

염화아연의 세포성 면역독성에 미치는 황기 추출물의 효과

채병숙[#] · 신태용^{*}

우석대학교 자연과학대학, 우석대학교 약학대학^{*}

(Received November 25, 1998)

Effects of Astragali Radix extract on the Cell Mediated Immunotoxicity of Zinc Chloride

Byeong Suk Chae[#] and Tae Yong Shin^{*}

College of Natural Science, Woosuk University, Samrae-Up 565-701, Korea

^{*}College of Pharmacy, Woosuk University, Samrae-Up 565-701, Korea

Abstract—Effects of Astragali Radix extract (AG) on the cell mediated- and nonspecific immunotoxic responses of zinc chloride (Zn) were studied using ICR mice. Mice were divided into 4 groups (10 mice/group), and Zn was given to the mice 1 hr after *i.p.* injection with 0.5 g/kg of AG by *i.p.* injection daily for 10 days at a dose of 25 mg/kg. Immune responses on the relative weight of thymus, delayed-type hypersensitivity to SRBC (DTH), phagocytic activity and circulating leukocytes were evaluated. Zn treatment decreased body weight gain, the relative weight of thymus, DTH and circulating leukocytes compared with those in controls. AG treatment increased DTH, phagocytic activity and circulating leukocytes compared with those in controls. Combination of AG and Zn increased DTH and circulating leukocytes compared with those in controls, but decreased body weight gain and the relative weight of thymus. Combination of AG and Zn increased DTH and circulating leukocytes than in Zn alone, but decreased body weight gain and the relative weight of thymus. These findings indicated that AG decreased immunotoxicity of Zn on the DTH and circulating leukocytes.

Keywords □ Astragali Radix, zinc, delayed-type hypersensitivity reaction, phagocytic activity, circulating leukocyte.

아연은 식품, 물 및 공기에 존재하고, 해산물, 육류, 곡물, 유제품, 견과류 및 콩류 등에 많이 함유되어 있으나 야채류에는 별로 함유되어 있지 않으며, 계속적인 노출로 체내에 축적되지 않고, 고용량의 아연 섭취로 인한 독성은 일반적으로 발생되지 않으며,¹⁾ metallothionein의 합성을 유도한다.²⁾ 그러나 대부분 아연에 대한 급성 독성은 도금한 용기속에 저장된 식품이나 음료로 아연이 용출되므로써 나타나며, 또한 지역적 환경의 심한 오염으로 zinc oxide fume을 흡입하므로써 metal fume fever와 같은 산업적 위해성을 갖는다.^{3,4)} 과량의 아연투

여로 오심, 구토, 복부경련, 피로, 설사, 기면, 상기, 보행 곤란, 구리결핍성 빈혈 등의 증상이 나타나고,^{4,6)} 면역이 억제되며,^{7,8)} low density lipoprotein(LDL) cholesterol의 증가 및 high density lipoprotein(HDL) cholesterol의 감소를 가져왔으나 triglyceride와 총 cholesterol 농도의 변화가 없었다고 보고되었다.^{7,9)}

황기의 면역학적 보고에 따르면 Sugiura 등¹⁰⁾은 *Astragalus membranaceus*(AM)가 비장세포의 성장률, 대식세포의 활성, 복강 macrophage의 interleukin (IL)-1 생산을 증가시켰다고 보고하였고, Wang 등¹¹⁾과 Chu 등¹²⁾은 AM가 *in vitro*에서 recombinant IL-2에 의한 lymphokine-activated killer cell의 항암효과를 강화시켰다고 보고하였고, Zhao 등¹³⁾은 cyclop-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0652-290-1426 (팩스) 0652-291-9312

hosphamide, radiation 또는 노화에 의해 억제된 T-dependent antigen에 대한 항체반응이 AM에 의하여 회복되었다고 보고하였고, Li 등¹⁴⁾은 신증성 환자에서 Astragali와 Angelica가 고용량의 단백질 섭취에 따른 cholesterol치를 감소시켰다고 보고하였다.

따라서 면역독성 및 HDL/LDL cholesterol 비의 감소 등을 유발시키는 고용량의 아연에 의하여 저하된 세포성면역반응이 면역증진작용 및 cholesterol 조절작용을 갖는 황기와 병용투여 시 회복될 것으로 사료되어 본 실험을 실시하였으며 그에 대한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고한다.

