

월견초종자유가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향

안영근* · 오연준 · 김정훈

원광대학교 약학대학

(Received January 20, 1992)

Effects of Evening Primrose Oil on the Immune Responses in Mice

Young Keun Ahn*, Yun Joon Oh and Joung Hoon Kim

College of Pharmacy, Won Kwang University, Iri 570-749, Korea

Abstract—The purpose of this experiment was to investigate both the immunomodulatory effect of evening primrose(EP) oil and the effects of EP oil on immunoregulation by cyclophosphamide in mice. EP oil at doses of 0.1, 0.2 and 0.4 ml/kg were orally administered to ICR male mice once daily for 28 consecutive days. Cyclophosphamide was injected intraperitoneally to ICR mice with a single dose of 5 mg/kg at 2 days before secondary immunization. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells(S-RBC). Immune responses were evaluated by humoral and cellular immune responses and non-specific immune response. The results of this study were summarized as follows; (1) The humoral immune responses such as hemagglutination titer(HA), hemolysin titer(HY), Arthus reaction and plaque forming cell(PFC) were significantly enhanced in the low dose EP oil administered groups(0.1 and 0.2 ml/kg). However, in the high dose EP oil administered group(0.4 ml/kg) the responses were significantly lowered. (2) In the case of cellular immune responses, delayed type hypersensitivity reaction(DTH) was significantly decreased in EP oil whereas rosette forming cell(RFC) was remarkably enhanced. (3) Activities of natural killer cells and phagocyte were generally enhanced in EP oil. In addition, serum albumin and globulin were also increased.

Keywords □ Evening primrose oil, humoral immunity, cellular immunity, phagocytic activity, natural killer cell activity, serum proteins.

월견초(Evening primrose)는 바늘꽃과(Epilobiacae)에 속하는 식물로, 월견초의 종자유가 세계 여러나라에서 본격적인 건강식품으로써 화제를 불러 일으키고 있으며, 옛부터 월견초종자유는 민간요법으로서 피부의 염증이나 발진에 발랐으며, 또한 내복함으로써 기침, 거담, 변비 및 감염 등에 효과가 있어서 널리 이용되고 있다.^{1,2)}

월견초종자는 약 24%의 유지를 함유하고 있는데, 그 유지의 지방산 조성은 palmitic acid 7~10%, stearic acid 1.5~3.5%, oleic acid 6~11%, linoleic acid 65~80%, γ -linolenic acid 7~14%(국내 생산품은

8.9~10.4%)를 함유하고 있다고 보고하였다.³⁾ 이와 같이 다가불포화지방산을 풍부하게 함유하는 식물은 고cholesterol혈증,⁴⁾ 혈전성 질병,⁵⁾ 비만증,⁶⁾ 고혈압⁷⁾ 및 alcohol중독자⁸⁾에게 흔히 권장되고 있다.

다가불포화지방산중에서 생물학적 활성을 가지며 건강유지에 바람직한 효과를 나타내는 것은 필수지방산(essential fatty acid)이며,⁹⁾ 이는 체내에서 생성되지 않기 때문에 음식물중에 함유된 것이 공급원이 되고 있다. 그 중 특히 중요한 γ -linolenic acid(18 : 3 w6)의 대사경로를 보면 linoleic acid(18 : 2w6)는 Δ -6-desaturase로 알려진 효소의 작용에 의해 γ -linolenic acid로 변환되고, 이 γ -linolenic acid는 다시 chain elongase에 의해 dihomo- γ -linolenic acid(20 : 3w6)

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

로 변환된 후 두 경로로 대사되는데, 그 하나는 여러 세포내에서 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin G₁을 생성하고, 이 prostaglandin G₁은 prostaglandin synthetase에 의해 prostaglandin E₁, prostaglandin F₁ 및 prostaglandin D₁으로 되며, prostaglandin E₁은 혈소판응집억제작용,¹⁰⁾ 혈소판의 adenylate cyclase를 증가시키는 혈관확장작용 및 흉선과 T-lymphocyte의 기능을 특이하게 조절하는 역할을 한다.¹¹⁻¹⁴⁾ 또 한편으로는 Δ-5-desaturase에 의해 arachidonic acid(20:4w6)의 생성은 직접작용하며, 이 arachidonic acid는 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin G₂를 생성하고, 이 prostaglandin G₂는 prostacyclin synthetase에 의해 prostaglandin I₂로 전환된다. prostaglandin I₂의 혈소판 응집억제작용은 prostaglandin E₁의 수십배를 지니고 있다.¹⁵⁾ 또한 arachidonic acid는 lipoxygenase에 의해 leukotrienes을 생성하여 평활근 수축작용, T-lymphocyte, macrophage의 기능을 조절한다고 보고하였다.¹⁶⁾

이와같이 cis-linoleic acid로부터 γ-linolenic acid로의 변환은 아연 및 pyridoxine 결핍,^{14,17,18)} insulin 결핍,^{19,20)} 고혈당증,²¹⁾ 포화지방산의 과잉섭취,²²⁾ virus 감염과 방사선조사,^{23,24)} 노령화²⁵⁾ 및 장기음주 등^{8,26)}으로 저지된다고 보고되었으며, Horrobin 등²⁷⁾은 primrose계 종자유에는 다른 식물유보다 다량의 cis-linoleic acid가 함유하고 있기 때문에 primrose계 종자유의 투여는 cis-linoleic acid에서 γ-linolenic acid로의 변환과정의 차단에서 초래되는 각종 질병에 효과가 있음을 보고하였다.

지금까지 자연계에서 γ-linolenic acid를 함유하고 있는 것으로는 evening primrose oil과 모유로 알려져 있다.²⁷⁾

월경초종자유의 순환기계에 관한 보고로는, 인체에 있어서 죽상경화증과 고지혈증, 관상동맥심장병 및 다발성경화증 등에 효과가 있음을 보고하였으며,²⁸⁻³⁰⁾ David 등³¹⁾은 심장질환에 있어서 γ-linolenic acid가 혈중cholesterol치의 저하작용이 강함을 보고하였고, Sugano 등³²⁾은 고cholesterol이 투여된 흰쥐에 있어서 각종의 다가불포화지방산을 투여하여 혈중cholesterol치 저하효과를 비교관찰한 바 월경초종자유가 유의한 효과가 있음을 보고하였고, Soma 등³³⁾은 자연 발생적으로 혈압이 높은 흰쥐에 있어서 월경초종자유를 투여한바, 혈압이 저하됨을 보고하였다.

월경초종자유의 alcoholism에 관한 보고로는, Horrobin³⁴⁾과 Rotrosen 등³⁵⁾의 보고에 의하면 alcohol의 급성효과는 prostaglandin E₁의 생성을 증가시키나, 만성섭취는 dihomog-γ-linolenic acid의 고갈을 초래함으로써 alcohol의 금단증상은 prostaglandin E₁의 현저한 저하를 나타냄으로, 동물이나 인체에 있어서 prostaglandin E₁과 γ-linolenic acid를 투여하면 alcohol의 금단증상을 감소시킬 수 있음을 보고하였고, Wilson 등³⁶⁾은 ethanol을 섭취한 동물에서 prostaglandin E₁의 투여는 지방간의 발생을 방지해 준다고 보고하였다.

월경초종자유의 월경전조증에 관한 보고로는, Brush³⁷⁾는 월경초종자유에서 유래된 prostaglandin E₁이 prolactin의 효과를 저하시킴을 보고하였으며, Horrobin 등³⁸⁾은 γ-linolenic acid 투여에 의해 생리통 감소와 생리주기가 일정해짐을 보고하였다.

월경초종자유의 피부에 대한 보고로는 Wright 등³⁹⁾은 atopy성습진환자에 있어서 다량의 γ-linolenic acid를 함유한 월경초종자유투여군에서 43%유효함을 보고하였으며, Saarinen 등⁴⁰⁾은 모유로 자란 유아에 있어 atopy성질환을 예방할 수 있음을 보고하였고, Hassan 등⁴¹⁾은 인체와 흰쥐의 피부에 C¹⁴-labeled γ-linolenic acid를 연고형태로 투여하면 적용부위의 피하조직에 효과가 지속됨으로서 피부질환을 치료할 수 있다고 보고하였다.

월경초종자유의 암에 관한 보고로는, Seo 등⁴²⁾은 sarcoma 180유발생쥐에 있어서 월경초종자유가 생존일수의 연장, 암세포와 백혈구증식의 억제효과가 있음을 보고하였으며, Paccalin 등⁴³⁾은 간경변환자에 있어서는 Δ-6-desaturase의 결핍에 기인하기 때문에 월경초종자유를 투여한바, 암세포의 성장률을 저하시키는데 유효함을 보고하였고, Booyens 등⁴⁴⁾은 악성 암세포의 배지에 10 μg/ml농도의 γ-linolenic acid를 첨가하고 10일간 배양한바, 69% 정도로 암세포의 성장률이 억제되었다고 보고하였다.

