

三稜煎이 생쥐에 이식된 L1210 세포의 증식에 미치는 영향

전용근 · 임재윤 · 송정모¹ · 은재순*

우석대학교 약학대학, 1: 한의과대학

Effects of *Samreungjeon* on the Proliferation of Transplanted-L1210 Cells in Mice

Yong Keun Jeon, Jae Yoon Leem, Jung Mo Song¹, Jae Soon Eun*

College of Pharmacy, 1: College of Oriental Medicine, Woosuk University

We studied effects of *Samreungjeon* water extract (SE) on the proliferation of transplanted-L1210 cells to mice. *Samreungjeon* is composed of *Scirpi Tuber*, *Zedoariae Rhizoma*, *Aurantii immaturi Pericarpium*, *Pinelliae Tuber* and *Hordei Fructus Germinatus*. When SE (500 mg/kg) was administered orally once a day for 7 days after transplantation of L1210 cells to mice, the proliferation of transplanted-L1210 cells was decreased and DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells was induced. Also, DNA fragmentation of L1210 cells was enhanced by co-culture with the peritoneal macrophages obtained from SE-administered mice and was partly inhibited by L-NMMA *in vitro*. SE enhanced the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that SE partly induces apoptosis of transplanted-L1210 cells *via* production of nitric oxide from macrophages.

Key words : *Samreungjeon*, L1210 cells, apoptosis, nitric oxide

서 론

三稜煎은 宋代의 三因極一病證方論에 최초로 수재된 처방으로 三稜, 蓬朮, 靑皮, 半夏 및 麥芽로 구성되어 있으며, 血癥, 血癥, 食積, 痰滯 등의 치료에 사용되어 왔다¹⁾. 구성 약물 중 三稜은 자궁암 및 간암세포를 억제하는 작용이 있고²⁾, 蓬朮은 자궁경 부암에 효과가 있으며^{2,3)}, 三稜煎은 여성암세포의 증식을 억제한다는 李의 보고⁴⁾가 있었다. 특히, 李⁴⁾는 三稜煎이 여성암세포인 HeLa 세포의 apoptosis를 유도하였으며, 복강 macrophages로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하였다고 보고하였다.

Nitric oxide (NO)는 L-arginine으로부터 NO synthetase에 의해 생성되며, 생성된 NO는 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. Macrophage에서 생성된 NO는 mitochondria function 및 DNA synthesis를 억제하여 다양한 cytostatic 및 cytotoxic effect를 나타내며⁶⁾, 또한 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되었다⁷⁾. 또한, 본 연구자들은 감초의 주성분인 glycyrrhizin 및 glycyrrhetic acid가 복강 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 이식된 암

세포의 apoptosis를 촉진함을 이미 보고한 적이 있다^{8,9)}.

따라서 본 실험에서는 李가 보고⁴⁾한 三稜煎의 암세포 증식 억제작용 기전을 규명하여 보고자 생쥐에 三稜煎을 투여한 후 복강 macrophages를 분리하여 백혈병 세포주인 L1210 세포와 transwell을 이용하여 co-culture한 다음 L1210 세포의 DNA fragmentation 및 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 생쥐는 C57BL계 수컷 6 주령을 대한실험동물에서 구입하여, 온도 20 ± 2 °C, 습도 50 ± 3%, dark/light 12 시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기기

사용한 시약은 lipopolysaccharide (LPS), γ -interferon (γ -IFN), MTT, propidium iodide, N-naphthylethylenediamine · 2HCl, sulfanilamide, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA),

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

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

· 접수 : 2005/05/19 · 수정 : 2005/06/21 · 채택 : 2005/07/26

propidium iodide는 Sigma Co., RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co. 제품을, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다. 사용기기는 microplate-reader (Dynatech MR5000), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted microscope (Nikon Co.), freeze dry apparatus (Ilsin Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 삼릉전의 구성은 濟陰綱目¹⁰⁾에 준하였으며, 사용한 약재들은 우석대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였으며, 내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. 三稜煎의 처방구성

韓藥名	生藥名	重量 (g)
三稜	<i>Scirpi Tuber</i>	37.5
蓬朮	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	37.5
靑皮	<i>Aurantii immaturi Pericarpium</i>	75
半夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	75
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	75
Total		300

처방 1첩 분량을 증류수 1,500 ml로 2회 가열추출한 후, 여액을 모아 rotary evaporator로 감압농축한 다음, freeze dryer로 동결건조하여 분말 29.5 g (이하 SE라 함)을 얻어 실험에 사용하였다.