실험재료 및 방법

실험동물 - 생후 6주령 체중 17~21 g의 수컷 ICR 생쥐를 대한실험동물센터(충북 음성 소재)에서 분양받아 사판사료(제일사료 제품 : 조단백질 22.5%이상, 조지방 35%이상, 조섬유 7.5%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.7%이상)로 1주간 급식시켜 적용시킨 후 10마리를 1군으로 하고 전체를 4군으로 나누어 온도 23±2°C, 습도 50~60%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 14일간 사육하였다.

Zinc chloride(Zn) 용액의 조제 및 투여 - Zinc chloride(Sigma Co., Ltd., U.S.A.)을 주사용 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 25 mg을 10일간 황기 메탄올 엑스 투여 1 시간 전 일정한 시각에 복강내 주사하였다.

황기 메탄올 추출물(AG)의 조제 및 투여 - Astragali Radix(한약유통)를 세말로 한 다음 그 50 g을 methanol(Sigma Co., Ltd., U.S.A.)에 넣고 70°C의 수욕상에서 3시간 환류냉각 추출하여 여과한 다음 이 여액을 서서히 감압농축 동결건조시킨 다음 이 황기 메탄올 추출물을 주사용 생리식염수에 용해시켜 생쥐의 kg당 0.5 g을 10일간 1일 1회 복강내로 주사하였다.

체중 및 장기의 중량계측 - 실험동물의 체중은 실험 개시일과 최종일 약 24시간 전에 절식시킨 후 동일한 시간에 측정하였다. 실험 최종일에 실험동물의 경동맥을 절단하고 혈액을 취한 후, 흉선을 적출하고 그 중량을 측정하여 대체중 백분비를 구하였다.

항원조제 - 면양적혈구(sheep red blood cell: SRBC)를 사용하였는데, 그 방법은 음성면양의 경동맥으로부터 heparin처리 주사기로 혈액을 취한 후 동량의 Alserver's 완충액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하

여 2주일 이내에 사용하였다. 보존 중인 SRBC를 사용할 때에는 사용 직전 phosphate-buffered saline(이하 PBS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 3회 원심 세척한 후 적절한 농도로 Hanks' balanced salt solution(이하 HBSS: Gibco Co., Grand Island, N.Y., U.S.A.)에 부유시켜 사용하였다.

면역 - 원심 세척한 SRBC를 Reed 등의 방법¹⁵⁾을 참고하여 HBSS에 1×10⁸ cells/ml의 농도로 부유시키고, 그 부유액 0.1 ml(1×10⁷ cells)를 생쥐의 꼬리 정맥에 주사하여 면역을 유도하였으며, 지연형 과민반응을 위해 면역 4일 후에 생쥐의 좌측후지족척내에 2×10⁹ cells/ml 부유액 0.05 ml(1×10⁸ cells)를 주사하였다.

족척종창반응의 측정(Footpad swelling test) - 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity reaction: DTH)을 측정하기 위하여 Yoshikai 등¹⁶⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 면역 4일 후에 SRBC 0.05 ml(1×10⁸ cells)를 생쥐의 좌측후지족척에 피내주사하였다. 주사 후 일정시간 경과한 후 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo Mfg. Co., Ltd., Japan)로 측정하였으며, 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다. 판독기준은 Sugimoto 등¹⁷⁾의 판독기준에 따라, 다음과 같이 24시간 경과 후의 반응을 DTH로 간주하였다.

Footpad swelling index =

$$\frac{\text{종창두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

대식세포 활성도의 측정 - 본 실험에서는 Biozzi 등¹⁸⁾이 기술한 방법에 준하여 대식세포의 탐식능력 측정을 다음과 같이 실시하였다. 즉, 최종 약물투여 2일 후에 Rotring ink를 1% gelatin 수용액으로 6배 희석한 현탁액을 조제하여 37°C에 보관하였다. 위와 같이 조제한 colloid상 탄소현탁액을 흰쥐 체중 g당 0.01 ml씩 꼬리 정맥내로 주사하였다. 그 후 생쥐의 안와후부정맥혈관총(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μl: microhematocrit)로 천자하여 20 μl의 혈액을 10, 20 및 30분 간격으로 혈액을 취하여 0.1% sodium carbonate용액 2 ml가 든 test tube에 넣어서 적혈구가 용해되도록 잘 혼합하였다. 이어서 흡광도를 600 nm에서 측정하고 다음 공식에 따라 계산하였다. 실험동물의 체중, 간장 및 비장의 무게를 측정하

