

글리실레틴산이 생쥐에 이식된 L1210 세포의 세포사에 미치는 영향

은재순[#] · 권 진 · 염정열 · 오찬호^{*}
우석대학교 약학대학, *자연과학대학
(Received September 22, 1998)

Effect of Glycyrrhetic acid on the Cell Death of Transplanted-L1210 cells in Mice

Jae-Soon Eun[#], Jin Kwon, Jung-Yul Yum and Chan-Ho Oh^{*}
College of Pharmacy, *College of Natural Science,
Woosuk University, Samrye, 565-701 Korea

Abstract—These experiments were investigated effects of the cell death of glycyrrhetic acid (GA) on transplanted-L1210 cells in BALB/c mice. The GA suppressed the proliferation of L1210 cells *in vivo* and *in vitro* system. The administration of GA induced apoptosis of transplanted-L1210 cells via the reduction of mitochondrial transmembrane potential in mice. The GA enhanced the production of nitric oxide in peritoneal macrophages obtained from L1210 cells-transplanted mice. The apoptosis of L1210 cells were induced by co-culture of the macrophages obtained from GA administered mice and L1210 cells *in vitro*, and was partly inhibited by the treatment of L-NMMA. These results suggest that GA induces the cytotoxicity and the apoptosis of transplanted-L1210 cells *via* the production of nitric oxide in peritoneal macrophages.

Keywords □ Glycyrrhetic acid, apoptosis, mitochondrial transmembrane potential, macrophage, nitric oxide, cytotoxicity.

세포사는 necrosis와 apoptosis라는 서로 다른 두가지 경로에 의해 진행되는 것으로 알려져 있으며, 세포의 necrosis를 accidental death라고 한다면 apoptosis는 natural death로서 능동적이면서 자발적인 사망기전이라 할 수 있다.¹⁾ Apoptosis는 programmed cell death에 동반하여 관찰되는 cell death의 형태이지만 항암제 또는 방사선 등과 같은 외부의 요인에 의해서도 유도된다. 이러한 apoptosis를 유도시키는 자극은 각종 세포종에 따라서 다르게 나타나는데, 예를 들면 actinomycin D나 cycloheximide 등은 흉선세포에서는 apoptosis를 일으키기 어렵지만 골수계 백혈병세포를 비롯한 과립구계의 세포에서는 apoptosis를 유도하며,

topoisomerase 저해제들은 암세포의 apoptosis를 유도함이 밝혀졌다.^{2,3)}

Glycyrrhetic acid(GA)는 anti-tumor promoting activity, protein kinase C의 활성 억제작용, 사람 간암 세포주인 HuH-7의 증식 억제작용, TPA에 의해 야기된 skin carcinogenesis 억제작용 및 B16 melanoma 세포 증식 억제작용 등 암세포 증식 억제작용이 있음이 보고^{4,5)}되었다.

본 저자들은 전보⁷⁾에서 glycyrrhizin이 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하고 있음을 보고한 적이 있다. GA는 glycyrrhizin이 가수분해 되어 생성된 물질로 암세포 증식 억제작용이 glycyrrhizin 보다 강력하다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 GA 투여에 의한 이식된 L1210 세포의 세포사에 대한 작용 기전을 규명하고자 mouse leukemia cell-line인 L1210 세포를 BALB/

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1569 (팩스) 0652-290-1567

c mouse에 이식하고, 이식된 L1210 세포의 proliferation 및 apoptosis에 대한 영향을 관찰하였다.

실험방법

실험동물 - 실험동물은 생후 8 주령된 BALB/c 계통의 음성 생쥐를 대한실험동물에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용할 때 까지 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기가 12시간인 사육실에서 고품질 pellet 사료와 물을 자유로이 섭취하게 하면서 사육하였다.

시약 및 기기 - 시약은 glycyrrhetic acid, DME, RPMI 1640, propidium iodide, carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone(mClCCP), 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC₆), MTT, lipopolysaccharide(LPS, 026 : B6), γ -interferon(γ -IFN, Hur-IFN), NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA), N-naphthylethylenediamine-2HCl, lucigenin, zymosan은 Sigma Co., FBS, thioglycollate는 Difco Co. 등을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 기기는 microplate reader(Dynatech MR5000), laser flow cytometer(Coulter, EP-ICS-XL), CO₂ incubator(Vision Co.), luminometer(Berthold 96LP), inverted microscope(Nikon Co.) 등을 사용하였다.