4. 세포증식능 측정

L1210 세포의 증식에 미치는 SE의 영향을 알아보기 위해 Mosmann¹¹⁾이 개발하여 Kotnik¹²⁾ 등이 변형시킨 MTT법을 사용하였다. 생쥐 1군을 5마리로 하여 1마리 당 L1210 세포를 2×10^6 cells 씩 복강에 이식하고 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 5 ml를 복강에 주입하여 잘 혼합한 후 복강액을 분리하여 원심분리 (1,500 rpm, 5분, 4℃) 하였다. 침전된 세포를 petri dish로 옮겨 약 2시간 동안 배양 한 후, 부착한 세포를 제거하고 부착하지 않은 세포를 모아 원심분리하였다. 침전된 세포분획을 모아 RPMI1640 배지로 2×10^5 cells/ml로 조제하여 96-well plate의 각 well에 100 μ l씩 분주하고, 37℃의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 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.

5. DNA fragmentation 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 1마리 당 L1210 세포를 RPMI1640

배지로 2×10^6 cells로 조제하여 복강에 이식하고 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 후 생쥐를 경추 탈구시켜 도살하였다. 도살 후 cold PBS 5 ml를 복강에 주입하여 잘 섞은 다음 복강액을 분리하여 원심분리 (1,500 rpm, 5분, 4℃) 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℃)하였다. 침전된 세포분획을 모아 PI buffer (0.1% Na-Citrate + 0.2% Triton X-100)에 용해시킨 propidium iodide (10 μ g/ml) 20 μ l를 넣어 4℃에서 30분간 염색한 후, flow cytometer로 DNA fragmentation (sub-G1 peak)을 측정하였다¹³⁾.

6. Co-culture에 의한 DNA fragmentation 측정

생쥐 1군을 5마리로 하여 대조군에는 생리식염수만을, 실험군에는 SE 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 최종 투여 3일 전에 멸균한 3% thioglycollate 2 ml를 복강에 투여하고, 3일 후에 생쥐를 경추탈골하여 도살하였다. 도살 후 cold-PBS 10 ml를 복강에 주입하여 복강세포를 수집하고, 4℃에서 1,300 rpm으로 10분간 원심분리한 다음, RPMI 1640 배지로 2회 세척한 후, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 2시간 배양 후 부착되지 않은 세포를 제거하고 부착한 세포만을 모아 macrophage로 사용하였다. 분리한 macrophage를 24-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고, 1시간 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℃ CO₂ incubator에서 24시간 co-culture 하였다¹⁴⁾. Co-culture 후 L1210 세포를 수거하여 동일한 방법으로 DNA fragmentation을 측정하였다. Nitric oxide synthetase inhibitor인 L-NMMA는 0.5 mM/well을 사용하였다.

7. Nitric oxide의 측정

위와 동일한 방법으로 분리한 macrophage를 24-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후, 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37℃ CO₂-incubator에서 24시간 배양한 후 NO양을 Griess 시약으로 측정하였다¹⁵⁾. 즉, 배지 100 μ l와 Griess reagent (1% sulfanilamide + 0.2% N-naphthylethylenediamine · 2HCl + 2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 혼합하여 96-well plate에 넣고 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 미리 작성한 NaNO₂의 검량선에 의해 NO 양을 측정하였다. In vitro 실험에서는 분리한 복강 macrophages를 24-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후 SE 1, 10 및 100 μ g/ml를 각각 처리하고 각 well에 LPS 1 μ g/ml와 γ -IFN 25 units/ml를 첨가하여 37℃ CO₂-incubator에서 24시간 배양한 후 동일한 방법으로 NO 양을 측정하였다.