고, 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 도면에 표시한 그래프 곡선)

말초순환 백혈구수의 측정 - 생쥐의 안구정맥총으로부터 말초혈액을 취하고 Türk액으로 희석하여 혈구계산판상에 적하한 후, 백혈구 총수를 측정하였다.

통계학적 분석¹⁹⁾ - 모든 자료는 mean±standard error(S.E.)로 나타냈으며 유의성 검사는 Student's *t*-test로 행하였다.

실험결과

ICR 생쥐에 있어서 zinc chloride의 세포성 및 비특이적 면역독성에 대한 항기 매탄을 추출물의 영향에 관한 실험 결과는 다음과 같다.

체중 및 흉선의 변화 - 각 군의 체중변화는 Table I에서 보는 바와 같이, 대조군의 체중 증가율이 32.08±3.82%인데 비해 Zn 단독투여군과 AG와 Zn 병용투여군에서 각각 23.61±6.62% 및 18.59±3.90%로 감소되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서도 유의성 없는 감소가 있었다.

Table I— Effects of Astragali Radix extract on the thymus weights of zinc chloride in ICR mice

Group	Body weight gain (%)	Thymus / Body weight × 100 (%)
Control	32.08±3.82	0.33±0.03
Zn	23.61±6.62	0.29±0.08
AG+Zn	18.59±3.90*	0.17±0.05*
AG	30.75±8.06	0.39±0.07

Zn: Zinc chloride. AG: Astragali Radix. Zn was given to mice 1 hr after *i.p.* injection with 25 mg/kg of AG by *i.p.* injection daily for 10 days at a dose of 0.5 g/kg. Each value represents the mean±S.E. of 10 mice. Asterisks denote a significant difference compared with control group (*, *p*<0.05).

Table II— Effects of Astragali Radix extract on the delayed type hypersensitivity of zinc chloride in ICR mice

	FPSI index
Control	5.75±1.19
Zn	4.94±1.14
AG+Zn	7.57±2.46
AG	9.90±1.27*

Mice were challenged s.c. with 10⁸ SRBC on left hind footpad 4 days after immunization.

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

where T₀ is the left hind footpad thickness immediately before challenge and T₂₄ is the left hind footpad thickness 24 hr after challenge. Each value represents the mean±S.E. of 10 mice. Other legends and methods are the same as in Table I (*, *p*<0.05).

흉선의 중량 변화는 Table I에서 보는 바와 같이 체중의 변화와 같은 결과를 나타냈는데, 대조군이 0.33±0.03%인데 비해 Zn 단독투여군 및 AG와 Zn 병용투여군에서 각각 0.29±0.08% 및 0.17±0.05%로 감소되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서도 유의성 없는 감소가 있었다.

지연형 과민반응에 미치는 영향 - 지연형 과민반응의 결과는 Table II에서 보는 바와 같이, 대조군 지연형 과민반응이 5.75±1.19%인데 비해 Zn 단독투여군에서 4.94±1.14%로 약간 감소되었으나 AG와 Zn 병용투여군에서는 7.57±2.46%로 약간 증가되었으며, Zn

Table III— Effects of Astragali Radix extract on the phagocytic activity and the number of circulating leukocyte of zinc chloride in ICR mice

	Corrected phagocytic index ¹⁾	Number of circulating leukocyte (/mm ³) ²⁾
Control	4.53±0.30	6,220±1,065
Zn	4.56±0.90	4,540±806
AG+Zn	4.83±0.62	7,820±1,229 [§]
AG	5.45±0.43	8,800±1,324

¹⁾ Corrected phagocytic index is a constant obtained from a formula relating the cube root of K to the ratio of body weight to the weights of the liver and spleen.