월경초종자유의 노화와 면역억제에 대한 보고로는, Horrobin 등¹¹⁾은 입마구에서 cyclic AMP치가 감소되고 Δ-6-desaturase의 활성저하가 노화의 원인임을 규명하였고, 월경초종자유에 함유된 γ-linolenic acid를 투여한 바, 혈전을 억제하는 T-lymphocyte를 활성화시키고 조직에서 cyclic AMP치를 증가시킨다고 보고하였으며, Carmichael⁴⁵⁾은 월경초종자유, vitamin

및 mineral의 혼합물이 류마티스성 관절염의 치료에 현저한 효과가 있음을 보고하였으며, McCormick 등⁴⁶⁾에 의하면 다발성관절염이 있는 흰쥐에서 월견초종자유를 투여한 바, 현저한 효과가 있음을 보고하였다.

이와같이 월견초종자유의 생체기능에 대한 영향의 연구는 많이 진행되어 왔으나, 월견초종자유가 여러 가지 용량과 특이적 및 비특이적 면역반응들과의 상관성에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 저자들은 월견초종자유에 따른 면역반응에 미치는 영향을 규명하고자, 본 실험을 실시한 바, 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

실험방법

실험동물— 생후 5~6주령 체중 17~21g의 ICR 웅성 생쥐를 경남축산(경기도 화성소재)에서 분양받아 시판사료(제일사료 Co.: 조단백질 22.5% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 7.1% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.7% 이상)로 1주간 급식시켜 적응시킨 후에, 10마리를 1군으로 하고 전체를 8군으로 나누어 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 50~60%로 유지되는 항온 습식 사육실에서 4주간 사육하였다.

월견초종자유(Evening primrose oil)의 조제 및 투여— 한국산 야생 월견초(*Oenothera oderata* Jacquin) 종자를 야산에서 채취하여 그늘에서 1개월간 건조한 후, petroleum ether(Rots Chemical Co.)를 용매로 하여 soxhlet추출장치로 월견초종자유(이하: EP oil)를 추출하였다. (실험에 사용한 EP oil의 분석치: γ -linolenic acid 10.2%, linoleic acid 71.7%, palmitic acid 8.8%, oleic acid 7.0%, stearic acid 1.3%)

본 EP oil을 olive oil (Yakuri Pure Chemicals Co., Japan)에 용해하여 체중 kg당 0.1, 0.2 및 0.4 ml를 각 실험군에 28일간 1일, 1회 일정한 시각에 경구투여하였다. 그리고 대조군과 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군은 olive oil 10 ml/kg를 위와 동일한 방법으로 투여하였다.

Cyclophosphamide용액의 조제 및 투여— Cyclophosphamide(Sigma Co., Ltd)는 사용 직전에 생리 식염수에 용해하여 2차면역 2일전에 5 mg/kg를 복강내에 1회 주사하였다.

체중 및 장기의 중량계측— 실험동물의 체중은 공

시약물투여 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 최종 약물투여 2일 후에 실험동물의 경동맥을 절단하고 채혈한 후 간장, 비장 및 흉선을 각각 적출하여, 그 중량을 측정하여 대체중 백분비를 구하였다.

항원조제— 본 실험에서는 면양적혈구(Sheep red blood cell 이하 S-RBC)를 사용하였는데, 그 방법은 응성면양의 경동맥으로부터 heparin처리 주사기로 채혈한 후, 동량의 Alserver씨액(pH 6.1)을 가하여 4°C 에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때에는 사용 직전 PBS로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks balanced salt solution(이하 HBSS: Gibco Laboratories Co., Ltd.)에 부유시켜 사용하였다.

면역— 원심 세척한 S-RBC를 Ha 등⁴⁷⁾의 방법을 참고하여 HBSS에 1×10^8 S-RBC/ml의 농도로 부유시키고 부유액 0.1 ml(1×10^7 S-RBC)를 생쥐의 미정맥에 주사하여 1차면역을 유도하였다. 2차면역은 1차면역 4일 후에 생쥐의 좌측후지족척피내에 2×10^9 S-RBC/ml 부유액 0.05 ml(1×10^8 S-RBC)를 주사하여 면역하였다.

혈청의 분리 및 비동화— 생쥐의 경동맥을 절단하여 혈액을 채혈하여 응고시킨 후, 원심 분리하여 혈청을 분리하고 56°C 에서 30분간 비동화시킨 후 4°C 에서 보존하여 사용하였다.

적혈구응집소(Hemagglutination titer 이하: HA titer)의 측정^{48,49)}— S-RBC의 응집소가를 microtitration tray(Nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로부터 얻은 각 비동화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 후, HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C 에서 18시간 정치하여 적혈구의 응집유형을 관찰판독하였으며, 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

적혈구 용혈소(Hemolysin titer 이하: HY)의 측정^{48,49)}— S-RBC의 양 및 혈청의 희석은 응집소 측정시와 동일하게 실시하였으며, S-RBC와 희석혈청이 들어 있는 각 well에 guinea pig complement를 20 배로 희석하여 0.025 ml씩 가한 다음 37°C 에서 1시간 방치하여 용혈여부를 관찰하였다. 이때에 완전 용혈을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 역가로 판독하였다.

적혈구 2-Mercaptoethanol(2-ME)내성응집소가의 측정^{48,49)}—각 혈청의 2-ME내성응집소가를 판정하기 위하여 0.15 N 2-ME(Eastman Kodak Co.)로 혈청을 처리하여, 2-ME내성항체를 immunoglobulin G(Ig G) 항체로, 2-ME로 처리하기 전의 항체를 2-ME감수성 항체 또는 Ig M 항체로 판독하였는데, 판독방법은 다음과 같이 실시하였다. 즉 혈청의 2-ME 처리는 0.15 N 2-ME가 함유된 HBSS로 혈청을 희석하고, 증발하지 않도록 tray를 밀폐하여, 37°C에서 30분간 방치한 후, S-RBC를 가하여 응집소가를 상기한 방법으로 검사하였다.

족척종창반응의 검사(Footpad swelling test)—Arthus반응 및 지연형과민반응(delayed type hypersensitivity reaction 이하 : DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등⁵⁰⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 1차면역 4일 후에 S-RBC 0.05 ml(1×10^8)를 생쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사 후 일정시간 경과한 후, 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co., Ltd.)로 측정하였으며, 종창정도의 측정기는 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등⁵¹⁾의 판독기준에 따라 3시간 경과 후의 반응을 Arthus 반응, 24시간 경과 후의 반응을 지연형과민반응(DTH)으로 간주하였다.

$$\text{Footpad swelling index} = \frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

비장세포 부유액의 조제⁴⁸⁾—비장을 생쥐로부터 무균적으로 적출하여 minimum essential medium(이하 MEM : Gibco Laboratories Co., Ltd.)을 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh로 여과하여 사세포괴를 제거하였으며, 한냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심 세척한 후, 비장세포 수가 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 부유시켰다. 매 실험 때마다 비장세포의 생존율 검사를 실시하였는데, 이 검사는 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 하였다. 즉, 시험관에 0.3 ml의 세포 부유액을 넣은 후, 0.1 ml의 trypan blue dye 용액을 가하여 5분 경과 후 혈구계산판에서 무색 생세포와 적색으로 염색된 사세포수를 측정한 후, 그 백분율을 계산하였다. 이때 세포 생존율이 95% 이상되었다.

비장세포의 Rosette형성세포수(이하 : RFC)의 검

출—비장세포의 rosette형성세포수의 검사는 Garvey 등⁵²⁾ 및 Elliott 등⁵³⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 비장세포 부유액(2×10^7 cells/ml) 0.025 ml를 시험관에 넣은 후, HBSS에 부유한 S-RBC(2×10^8 cells/ml) 0.025 ml를 넣고 혼합하여 200×G에서 12분간 원심분리한 후, 4°C에서 2시간 방치하였다. 그 후 조심스럽게 흔들어 재부유시킨 후, 이 부유액 1적을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경 관찰하였다. 검경시 비장세포에 S-RBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 식에 준하여 계산하였다.

$$\text{Rosette forming cell}(\%) = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

비장세포의 용혈반형성세포수(Plaque forming cell 이하 : PFC)의 측정—1) 비장세포의 용혈반형성세포수의 측정은 Cunningham⁵⁴⁾의 방법을 이용하여 다음과 같이 행하였다. 적출한 비장을 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고, 400×G에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거 후 37°C의 0.83% NH₄Cl용액에 부유시켜 3분간 정치하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 HBSS에 부유시켜 적혈구 제거 비장세포수를 혈구계산판에서 검경 관찰하였다.

