

## 글리시르히진이 생쥐에 이식된 L1210 세포의 아포프토시스에 미치는 영향

은재순<sup>#</sup> · 권 진 · \*오찬호  
우석대학교 약학대학, \*자연과학대학  
(Received April 30, 1998)

### Effect of Glycyrrhizin on Apoptosis of Transplanted-L1210 cells in mice

Jae-Soon Eun<sup>#</sup>, Jin Kwon and Chan-Ho Oh<sup>\*</sup>

College of Pharmacy, \*College of Natural Science, Woosuk University, Samrye, 565-701 Korea

**Abstract**—These experiments were conducted to investigate effects of glycyrrhizin (GL) on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. GL induced apoptosis of transplanted-L1210 cells. GL increased nitric oxide production from peritoneal macrophages of L1210 cells-transplanted mice. NOC12, nitric oxide donor, induced apoptosis of L1210 cells in vitro. The apoptosis of L1210 cells were enhanced by co-culture of the peritoneal macrophages of GL-administered mice and L1210 cells in vitro, and was inhibited by L-NMMA. These results suggest that the apoptosis of transplanted-L1210 cells is partly induced by nitric oxide produced from peritoneal macrophages in GL-administered mice.

**Keywords** □ Glycyrrhizin, Apoptosis, Macrophage, Nitric oxide.

Glycyrrhizin(GL)은 감초(*Glycyrrhizae Radix*)의 주성분으로 항염작용,<sup>1)</sup> 항게양작용,<sup>2)</sup> 항알러지작용,<sup>3,4)</sup> 항암작용,<sup>5,6)</sup> 항바이러스작용<sup>7,8)</sup> 및 면역조절작용<sup>9)</sup> 등 다양한 작용이 있음이 보고되었다. 특히 GL에는 protein kinase C의 활성 억제작용,<sup>10,11)</sup> 간암세포주의 증식 억제작용,<sup>12)</sup> lymphoma의 전이 억제작용<sup>13)</sup> 등이 있음이 밝혀졌다.

최근 GL은 T-lymphocyte로부터  $\gamma$ -IFN의 생성<sup>14,15)</sup> 및 peritoneal macrophage로부터 nitric oxide(NO) 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 한편  $\gamma$ -IFN는 복강 macrophage로부터 endotoxin에 의해 유도된 NO의 생성을 촉진하며,<sup>17)</sup> macrophage에서 생성된 NO는 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되었다.<sup>18)</sup> 이들 보고는 GL의 암세포에 대한 작용이 T-lymphocyte 및 macrophage와도 관련되어 있음을 시사하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 leukemia 세포주인 L1210 세포를 생쥐에 이식하고 GL을 투여하였을 때, 이식된 L1210 세포의 apoptosis가 유도됨을 확인하고, 이의 작용기전에 macrophage에서 생성되는 nitric oxide가 관여하고 있는지의 여부를 확인하고자 실험하였다.

#### 실험방법

**실험동물** - 실험동물은 생후 8 주령된 BALB/c 계통의 웅성 생쥐를 대한실험동물에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용할 때 까지 온도  $22\pm 3^\circ\text{C}$ , 습도  $50\pm 5\%$ , 명암주기가 12 시간인 사육실에서 고형 pellet 사료와 물을 자유로이 섭취케 하면서 사육하였다.

**시약 및 기기** - 시약은 glycyrrhizin, MEM, RPMI-1640, propidium iodide, carbamoyl cyanide m-chlorophenylhydrazone(mClCCP), MTT, 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide(DiOC<sub>6</sub>), N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine(L-NMMA),  $\gamma$ -interferon( $\gamma$ -IFN), li-

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0652-290-1569 (팩스) 0652-290-1567

popolysaccharide(LPS O55:B5)는 Sigma Co., FBS, thioglycollate는 Difco Co., NOC12는 Wako Co. 등을 사용하였으며 기타 시약은 세포배양용 및 1급 시약을 사용하였다. 기기는 flow cytometer(Coulter, EPICS-XL), CO<sub>2</sub> incubator(Vision Co.), inverted microscope(Nikon Co.)등을 사용하였다.