²⁾ Blood samples for measuring leukocytes in mice were collected from the retro-orbital plexus immediately before assay. Each value represents the mean±S.E. of 10 mice. Section marks denote a significant between Zn and AG plus Zn groups. Other legends and methods are the same as in Table I (*, *p*<0.05).

단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서 유의성 없게 증가되었다.

대식세포의 활성에 미치는 영향 - 대식세포의 탐식능을 측정하여 corrected phagocytic index로 환산한 결과는 Table III에서 보는 바와 같이, 대조군의 대식세포 활성이 4.53 ± 0.30 인데 비해 Zn 단독투여군은 4.56 ± 0.90 로 거의 변화가 없었으며 AG와 Zn 병용투여군에서는 4.83 ± 0.62 로 약간 증가하였다.

말초순환 백혈구수에 미치는 영향 - 말초순환 백혈구수에 대한 결과는 Table III에서 보는 바와 같이 대조군의 백혈구수가 $6,220 \pm 1,065$ WBC/mm³ 인데 비해 Zn 단독투여군에서 $4,540 \pm 806$ WBC/mm³으로 유의성 없게 감소되었으나 AG와 Zn 병용투여군에서는 $7,820 \pm 1,229$ WBC/mm³로 유의성 없게 증가되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다.

고 찰

본 실험에서 염화아연(Zn)의 용량설정은 염화아연 용량에 따른 ICR 생쥐의 면역반응에 대한 Ahn 등⁸⁾의 보고에서 면역독성용량을 참고로 하여 면역독성반응을 일으키기 위하여 25 mg/kg을 염화아연의 실험용량으로 정하였고, 황기 메탄올 추출물(AG)의 용량 설정은 Kim 등²⁰⁾의 보고에 의해 면역반응을 증강시키는 0.5 g/kg으로 하였다.

본 실험에서 체중변화는 정상대조군의 체중 증가율에 비해 Zn 단독투여군 및 AG와 Zn 병용투여군에서 감소되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서도 유의성 없는 감소가 있었다. 또한 흉선의 체중대증량비 변화도 체중변화와 같은 결과를 나타냈는데, 대조군에 비해 Zn 단독투여군 및 AG와 Zn 병용투여군에서 감소되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서도 유의성 없는 감소가 있었다(Table I). 이는 아연이 *in vitro*에서 IL-1 β 와 TNF α 의 농도를 증가시켰다는 Wellinghausen 등²¹⁾의 보고와, zinc fever인 경우 TNF, IL-8 및 IL-6의 농도가 증가되었다는 Blanc 등²²⁾의 보고와, 면역원에 의한 monocyte나 macrophage로부터 생산된 IL-1, TNF 및 IL-6 등 monokine은 단백질 합성에 대한 단백질 분해의 비를 증가시켜 골격근의 증대를 감소시키고 기초대사량 증가에 따른 에너지 소비를 증가시키며 아미노산을 당

신생작용으로 이용한다는 Klasing 등²³⁾의 보고로 미루어, 과량의 아연이 IL-1, TNF 등과 같은 monokine을 유리시켜 체중증가율을 감소시킨 것으로 사료되며 황기가 이런 monokine의 혈중농도에 변화를 줌으로써 Zn 단독투여군보다 AG와 Zn 병용투여군에서 더욱 체중증가율이 감소된 것으로 사료된다. 또한 흉선의 체중대증량비가 감소를 보인 것은 아연의 T cell의 활성 억제작용²⁴⁾ 및 황기의 T helper cell 활성 증진 작용¹³⁾에 의해 Zn 단독투여 시 보다 AG와 Zn 병용투여 시 흉선의 체중대증량비가 높을 것으로 사료되었으나 본 실험결과는 상반된 결과를 보여주었으며 이 기전에 대한 연구가 요구된다.

세포성 면역반응인 즉척종창반응에 의해 측정된 DTH 반응은 감작임파구에 의한 림포카인의 화학적 전달인자의 유리에 의해서 성립되며 특히 대식세포가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는 바, 본 실험에서 정상대조군에 비해 Zn 단독투여군에서 약간 감소되었으나 AG와 Zn 병용투여군에서는 약간 증가되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서 유의성 없는 증가를 보였다(Table II). 이는 6주동안 매일 아연 300 mg을 섭취한 11명의 건강한 성인 남자의 면역이 억제되었다는 Chandra⁷⁾의 보고와, 고용량의 아연이 T cell 기능을 직접적으로 차단시켰다는 Wellinghausen 등²⁴⁾의 보고와, cyclophosphamide, radiation 또는 노화에 의해 억제된 T-dependent antigen에 대한 항체반응이 Astragalus membranaceus (AM)에 의하여 회복되었다는 Zhao 등¹³⁾의 보고로 미루어, 고용량의 아연에 의해 억제된 T cell의 활성이 황기에 의해 회복된 것으로 사료된다.

