.M., Tano, T., Gusmao, C.M.L. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. J. Pharm. Pharmacol., 54(11):1515-1520, 2002.
11. Briedis, V., Povilaityte, V., Kazlauskas S. and Venskutonis, P.R. Polyphenols and anthocyanins in fruits, grapes juices and wines, and evaluation of their antioxidant activity. Medicina, 39(2):104-112, 2003.
12. Madeira, S.V., de Castro, R.A., Ognibene, D.T., de Sousa, M.A. and Soares de Moura, R. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. Pharmacol. Res., 52(4):321-327, 2005.
13. Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. J. Immunol., 120, 1497-1503, 1979.
14. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. methods, 65, 55-63, 1983.
15. Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. J. Immunol. methods, 129, 23-30, 1990.
16. Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of

- the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, 179, 873-879, 1994.
17. Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174, 259-268, 1994.
 18. Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 112, 163-168, 1988.
 19. Chok, P.W., Choon, S.P. and Benjamin, H.S. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*, 162, 1, 1993.
 20. Rockett, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B. and Clark, I.A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9):3280-3283, 1991.
 21. Channon, J.Y., Leslie, C.C. and Johnston, Jr. R.B. Zymosan-stimulated production of phosphatidic acid by macrophages: relationship to release of superoxide anion and inhibition by agents that increase intracellular cyclic AMP. *J. Leucocyte Biol.*, 41, 450-455, 1987.
 22. Scaglione, F., Ferrara, F., Dugnani, S., Falchi, M., Santoro, G. and Fraschini, F. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 16(10):537-542, 1990.
 23. See, D.M., Broumand, N., Sahl, L. and Tilles, J.G. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*, 35(3):229-235, 1997.
 24. Gillis, C.N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem. Pharmacol.*, 54(1):1-8, 1997.
 25. Friedl, R., Moeslinger, T., Kopp, B. and Spieckermann, P.G. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Panax ginseng* root in RAW 264.7 cells. *Br. J. Pharmacol.*, 134(8):1663-1670, 2001.
 26. Wilasrusmee, C., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., Kittur, S. and Kittur, D.S. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am. Surg.*, 68(10):860-864, 2002.
 27. Liu, J., Wang, S., Liu, H., Yang, L. and Nan, G. Stimulatory effect of saponin from *Panax ginseng* on immune function of lymphocytes in the elderly. *Mech. Ageing Dev.*, 83(1):43-53, 1995.
 28. Luo, Y.M., Cheng, X.J. and Yuan, W.X. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb1 on immunity in cold water swim stress mice and rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 14(5):401-404, 1993.
 29. Morisaki, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Zenibayashi, M., Shiina, R., Koyama, N., Kanzaki, T. and Saito Y. Mechanism of angiogenic effects of saponin from ginseng *Radix rubra* in human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 115(7):1188-1193, 1995.
 30. Nakajima, S., Uchiyama, Y., Yoshida, K., Mizukawa, H. and Haruki, E. The effects of ginseng *radix rubra* on human vascular endothelium cells. *Am. J. Chin. Med.*, 26(3-4):365-373, 1998.
 31. Kwon, Y.S., Jang, K.H. and Jang, I.H. The effects of Korean red ginseng on liver regeneration after partial hepatectomy in dogs. *J. Vet. Sci.*, 4(1):83-92, 2003.
 32. Lu, Y., Zhao, W.Z., Chang, Z., Chen, W.X. and Li, L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. *Acta Pharmacol. Sin.*, 25(8):1083-1089, 2004.
 33. Aldini, G., Carini, M., Piccoli, A., Rossoni, G. and Facino, R.M. Procyanidines from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.*, 73(22):2883-2898, 2003.
 34. Zhao, C., Giusti, M.M., Malik, M., Moyer, M.P. and Magnuson, B.A. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J. Agric. Food Chem.*, 52(20):6122-6128, 2004.
 35. Percival, S.S. and Sims, C.A. Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. *J. Nutri.* 130, 1091-1094, 2000.
 36. Miceli, M.C. and Parnes, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59, 1993.
 37. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. Cellular and molecular immunology. p.177-178 Saunders Company(2ed). U.S.A., 1994.
 38. Han, S.K., Song, J.Y., Yun, Y.S. and Yi, S.Y. Ginsan improved Th1 immune response inhibited by gamma radiation. *Arch. Pharm. Res.*, 28(3):343-350, 2005.
 39. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45, 1-8, 1984.
 40. Song, Z., Moser, C., Wu, H., Larsen, M.W., Johansen, H.K., Faber, V., Kharazmi, A. and Hoiby, N. Ginseng modulates the immune response via its effect on cytokine production-secondary publication. *Ugeskr. Laeger.*, 167(33):3054-3056, 2005.