**DNA fragmentation의 측정** - 생쥐에 L1210 세포 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse)를 복강내 투여하고, 7일간 GL(0.1 mg/mouse)을 경구투여한 다음 생쥐를 경추 탈구시켰다. PBS용액(10 ml/mouse)을 복강에 주입하여 이식한 L1210 세포를 복강으로 부터 회수하여 세척하고 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 1시간 동안 배양하여 부착세포를 제거한 다음 세포현탁액을 조제하여 세포수를  $1 \times 10^6$  cells/ml로 조정하였다. 세포분획에 PI(10 µg/ml)20 µl를 주입하여 염색(4°C, 30 분)하고 flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 620 nm)를 이용하여 DNA fragmentation(sub-G<sub>1</sub> peak)을 측정하였다.<sup>19)</sup>

**Mitochondrial transmembrane potential의 측정** - 위와 동일한 방법으로 L1210 세포를 회수한 후,  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 세포수를 조정하여 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide를 최종농도가 40 nM이 되도록 PBS에 희석해서 염색하고 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 flow cytometer(excitation: 488 nm; emission: 525 nm)로 측정하였으며, 이때 negative control로는 uncoupling agent로서 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone 50 mM을 가하여 측정하였다.<sup>20)</sup>

**복강 macrophage로 부터 nitric oxide의 측정** - 생쥐에 L1210 세포( $2 \times 10^6$  cells/mouse)를 복강내 투여하고, 7일간 GL(0.1 mg/mouse)을 경구투여한 다음, 최종 투여 3일전에 평균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고 3 일후에 생쥐를 경추탈골하여 도살시킨 후, 복강에 cold PBS 10 ml를 주입하여 복강세포를 수집하였다. 4°C에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리하여 RPMI 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 다음, 2시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고, 부착한 세포만을 cell scraper로 모아 macrophage로 사용하였다. 분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells을 분주한 후 각 well에 LPS 1 µg/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하고 37°C CO<sub>2</sub>-incubator에서 24 시간 배양한 후 생성된 NO양을 Griess

시약<sup>21)</sup>을 이용하여 측정하였다. 즉 배지 100 µl와 Griess reagent(1% sulfanilamide+0.2% N-Naphthylethylenediamine 2HCl+2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)100 µl를 혼합하여 96 well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다.

**NO donor에 의한 L1210 세포의 apoptosis 측정** - 배양 중인 L1210 세포를  $5 \times 10^5$  cells/ml로 조정하여 24 well plate에 0.5 ml씩 분주한 후, NO donor인 NOC12를 1, 10 및 100 µM 첨가하고 12시간 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.<sup>22)</sup> 배양 후 L1210 세포를 PBS로 세척하여 eppendorff tube에 넣고 위와 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였다.

**복강 Macrophage와 L1210 세포의 Co-culture시 이식된 L1210 세포의 apoptosis 측정** - 위와 동일한 방법으로 macrophage를 분리하여, 분리한 macrophage를 24 well plate에 well당  $1 \times 10^6$  cells을 분주하고, 1시간 후에 L1210 세포를 well당  $1 \times 10^5$  cells씩 transwell에 넣어 LPS 1 µg/ml와  $\gamma$ -IFN 25 units/ml를 첨가하고 37°C CO<sub>2</sub>-incubator에서 24 시간 co-culture 하였다. Co-culture 후 L1210 세포를 수거하여 위와 동일한 방법으로 apoptosis(Sub-G<sub>1</sub> peak)를 측정하였으며, NOS inhibitor 처리시에는 L-NMMA 0.5 mM/well을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**GL이 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과** - 생쥐 복강에 L1210 세포를 이식하고 7일간 GL을 투여한 후 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation을 측정한 결과, 대조군의 DNA fragmentation은  $16.9 \pm 2.1\%$  이었으며 GL투여군에서는  $29.0 \pm 3.1\%$ 로 DNA fragmentation이 촉진되었다(Fig. 1). 이는 GL이 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 촉진하고 있음을 의미하는 것이다.

