

## 생약제가 면역세포 활성화에 미치는 영향

이인선<sup>†</sup> · 하영득  
계명대학교 식품가공학과

### Effect of Edible and Medicinal Plants on the Activation of Immune Cells

In-Seon Lee<sup>†</sup> and Young-Duck Ha

Dept. of Food Technology and Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

#### Abstract

In order to evaluate the effect of the extracts of edible and medicinal plants on the activation of immune cells, measurements were made by ELISA and radioimmunoassay on the degree of release for the tumor necrosis factor (TNF) and neopterin by the edible and medicinal plants in peripheral blood cells. The results of measurements of TNF in the supernatant cultured liquid showed nothing in the control which does not have any edible and medicinal plants. However, measurements of TNF (pg/ml) in the samples are given as follows: 716.7 in lipopolysaccharide (LPS 1g/ml), 465.2 *Rheum palmatum* L., 302.7 *Sanguisorba officinalis* L., 818.2 *Rubus coreanus* M., 328.3 *Terminalia chebula* R., 426.6 *Areca catechu* L., 227.0 *Eugenia caryophyllata* T., 272.9 *Ephedra sinica* S., 30.1 *Caesalpinia sappan* L., 474.0 *Chaenomeles japonica* L., 396.0 *Cornus officinalis* S. in edible and medicinal plants. Neopterin (n mole/L) value showed below the check point in the control group, however, the values are 11.0 in LPS, and edible and medicinal plants, 5.3 *Rheum palmatum* L., 12.5 *Sanguisorba officinalis* L., 14.3 *Rubus coreanus* M., 6.2 *Terminalia chebula* R., 6.9 *Areca catechu* L., 11.6 *Eugenia caryophyllata* T., 5.5 *Ephedra sinica* S., 4.5 *Caesalpinia sappan* L., 4.3 *Chaenomeles japonica* L., 3.7 *Cornus officinalis* S. In order to find mRNA levels of cytokines increased by edible and medicinal plants, total RNA was separated from mononuclear cells treated 5hrs with *Rubus coreanus* M. and then administrated for RT-PCR. The considerable increases of the mRNA of TNF, IL-1 $\alpha$  and IL-6 were observed.

**Key words** : edible and medicinal plants, activation of immune cells, *Rubus coreanus* M.

#### 서 론

감염에 대한 보호작용, 장기이식 거부반응, 자기면역질환 그리고 암 등 여러가지 질환에 있어서 면역반응을 조절할려는 시도로 많은 면역조절제 또는 생물학적 반응조절제 (Biological Response Modifiers, BRM)가 연구되고 있다. 생물학적 반응조절제는 생물체로부터 추출된 천연산물 (natural product)로서, 그일부는 암의 진행을 억제하거나 생체의 면역능을 변조시키는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 생물학적 반응조절제로서의 천연산물은 생체에 투여했을때 부작용이 거의 없을뿐 아니라, 세포의 기능을 변화시키거나 조절하는데 큰 효과를 나타내는 새로운 물질원이 된다는 점에서 높이 평가되고

있다. 최근까지 분리된 많은 천연산물이 생물학적 반응조절제 효과를 보인다고 밝혀져 있으며<sup>2)</sup>, 그 대표적인 것은 lentinan, 시호, 인삼, 마늘, 그리고 화살나무 등에서 분리된 것이 있다<sup>3)</sup>. 그러나 이와 같이 각기 다른 생물체로부터 분리된 천연산물은 그 생물학적 활성이 각각 상이하기 때문에 다양한 종류의 생물체, 특히 생약제로부터 분리, 획득할 필요가 있다.