대식세포의 활성은 항원에 의한 면역능의 발현 및 인터루킨의 분비에 중요한 역할을 하며 그 탐식능이 망상조직내피계에 대한 영향을 측정지표로써 이용되고 있는 바, 본 실험에서 정상대조군의 대식세포 활성에 비해 Zn 단독투여군은 거의 변화가 없었고 AG와 Zn 병용투여군에서 약간 증가를 보였으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서 약간 증가를 보였다(Table III). 이는 고용량의 아연이 peripheral blood mononuclear cell의 IFN- γ 생산을 억제시켰다는 Wellinghausen 등²⁴⁾의 보고와, AM가 대식세포의 활성, 복강 macrophage의 IL-1 생산을 증가시켰다는 Sugiura 등¹⁰⁾의 보고로 미루어, 고용량 아연에 의한 IFN- γ 생산의 억제가 황기에 의하여 회복되므로써 Zn 단독투여군보다

AG와 Zn 병용투여군에서 대식세포 활성이 증가된 것으로 사료된다.

말초순환 백혈구수는 정상대조군에 비해 Zn 단독투여군에서 유의성 없게 감소되었으나 AG와 Zn 병용투여군에서는 유의성 없게 증가되었으며, Zn 단독투여군에 비해 AG와 Zn 병용투여군에서도 유의성 있는 증가를 보였다(Table III). 이는 아연으로 치료를 받는 sickle cell anemia 환자에서 leukopenia, neutropenia 등의 증상을 야기시켰다는 Hoffman 등²⁵⁾의 보고와, 흰쥐에서 cyclophosphamide로 억제된 면역반응이 AM에 의해 회복되었다는 Chu 등²⁶⁾의 보고로 미루어, 아연에 의해 억제된 말초순환 백혈구수가 황기의 면역증진 작용에 의하여 회복된 것으로 사료되며 그 기전에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다.

결 론

ICR 생쥐에서 zinc chloride(Zn; 25 mg/kg, 복강주사)의 면역독성에 미치는 Astragali Radix(AG; 0.5 g/kg, 복강주사)의 영향에 관하여 실험한 결론은 다음과 같다.