**GL이 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential에 미치는 효과** - 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential을 측정한 결과, 대조군의 mitochondrial transmembrane potential은  $89.2 \pm 1.2\%$ 이었으며, GL 투여군에서는 mitochondrial transmembrane potential이  $67.3 \pm 1.6\%$ 로 감소하였다(Fig. 2). 생체에서 세포사의

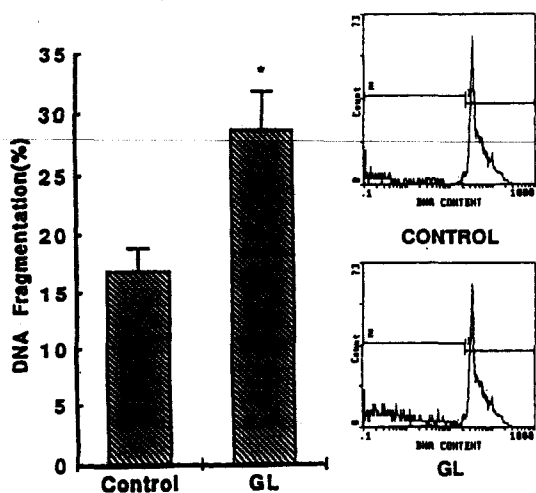


Fig. 1—Effect of glycyrrhizin on DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells in mice. L1210 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) were transplanted to BALB/c mice, and glycyrrhizin (GL, 0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days. The cells were stained with propidium iodide, and DNA content was determined with flow cytometer. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 experiments. \*Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ).

과정에는 일련의 단계적인 순서가 있는데, 특히 mitochondria의 swelling이 일어나기 전단계에서는 mitochondrial transmembrane potential의 감소가 선행되는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> 생쥐에 GL을 투여하여 이식된 L1210 세포의 apoptosis가 유도되었는데, 이때 mitochondrial transmembrane potential도 감소하였다는 것은 GL이 생체 내에서 이식된 L1210 세포의 mitochondrial transmembrane potential을 감소시켜 apoptosis를 촉진하고 있음을 시사하는 것이며, 또한 이식된 L1210 세포가 GL에 의해 apoptosis가 유도되고 있음을 확인하여 주는 결과라 할 수 있다.

**GL이 L1210 세포를 이식한 생쥐의 복강 macrophage로부터 NO 생성에 미치는 효과** - 대조군의 NO 생성량은 LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하지 않았을 때는  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$  이었으나, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $11.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 로 NO 생성이 증가하였다. GL을 투여한 생쥐에서 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하지 않았을 때의 NO 양은  $28.2 \pm 2.8 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $43.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$ 로 현저히 증가하였다. L1210 세포를 이식한 생쥐에서 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -

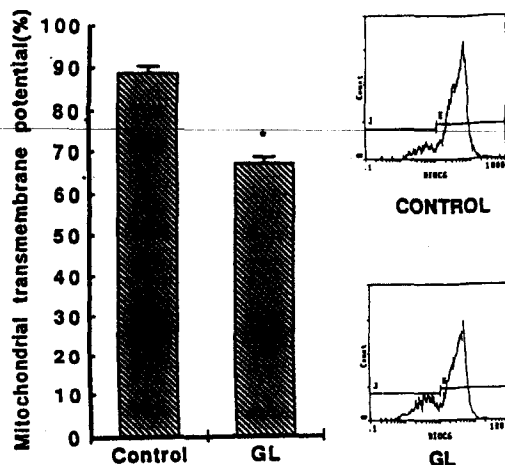


Fig. 2—Effect of GL on mitochondrial transmembrane potential of transplanted-L1210 cells in mice. The cells were stained with DIOC<sub>6</sub>, and the potential was determined with flow cytometer. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 experiments. \*Significantly different from control group ( $p < 0.01$ ).