본 연구에서는 한국에서 시판되고있는 생약제중 항균작용이 있는 것으로 알려진 대황(大黃), 지유(地榆), 복분자(覆盆子), 가자(柯子), 빈랑(檳榔), 정향(丁香), 마황(麻黃), 소목(蘇木), 목과(木瓜), 산수유(山茱萸)의 수용성 추출물을 사용하여 대식세포 활성화에 미치는 영향과 여러 cytokine 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 실험에 사용한 생약제의 종류와 추출과정

사용한 생약제는 대황(大黃, *Rheum palmatum* L.), 지유(地榆, *Sanguisorba officinalis* L.), 복분자(覆盆子, *Rubus coreanus* M.), 가자(柯子, *Terminalia chebula* R.), 빈랑(檳榔, *Areca catechu* L.), 정향(丁香, *Eugenia caryophyllata* T.), 마황(麻黃, *Ephedra sinica* S.), 소목(蘇木, *Caesalpinia sappan* L.), 목과(木瓜, *Chaenomeles japonica* L.), 산수유(山茱萸, *Cornus officinalis* S.) 등 10종을 증류수 100ml당 2g씩 넣고 80°C에서 4시간 추출하였다. 추출액은 3,000rpm으로 원심한 후 0.45 $\mu$ m의 seitz형 여과지로 여과하였다.

생약추출액은 냉동 건조하여 분말로 만든 다음 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

### Whole blood culture

Heparin(10U heparin/ml of blood) 처리한 정상인의 정맥혈을 RPMI 1640media (contained with 200mM glutamine)로 5배 희석한 다음 96 well culture plate의 각 well에 180 $\mu$ l씩 분주하고 냉동 건조하여 생리식염수에 녹인 생약 추출물 20 $\mu$ l씩을 넣어 생약제의 농도가 500 $\mu$ g/ml되게 한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 16시간 배양 후 그 상층액을 얻어 -20°C에 보관하였다가 tumor necrosis factor(TNF)와 neopterin의 농도를 측정하였다.

### 배양상층액에서의 tumor necrosis factor(TNF)와 neopterin의 측정

TNF농도의 측정은 두가지 항체를 이용하는 효소면역법(NEN, Boston, MA, USA)으로 시행하였다. TNF에 대한 monoclonal antibody가 coating된 polystyrene microtiter plate에서 시료와 표준용액을 넣고 4°C에서 12시간 반응시킨 후 well들을 세척하였다. Polyclonal rabbit anti-TNF antibody를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시켜 세척하고 horse radish peroxidase를 결합시킨 goat anti-rabbit antibody를 넣고 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 well들을 세척하고 hydrogen peroxide와 orthophenylenediamine이 함유된 기질용액을 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 발색반응을 중지시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader(Titertek, USA)로 490nm와 690nm에서 30분 이내에 측정하였다. 표준곡선은 recombinant TNF를 사용하여 작성하였으며, 단위는 pg/ml로 나타내었다.

Neopterin의 농도는 liquid phase radioimmunoassay 방법으로 측정하였다. 즉, 배양상층액 50 $\mu$ l를 radioimmuno-special vials(Sarstedt, Numbrecht, F. R. G.)에 넣고 <sup>125</sup>I-neopterin tracer 10 $\mu$ l와 precipitated antibody complex(sheep anti-neopterin antibody를 donkey anti-sheep IgG antibody로 미리 precipitate시킨 것) 10 $\mu$ l을 가하여 22°C에서 1시간동안 반응시킨 후 6% polyethylene glycol용액을 1ml씩 가하여 2,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 상층을 제거하고 pellet의 radioactivity를 gamma-counter(Packard, USA)로 측정하였다.

### RT-PCR(reverse transcription and polymerase chain reaction)

#### RNA 분리

총 RNA는 Chomczynski와 Sacchi의 방법<sup>3)</sup>에 따라 RNAzol B로서 분리하였다. 단핵구세포(1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/ml)를 분리하여 RNAzol B 900 $\mu$ l와 chloroform 100 $\mu$ l을 넣어 충분히 혼합한 후 원심분리(4°C, 12,000 $\times$ g, 15min)하여 상층과 같은 양의 isopropyl alcohol을 넣어 -20°C에서 3시간 배양하였다. 침전된 RNA를 원심분리(4°C, 12,000 $\times$ g, 20min)하여 회수하고 75% ethanol로 세척 및 건조한 후 diethylpyrocarbonate(DEPC)처리한 물로서 용해하여 UV spectrophotometer(Gilford 2600)로서 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 RNA의 양을 확인하였다.