L1210 세포의 증식능 측정 - 이식된 L1210 세포의 증식에 미치는 glycyrrhetic acid(GA)의 영향을 알아보기 위해 Mosmann⁸⁾이 개발하여 Kotnik⁹⁾등이 변형시킨 MTT법을 사용하였다. 생쥐 1군을 5마리로 하여 1마리당 L1210 세포를 2×10^6 cells 씩 복강에 이식하고 7일간 GA(0.1 mg/mouse)를 경구투여한 후 마우스를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 5 ml를 복강에 주입하여 잘 혼합한 후 복강액을 분리하여 원심분리(1,500 rpm, 5분, 4°C) 하였다. 침전된 세포를 petri dish로 옮겨 약 2시간 동안 배양 한 후, 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 원심분리(1,500 rpm, 5분, 4°C)하였다. 침전된 세포분획을 모아 2×10^5 cells/ml로 조제하여 96 well plate의 각 well에 세포부유액 100 μ l를 분주하고 배지 100 μ l를 채워 37°C의 CO₂ incubator에서 24 및 48시간 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μ l를 각 well에 첨가하고, DMSO 100 μ l로 용해시켜 18시간 동안 은박지로 빛을

차단하였다. 발색된 각 well의 흡광도를 microplate-reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다. *In vitro* 실험에서는 L1210 세포를 96 well plate에 분주하고 GA를 농도별로 희석하여 처리한 후 동일한 방법으로 실험하였다.

Mitochondrial transmembrane potential 측정 - 생쥐에 L1210 세포(2×10^6 cells/mouse)를 복강내 이식하고, 1일 1회씩 7일간 GA(0.1 mg/mouse)를 경구투여한 후 마우스를 경추 탈구시켜 도살하였다. PBS 용액(10 ml/mouse)을 복강에 주입하여 이식한 L1210 세포를 복강으로부터 회수하여 세척하고 CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양하여 부착세포를 제거한 다음, 세포현탁액을 조제하여 세포수를 1×10^6 cells/ml로 조정하였다. 세포분획에 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide를 최종 농도가 40 nM이 되도록 PBS에 희석해서 염색하고 37°C에서 15 분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm; emission: 525 nm)로서 측정하였으며, 이때 negative control로는 uncoupling agent로써 carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone 50 μ M을 가하여 측정하였다.¹⁰⁾

DNA fragmentation의 측정 - 위와 동일한 방법으로 L1210 세포를 회수한 후, PI buffer(0.1% Na-Citrate+0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide(10 μ g/ml) 20 μ l를 넣어 4°C에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 DNA fragmentation(sub-G1 peak)를 측정하였다.¹¹⁾

복강 macrophage와 L1210 세포의 co-culture시 L1210세포의 DNA fragmentation 측정 - 생쥐에 L1210 세포(2×10^6 cells/mouse)를 복강내에 이식하고, 1일 1회씩 7일간 GA(0.1 mg/mouse)를 경구투여한 다음, 최종 투여 3일 전에 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고, 3일 후에 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하고, 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양한 다음, 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다. 분리한 macrophage를 24 well plate에 well 당 1×10^6 cells을 분주하고, 1 시간 후에 L1210 세포를 well당 1×10^5 cells씩 transwell에 넣어 LPS 1 μ g/ml와 γ -

IFN 25 units/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37°C CO₂ incubator에서 24 시간 co-culture 하였다. Co-culture 후 L1210 세포를 수거하여 위와 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였으며, NOS inhibitor 처리시에는 L-NMMA 0.5 mM/well을 사용하였다.

복강 macrophage로부터 nitric oxide의 측정 - 위와 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24-well plate에 well당 1×10⁶ cells을 분주한 후, 각 well에 LPS 1 µg/ml와 γ-IFN 25 units/ml를 첨가하여 37°C CO₂-incubator에서 24 시간 배양한 후 생성된 nitric oxide (NO)양을 Griess 시약으로 측정하였다.¹²⁾ 즉, 배지 100 µl와 Griess reagent(1% sulfanilamide+0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl+2.5% H₃PO₄) 100 µl를 혼합하여 96well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

GA 투여시 이식된 L1210세포의 증식에 미치는 효과 - GA는 glycyrrhizin보다 항암작용이 강하며, 세포독성이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 GA를 투여한 생쥐에 L1210 세포를 이식한 후 회수하여 세포생존율을 측정한 결과, 24 시간 및 48 시간 배양시 L1210 세포의 생존율은 대조군에 비해 감소하였다(Table I). 이러한 결과가 L1210 세포에 대해 GA의 직접적인 세포독성인지를 확인하기 위하여, *In vitro*계에서 L1210 세포에 대한 세포생존율을 측정한 결과, L1210 세포에 대해 IC₅₀이 24.2 µg/ml로 직접적인 세포독성이 있었다.