2) S-RBC를 PBS로 4회 세척하고(400×G, 5분) 마지막 세척 후 PBS에 4×10^9 S-RBC/ml의 농도로 부유시켰다.

3) 4×10^9 S-RBC 250 μl, guinea pig complement (Gibco Lab. Co., Ltd.) 500 μl를 혼합하여 ice bath 상에서 30분간 정치 후 사용하였다.

4) 상기 guinea pig complement와 4×10^9 S-RBC혼합액 150 μl, 비장세포 부유액 650 μl를 잘 혼합하여 microchamber(Takahashi Giken Glass 76×26 mm)에 100 μl씩 주입하고 wax-vaseline(1 : 1)으로 밀봉하여 CO₂ incubator(37°C)에서 1시간 배양후 형성된 용혈반(plaque forming cells)수를 간접광선하에서 측정하였다.

5) 백만개의 비장세포 중 용혈반형성세포수(PFC/10⁶ spleen cells) 및 비장세포 전체중의 용혈반형성세포수(PFC/total spleen cells)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$PFC/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$PFC/\text{total spleen cells} = \left(\frac{PFC}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s$$

단, $a = \frac{650}{800}$ (배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)

N : the number of plaque observed in microchamber

C : the count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspension

V_m: volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension(ml)

Natural Killer Cell활성도의 측정—약물투여 최종 일로부터 2일후에 생쥐를 치사시켜 전술한 방법으로 비장세포를 분리하여 RPMI 1640배지에 2×10^7 cells/ml의 농도로 현탁시켜 작동세포로서 이용하였다. 표지세포로는 YAC-I cell을 이용하였으며, Kiesseling 등⁵⁵⁾의 방법으로 방사선 동위원소 sodium chromate (에너지 연구소에서 분양)를 labeling한 후, 2×10^5 cells/ml의 농도로 부유시켜 사용하였다. 이때 세포 생존율이 95% 이상되게 하였다. 작동세포(임파구)와 표지세포의 비율은 100 : 1 및 50 : 1로 하였다. ⁵¹Cr이 표지된 표지세포(2×10^5 cells/ml) 100 μ l와 작동세포(1×10^7 cells/ml) 100 μ l를 96 well tissue culture plate(Flow Lab., U.S.A.)의 각 well에 혼합한 후, 37°C 5% CO₂ incubator(Forma, U.S.A.)에서 5시간 incubation하였다. 이 tissue culture plate를 500×G에서 10분간 원심분리한 후, 상층액 100 μ l씩을 취하여 gamma counter(Beckman, U.S.A.)로 radioactivity를 측정하였다. 각 실험은 3배수로 실시하였으며, percent specific lysis를 다음의 식에 의하여 산출하였다.

$$\% \text{ Specific Lysis} = \frac{\text{c.p.m. in experiment}}{\text{c.p.m. maximum release}} - \frac{\text{c.p.m. spontaneous release}}{\text{c.p.m. spontaneous release}} \times 100$$

여기에서 c.p.m. in experiment는 실험군의 상층액 100 μ l의 방사선량, c.p.m. spontaneous release는 작동세포가 들어있지 않고 표지세포만 들어있는 대조군의 상층액 100 μ l의 방사선량이고, c.p.m. maximal release는 표지세포 (10⁴ cells in 100 μ l)에 triton X-

100 1% 용액 100 μ l를 가하여 얻었으며 표지된 방사능의 95% 이상이 되게 하였다. c.p.m. spontaneous release는 c.p.m. maximal release의 10% 이내가 되게 하였다.

대식세포활성검사—대식세포의 탐식능력을 측정하고자, 본 실험에서는 Biozzi 등⁵⁶⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물투여 2일후에 rotring ink를 멸균증류수에 녹인 1% gelatin액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와같이 조제한 colloid상 탄소현탁액을 생쥐체중 g당 0.01 ml씩 생쥐의 미정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부정맥혈관총(retroorbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μ l; microhemocrit)로 천자하여 20 μ l의 혈액을 10분, 20분, 30분 간격으로 채혈하여 0.1% sodium carbonate용액 2 ml가 든 vial에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼화하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하고, 이들로부터 phagocytic coefficient와 corrected phagocytic index를 계산하였다.

$$\text{Corrected Phagocytic Index} = \frac{B}{L+S} \times \sqrt[3]{K}$$

B : body weight

L : liver weight

S : spleen weight

K : phagocytic coefficient(측정농도의 10배수를 log로 전환하고 시간에 대하여 plot할때의 기울기)

혈청총단백의 측정—혈청 0.02 ml를 취하여 Biuret법⁵⁷⁾에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 시험관 A에 혈청 0.02 ml를 취하여, 시험관 S에 표준액(7g/dl albumin) 0.02 ml를 취하여, 각 관에 발색시약(Total protein color reagent=Buret reagent) 40 ml를 가하여 혼화한 다음, 30분 후(3시간 이내)에 발색시약을 대조로하여 545 nm에서 각각의 흡광도 E_A, E_S를 측정하였다. 다음과 공식에 준하여 계산하였다.

$$\text{총혈청단백농도} = \frac{E_A}{E_S} \times 7g/dl$$

Table I—The effect of evening primrose(EP) oil on the body weight in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>) for 28 days(%)	Increasing rate
Control	—	24.92± 3.41
EP oil	0.1	53.75± 19.20**
	0.2	36.96± 21.78**
	0.4	39.31± 12.01**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	39.10± 19.56***°
	0.2+5.0	33.02± 13.34***°
	0.4+5.0	47.54± 14.29***°
Cyclophosphamide	5.0	25.99± 9.41

Evening primrose(EP) oil was orally administered to ICR mice once daily for 28 consecutive days. Cyclophosphamide was injected intraperitoneally(*i.p.*) to ICR mice with a single dose 5 mg/kg body weight on 2 days before secondary immunization.

Each value represents the mean± S.D. from 30 mice.

The significances of the difference as compared as control group; **, $p < 0.01$.

The significances of the difference between EP oil plus cyclophosphamide-treated groups and cyclophosphamide-treated control group; °°, $p < 0.01$.

혈청 Albumin의 측정—BCG에 의한 albumin정량법에 준하여 측정하였다.⁵⁸⁾ 즉 혈청을 시험관 A에 취하고 표준액 0.025 ml(4g/dl albumin)를 시험관 S에 취하고 시험관 A, S에 발색시약 5.0 ml(0.012% bromocresol green in 0.075 M, pH 4.2, citrate buffer solution Brij 35)를 가하여 혼합, 25°C에서 30분간 방치한 후, 발색시약을 대조로 하여 630 nm에서 비색, 각각의 흡광도를 E_A , E_S 로 하고, 다음의 공식에 준하여 계산하였다.

$$\text{혈청 Albumin농도} = \frac{E_A}{E_S} \times 4g/dl$$

통계학적 분석—모든 자료는 mean± standard deviation(S.D.)으로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's t-test로 행하였다.

실험결과

월견초종자유가 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실시한 결과는 다음과 같다.

Table II—The effect of evening primrose(EP) oil on the liver weight in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	Liver wt. Body wt. × 100
Control	—	4.42± 0.46
EP oil	0.1	4.10± 0.43**
	0.2	4.42± 1.02
	0.4	3.51± 0.97**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	4.12± 0.28***°
	0.2+5.0	4.12± 0.79***°
	0.4+5.0	4.15± 0.12***°
Cyclophosphamide	5.0	2.52± 0.19**

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (**, $p < 0.01$ and °°, $p < 0.01$)

체중의 변화—대조군의 체중증가율이 24.92± 3.41%인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 53.75± 19.20, 36.96± 21.78 및 39.31± 12.01%로 유의한 증가를 보였다. 또한 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 25.99± 9.41%에 비해 각각 39.10± 19.56, 33.02± 13.34 및 47.54± 14.29%로 유의한 증가를 보였다. (Table I)

간장의 중량변화—간장 대 체중중량비가 대조군이 4.42± 0.46%인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.4 ml/kg 투여군은 4.10± 0.43과 3.51± 0.97%로 유의한 감소를 보였으나, 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군은 4.42± 1.02로 유의성없는 약간의 증가를 보였다. 또한 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 2.52± 0.19에 비해 각각 4.12± 0.28, 4.12± 0.79 및 4.15± 0.12%로 유의한 증가를 보였다. (Table II)

비장과 흉선의 중량변화—비장 대 체중중량비에서 대조군이 0.59± 0.13%인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군은 0.63± 0.20과 0.63± 0.29%로 유의성없는 증가를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 0.54± 0.14%로 유의성없는 감소를 보였다. 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 0.72± 0.22%에 비해 각각 0.55±