#### Olygonucleotide primers 및 reverse transcription

Reverse transcription과 PCR은 GeneAmp RNA PCR kit(Perkin-Elmer Cetus사, Norwalk, CT)를 사용하였다. 역전사반응(reverse transcription)은 각 반응마다 total RNA 200ng과 2.5 $\mu$ M oligo d(T)<sub>18</sub>, 그리고 50U의 Moloney murine leukemia virus transcriptase(MMLV-RT)가 포함된 반응용액을 42°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성후 99°C에서 5분간 방치하여 역전사효소의 활성을 억제시켰으며, 이후 PCR에 이용될때까지 5°C에 보관하였다(Table 1a).

#### PCR 증폭 및 전기영동

PCR은 Ericomp사의 thermal cycler를 이용하여 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1.5분간을 유지하도록 하는 각 cycle을 35회 반복하였다(Table 1b). PCR 생성물 15 $\mu$ l에 3 $\mu$ l의 gel loading buffer를 더하여 1.5% agarose gel 위에서 120V로 90분간 전기영동하였다.  $\beta$ -

actin을 RNA의 intactness와 cDNA 합성의 효율성을 증명하기 위한 대조군으로 사용하였다. cDNA의 증폭을 위해 사용한 human  $\beta$ -actin, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF 그리고 IL-6 primers는 Clontech사(USA)에서 구입하였다 (Table 2).

## 결과 및 고찰

### 생약제가 TNF유리에 미치는 영향

현재까지 많은 연구자에 의해 생물체로부터 다양한 종류의 천연산물이 추출되었으며, 이들 천연산물중 일부는 그 구조와 생화학적 특성이 명확히 밝혀져 있다. 특히 세포분열 및 세포기능의 변화와 관련된 일부의 천연산물은 중요한 생물학적 반응조절제로 취급되어 그 특성은 물론 작용과정에 대해 자세히 연구되고 있다. 그러나 국내의 경우 생물학적 반응조절제 효과를 보이는 것으로 알려져 전송되어 온 많은 생약제들이 있음에도 불구하고 이들이 어떠한 생물학적 활성을 가지고 있는가에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다.

시판되고 있는 생약제중 항균작용이 있다고 알려진 대황, 지유, 복분자, 가자, 빈랑, 정향, 마황, 소목, 산수유를 대상으로 대식세포의 TNF 유리에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 1).

TNF는 내독소, 바이러스, 곰팡이 등에 의해 대식세포에서 주로 생성 유리되지만 비만세포, 내피세포, natural killer 세포에서도 유리된다고 한다<sup>6)</sup>. TNF는 면역반응을 증가시키고, 혈관의 성장을 자극하며, energy mobilization을 증가시키고, 다른 cytokinase의 유리를 유도할뿐만 아니라, 창상치유를 촉진한다. 대량의 TNF가 일시적으로 혈중에 유리되면 쇼크, 장기부전, 사망을 초래한다.

본 실험에서 TNF의 농도 증가는 복분자 (*Rubus co-*

*reanus* M.)가 818.2pg/ml로서 가장 높았다. 복분자는 낙엽관목의 열매로서 지혈, 지사 그리고 이뇨에 사용되고 있으며, citrin과 astragalins을 함유하고 있는 것으로 분석되어 있다<sup>4)</sup>. LPS (lipopolysaccharide)는 717.0 pg/ml 증가되었으며 이 물질은 그람음성균체의 세포벽을 구성하는 주요한 성분으로서 인체내에서는 주로 대식세포를 자극하여 TNF를 비롯한 각종 염증 매개 물질을 유리한다고 알려져 있다<sup>4)</sup>. 대황 (*Rheum palmatum* L.)과 빈랑 (*Areca catechu* L.)은 이용 부위는 주로 뿌리 부분과 열매로 옛부터 한약제로 사용되었으며 주성분으로서 emodin류, chrysophanic acid 등으로 대조군

Table 1. Reaction mixtures of reverse transcription and polymerase chain reaction