8. 통계처리

모든 실험결과들은 mean \pm SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험성적

1. L1210 세포의 증식능에 미치는 효과

생쥐 복강에 L1210 세포 2×10^6 cells을 이식한 후 SE를 7일간 경구투여한 다음 이식한 L1210 세포를 회수하여 세포생존율을 측정하기 위해 48 시간 배양하였다. 대조군에서 회수한 L1210 세포의 세포생존율을 100% 하였을 때 SE를 투여하고 회수한 L1210 세포의 세포생존율은 $72.8 \pm 3.7\%$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 1).

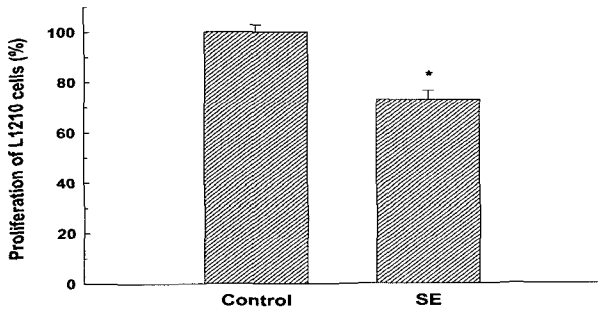


Fig. 1. Effect of Samreungjeon (SE) on the proliferation of transplanted-L1210 cells in mice. L1210 cells (2×10^6 cells/ml) were transplanted to C57BL mice and SE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days. The data represents the mean \pm SE from 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

2. L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐 복강에 L1210 세포 2×10^6 cells을 이식한 후 SE를 7일간 경구투여한 다음 이식한 L1210 세포를 회수하여 DNA fragmentation을 측정된 결과 대조군에서 회수한 L1210 세포의 DNA fragmentation은 $18.4 \pm 3.6\%$ 이었으나, SE를 투여하고 회수한 L1210 세포의 DNA fragmentation은 $32.7 \pm 3.4\%$ 로 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2).

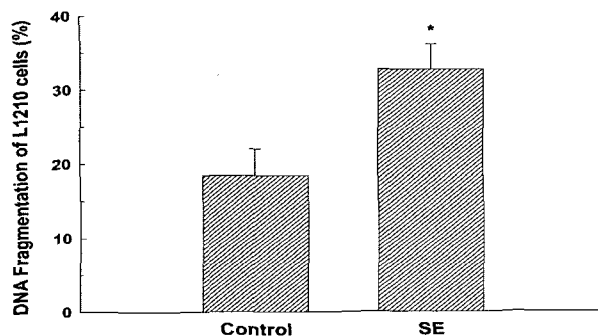


Fig. 2. Effect of SE on DNA fragmentation of transplanted-L1210 cells in mice. L1210 cells (2×10^6 cells/ml) were transplanted to C57BL mice and SE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days. The collected L1210 cells were stained with propidium iodide and DNA content was determined with a flow cytometer. The data represents the mean \pm SE from 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

3. 복강 macrophage와 L1210 세포의 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation에 미치는 효과

생쥐에 SE를 7일간 경구투여한 후 복강 macrophages를 분

리하여 24-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고, L1210 세포를 well당 1×10^5 cells씩 transwell에 넣어 co-culture 하였다. 대조군에서 회수한 복강 macrophages와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 DNA fragmentation은 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않은 경우 $10.3 \pm 1.5\%$ 이었으나, SE를 투여하고 회수한 복강 macrophages와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 DNA fragmentation은 $16.3 \pm 2.7\%$ 로 증가하였으며, 대조군에서 회수한 복강 macrophages와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 DNA fragmentation은 LPS와 γ -IFN을 처리한 경우 $21.6 \pm 2.9\%$ 이었으나, SE를 투여하고 회수한 복강 macrophages와 L1210 세포를 co-culture 하였을 때 L1210 세포의 DNA fragmentation은 $32.5 \pm 3.4\%$ 로 증가하였다.