Table III—The effect of evening primrose(EP) oil on the spleen and thymus weights in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	Spleen wt.	Thymus wt.
		Body wt. ×100	Body wt. ×100
Control	—	0.59± 0.13	0.17± 0.06
EP oil	0.1	0.63± 0.20	0.16± 0.06
	0.2	0.63± 0.29	0.17± 0.05
	0.4	0.54± 0.14	0.19± 0.09
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	0.55± 0.11	0.19± 0.11
	0.2+5.0	0.64± 0.17	0.19± 0.12
	0.4+5.0	0.56± 0.12	0.13± 0.07
Cyclophosphamide	5.0	0.72± 0.22**	0.17± 0.06

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (**, p<0.01)

Table IV—The effect of evening primrose(EP) oil on the antibody production in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	HA titer	MER-HA titer	HY titer
		(log ₂)# ²⁾	(log ₂)# ²⁾	(log ₂)# ²⁾
Control	—	3.60± 0.36	2.00± 0.89	3.67± 0.47
EP oil	0.1	4.20± 1.33	4.00± 1.55**	3.43± 1.30
	0.2	4.50± 1.12**	4.20± 0.74**	4.00± 1.09
	0.4	3.40± 0.80	2.80± 0.75**	2.50± 1.11**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	2.00± 1.26***°	1.00± 0.63**	2.67± 0.94***°°
	0.2+5.0	2.20± 1.16***°°	2.00± 1.08	2.66± 0.94***°°
	0.4+5.0	2.04± 1.12***°°	1.40± 0.48*	2.33± 0.94***°°
Cyclophosphamide	5.0	1.20± 0.40**	1.40± 0.80*	1.67± 0.37**

#HA: Hemagglutinin, MER-HA: Mercaptoethanol-resistant HA and HY: Hemolysin.

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on 4th days after sensitization.

²⁾ON the 5th day, HA, MER-HA and HY titers were assayed.

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (*, p<0.05, **, p<0.01, °, p<0.05 and °°, p<0.01)

0.11, 0.64± 0.17 및 0.56± 0.12%로 유의성없는 감소를 보였다.(Table III)

한편, 흉선 대 체중중량비는 대조군이 0.17± 0.06 %인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군은 0.16± 0.06과 0.17± 0.05%로 약간의 감소를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 0.19± 0.09%로 유의성없는 증가를 보였다. 또한 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 0.17± 0.06%에 비해 각각 0.19± 0.11과 0.19± 0.12%로 유의성없는 증가를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 0.13± 0.07 %로 유의성없는 감소를 보였다.(Table III)

적혈구 응집소가, 용혈소가 및 2-ME내성응집소가

에 미치는 영향—적혈구응집소가(HA titer)는 대조군이 3.60± 0.36인데 비하여, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 4.20± 1.33, 4.50± 1.12 및 3.40± 0.80으로 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 HA titer가 증가하였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 HA titer가 감소하였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군은 1.20± 0.40인데 비해, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 2.00± 1.26, 2.20± 1.16 및 2.04± 1.12로 유의한 증가를 보여, 월견초종자유가 cyclophosphamide에 의한 HA titer의 억제효과를 저지하는 현상을 보였다.(Table IV)

적혈구 용혈소는 대조군이 3.67± 0.47인데 비해, 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군에서는 3.43±

1.30과 4.00 ± 1.09 로 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 증가하였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 2.50 ± 1.11 로 유의한 감소를 보였다. 또한 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 1.67 ± 0.37 에 비해, 각각 2.67 ± 0.94 , 2.66 ± 0.94 및 2.33 ± 0.94 로 cyclophosphamide에 의한 용혈소가 억제효과를 월견초종자유가 현저하게 저지시키는 것으로 나타났다.(Table IV)

한편, 2-ME내성응집소가는 대조군이 2.00 ± 0.89 인데 비하여, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 4.00 ± 1.55 , 4.20 ± 0.74 및 2.80 ± 0.75 로서 용량의존적으로 현저한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 1.40 ± 0.80 에 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 1.00 ± 0.63 , 2.00 ± 1.08 및 1.40 ± 0.48 로 월견초종자유가 cyclophosphamide에 의한 2-ME내성응집소가억제효과에 대해서는 영향을 미치지 못했다.(Table IV)

Arthus 반응에 미치는 영향—대조군이 12.80 ± 0.03 인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 13.89 ± 2.75 , 15.60 ± 0.81 및 13.13 ± 1.02 로 특히 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 8.36 ± 2.70 에 비해 월견초종자유 0.1 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 8.29 ± 0.29 로 약간의 감소를 보였으나, 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 12.58 ± 2.60 과 12.40 ± 2.40 으로 유의하게 증가하여, 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 cyclophosphamide에 의한 Arthus 반응억제효과를 저지하는 효과가 있음을 보여 주었다.(Table V)

용혈반형성세포수(PFC)에 미치는 영향— 10^6 농도의 비장세포에서는 대조군이 68.90 ± 15.98 인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군은 72.01 ± 18.00 과 82.40 ± 20.60 으로 특히 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군에서 유의하게 증가하였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 51.20 ± 12.80 으로 유의하게 감소하였다. 또한 cyclophosphamide 단독투여군이 34.40 ± 9.80 인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 39.22 ± 9.80 , 52.40 ± 13.10 및 40.20 ± 10.10 으로 현저한 증

Table V—The effect of evening primrose(EP) oil on the Arthus reaction in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	FPSI ²⁾
Control	—	12.80 ± 0.03
EP oil	0.1	13.89 ± 2.75
	0.2	$15.60 \pm 0.81^{**}$
	0.4	13.13 ± 1.02
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	$8.29 \pm 0.29^{**}$
	0.2+5.0	$12.58 \pm 2.60^{\circ\circ}$
	0.4+5.0	$12.40 \pm 2.40^{\circ\circ}$
Cyclophosphamide	5.0	$8.36 \pm 2.70^{**}$

¹⁾Mice were challenged with 10^8 S-RBC on left hind footpad on 4th days after sensitization.

²⁾Footpad thickness was measured immediately before challenge and at 3hr after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_3 - T_0}{T_0} \times 100$$

where T_0 is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T_3 is the left hind footpad thickness 3hr after challenge.

Other legends and methods are the same as in Table I. Each values represents the mean \pm S.D. from 10 mice. (**, $p < 0.01$ and $^{\circ\circ}$, $p < 0.01$)

가를 보여, 월견초종자유가 cyclophosphamide에 의한 PFC억제효과를 유의성있게 저지하는 효과를 보였다.(Table VI)

한편, 10^3 농도의 비장세포에서는 대조군이 192 ± 48 인데 비해 월견초종자유 0.1 ml/kg 투여군은 228 ± 12 로 유의한 증가를 보였고, 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군은 228 ± 48 로 유의성없는 증가를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 126 ± 60 으로 현저한 감소를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 54 ± 18 인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 102 ± 30 , 120 ± 62 및 108 ± 34 로 현저한 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 PFC억제효과를 유의성있게 저지하였다.(Table VI)

지연형과민반응에 미치는 영향—대조군이 5.56 ± 0.40 인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 5.55 ± 1.70 , 4.71 ± 1.57 및 4.20 ± 1.60 으로 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 유의성있게 감소하였다. 또한, cyclophosphamide 5 mg/kg 단독

Table VI—The effect of evening primrose(EP) oil on the hemolytic plaque forming cell (PFC) in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	PFC/10 ⁶ spleen cells	PFC/spleen (×10 ³)
Control	—	60.90± 15.98	192± 48
EP oil	0.1	72.01± 18.00	228± 12**
	0.2	82.40± 20.60**	222± 48
	0.4	51.20± 12.80**	126± 60**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	39.22± 9.80***°	102± 30***°
	0.2+5.0	52.40± 13.10***°	120± 62***°
	0.4+5.0	40.20± 10.10***°	108± 34***°
Cyclophosphamide	5.0	34.40± 9.80**	54± 18**

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (**, p<0.01 and °, p<0.01)

Table VII—The effect of evening primrose(EP) oil on the delayed type hypersensitivity (DTH) reaction in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	FPSI ²⁾
Control	—	5.56± 0.40
EP oil	0.1	5.55± 1.70
	0.2	4.71± 1.57*
	0.4	4.20± 1.60**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	4.46± 1.88*
	0.2+5.0	4.67± 1.84*
	0.4+5.0	4.20± 1.60**
Cyclophosphamide	5.0	4.00± 1.54**

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad on 4th days after sensitization.

²⁾Footpad thickness was measured immediately before challenge and at 24hrs after challenge.

$$\text{Footpad swelling index(FPSI)} = \frac{T_{24} - T_0}{T_0} \times 100,$$

where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₂₄ is the left hind footpad thickness at 24hr after challenge.