Table I—Effect of glycyrrhetic acid on the cell viability of transplanted-L1210 cells in mice

Samples	Cell viability (%)	
	24 h	48 h
Control	100.0±2.2	100.0±1.8
GA	67.1±3.5*	55.4±3.2*

Glycyrrhetic acid (GA, 0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days, and L1210 cells were transplanted *i.p.* at the first day. The cells were cultured for 24 h. or 48 h. in CO₂ incubator at 37°C. The data was represents the mean±SE from 5 experiments. *Significantly different from control group (p<0.001).

GA가 이식된 L1210세포의 mitochondrial transmembrane potential에 미치는 효과 - 생체에서 세포사의 과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데 respiratory chain이 저해되어 ATP가 제거되고 mitochondrial transmembrane potential이 감소된 다음 막투과성이 변화되고 mitochondria의 swelling이 일어나면서 세포사가 진행되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 생쥐 복강에 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential이 대조군에 비해 GA 투여군에서 감소되었다는 것은, 이식된 L1210 세포가 GA 투여에 의해 초기에 apoptosis가 유도되고 있음을 의미하는 것이다(Table II).

GA가 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과 - 생쥐 복강에 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에 비하여 GA 투여군에서 3배 이상 증가하였다(Table III). 이는 GA가 복강에 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하고 있음을 의미하는 것이나, 시간에 따른 apoptotic 변화에 대한 자세한 기전은 추후 연구할 예정이다.

GA를 투여한 복강 macrophage와 L1210 세포의 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

Table II—Effect of GA on mitochondrial transmembrane potential of transplanted-L1210 cells in mice

Samples	Mitochondrial transmembrane potential (%) of transplanted-L1210 cells
Control	94.9±0.3
GA	70.1±0.6*

The cells were stained with DiOC₆, and the potential was determined by a flow cytometry. The data represents the mean±SE from 5 experiments. *Significantly different from control group (p<0.01).

Table III—Effect of glycyrrhetic acid on DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells in mice

Samples	DNA fragmentation (%) of transplanted-L1210 cells
Control	10.0±1.4
GA	32.9±3.1*

L1210 (2×10⁶ cells/mouse) cells were transplanted to BALB/c mice, and GA (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* once a day for 7 days. The cells were stained with propidium iodide, and DNA content was determined by a flow cytometry. The data was represents the mean±SE from 5 experiments. *Significantly different from control group (p<0.001).

Table IV—Effect of GA on DNA fragmentation of L1210 cells in co-culture of peritoneal macrophages obtained from GA-administered mice and L1210 cells *in vitro*

Samples	DNA fragmentation (%)		
	Non-treatment of LPS and γ IFN	Treatment of LPS and γ IFN	Treatment of LPS, γ IFN and L-NMMA
Control	12.8 \pm 1.8	23.2 \pm 1.2	16.4 \pm 1.5*
GA	25.8 \pm 1.4*	40.3 \pm 2.2*	31.6 \pm 1.7*

GA (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days, and then peritoneal macrophages were collected. The macrophages were cultured with LPS and γ IFN in 24 well plate, and L1210 cells were cultured in transwell. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments.

* Significantly different from control group ($p < 0.01$).

† Significantly different from LPS and γ IFN treated group ($p < 0.05$). L-NMMA; 0.5 mM/well.