한편, LPS와 γ -IFN을 처리한 군에 nitric oxide synthetase inhibitor인 L-NMMA를 처리하였을 경우 L1210 세포의 DNA fragmentation이 대조군에서 $14.8 \pm 1.3\%$ 로 SE 투여군에서 $24.6 \pm 2.7\%$ 로 LPS와 γ -IFN을 처리한 군에 비해 일부 억제되었다 (Table 2).

Table 2. Effect of SE on DNA fragmentation of L1210 cells in co-culture with peritoneal macrophages obtained from SE-administered mice *in vitro*

Samples	DNA fragmentation (%)		
	without LPS+ γ -IFN	with LPS+ γ -IFN	with LPS+ γ -IFN + L-NMMA
Control	10.3 \pm 1.5	21.6 \pm 2.9	14.8 \pm 1.3*
SE	16.3 \pm 2.7	32.5 \pm 3.4	24.6 \pm 2.7*

SE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days and peritoneal macrophages were collected. The co-culture of L1210 cells and macrophages were conducted in the absence or presence of LPS and γ -IFN. The data represents the mean \pm SE from 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$). *: Significantly different from LPS and γ -IFN treated group ($p < 0.05$). L-NMMA: 0.5 mM/well

4. L1210 세포 이식시 복강 macrophage로부터 nitric oxide 생성에 미치는 효과

SE 투여에 의해 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양을 측정하기 위해 macrophages를 24-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후 LPS 및 γ -IFN을 처리한 다음 생성되는 NO양을 측정하였다. 대조군에서 회수한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양은 $10.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 이었으나, SE를 투여하고 회수한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양은 $18.5 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 로 증가하였으며, L1210 세포를 이식하고 회수한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양은 $28.9 \pm 2.5 \mu\text{M}$ 로, L1210 세포를 이식하고 SE를 투여하고 회수한 복강 macrophages로부터 생성되는 NO양은 $45.2 \pm 3.8 \mu\text{M}$ 로 현저히 증가하였다 (Table 3). *In vitro*의 결과를 알기 위해 분리한 복강 macrophages에 SE 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하고 LPS와 γ -IFN을 첨가하였을 때 대조군에서 생성되는 NO양은 $15.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$ 이었으나, SE 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리한 군에서는 $16.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$, $20.8 \pm 1.4 \mu\text{M}$, $32.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 로 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 NO양이 증가하였다 (Table 4).

Table 3. Effect of SE on the production of nitric oxide in murine peritoneal macrophages obtained from L1210 cells-transplanted mice

Samples	Nitric oxide (μM)
Control	10.3 ± 1.1
SE	18.5 ± 2.1 [*]
L1210-Transplantation	28.9 ± 2.5 [*]
L1210-Transplantation + SE	45.2 ± 3.8 [#]

SE (500 mg/kg) was administered *p.o.* once a day for 7 days after the transplantation of L1210 cells to mice. The collected peritoneal macrophages were cultured for 24 h in the presence of LPS and γ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE from 5 mice. ^{*}: Significantly different from control group ($p < 0.001$). [#]: Significantly different from L1210-transplantation group ($p < 0.001$).

Table 4. Effect of SE on the production of nitric oxide from murine peritoneal macrophages treated with LPS and γ -IFN *in vitro*

Samples	Dose (μg/ml)	Nitric oxide (μM)
Control	-	15.3 ± 1.8
SE	1	16.3 ± 1.3
SE	10	20.8 ± 1.4 [*]
SE	100	32.3 ± 2.1 ^{**}

The collected peritoneal macrophages were cultured with several concentration of SE for 24 h in the presence of LPS and γ -IFN. The production of nitric oxide was determined with a Griess reagent. The data represents the mean \pm SE from 5 mice. ^{*}: Significantly different from control group ($p < 0.05$); ^{**}: $p < 0.001$.