#### a) RT master mix

Component	Volume	Final concentration
MgCl <sub>2</sub> solution	4 $\mu$ l	5mM
10X PCR buffer II	2 $\mu$ l	1X
Sterile D.W.	1 $\mu$ l	
dNTP	8 $\mu$ l	1 mM each dNTP
RNase inhibitor	1 $\mu$ l	1 mM
Reverse transcriptase	1 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>16</sub>	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
Positive control RNA or sample RNA	2 $\mu$ l	10 <sup>4</sup> copies or < 1 $\mu$ g total RNA
Total volume	20 $\mu$ l	

#### b) PCR master mix

Component	Volume	Final concentration
MgCl <sub>2</sub> solution	4 $\mu$ l	2mM
10X PCR buffer II	8 $\mu$ l	1X
Sterile D.W.	65.5 $\mu$ l	
Taq polymerase	0.5 $\mu$ l	2.5 U/100 $\mu$ l
5' primer	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
3' primer	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Total volume	80 $\mu$ l	

Table 2. Primer sequences used for detection of cytokine gene expression

	Oligonucleotide sequence
$\beta$ -actin	(5') 5' -ATGGA TGATG ATATC GCCGC G-3' (3') 5' -CTAGA AGCAT TTGCG GTGGA CGATG GAGGG GCC-3'
IL-1 $\alpha$	(5') 5' -GTCTC TGAAT CAGAA ATCCT TCTAT C-3' (3') 5' -CATGT CAAAT TTCAC TGCTT CATCC-3'
IL-1 $\beta$	(5') 5' -ATGGC AGAAG TACCT AAGCT CGC-3' (3') 5' -ACACA AATTG CATGG TGAAG TCACT T-3'
IL-6	(5') 5' -ATGAA CTCCT TCTCC ACAAG CGC-3' (3') 5' -GAAGA GCCCT CAGGC TGGAC TG-3'
TNF	(5') 5' -ATGAG CACTG AAAGC ATGAT CCGG-3' (3') 5' -GCAAT GATCC CAAAG TAGAC CTGCC C-3'

과 다른 생약제에 비해서 TNF의 유리정도가 각각 465.-2, 426.6pg/ml로 높게 증가되었다. 목과 (*Chaenomeles japonica* L.)에는 amygdalin과 tannin이 함유되어 있으며 474.0pg/ml로 나타났다. 가자 (*Terminalia chebula* R.)와 산수유 (*Cornus officinalis* S.)는 각각 328.3pg/ml, 396.0pg/ml로 증가 되었으며 사용부위가 다같이 열매이고 shikimic acid 유도체 및 유기산들을 가지고 있다. 지유 (*Sanguisorba officinalis* L.)는 302.7pg/ml 증가되었으며, 현재 한약계에서는 지혈과 지사제로 사용되고 있고, glycosides, emodine, anthraquinone, catechins 등이 함유되어 있다고 한다<sup>4)</sup>.

정향 (*Eugenia caryophiata* T.)은 227.0pg/ml으로 약간의 증가를 보였으며, 마황 (*Ephedra sinica* S.)은 272.9pg/ml 이었고 사용부위는 나무줄기로서 ephedrine이 이 생약제에서 유래하였다. 소목 (*Caesalpinia sappan* L.)은 대조군과 비슷한 수준이었으며 사용부위는 목심으로서 항균성과 항바이러스성이 있다고 조사되어 있다<sup>4)</sup>.

생약제가 neopterin유리에 미치는 영향

Neopterin은 guanosine triphosphate (GTP)로 부터 유래되는 pyrazinopyrimidine유도체로 biopterin 생합성 과정에서 만들어지는 중간 산물이다. Neopterin은 T세포에서 유리된 INF-gamma의 작용으로 단핵구와 대식세포에서 생합성 되어 특이적으로 분비된다. 따라

서 neopterin의 증가는 T세포와 대식세포의 활성화를 나타낸다<sup>7)</sup>. 사용한 생약제들이 neopterin유리에 미치는 영향은 Fig. 2에서 나타내었다. 사용한 생약제중에서 복분자가 14.3nmole/L로 neopterin유리정도가 가장 높았으며 지유와 정향에서 각각 12.5, 11.6으로 lipopolysaccharide의 11.0에 비해서 약간 높게 나타났다. 그리고 가자와 빈랑에서 각각 6.2, 6.9 정도로 유리되었으며, 대황은 5.3, 마황은 5.5, 소목은 4.5, 목과는 4.3 정도 유리되었으며, 산수유가 3.7로서 사용한 생약제 중에서는 가장 낮게 나타났다.