는 효과 - 생쥐의 복강 macrophage를 transwell을 이용하여 L1210 세포와 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation은 대조군에서 LPS와 γ -IFN을 처리한 경우 증가하였으며, GA를 투여한 군에서는 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않은 경우에도 증가하였고, LPS와 γ -IFN을 처리한 경우에는 현저히 증가하였다. NOS inhibitor인 N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)를 처리한 군은 DNA fragmentation이 억제되었다(Table IV). GA를 투여한 생쥐의 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때, macrophage에 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않았을 때도 L1210 세포의 apoptosis가 유도되었다는 것은 GA가 생체 내에서 macrophage를 자극하여 NO 생성을 촉진하고 있음을 의미하며, L-NMMA에 의해 L1210 세포의 apoptosis가 일부만 억제되었다는 것은 L1210 세포의 apoptosis 유도에 NO가 일부만 관여하고 있음을 시사하는

것이다. 전보⁷⁾에서 glycyrrhizin을 투여시에는 L-NMMA에 의해 약 78% 정도 이식된 L1210 세포의 apoptosis가 억제되었는데 GA 투여시에는 약 63% 정도 억제되었다. 이는 GA 투여에 의해 생성되는 NO양이 glycyrrhizin 투여시에 생성되는 NO양 보다 적은 것도 원인이 되겠지만, TNF- α 와 같은 다른 물질이 L1210 세포의 apoptosis에 관여하고 있기 때문이라 추정되기 때문에 자세한 기전은 다양한 apoptotic biomarker를 이용하여 추후 연구되어야 할 과제이다. 그러나 본 실험의 결과는 NO releasing compound인 NOC에 의해 dose-dependent하게 apoptosis를 일으키며,¹³⁾ 복강 macrophage로부터 생성된 NO가 종양세포의 apoptosis를 유도하고,^{14,15)} 이러한 작용은 L-arginine과 비슷한 구조를 가진 L-NMMA에 의해 억제된다는 보고¹⁶⁾와 유사한 결과라 사료된다.

GA가 L1210 세포를 이식한 생쥐 복강 macrophage로부터 NO 생성에 미치는 효과 - GA 투여에 의한 복강 macrophage로부터 생성되는 NO에 의해 L1210 세포의 apoptosis가 유도되는지를 확인하기 위하여 NO양을 측정하였다. GA 투여 또는 L1210 세포를 마우스에 이식하였을 때 NO 생성이 증가되었으며, L1210 세포를 이식한 마우스에 GA를 투여하였을 때는 NO 생성이 GA 또는 L1210 세포 단독 처리시 보다 현저히 증가되었고, LPS와 γ -IFN을 처리하였을 때는 NO 생성이 더욱 증가되었다. 이때 생성된 NO는 L-NMMA에 의해 차단되었다(Table V). 이러한 결과는 glycyrrhizin 및 GA가 human T-lymphocyte에서 γ -IFN의 생성을 촉진한다는 보고¹⁷⁾와 γ -IFN은 murine macrophage부터 NO 생성을 촉진한다는 보고¹⁸⁾와 비교하였을 때, GA 투여시 NO 생성이 촉진된 것도와 비슷한 기전에 의해 작동 되었으리라 예상된다. 또

Table V—Effect of GA on the production of nitric oxide from peritoneal macrophages in mice

Samples	Nitric oxide (μ M)		
	Non-treatment of LPS and γ IFN	Treatment of LPS and γ IFN	Treatment of LPS, γ IFN and L-NMMA
Control	1.5 \pm 0.1	11.2 \pm 0.6	1.8 \pm 0.1
L1210	15.5 \pm 1.8**	25.7 \pm 2.6*	5.5 \pm 0.4
GA	20.3 \pm 1.6**	31.2 \pm 1.9*	4.3 \pm 0.6
L1210+GA	43.2 \pm 3.2 [†]	52.4 \pm 3.9 [†]	8.7 \pm 1.2

GA (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* once a day for 7 days, and L1210 cells were transplanted *i.p.* at the first day. Each bar represents the mean \pm SE from 5 experiments.

* Significantly different from control group (*: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$). † Significantly different from L1210 cells-transplanted group ($p < 0.01$).

한 GA의 항암작용 기전에 NO가 일부 관여하고 있다는 본 실험의 결과는, L.L. Thomsen 등¹⁹⁾이 antitumor agents인 flavone-8-acetic acid와 xantherone-4-acetic acid가 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 항암작용을 나타낸다는 실험 결과와도 비슷한 결과이다. Hibbs 등²⁰⁾은 생쥐에 BCG를 투여하고 macrophage를 분리하여, LPS를 첨가하고 배양하면 종양 세포의 증식이 억제되며, L-NMMA를 가하면 항암작용이 나타나지 않음을 발견하고 암세포의 증식에 NO가 관여하고 있음을 보고하였다. 또한 Nathan 등²¹⁾은 NO는 DNA synthesis를 억제하여 다양한 cytostatic 및 cytotoxic effect를 나타낸다고 보고하였다. *In vivo* 계에서 GA 투여에 의해 L1210 세포의 증식이 억제되었다는 결과가, GA가 macrophage로부터 NO 생성을 촉진한 결과인지 확실하게 설명할 수는 없지만, 타 연구자의 보고와 비교할 때 NO가 일부 관여하고 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다. GA가 이식된 L1210 세포에 대해 cytotoxicity 및 apoptosis 유도작용이 있음을 확인하였기에, 추후 PI 및 Annexin V로 double staining하여 좀 더 자세한 기전을 연구할 예정이다.