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (*, p<0.05 and **, p<0.01)

투여군이 4.00± 1.54인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 초종자유가 영향을 미치지 못하였다.(Table VII)

비장세포의 Rosette형성능(RFC)에 미치는 영향— 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 4.46± 1.88, 4.67± 1.84 및 4.20± 1.60으로 유의성있는 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 지연형 과민반응억제효과를 월견

Table VIII—The effect of evening primrose(EP) oil on the rosette forming cell (RFC) in S-RBC-challenged mice¹⁾

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	RFC(%) ²⁾
Control	—	10.50± 0.94
EP oil	0.1	10.51± 0.95
	0.2	18.05± 2.20**
	0.4	11.61± 1.01**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	10.05± 1.00°
	0.2+5.0	11.60± 1.29***°
	0.4+5.0	9.30± 1.80*
Cyclophosphamide	5.0	8.92± 1.50**

¹⁾Mice were challenged with 10⁸ S-RBC on left hind footpad on 4th days after sensitization.

²⁾On the 5th day, RFC assay was performed.

$$\text{RFC(}\%) = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{viability}} \times 100$$

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (*, p<0.05, **, p<0.01, °, p<0.05 and °°, p<0.01)

대조군이 10.50± 0.94%인데 비해, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 10.51± 0.95, 18.05± 2.20 및 11.61± 1.01%를 보였으며, 특히 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군에서 유의한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 8.92± 1.50%인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 10.05± 1.00과 11.60± 1.29%로 유의성있는 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 RFC억제효과를 저지하였다.

Table IX—The effect of evening primrose(EP) oil on the natural killer cell activity in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	% Specific lysis of ⁵¹ Cr-labelled target cell (YAC-I) ¹⁾	
		Effector : Target cell	
		100 : 1	50 : 1
Control	—	21.40± 4.98	20.65± 6.48
EP oil	0.1	25.00± 1.83**	24.43± 6.59
	0.2	29.07± 5.45**	27.44± 2.15**
	0.4	25.77± 5.03*	23.22± 8.70
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	16.59± 2.92*** ^o	16.74± 6.74
	0.2+5.0	23.92± 4.23 ^o	19.68± 3.69 ^o
	0.4+5.0	12.19± 3.11**	19.41± 5.13 ^o
Cyclophosphamide	5.0	11.38± 4.03**	14.07± 0.45**

¹⁾The % lysis was determined by a standard 4 hours ⁵¹Cr release assay and effector to target ratios were 100 : 1 and 50 : 1.

Each value represents the mean± S.D. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (*, *p*<0.05, **, *p*<0.01 and ^o, *p*<0.01)

(Table VIII)

Natural Killer Cell Activity에 미치는 영향—Effector cell : target cell이 100 : 1일때는, 대조군이 21.40 ± 4.98인데 비해, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 25.00± 1.83, 29.07± 5.45 및 25.77± 5.03으로, 특히 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 11.38± 4.03인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 16.59± 2.92 및 23.92± 4.23으로 유의한 증가를 보여, cyclophosphamide에 의한 억제효과를 저지하는 효과가 뚜렷하였다.(Table IX)

한편, effector cell : target cell이 50 : 1일때는, 대조군이 20.65± 6.48인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 24.43± 6.59, 27.44± 2.15, 23.22± 8.70으로, 특히 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군에서 유의한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 14.07± 0.45인데 비해, 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 병용투여군은 19.68± 3.69, 19.41± 5.13으로, cyclophosphamide에 의한 억제효과를 저지하였다.

대식세포의 활성에 미치는 영향—대식세포의 탐식능을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 대조군이 6.64± 1.78인데 비해 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 8.08± 2.23과 7.68± 1.29로

Table X—The effect of evening primrose(EP) oil on the Phagocyte activity in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	Corrected phagocytic index ¹⁾
Control	—	6.64± 1.78
EP oil	0.1	6.62± 1.73
	0.2	8.08± 2.23**
	0.4	7.68± 1.29**
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	4.53± 0.75*** ^o
	0.2+5.0	6.29± 1.09 ^o
	0.4+5.0	7.25± 1.13 ^o
Cyclophosphamide	5.0	3.57± 0.08**

¹⁾Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root K to the ratio of body weight to the weights of the liver and spleen. Each value represents the mean± S.D. from 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I. (**, *p*<0.01 and ^o, *p*<0.01)

유의한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 3.57± 0.88인데 비해, 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 4.53± 0.75, 6.29± 1.09 및 7.25± 1.13으로 월견초종자유가 cyclophosphamide에 의한 대식세포의 활성억제효과를 현저하게 저지하였다.(Table X)

혈청총단백에 미치는 영향—총혈청단백농도의 경

Table XI—The effect of evening primrose(EP) oil on the serum proteins in S-RBC-challenged mice

Drug	Dose (ml/kg, <i>p.o.</i> , mg/kg, <i>i.p.</i>)	Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Globulin (g/dl)	A/G ratio
Control	—	6.50±2.00	3.79±0.55	3.00±0.75	1.26±0.73
EP oil	0.1	7.65±0.78*	3.95±0.48**	5.04±0.53**	0.78±0.90
	0.2	7.91±1.30*	4.28±0.18**	5.39±0.47**	0.79±0.38*
	0.4	6.87±1.31	4.36±0.32**	4.94±0.68**	0.88±0.47
+ Cyclophosphamide	0.1+5.0	7.22±1.39	4.06±0.33**	4.44±0.57**	0.91±0.57
	0.2+5.0	8.43±0.78***°°	4.40±0.12***°°	5.35±0.71***°°	0.82±0.17*
	0.4+5.0	6.46±0.57°°	4.35±0.73**	4.43±0.53**	0.98±1.38
Cyclophosphamide	5.0	7.39±0.54	4.28±0.31**	4.69±0.69**	0.91±0.45

Each value represents the mean±S.D. from 10 mice.

Other legends and methods are the same as in Table I. (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$ and °°, $p<0.01$)

우에 있어서는 대조군이 6.50±2.00g/dl인데 비해 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군은 7.65±0.78과 7.91±1.30g/dl로 유의성있는 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 7.39±0.54g/dl인데 비해, 월견초종자유 0.2 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 8.43±0.78g/dl로 현저한 증가를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 6.46±0.57g/dl로 유의한 감소를 보여, 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 cyclophosphamide에 의한 혈청총단백역제 효과가 저지시키지 못함을 보였다.(Table XI)

Albumin농도의 경우에 있어서는 대조군이 3.79±0.55g/dl인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 3.95±0.48, 4.28±0.18 및 4.36±0.32 g/dl로, 특히 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군에서 현저한 증가를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 4.28±0.31g/dl인데 비해 월견초종자유 0.1 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 4.06±0.33g/dl로 유의성있는 감소를 보였으나, 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 4.40±0.12와 4.35±0.73g/dl로 약간의 증가를 보여 cyclophosphamide에 의한 albumin 농도의 억제효과에는 영향을 미치지 못했다.(Table XI)

Globulin의 경우, 대조군이 3.00±0.75g/dl인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군은 각각 5.04±0.53, 5.39±0.47 및 4.94±0.68g/dl로 유의한 증가를 보였다. 또한 월견초종자유 0.2 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군의 4.69±0.69g/dl에 비해 5.35±0.71g/dl로 현저한 증가를 보여 cyclophosphamide에 의한 globulin억제효과를 저지함이 뚜렷하였다.(Table XI)

한편, albumin과 globulin의 비는 대조군이 1.26±0.73인데 비해 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군은 0.79±0.38로 유의성있는 감소를 보였다. 또한 cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군이 0.91±0.45인데 비해 월견초종자유 0.1, 0.2 및 0.4 ml/kg에 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여군은 각각 0.91±0.57, 0.82±0.17 및 0.98±1.38로 유의성 없는 약간의 증감을 보여 월견초종자유가 cyclophosphamide에 의한 albumin과 globulin의 비에는 영향을 미치지 못했다.(Table XI)

고 찰

월견초종자유에 함유되어 있는 linoleic acid와 γ -linolenic acid의 체내에서의 주요 역할 가운데 하나는 prostaglandin의 전구물질로 작용하는 것이며, 1계열의 prostaglandin은 dihomogamma-linolenic acid로부터 생성되고, 2계열의 prostaglandin은 arachidonic acid로부터 생성됨은 주지의 사실이다.