RT-PCR을 이용한 cytokines의 mRNA측정

Cytokine의 측정은 주로 bioassay법이나 ELISA법을 이용하여 왔으나 이것은 병소부에 극히 소량으로 합성되며 그 반감기가 매우 짧기 때문에 이들 방법은 그 특이도나 민감도에서 어려움이 있다. 그러므로 cytokine의 mRNA 수준에서의 측정법이 많이 시도되고 있다. 지금까지 mRNA 측정에 이용된 Northern blot이나 RNA dot blot법 등은 비교적 많은 세포를 필요로 할뿐 아니라 그 실험과정이 복잡하고 까다로운 점 등이 문제점으로 지적되고 있다. 최근에 polymerase chain reaction을 이용하여 mRNA를 측정하는 RT-PCR법이 소개되고 있다<sup>8-11)</sup>. RT-PCR법은 세포에서 분리한 total RNA를 reverse transcription 과정을 통하여 cDNA로 만들고, cDNA를 다시 측정하고자 하는 cytokine에 특이적인 primer를 이

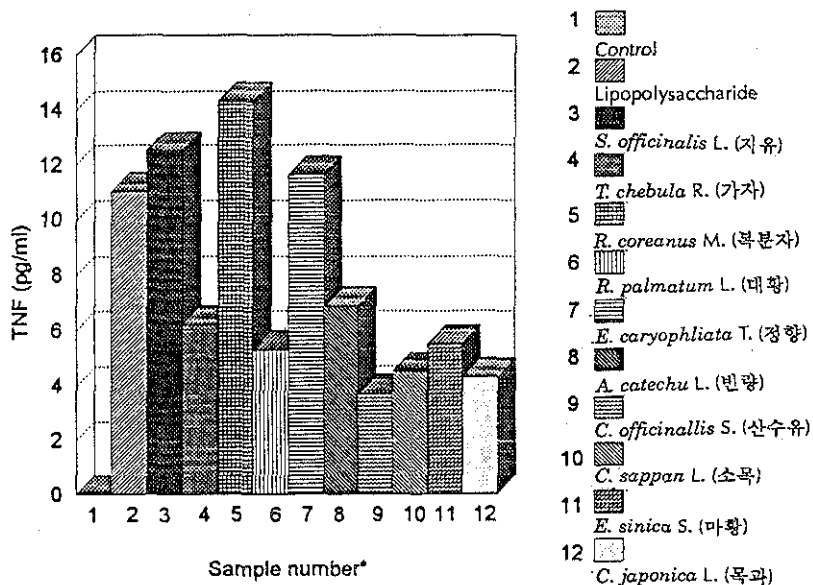


Fig. 1. In vitro production of tumor necrosis factor (TNF) in whole blood culture by aqueous extracts of edible and medicinal plants.

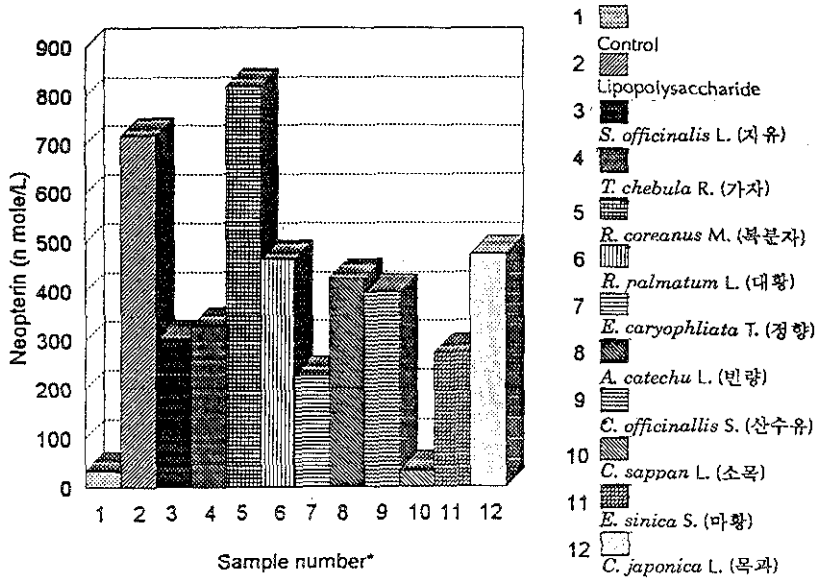


Fig. 2. *In vitro* production of neopterin in whole blood culture by aqueous extracts of edible and medicinal plants.