고찰

三稜煎은 三稜, 蓬朮, 靑皮, 半夏 및 麥芽로 구성되어 있으며, 三稜은 苦味平無毒으로 肝脾經에 入하여 破氣祛痰, 消積止痛하고 血中之氣를 破하며, 蓬朮은 苦味溫無毒으로 肝脾經에 入하여 行氣破血, 消積止痛하고 氣中之血을 治하며, 靑皮는 苦辛微溫無毒으로 肝膽經에 入하여 疏肝破氣, 散積化滯, 除痰消痞하고, 半夏는 辛溫有毒으로 脾胃經에 入하여 燥濕化痰, 消痞散結하며, 麥芽는 甘微溫無毒으로 脾胃經에 入하여 消食, 和中, 和積하니, 이는 주로 行氣, 破氣시키는 약물로 구성되어 있어 積聚, 癥瘕의 治法 中 攻法에 속하는 처방이다¹⁶⁻¹⁹).

본 실험은 三稜煎이 암세포증식을 억제한다는 李 등의 보고⁹)에 따라 이의 작용 기전을 규명하고자 실험하였다. 세포사 (cell death)에는 necrosis와 apoptosis의 두 가지 경로가 있다. Necrosis는 ischemia, sustained hyperthermia 또는 물리적, 화학적 상해 등의 급격한 손상으로 고유의 homeostasis를 상실하여 원형질막의 주요 부위가 손상되고 삼투압 조절 능력이 상실되어, 세포가 팽창되어 파괴되면서 괴사가 일어나는 것이며, apoptosis는 세포질과 핵 chromatin이 농축되면서 DNA가 180~200개의 염기로 절단(DNA fragmentation)되는 것이다²⁰). Apoptosis는 programmed cell death에 동반하여 관찰되는 cell death의 형태이지만 항암제 또는 방사선 등과 같은 외부의 요인에 의해서도 유도되는 것으로 알려져 있다^{21,22}). SE 투여시 이식된 L1210 세포의 증식이 억제되었다. 이의 작용기전을 규명하고자 이식된 L1210 세포의 DNA fragmentation을 측정

결과 DNA fragmentation이 증가하였다. 이는 SE가 L1210 세포의 apoptosis를 유도하여 세포의 증식을 억제하고 있음을 시사하는 것이다. SE 투여에 의해 유도되는 L1210 세포의 apoptosis 기전을 규명하고자, SE를 생쥐에 투여하고 분리한 복강 macrophages와 L1210 세포를 *in vitro*에서 co-culture 하였다. 생쥐의 복강 macrophage를 transwell을 이용하여 L1210 세포와 co-culture시 L1210 세포의 DNA fragmentation은 SE 투여군에서 LPS와 γ -IFN을 처리하지 않은 경우에도 증가하였으며, LPS와 γ -IFN을 처리한 경우에는 더욱 증가하였다. 또한, L-NMMA에 의해 L1210 세포의 apoptosis가 일부 억제되었다. 이는 SE가 생체 내에서 macrophage를 자극함으로써 분비되는 NO에 의해 apoptosis를 일부 유도하고 있음을 의미하는 것이다. NO는 암세포의 apoptosis를 유도하며²³), 복강 macrophage로부터 생성된 NO도 종양세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다^{24,25}).

따라서 SE 투여에 의해 복강 macrophage로부터 NO가 생성되는지의 여부를 관찰하기 위해 LPS 및 γ -IFN을 처리하여 NO 양을 측정된 결과, L1210 세포를 이식한 군 및 SE 투여군은 대조군에 비해 NO 생성이 증가하였으며, L1210 세포를 이식한 군에 SE를 투여한 군은 NO 생성이 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 SE 투여에 의해 생성된 NO가 이식된 L1210 세포의 apoptosis에 일부 관여하고 있음을 확인하여 주는 결과라 할 수 있다. SE에 의한 NO 생성의 촉진작용이 직접작용인지를 관찰하기 위해 *in vitro*에서 복강 macrophages에 SE를 처리하였을 때 NO 생성이 증가하였다. 이는 SE가 macrophages에 직접작용하여 NO 생성을 촉진함을 시사하는 것이다. 이러한 결과는 항암제의 일부가 macrophage로부터 NO 생성을 촉진하여 항암작용을 나타낸다는 실험 결과²⁶) 및 생쥐에 BCG를 투여하고 macrophage를 분리하여, LPS를 첨가하고 배양하면 종양세포의 증식이 억제되며, L-NMMA를 가하면 항암작용이 없어진다는 실험결과²⁷)와도 유사한 결과라 할 수 있다. 생체에서 암세포의 apoptosis를 유도하는 것은 NO 뿐만 아니라, 다양한 인자들이 관여하고 있기 때문에 SE 투여에 의해 유도되는 L1210 세포의 apoptosis 촉진인자들에 대해서는 추후 연구되어야 할 과제이다.