1계열의 prostaglandin은 dihomogamma-linolenic acid로부터 세포내에서 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin G₁이 생성되고, 이 prostaglandin G₁은 prostaglandin synthetase에 의해 prostaglandin E₁, prostaglandin F₁ 및 prostaglandin D₁으로 되며, prostaglandin E₁은 T-lymphocyte를 활성화시킴으로써 면역학적 회복, 혈소판응집억제, 혈관확장작용 및 cholesterol

농도를 조절하는 역할을 한다.¹¹⁻¹⁴⁾ 한편, 2계열의 prostaglandin은 다가불포화지방산인 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase의 산화를 받아 prostaglandin I₂, prostaglandin D₂, prostaglandin F_{2α}, prostaglandin E₂ 및 thromboxane A₂로 전환된다.

Arachidonic acid의 대사산물인 prostaglandin의 면역반응에 미치는 영향에 대한 보고로는, Goodwin 등⁵⁹⁾은 arachidonic acid의 15-lipoxygenase 대사물이 mitogen으로 인한 생쥐비장세포의 증식을 억제했다고 보고하였으며, Gordon 등⁶⁰⁾은 prostaglandin이 lymphokine들의 형성을 억제한다고 보고하였고, Melmon 등⁶¹⁾은 prostaglandin이 항체형성세포를 억제한다고 보고하였다.

음식물에서 공급되는 arachidonic acid로부터의 2계열의 prostaglandin은 쉽게 생성되는 반면, dihomo- γ -linolenic acid에서 생성되는 1계열의 prostaglandin은 쉽게 생성되지 못하기 때문에, 체내에서 1계열과 2계열의 prostaglandin균형에 영향을 줄수 있고, 특징적으로 1계열의 prostaglandin (특히 prostaglandin E₁)의 형성을 선택적으로 높일 수 있으며, 또한 면역항진작용이 기대된 바, 이에 저자들은 월견초종자유의 용량에 따른 면역수식의 작용기전을 규명하기 위해 면역장기의 변화, 체액성 및 세포성면역반응, natural killer cell activity, phagocyte activity, 혈청 총단백 및 cyclophosphamide의 면역억제에 미치는 월견초종자유의 영향에 대하여 실험을 실시한 고찰은 다음과 같다.

면역장기증가 작용—비장 대 체중중량비는 유의성은 없으나 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군에서는 증가하였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 감소하였다. 한편, 흉선 대 체중중량비는 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 유의성 없는 증가를 보였다. 이는 월견초종자유가 비장 및 흉선 대 체중중량비는 상반되게 작용하는 것으로 사료된다.(Table III)

체액성면역항진작용—적혈구응집 및 용혈반응은 면양 적혈구에 대한 항원과 항체와의 반응으로서, T-림파구 의존성 항원에 대한 면역항체의 양을 나타내는 지표인데, 이의 측정으로 혈중 면역항체의 소장을 측정하는데 널리 이용되고 있다.⁴⁹⁾ 본 실험에서 적혈구응집소가와 용혈소가는 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군에서 증가하였고, 2-ME내성응집소가는

전군에서 현저하게 증가하였다. 그러나 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 전반적으로 감소를 보였다.(Table IV) 이는 월견초종자유의 양에 따라 미치는 영향이 상반되게 면역억제적으로 나타났다고 사료된다.

Arthus반응은 감각숙주에 주입된 항원이 항원-항체 면역복합체를 형성하여 조직에 침착하고 복합체를 활성화시키며, 항원에 의해 자극된 mast cell로부터 유리된 histamine 및 leukotriene이 다형핵백혈구의 유주작용을 증가시키고, 유주하여 온 다형핵백혈구가 lysosomal enzyme를 유리하여 염증 반응을 촉진시키는 현상으로,⁵²⁾ 월견초종자유의 양이 증가함에 따라 Arthus반응이 용량의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군에서 유의성있는 증가를 보였다.(Table V) 이는 월견초종자유에 있어서 일정량의 초과는 상반된 면역수식작용이 있음이 사료된다.

비장세포의 용혈반형성세포(PFC)는 월견초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군에서 유의성있는 증가를 보였으나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 유의성있는 감소를 보였다.(Table VI) 이러한 월견초종자유의 체액성면역항진 작용은 prostaglandin이 antibody titer와 PFC반응을 저해한다는 Horrobin의 보고⁶²⁾와 prostaglandin E₁이 혈소판응집을 억제한다는 Plescia 등의 보고¹⁰⁾에 의하여, 월견초종자유가 arachidonic acid보다 1계열의 prostaglandin의 비율을 높여서, T-lymphocyte의 활성화와 immunoglobulin 합성을 증진하여 체액성면역을 항진시킨 것으로 사료되나, 양의 초과는 상반된 면역수식작용이 있음이 사료된다.

세포성면역항진작용—지연형과민반응(DTH)은 감각 입과구에 의한 lymphokine들의 화학적 전달인자의 유리에 의해서 성립되며, 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바,^{51,63)} 본 실험에서는 투여량의 증가에 따라 DTH가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 유의한 감소를 관찰할 수 있었다.(Table VII)

비장세포의 rosette형성능(RFC)은 T-cell 및 대식세포가 모두 rosette cell을 형성할 수 있으나, 대부분 T-cell이 깊이 관여한다고 하였는데,⁶³⁾ 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군에서 현저한 증가를 보였다.(Table VIII)

이러한 월견초종자유의 세포성면역항진작용은 prostaglandin E₂가 adenylate cyclase를 활성화하여 세포내 cyclic AMP를 증가시켜 lymphokine들의 생성을 억제한다는 Gordon 등의 보고⁶⁰)와 활성화된 임파구에 의한 직접적인 cytolysis를 억제한다는 Chung 등의 보고⁶⁴)와 사람의 T세포의 rosette형성을 억제한다는 Morley의 보고⁶⁵)에 의하여, 월견초종자유가 arachidonic acid로부터의 prostaglandin 생성보다는 prostaglandin E₁의 생성을 촉진시킴으로서 T-lymphocyte의 활성화와 세포내 cyclic GMP농도를 증가시키고, helper T-cell의 유도를 증가시켜 세포성면역을 항진시킨 것으로 사료된다.

NK Cell활성증가작용—Natural killer cell의 활성화는 비특이적 면역능의 부활여부를 확인하기 위하여 실시하는데, 월견초종자유투여로 전반적으로 증가되었으며, 특히 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군에서 현저한 증가를 보였다.(Table IX) 이는 prostaglandin이 활성화된 임파구에 의한 직접적인 cytolysis를 억제한다는 Henney 등의 보고⁶⁶)와 prostaglandin이 mitogen으로 유발한 임파구의 증식을 억제한다는 Smith 등의 보고⁶⁷)에 의해서, 월견초종자유가 prostaglandin E₁의 생성을 촉진시킴으로서 임파구의 natural killer cell의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다.

대식세포활성증가작용—대식세포의 활성화는 항원에 의한 면역능의 발현 및 interleukin들의 분비에 중요한 역할을 하여 그 탐식능이 망상조직내피계에 영향을 끼쳤는가를 측정하는 지표로서 이용되고 있는 바,⁶⁸) 본 실험에서는 월견초종자유 0.2 및 0.4 ml/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다.(Table X) 이러한 결과는 prostaglandin이 lymphokine들의 형성을 억제한다는 Gordon 등의 보고⁶⁰)와 강력한 prostaglandin합성억제작용이 있는 indomethacin이 guinea pig의 임파구증식과 lymphokine들의 형성을 증진한다는 Morley의 보고⁶⁵)에 의하여, 월견초종자유가 arachidonic acid의 대사보다는 prostaglandin E₁의 생성을 증가시켜, T-임파구의 증식과 lymphokine들의 형성을 촉진함으로써 대식세포의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다.

혈청총단백증가작용—혈청총단백과 albumin의 검사소견에서 간기능장애, 세망내피계 질환 및 대사항진 등을 확인하기 위하여 총혈청단백의 양을 측정했는데,

본 실험에서는 월견초종자유를 투여한 전군에서 유의하게 증가를 보였다.(Table XI) 이는 포화지방산과 cholesterol이 Δ -6-desaturase와 γ -linolenic acid형성을 억제시킨다는 Horrobin 등의 보고¹¹)와 간과 뇌에는 다량의 dihomogamma-linolenic acid가 함유되어 있다는 Cawfold 등의 보고⁶⁹)에 의해서, 월견초종자유의 성분인 γ -linolenic acid가 간장내 Kupffer's cell과 prostaglandin E₁의 생성을 촉진하여, 면역항체항진으로 총혈청단백량을 증가시킨 것으로 사료된다.