IFN을 첨가하지 않았을 때의 NO 양은  $15.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $25.7 \pm 2.6 \mu\text{M}$ 로 현저히 증가하였다. L1210 세포를 이식한 생쥐에 GL을 투여하고 분리한 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하지 않았을 때의 NO 양은  $58.2 \pm 3.2 \mu\text{M}$ 로 L1210 세포만을 이식한 군에 비해 증가하였으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $72.8 \pm 3.9 \mu\text{M}$ 로 현저히 증가하였다. 이때 NOS inhibitor인 L-NMMA를 처리하면 각각  $1.8 \pm 0.1$ ,  $5.5 \pm 0.4$ ,  $4.5 \pm 0.4$  및  $9.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ 로 NO 생성이 차단되었다(Fig. 3). 이 결과는 GL이 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진한다는 Kondo 등<sup>16)</sup>의 결과와도 동일한 결과이며, GL을 투여한 생쥐의 macrophage에 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않아도 NO 생성이 촉진되었다는 것은 GL이 투여되었을 때 T-lymphocyte에서  $\gamma$ -IFN 등의 생성이 촉진되어 macrophage로부터 NO 생성이 증가된 결과라 추정된다. L1210 세포만을 이식하였을 때도 NO 생성이 촉진되었다는 것은 암세포가 생체에 들어오면 macrophage가 자극을 받아 NO 생성을 촉진하여 암세포에 대해 저항력을 나타내는 것이 아닌가 추정된다. 또한 L1210 세포를 이식하고 GL을 투여하면, L1210 세포 이식 또는 GL만을 단독 투여하였을 때에 비해, NO 생성이 현저히 증가하였는

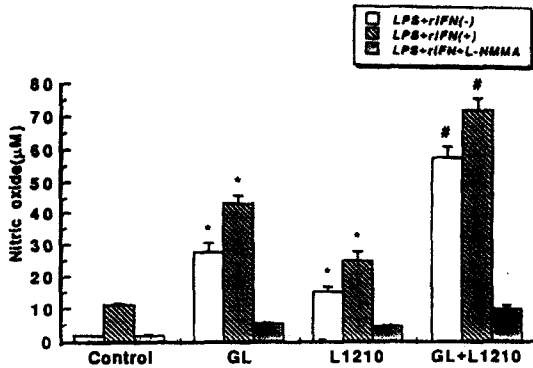


Fig. 3—Effect of GL on nitric oxide production from peritoneal macrophages of mice. GL (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days, and L1210 cells were transplanted *i.p.* at the first day. Each bar represents the mean±S.E. from 5 experiments. \*Significantly different from control group ( $p<0.01$ ). #Significantly different from L1210 treated group ( $p<0.01$ ). (-): LPS and  $\gamma$ -IFN non-treated group, (+): LPS and  $\gamma$ -IFN treated group, L-NMMA: 0.5 mM/well.

데, 이 결과는 L1210 세포에 의해 자극을 받은 macrophage에 GL이 상승적으로 작용하는 것이 아닌가 추정되나 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

**NO donor가 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과** - NO donor인 NOC12를 1, 10 및 100  $\mu$ M로 각각 처리하였을 때, 대조군의 DNA fragmentation은  $18.0\pm 1.0\%$  이었으며, NOC12 처리시  $25.2\pm 1.7$ ,  $27.9\pm 0.3$  및  $33.8\pm 1.5\%$ 로 대조군에 비해 농도의 존적으로 L1210 세포의 DNA fragmentation이 증가되었다(Fig. 4). 이 결과로는 NO에 의해 L1210 세포의 apoptosis가 유도되고 있음을 확인할 수 있었다.