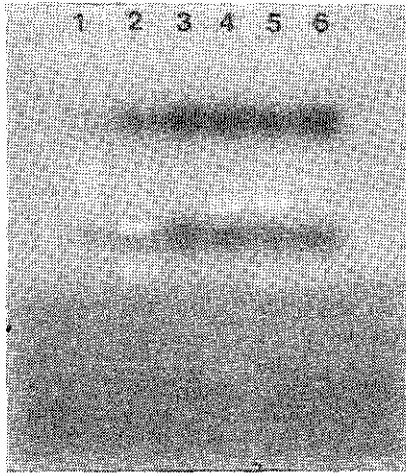


Fig. 3. PCR assisted mRNA amplification from *Rubus coreanus M.* stimulated peripheral blood mononuclear cells. Primers used in lane 2-6 are IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF,  $\beta$ -actin, respectively and lane 1 shows molecular weight markers (from Shimane Medical School, pHY digested by Hind III).

용하여 증폭시킨 후 전기영동으로 그 증폭생성물을 확인한다. 이 때 증폭생성물의 양은 처음 mRNA의 양에 비례하므로 양적인 비교가 가능하다. RT-PCR법을 이용한 mRNA정량법은 극히 소량의 시료에서 신속하고 간편하게 그리고 동시에 여러 종류의 유전자 발현을 알아볼 수 있는 등의 장점을 가지므로 면역계에 작용하는

약제의 활성을 분자 생물학적 차원에서 밝혀 내는데 아주 유용하다.

먼저 대식세포의 TNF 및 neopterin-유리에 미치는 영향을 조사한 결과에서 복분자가 가장 높은 것으로 나타났다. 그래서, 복분자로 자극된 말초단핵구에서 RNA를 분리하여 M-MLV (molony murine leukemia virus) reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Human  $\beta$ -actin 유전자 합성을 control로 삼아 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 등의 cytokine specific primer를 이용하였다. IL-1은 대부분의 유핵세포가 손상을 받으면 유리되지만 염증시에는 대식세포에서 주로 유리된다. IL-1은 T세포와 호중구를 활성화시켜 각종 colony stimulating factor (CSF)의 생성을 유도하고 뇌에 작용하여 발열을 유발한다. IL-6은 interferon-beta 2, B cell stimulatory factor type2 (BSF-2), hepatocyte stimulating factor로 알려져 있으며, 간장에서의 acute phase protein의 합성을 유도하고 조직 손상에 대한 발열반응을 초래한다. 그밖에도 B세포에서의 면역 글로불린 유리를 촉진시키고 thymocyte와 T세포의 분화에 관여한다. IL-6은 활성화된 대식세포 뿐아니라 섬유아세포, 내피세포 등에서도 유리가 된다.

본 실험에서는 4 종류의 primer를 사용하여 PCR법으로 증폭시킨 후 그 생성물을 전기영동 확인하였다 (Fig. 3). 복분자의 경우 TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 합성을 mRNA 수준에서 조사한 결과 사용한 cytokine중에서 IL-

1 $\alpha$ , IL-6 그리고 TNF 등에서 유전자의 발현 즉, mRNA의 합성이 현저히 증가되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 조사된 10종의 생약제 모두가 정도의 차이는 있지만 대식세포를 자극하여 TNF와 neopterin을 유리함은 흥미 있는 결과라 하겠다. 또한 복분자 처리에서는 TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-6의 경우 mRNA의 합성이 증가됨을 보여주었다. 이들 생약제가 대식세포를 활성화시키는 기전은 아직 알려져 있지 않으나 생약제에 함유된 lectin 성분이 대식세포를 비특이적으로 활성화시키는 것으로 생각된다.