Cyclophosphamide의 면역억제에 미치는 월견초종자유의 작용—Cyclophosphamide는 microsomal enzyme system에 의해 활성화되어 많은 alkylating metabolite를 생성하고,^{70,71}) 여러 실험동물과 사람의 암에 대하여 상당한 항암작용이 있으나,⁷²) 가장 강력한 면역억제제중의 하나로 알려져 있는데,⁶⁵) 항체형성을 현저하게 저해하여 체액성면역을 억제한다고 보고되었다.⁷³⁻⁷⁶) 한편, 적절한 농도로 투여되었을 때는 DTH와 cytotoxicity를 증가시키고,⁷⁷⁻⁸²) suppressor T-cell의 기능을 억제하여 세포성면역을 항진시킴으로써 면역계에 선택적으로 작용한다고 보고⁸³)되었는데, 이는 cyclophosphamide의 투여량이 증가함에 따라 흉선의 중량이 감소하였고, 비장의 B-cell과 흉선의 T-cell이 감소하였다는 Wachsmuth의 보고⁸⁴)되는 서로 다른 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 cyclophosphamide투여군이 세포성 및 체액성면역을 유의성있게 억제하여 세포성면역에 대한 Wachsmuth의 보고⁸⁴)와 일치된 결과를 나타내었다. 월견초종자유와 cyclophosphamide 5 mg/kg 병용투여전군의 면역반응이 대조군에 비해서는 억제되었으나, cyclophosphamide 5 mg/kg 단독투여군에 비해서는 현저하게 항진되었는데, 이것은 cyclophosphamide의 면역억제작용에 대한 월견초종자유의 강한 저지효과를 시사해 준다.

이상 본 실험의 면역학적 검사를 종합하면 월견초종자유는 면양 적혈구항원에 대한 세포성 및 체액성면역을 항진시켰으며, 용량의존적 반응인 상용량의 월견초종자유 0.2 mg/kg 투여군에서 가장 효과적이었다. 그러나, 월견초종자유 0.4 ml/kg 투여군은 월견초종자유 0.2 ml/kg 투여군보다 그 효과가 떨어지는 것은 용량에 따른 면역수반반응의 차이라고 사료된다. 이에 대한 월견초종자유의 작용기전은 앞으로 진행할 만한 연구과제인 것으로 사료된다.

결 론

월건초종자유(0.1~0.4 ml/kg, 경구투여)가 면양적 혈구 감각생쥐에서 나타나는 면역반응과 비특이적 면역반응에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과는 다음과 같다.

(1) 월건초종자유 0.1 및 0.2 ml/kg 투여군은 체액 성면역과 관계되는 적혈구응집소가, 적혈구용혈소가, Arthus반응 및 용혈반형성세포수를 유의성있게 증가시켰으나, 월건초종자유 0.4 ml/kg 투여군에서는 유의성있는 감소를 보였다.

(2) 월건초종자유는 세포성면역과 관계되는 지연형과민반응이 유의한 감소를 보였으나, RFC는 현저하게 증가하였다.

(3) 월건초종자유는 전반적으로 NK 세포와 대식세포의 활성이 유의성있게 증가하였고, 혈청 albumin 및 globulin 농도도 증가를 보였다.

문 헌

- Cunnane, S.C., Horrobin, D.F., Ruf, K.B. and Sella, G.: Prevention of harmful effects of zinc deficient diet by essential fatty acid supplementation. *J. Physiol.*, in press.
- O'dell, B.L., Reynolds, G. and Reeves, P.G.: Analogous effects of zinc deficiency and aspirin toxicity in the pregnant rat. *J. Nutr.*, **107**, 1222 (1977).
- Hassam, A.G.: The role of evening primrose oil in nutrition and disease. *Brit. J. Nutr.*, **38**, 137 (1977).
- Wilson, W.S., Hulley, S.B. and Burrows, M.I.: Serial lipid and lipoprotein responses to the American Heart Association Fat-Controlled Diet. *Am. J. Med.*, **51**, 491 (1971).
- Malinow, M.R.: The reversibility of atheroma. *Circulation* **64**, 1 (1981).
- Hansen, A.E., Haggard, M.E. and Boelsche, A.N.: Essential fatty acids in human nutrition. *J. Nutr.*, **60**, 565 (1958).
- Macdonald, M.C., Kline, R.L. and Mogensen, G.J.: Dietary linoleic acid and salt-induced hypertension. *Can. J. Physiol.*, **50**, 372 (1981).
- Horrobin, D.F.: A biochemical basis for alcoholism and alcohol-induced damage including the fetal alcohol syndrome and cirrhosis; Interference with essential fatty acid and prostaglandin metabolism. *Med. Hypothesis* **6**, 929 (1980).
- Mead, J.E.: The metabolism of essential fatty acids. VI. Distribution of unsaturated fatty acids in rats on fat-free and supplemented diets. *J. Biol. Chem.*, **227**, 1025 (1957).
- Horrobin, D.F.: A new concept of life style-related cardiovascular disease; The importance E₁ and thromboxane A₂. *Med. Hypotheses* **6**, 785 (1980).
- Horrobin, D.F., Manku, M.S., Oka, M. *et al.*: The nutritional regulation of T lymphocyte function. *Med. Hypotheses* **5**, 969 (1979).
- Horrobin, D.F.: The regulation of prostaglandin biosynthesis; Negative feedback mechanisms and the selective control of formation of 1 and 2 series prostaglandins; Relevance to inflammation and immunity. *Med. Hypothesis* **6**, 687 (1980).
- Horrobin, D.F., Oka, M. and Manku, M.S.: The regulation of prostaglandin E₁ formation; A candidate for one of the fundamental mechanisms involved in the actions of vitamin C. *Med. Hypotheses* **5**, 849 (1979).
- Cunnane, S.C. and Horrobin, D.F.: Parenteral linoleic and gamma-linolenic acids ameliorate the gross effects of zinc deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **164**, 583 (1980).
- Owen, N.E. and Le Breton, G.C.: Ca²⁺ mobilization in blood platelets as visualized by chortetracycline fluorescence. *Am. J. Physiol.*, **241**, 613 (1981).
- Weider, K.J. and Webb, D.R.: The effect of prostaglandin metabolism on immunoglobulin and antibody production in naive and educated whole spleen cells. *Prostaglandins Med.*, **7**, 79 (1981).
- Manku, M.S., Horrobin, D.F., Karmazyne, M., *et al.*: Prolactin and zinc effects on rat vascular reactivity; Possible relationship to dihogamma linolenic acid and to prostaglandin synthesis. *Endocrinology* **104**, 774 (1979).
- Witten, P.W. and Holman, R.T.: Effect of pyridoxine on essential fatty acid conversions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 266 (1952).
- Brenner, R.R. and Peluffo, R.O.: Regulation of unsaturated fatty acids biosynthesis; Effect of unsaturated fatty acids biosynthesis; Effect of unsaturated fatty acids biosynthesis.