결 론

L1210 세포를 이식한 생쥐에 GA를 투여하면 이식된 L1210 세포의 cytotoxicity 및 apoptosis가 유도되었으며, 이의 작용에는 복강 macrophage로부터 생성된 nitric oxide가 일부 관여하고 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) A. H. Willie, J. F. R. Kerr, A. R. Currie : Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251 (1980).
- 2) S. H. Kaufmann : Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a causally note. *Cancer Res.*, **49**, 5870 (1989).
- 3) R. Bertand, M. Sarang and J. Jenkin : Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomeraseII inhibitors in human tumor cell lines with amplified *c-myc* expression. *Cancer Res.*, **51**, 6280 (1991).
- 4) H. Nishino, S. Shibata, K. Hirabayashi : Antitumor promoting activity of glycyrrhetic acid-related compounds. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **95**, 1563 (1986).
- 5) H. Nishino, K. Yoshioka, A. Iwashima, H. Takizawa, S. Kunishi, H. Okamoto, H. Okabe, S. Shibata, H. Fujiki and T. Sagimura : Glycyrrhetic acid inhibits tumor promoting activity of teleocidin and 12- α -tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage muose skin carcinogenesis. *Japanese. J. Cancer Res.(GANN)*, **77**, 33 (1986).
- 6) H. Abe, N. Ohya, K. F. Yamamoto, T. Shibata, S. Arichi and S. Odashima : Effects of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. cancer Clin. Oncol.*, **23**, 1549 (1987).
- 7) J. S. Eun, J. Kwon and C. H. Oh : Effect of glycyrrhizin on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji*, **42**(3), 324 (1998).
- 8) T. Mosmann : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods*, **65**, 55 (1983).
- 9) V. Kotnic and W. R. Jr. Fleischmann : A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods*, **129**, 23 (1990).
- 10) N. Zamzami, P. X. Petit and G. Kroemer : Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.*, **181**, 1661 (1995).
- 11) I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. A. Riccardi : Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **139**, 271 (1991).
- 12) K. A. Rocket, M. M. Awburn, W. B. Cowden, and I. A. Clark : Killing of *Plasmodium falciparum*

- in vitro* by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, **59**(9), 3280 (1991).
- 13) S. Motomu, I. Tetsuya, O. Akitoshi, T. Nobuyuki, M. Takashi, H. Takashi, and Y. Ikuto : NOC, A nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophage. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **209**(2), 519 (1995).
 - 14) J. E. Albina, S. Cui, R. B. Mateo and J. S. Reichner : Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **150**(11), 5080 (1993).
 - 15) C. Shijun, S. R. Jonathan, B. M. Romeo and E. A. Jroge : Activated Murine Macrophages Induce apoptosis in tumor cells through Nitric oxide-dependent or independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 2462 (1994).
 - 16) T. R. Billiar, R. D. Curran, B. G. Harbrecht, D. J. Stuehr, A. J. Demetris, and R. L. Simmons : N^G-Methyl L-arginine inhibits endotoxin-induced Nitrite/Nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J. Leu. Bio.*, **48**, 565 (1990).
 - 17) M. Shinada, M. Azuma, H. Kawai, K. Sasaki, I. Yoshida, T. Yoshida, T. Suzutani and T. Sakuma : Enhancement of γ -interferon production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to concanavalin A and to surface antigen of hepatitis B virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **181**, 205 (1986).
 - 18) Y. Kondo, and F. Takano : Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophage enhanced with Glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(5), 759 (1994).
 - 19) L. L. Thomsen, L. M. Ching and B. C. Baguley : Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xantherone-4-acetic acid. *Cancer Res.*, **51**, 6073 (1991).
 - 20) J. B. Hibbs, R. R. Tainter and Z. Vavrin : Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, **235**, 473 (1987).
 - 21) C. Nathan : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB. J.*, **6**, 3051 (1992).