**GL 투여 생쥐의 복강 macrophage와 L1210 세포의 Co-culture 시 이식된 L1210 세포의 apoptosis에 미치는 효과** - GL 투여 생쥐의 복강 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 apoptosis 발생율은 LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하지 않았을 때의 대조군에서  $15.7\pm 1.3\%$ 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $23.9\pm 2.2\%$ 로 증가하였다. GL을 투여하고 분리한 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 apoptosis 발생율은 LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하지 않았을 때는  $42.3\pm 3.2\%$ 이었으며, LPS와  $\gamma$ -IFN을 첨가하였을 때는  $56.5\pm 3.5\%$ 로 증가하였다. 이때 L-NMMA를 처리하면 23.8

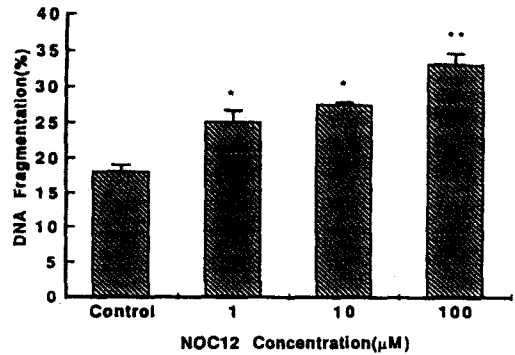


Fig. 4—Effect of nitric oxide donor on DNA fragmentation of L1210 cells *in vitro*. L1210 cells were cultured with NOC12 for 12 hrs. in  $CO_2$  incubator. Each bar represents the mean±S.E. from 4 experiments. \*Significantly different from control group ( $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ). NOC12:  $C_6H_{16}N_4O_2$  (Wako 347-0691, NO donor, Half-life: 13 min).

$\pm 1.2\%$  및  $32.2\pm 2.5\%$ 로 apoptosis 발생율이 감소되었다(Fig. 5).

GL을 투여하고 분리한 macrophage와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 LPS와  $\gamma$ -IFN을 처리하지 않아도 L1210 세포의 apoptosis 발생율이 증가하였다는

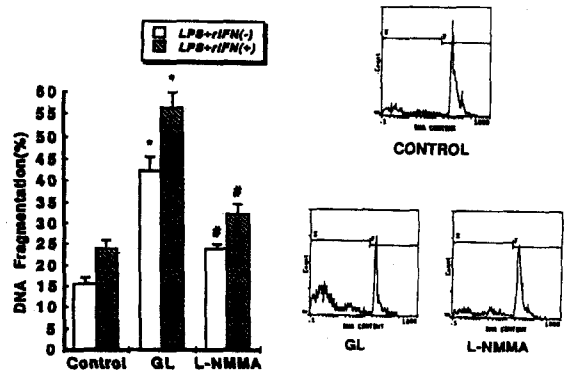


Fig. 5—Effect of GL on DNA fragmentation of L1210 cells in coculture of peritoneal macrophages obtained from GL-administered mice and L1210 cells *in vitro*. GL (0.1 mg/mouse) was administered *p.o.* for 7 days, and then macrophages were collected. Macrophages were cultured with LPS and  $\gamma$ -IFN in 24 well plate, and L1210 cells were cultured in transwell. Each bar represents the mean±S.E. from 5 experiments. \*Significantly different from control group ( $p<0.01$ ). #Significantly different from GL-treated group ( $p<0.01$ ). L-NMMA: 0.5 mM/well.

것은 GL이 macrophage를 자극하여 NO 생성을 촉진하고, 생성된 NO가 직접적으로 L1210 세포의 apoptosis를 유도하기 때문이라 추정된다. 또한 이 결과는 복강 macrophage로부터 생성되는 NO가 종양세포의 apoptosis를 유도한다는 C. Shijun 등<sup>23)</sup>의 결과와도 유사한 결과이다. Co-culture시 L1210 세포의 apoptosis 발생율이 L-NMMA에 의해 70% 정도 감소되었다는 것은, 이식된 L1210 세포의 apoptosis 유도기전에 복강 macrophage로부터 생성된 NO가 주된 작용을 하고 있으며, 이외에 또다른 factor가 일부 관여하고 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