- turated fatty acid of 18 carbons on microsomal desaturation of linoleic acid into gamma-linolenic acid. *Biochem. Biophys. Acta.*, **176**, 471 (1966).
- 20) Brenner, R.R.: The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **6**, 567 (1971).
 - 21) Wene, J.D., Connor, W.E. and Denbesten, L.: The development of essential fatty acid deficiency in healthy men fed fat-free diets intravenously and orally. *J. Clin. Invest.*, **56**, 127 (1975).
 - 22) Brenner, R.R.: The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals. *Mol. Cell Biochem.*, **3**, 41 (1974).
 - 23) Bunbar, L.M. and Bailey, J.M.: Enzyme deletions and essential fatty acid metabolism in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1152 (1975).
 - 24) Bailey, J.M.: Lipid metabolism in cultured cells. In *Lipid Metabolism in Mammals*. 2nd ed., Snyder Plenum Press, New York, p. 352 (1977).
 - 25) Walford, R.L.: Immunology and aging. *Am. J. Clin. Path.*, **74**, 247 (1980).
 - 26) Reitz, R.C., Wang, L., Schilling, R.J., et al.: Effects of ethanol ingestion on the unsaturated fatty acids from various tissues; In *Golden Jubilee Congress on Essential Fatty Acids* (May 1980) *Progress in Lipid Res. in press*.
 - 27) Horrobin, D.F.: *Clinical Uses of Essential Fatty Acids*. Eden Press, Montreal-London p. 89 (1982).
 - 28) Mann, G.V.: Current concepts diet and heart. End of Era. *New Engl. J. Med.*, **297**, 644 (1977).
 - 29) Keys, A.: The edinburgh companion. *Lancet* **2**, 58 (1981).
 - 30) Mever-Riencker, H.J.: Effect of γ -linolenate in multiple sclerosis. *Lancet* **2**, 966 (1976).
 - 31) David, F. and Horrobin, P.B.: Loss of Δ -6-desaturase activity as a key factor in aging. *Medical Hypotheses* **7**, 1211 (1981).
 - 32) Sugano, M., et al.: Hypocholesterolemic effect of γ -linolenic acid as evening primrose oil in rats. *Ann. Nutr. Metabol.*, **30**, 289 (1986).
 - 33) Soma, M., Manku, M.S. and Horrobin, D.F.: The effects of hydrogenated coconut oil, safflower oil, evening primrose oil on development of hypertension and sodium handling in spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63** (1985).
 - 34) Horrobin, D.F.: Loss of delta-6-desaturase activity as a key factor in aging. *Medical Hypothesis* **7**, 1211 (1981).
 - 35) Rotrosen, J., Mandio, D., Segarnick, D., et al.: Ethanol and prostaglandin E₁; Biochemical and behavioral interactions. *Life Sci.*, **26**, 1867 (1980).
 - 36) Wilson, D.E., Engel, J. and Wong, R.: Prostaglandin E₁ prevents alcohol-induced fatty liver. *Clin. Res.*, **21** (1973).
 - 37) Brush, M.G.: *Clinical Uses of Essential Fatty Acid*. Montreal Eden Press, p. 155 (1982).
 - 38) Horrobin, D.F., Mtabaji, J.P. and Mank, M.S.: Physiological cortisol levels block the inhibition of vascular reactivity produced by prolactin. *Endocrinology* **99**, 406 (1976).
 - 39) Wright, S. and Burton, J.L.: Oral evening primrose oil improves atopic eczema. *Lancet* **2**, 1120 (1982).
 - 40) Saarinen, U.M., et al.: Prolonged breast-feeding as prophylaxis for atopic disease. *Lancet* **28** (July 1979).
 - 41) Hassan, A.G., Sinclair, A.J. and Craford, M.A.: *Lipids* **10**, 417 (1975).
 - 42) Seo, J.K., et al.: Effects of evening primrose seed oil on sarcoma 180 bearing mice. *Bull. Environmental Sciences* **9**, 101 (1988).
 - 43) Paccalin, J., Delhaye, N., Bernard, M., Lacomere, R.P., Spiolmann, D., Piganeau, P and Mendy, F.: Etude des acides gras au niveau des esters de cholesterol et des phospholipides circulant chez des cirrotiques et variation sous l'effect d'une supplementation en acide gamma linolemique. *Can. Nutr. Diet.*, **17**, 211 (1982).
 - 44) Booyens, J., et al.: Some effects of linoleic acid and γ -linolenic on the proliferation of human hepatoma cells in culture. *SA. Med. J.*, 65 (14 April 1984).
 - 45) Carmichael, H.A.: *Clinical Uses of Essential Fatty Acids*. Montreal Eden Press, p.139 (1982).
 - 46) McCormick, J.N., Neill, W.A. and Sim, A.K.: Immunosuppressive effect of linolenic acid. *Lancet* **2**, 508 (1977).
 - 47) Ha, T.H., Reed, N.D. and Growle, P.K.: Immune response potential of mast cell deficient w/w mice. *Int. Archs Alergy Appl. Immune* **80**, 85 (1986).
 - 48) Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.: Detection of com-

- plete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell egg albumin antigen unit. *Brit. J. Exp. Path.*, **35**, 472 (1954).
- 49) Stavitsky, A.B.: Micro methods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).
- 50) Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to SRBC in mice. *Immuno.*, **38**, 577 (1979).
- 51) Sugimoto, M., Kojima, A.M., Yaginuma, K and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1975).
- 52) Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussclorf, D.H.: *a2* Methods in Immunology. Benjamin, **3**, 449 (1980).
- 53) Elliott, B.E. and Haskill, J.S.: Characteristics of thymus-derived bone-marrow-derived rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973).
- 54) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* **17**, 5 (1973).
- 55) Kiesseling, *et al.*: Natural killer cell in mouse. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 112 (1975).
- 56) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B.N.: Etude quantitative de l'activity granulopexique du systeme reticuloentherial chezla souris. *C. R. Soc. Biol. Paris* **148**, 43 (1954).
- 57) 水野映二等: 臨床病理. *Biuret Method* **19**, 427 (1971).
- 58) Doumas, *et al.*: *Clin. Chem. Acta.*, **31**, 87 (1971).
- 59) Goodwin, M.G. and Weigle, W.D.: Modulation of lymphocytic activation. *J. Immunol.*, **125**(2), 593 (1980).
- 60) Gordon, D., Bray, M.A. and Morley, J.: Control of lymphokin secretion by prostaglandins. *Nature* (London) **262**, 401 (1976).
- 61) Melmon, K.L., Bourne, H.R., Weinstein, Y., Shearer, G.M., Kram, J. and Bauminger, S.: Hemolytic plaque formation by leukocytes *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **53**, 13 (1974).
- 62) Plescia, O.J., Smith, A., Greenwich, K. and Feit, C.: *Fundamental Aspects of Neoplasia*. Springer-Verlag, New York, p. 139 (1975).
- 63) Back, J.E. and Dardenne, M.: Antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **3**, 1 (1972).
- 64) Chung, H.T., Ahn, B.S., Kim, U.H. and Ahn, D.S.: Regulation of immune response by arachidonic acid metabolites. *Kor. J. Immunol.*, **9**(1), 85 (1987).
- 65) Morley, J.: Prostaglandins and lymphokines in arthritis. *Prostaglandins* **8**(4), 315 (1974).
- 66) Henney, C.S., Bourne, H.R., and Lichtenstein, L. M.: The role of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. *J. Immunol.*, **108**, 1526 (1972).
- 67) Smith, J.W., Steiner, A.L. and Parker, C.W.: Human lymphocyte metabolism: effects of cyclic and non-cyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.*, **50**, 442 (1971).
- 68) Hambach, A., Stiller-winkler, R., Oberbarnscheidt, J. and Ewers, U.: Sind suppressor T-zellen die primaren ziellen der immunotoxischen wirkungen von blei ? *Zbl. Bart. Hyg. 1 Abt. Orig. B.*, **178**, 361 (1983).
- 69) Crawford, M.A., Caspend, N.M. and Sinclair, A.J.: The long chain metabolites of linoleic acid and γ -linolenic acid in liver and brain in herbivores and carnivores. *Comp. Biochem. Physiol.*, **54**, 395 (1976).
- 70) Brock, N.: Pharmacologic characterization of cyclophosphamide(NSC-266, 271) and cyclophosphamide metabolites. *Cancer Chemotherapy Rept.*, **51**, 315 (1967).
- 71) Brock, N., Gross, R., Hohorst, H.J., Klein, H.O. and Schneider, B.: Activation of cyclophosphamide in man and animals. *Cancer* **27**, 1512 (1967).
- 72) Livingston, R.B. and Carter, S.K.: *Single Agent in Cancer Chemotherapy*. IFI/Plenum, New York p.25 (1970).
- 73) Hersh, E.M.: Immunosuppressive agents. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, (Ac Sartoreli and DG Johns eds.) **38**, Part. I. Antineoplastic and immunosuppressive agents. Springer-Verlag, Berlin p. 577 (1974).
- 74) Lerman, S.P. and Weidanz, W.P.: The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens. *J. Immunol.*, **105**, 614 (1970).
- 75) Stockman, G.D. and Trentin, J.J.: Cyclophosphamide

- mide-induced tolerance to equine gamma globulin and to equine antimouse-thymocyte globulin in adult mice. I. Studies on antigen and drug requirements. *J. Immunol.*, **1088**, 112 (1972).
- 76) Stockman, G.D., Heim, L.R., South, M.A. and Trentin, J.J.: Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. *J. Immunol.*, **110**, 227 (1973).
- 77) Ha, T.Y.: The effect of measles virus infection on immune response in mouse. *Kor. Cent. J. Med.*, **32**, 319 (1977).
- 78) Lagrage, P.H., Mackanase, G.B. and Miller, T.E.: Potentiation of cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.*, 139 (1974).
- 79) Otterness, I.G. and Chang, Y.H.: Comparative study of cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, azathiopurine and methotrexate; Relative effects on the humoral and the cellular immune response in the mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 346 (1976).
- 80) Askenase, P.W., Hayden, B.J. and Gershon, R.K.: Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not effect antibody responses. *J. Exp. Med.*, **141**, 697 (1975).
- 81) Zembala, M. and Asherson, G.L.: The effect of cyclophosphamide and irradiation on cells which suppress contact sensitivity in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, **23**, 554 (1976).
- 82) Roellinghoff, M., Powitz, A.S., Pfizenmaier, K. and Wagner, H.: Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the *in vivo* generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, **112**, 564 (1974).
- 83) Ha, T.Y. and Chung, H.T.: Effect of cyclophosphamide on the humoral and cellular immune responses in mice. *J. Kor. Med. Assoc.*, **20**(11), 985 (1977).
- 84) Wachsmuth, E.D.: In *Advances in Pharmacology and Therapeutics II*. Pergamon Press, Oxford and New York, p. 5 (1982).