결론

삼릉전은 복강 macrophage에 직접작용하여 NO 생성을 촉진하며, 생성된 NO가 이식된 L1210 세포의 apoptosis를 유도하는데 일부 관여하고 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성 사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 陳 壽. 三因極一病證方論, 서울, 一中社, p 261, 1992.

2. 常敏毅. 抗癌本草, 湖南科學技術出版社, p 16, 105, 1987.
3. 葉銘洪. 治癌中藥及處方, 臺北, 華聯出版社, p 129, 149, 1986.
4. 李枝映. 人體 女性癌 細胞株에 미치는 三稜煎 煎湯液의 影響, 圓光大學校 博士學位論文, 1995.
5. Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, p 235, 473, 1987.
6. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB, J.* p 6, 3051, 1992.
7. Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, p 150, 5080, 1993.
8. Eun, J.S., Kwon, J., Oh, C.H. Effect of glycyrrhizin on apoptosis of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji*, 42(3):324, 1998.
9. Eun, J.S., Kwon, J., Yum, J.Y., Oh, C.H. Effect of glycyrrhetic acid on the cell death of transplanted-L1210 cells in mice. *Yakhak Hoeji*, 42(6):583, 1998.
10. 武之望. 濟陰綱目, 臺北, 旋風出版社, p 149, 162, 1975.
11. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.* p 65, 55-61, 1983.
12. Kotnic, V., Fleischmann, W.R. Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.* p 129, 23-8, 1990.
13. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C.A. Rapid and simple method for mesuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, p 139, 271, 1991.
14. Won, K.S., Kim, D.K., Oh, C.H., So, J.N., Eun, J.S. Apoptosis Induction of L1210 cells, Mouse Leukemia Cell-Line, by Lithospermi Radix. *Kor. J. Oriental Medical Physiology & Pathology*, 15(6):936-940, 2001.
15. Rocket, K.A., Awburn, M.M., Cowden, W.B., Clark, I.A. Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunity*, 59(9), 3280, 1991.
16. 辛民教. 臨床本草學, 서울, 南山堂, p 381, 556, 1986.
17. 申佶求. 申氏本草學(各論), 서울, 壽文社, p 497, 697, 1988.
18. 李常仁 外. 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, p 228, 289, 1986.
19. 醫學研究會編. 增補本草備要(卷1), 高文社, p 18, 54, 1974.
20. Suda, S., Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.*, p 179, 873, 1994.
21. Kaufmann, S.H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionally note. *Cancer Res.*, p 49, 5870, 1989.
22. Bertand, R., Sarang, M., Jenkin, J. Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res.*, p 51, 6280, 1991.
23. Motomu, S., Tetsuya, I., Akitoshi, O., Nobuyuki, T., Takashi, M., Takashi, H., Ikuto, Y. NOC, A nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophage. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 209(2):519, 1995.
24. Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, 150(11):5080, 1993.
25. Shijun, C., Jonathan, S.R., Romeo, B.M., Jroge, J.A. Activated Murine Macrophages Induce apoptosis in tumor cells through Nitric oxide-dependent or independent machanisms. *Cancer Res.*, p 54, 2462, 1994.
26. Thomsen, L.L., Ching, L.M., Baguley, B.C. 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.*, p 51, 6073, 1991.