1. Zn 단독투여군은 정상대조군에 비해 체중증가율, 흉선의 체중대 중량비, 지연형과민반응 및 말초순환 백혈구수 등이 감소되었으나 대식세포의 활성은 거의 변화가 없었다.

2. AG 단독투여군은 정상대조군에 비해 흉선의 체중대 중량비, 지연형과민반응, 대식세포의 활성 및 말초순환 백혈구수 등이 증가되었다.

3. AG와 Zn 병용투여군은 정상대조군에 비해 지연형과민반응 및 말초순환 백혈구수 등이 증가되었으나 체중증가율 및 흉선의 중량비는 감소되었다.

4. AG와 Zn 병용투여군은 Zn 단독투여군에 비해 지연형과민반응 및 말초순환 백혈구수 등이 증가되었으나 체중증가율 및 흉선의 중량비는 감소되었다.

이상의 결과, 지연형 과민반응 및 말초순환백혈구수에 따른 고용량 아연의 면역독성이 황기 메탄올 추출물에 의하여 정상으로 회복되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 우석대학교 학술연구비에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Klaassen, C. D. : Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 5th, 720 (1996).
- 2) Sullivan, V. K., Burnett, F. R. and Cousins, R. J. : Methallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. *J. Nutr. (JEV)* **128**(4), 707 (1998).
- 3) Fosmira, G. J. : Zinc toxicity. *AM. J. Clin. Nutr.* **51**, 225 (1990).
- 4) Brown, M. A., Thom, J. V. and Orth, G. L. : Food poisoning involving zinc contamination. *Arch. Environ. Health* **8**, 657 (1964).
- 5) Murphy, J. V. : Intoxication following ingestion of elemental zinc. *JAMA* **212**, 2119 (1970).
- 6) Brewer, G. J., Hill, G. M., Dick, R. D., Prasad, A. S. and Cossack, Z. T. : Interactions of trace elements: Clinical significance. *J. Am. Coll. Nutr.* **4**(1), 33 (1985).
- 7) Chandra, R. K. : Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA* **252**, 1443 (1984).
- 8) Anh, Y. K., Kim, J. H., Chae, B. S. and Cha, K. J. : Effects of zinc chloride on the immune response in ICR mice. *Yakhak Hoeji* **36**(4), 291 (1992).
- 9) Hooper, P. L., Visconti, L., Garry, P. J. and Johnson, G. E. : Zinc lowers high-density-lipoprotein-cholesterol levels. *JAMA* **244**, 1960 (1980).
- 10) Sugiura, H., Nishida, H., Inaba, R. and Iwata, H. : Effects of exercise in the growing stage in mice and of *Astragalus membranaceus* on immune functions. *Nippon Eiseigaku Zasshi* **47**(6), 1021 (1993).
- 11) Wang, Y., Qian, X. Y., Hadley, H. R. and Lau, B. H. : Phytochemicals potentiate interleukin-2 generated lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against murine renal cell carcinoma. *Mol. Biother.* **4**(3), 143 (1992).
- 12) Chu, D., Sun, Y., Lin, J., Wong, W. and Mavligit, G. : F3, a fractionated extract of *Astragalus membranaceus*, potentiates lymphokine-activated killer cell cytotoxicity generated by low-dose re-

- combinant interleukin-2. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* **10(1)**, 34 (1990).
- 13) Zhao, K. S., Manicini, C. and Doria, G. : Enhancement of the immune response in mice by *Astragalus membranaceus* extracts. *Immunopharmacology* **20(3)** 225 (1990).
 - 14) Li, L., Yu, H. and Pan, J. : A study on protein metabolism in nephrotic patients treated with Chinese herbs. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* **34(10)** 670 (1995).
 - 15) Reed, N. D., Crowle, P. K. and Ha, T. : Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals. *B. Sordeted. Karger Baselip.* 184 (1984).
 - 16) Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed-footpad reation to SRBC in mice. *Immunol.* **38**, 577 (1979).
 - 17) Sugimoto, M., Kojima, A. M., Yaginuma, K. and Gashira, Y. E. : Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **28**, 32 (1975).
 - 18) Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B. N. : Etude quantitative du l'acivite granulopexique du system reticuloentherial chezla souris. *C. R. Soc. Biol. Paris* **148**, 431 (1954).
 - 19) Stavitsky, A. B. : Micro methods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.* **72**, 360 (1954).
 - 20) Kim, J. H., Park, J. S., Chae, B. S., Kang, T. W., Park, C. B. and Ahn, Y. K. : Immunobiological studies on doses of methanol extract of *Astragali Radix*. *Yakhak Hoeji* **40(3)**, 326 (1996).
 - 21) Wellinghausen, N., Driessen, C. and Rink, L. : Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine (A52)* **8(10)**, 767 (1996).
 - 22) Blanc, P. D., Boushey, H. A., Wong, H., Wintermeyer, S. F. and Bernstein, M. S. : Cytokines in metal fume fever. *Am. Rev. Respir. Dis. (426)* **147(1)**, 134 (1993).
 - 23) Klasing, K. C. and Johnstone, B. J. : Monokines in growth and development. *Poult. Sci. (PG 3)*, **70(8)**, 1781 (1991).
 - 24) Wellinghausen, N., Martin, M. and Rink, L. : Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur. J. Immunol. (EN5)* **27(10)**, 2529 (1997).
 - 25) Hoffman, H. N., Phyliky, R. L. and Fleming, C. R. : Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* **94**, 508 (1988).
 - 26) Chu, D. T., Wong, W. L. and Mavligit, G. M. : Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. II: Reversal of cyclophosphamide-induced immune suppression by administration of fractionated *Astragalus membranaceus in vivo*. *J. Clin. Lab. Immunol. (J3K)* **25(3)**, 125 (1988).