## 결론

암세포인 L1210 세포를 이식한 생쥐에 GL을 투여하면 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여, 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 일부 유도하고 있다고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구조성비에 의하여 연구 되었으며 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) H. Inoue, K. Inoue, T. Takeuchi, N. Nagata and S. Shibata : Inhibition of rat acute inflammatory paw edema by dihemiphthalate of glycyrrhizic acid derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**, 1067 (1993).
- 2) K. Takagi and Y. Ishii : Peptic ulcer inhibiting properties of a new fraction from Licorice root (F<sub>M</sub>100). *Arzneimittel Forschung*, **18**, 53 (1968).
- 3) T. Iso, N. Nakajima, H. Suda, H. Yamauchi and K. Uda : Passive anaphylaxis in rat conjunctiva and topical effects of anti-allergic agents hypersensitivity in conjunctiva and drug efficacy. *Ophthalmic Res.*, **12**, 9 (1980).
- 4) H. Inoue, T. Mori, S. Shibata and H. Saito : Pharmacological activities of Glycyrrhetic acid derivatives: Analgesic and anti-type IV allergic effects. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3888 (1987).
- 5) H. Abe, N. Ohya, K. Fujikawa, T. Shibuga, 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).
- 6) H. Okamoto, D. Yoshida, Y. Saito and S. Mizusaki : Inhibition of 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced induction in epstein-barr virus early antigen in Raji cells. *Cancer Letters*, **19**, 27 (1983).
- 7) M. Ito, H. Nakashima, M. Baba, R. Pauwells, E. DeClercq, S. Shigeta and N. Yamamoto : Inhibitory effect of Glycyrrhizin on vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus. *Antiviral Research*, **7**, 127 (1987).
- 8) H. Nakashima, T. Matsui, O. Yoshida, Y. Isowa, Y. Kido, Y. Motoki, S. Shigeta, T. Mori and N. Yamamoto : A new anti-human immunodeficiency virus substance, Glycyrrhizin sulfate: Endowment of Glycyrrhizin with reverse transcriptase inhibitory activity by chemical modification. *JPN. J. Cancer Res.*, **78**, 767 (1987).
- 9) J. H. Han, C. H. Oh and J. S. Eun : Effect of Glycyrrhizae Radix on the immune responses (II). Immuno-regulatory action of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid. *Yakhak Hoeji*, **35(3)**, 174 (1991).
- 10) H. Nishino, S. Shibata, K. Hirabayashi : Antitumor promoting activity of glycyrrhetic acid-related compounds. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **95**, 1563 (1986).
- 11) 仲増英治, 昇 公一, 内海耕造 : C-키ナー제 활성에對するグリチルリチンの影響. *Mino. Med. Rev.*, **17**, 89 (1986).
- 12) 佐佐木功典, 村上知之, 小賀 厚德, 高橋 學, 沖田 極 : 히토肝癌細胞 HuH-7의增殖ならび에 $\alpha$ -フェトпротеイン産生に及ぼすグリチルリチンの影響. *Biotherapy*, **3(6)**, 1515 (1989).
- 13) 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).

- 14) M. Shinada, M. Azuma, H. Kawai, K. Sasaki, I. Yoshida, T. Yoshida, T. Suzutani and T. Sakuma : Enhancement of interferon-gamma 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).
- 15) N. Abe, T. Ebina and N. Ishida : Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 535 (1982).
- 16) Y. Kondo and F. Takano : Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages enhanced with Glycyrrhizin. *Biol. Pharm. Bull.*, **17(5)**, 759 (1994).
- 17) M. J. Herriott, H. Jiang, C. A. Stewart, D. J. Fast and R. W. Leu : Mechanistic Differences between Migration Inhibitory Factor(MIF) and IFN- $\gamma$  for Macrophage Activation. *J. Immunol.*, **150**, 4524 (1993).
- 18) J. E. Albina, S. Cui, R. B. Mateo and J. S. Reichner : Nitric oxide-mediated Apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **150**, 5080 (1993).
- 19) 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).
- 20) N. Zamzami, P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, 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).
- 21) K. A. Rockett, 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).
- 22) 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. *Bioche. and Biophys. Res. Com.* **209(2)**, 519 (1995).
- 23) C. Shijun, S. R. Jonathan, B. M. Romeo and E. A. Jroge : Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 2462 (1994).