요 약

여러가지 생약제들의 면역세포 활성화능을 알아보기 위해 말초혈액 세포에서 생약제 자극에 의한 tumor necrosis factor (TNF)와 neopterin 등의 cytokines 유리정도를 ELISA와 radioimmunoassay법으로 각각 측정하였다. 시판되는 생약제 중에서 대황(大黃, *Rheum palmatum* L.), 지유(地榆, *Sanguisorba officinalis* L.), 복분자(覆盆子, *Rubus coreanus* M.), 가자(柯子, *Terminalia chebula* R.), 빈랑(檳榔, *Areca catechu* L.), 정향(丁香, *Eugenia caryophyllata* T.), 마황(麻黃, *Ephedra sinica* S.), 소목(蘇木, *Caesalpinia sappan* L.), 목과(木瓜, *Chaenomeles japonica* L.), 산수유(山茱萸, *Cornus officinalis* S.) 등 10종을 사용하였다. 배양액의 상층층에 유리된 TNF의 양을 측정할 결과 약제를 첨가하지 않은 대조군에서는 검출되지 않았으며, lipopolysaccharide (LPS) 1g/ml 첨가한 경우는 716.7 pg/ml, 그리고 생약제 투여 경우는 각각 대황 465.2, 지유 302.7, 복분자 818.2, 가자 328.3, 빈랑 426.6, 정향 227.0, 마황 272.0, 소목 30.1, 목과 474.0, 산수유 396.0pg/ml이었다. Neopterin치는 대조군에서는 검출범위 이하였고, LPS투여 경우는 11.0nmole/L, 그리고 생약제투여의 경우는 각각 대황 5.3, 지유 12.5, 복분자 14.3, 가자 6.2, 빈랑 6.9, 정향 11.6, 마황 5.5, 소목 4.5, 목과 4.3, 산수유 3.7nmole/L였다. 생약제의 이러한 cytokines 유리증가를 mRNA level에서 알아볼 목적으로 복분자 투여 후 5시간 배양 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행한 결과에서도 복분자에 의해 TNF, IL-1 $\alpha$ , 그리고 IL-6의 transcription이 증가되었음을 알 수 있었다.

문 헌

1. Millan, I. and McMichael, J. C. : Glycoproteins of natural origin with an affinity for hepatitis B surface antigen. *Infect. Immunol.*, **21**, 879 (1978)
2. Venkateswaran, P. S., Millman, I. and Blumberg, B. S. : Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses : *In vitro* and *in vivo* studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 274 (1987)
3. DeForge, L. E., Kenney, J. S., Jones, M. L., Warren, J. S. and Remick, D. G. : Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS) stimulated human whole blood. *J. Immunol.*, **148**, 2133 (1992)
4. 육창수, 안덕균 : 현대본초학. 교문사, 서울 (1972)
5. Chomczynski, P. and Sacch, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156 (1987)
6. Aggarwal, B. B., Bohr, W. J. and Hass, P. E. : Human tumor necrosis factor production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2345 (1985)
7. Fuchs, D., Hausen, A. and Reibnegger, G. : Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity : Application in HIV infection. *Immunol. Today*, **9**, 150 (1988)
8. Brenner, C. A., Tam, A. W., Nelson, P. A., Engleman, E. G., Suzuki, N., Fry, K. E. and Larrick, J. W. : Message amplification pheno-typing (mapping) : a technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. *Biotechniques*, **7**, 1096 (1989)
9. Wang, A. M., Doyle, M. V. and Mark, D. F. : Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 9717 (1989)
10. Becker-Andre, M. and Hahbrock, K. : Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9437 (1989)
11. Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J. C. and Kahn, A. : Quantitative estimation of minor RNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 691 (1990)
12. Frye, R. A., Bens, C. C. and Lium, E. : Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogenes*, **4**, 1153 (1989)
13. Bouaboula, M., Legoux, P., Pessegué, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Casella, P. and Shire, D. : Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21830 (1991)

(1993년 12월 27일 접수)