

마우스 대식세포(Raw 264.7)에 대한 한약조성물 KOCO-P1의 세포활성 연구

박완수^{##}

경원대학교 한의과대학 병리학교실

Study on Biological Effect of Multi-Herbal Drug KOCO-P1 on Mouse Macrophage Raw 264.7 Cells

Wansu Park^{##}

Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to investigate the biological Effect of multi-herbal drug 'KOCO-P1' on mouse macrophage Raw 264.7 cells.

Methods : Multi-herbal drug 'KOCO-P1' was composed of Ginseng Radix, Astragali Radix, Polygonati Rhizoma, Liriopsis Tuber, and Scrophulariae Radix. Cytotoxicity and cytoprotective activity of KOCO-P1 was verified by MTT assay. And antioxidative effect of KOCO-P1 against EtOH, Nicotine was inspected by Hydroperoxide assay.

Results : KOCO-P1 showed no cytotoxicity on RAW 264.7 cells for 24, 48, 72 hours. KOCO-P1 at 200, 100, and 50 ug/mL reduced the production of H₂O₂ in Raw 264.7 cells by EtOH. KOCO-P1 at 50 ug/mL reduced the production of H₂O₂ in Raw 264.7 cells by Nicotine.

Conclusions : KOCO-P1 could be supposed to have antioxidative effect on macrophage with no cytotoxicity

Key words : Macrophage, Immuno activity, Multi-Herbal Durg, Cytotoxicity, Antioxidative Effect

서 론

대식세포(大食細胞; macrophage)는 인체 면역계의 중요한 역할을 담당하고 있는 대표적인 세포이며 탐식세포(貪食細胞)라고도 한다. 인체의 면역기능을 담당하는 세포로서 체내의 모든 조직에 분포하며 세

균(bacteria), 바이러스(virus) 등의 외부로부터 침입하는 병원체뿐만 아니라 인체 내의 정상세포들이 노화된 상태, 또는 암세포 등을 포식하고 소화하는 대형의 아메바성 식세포를 총칭하는 것이다. 골수의 혈구생성과정(hematopoiesis)에서 단핵전구세포(promonocyte)가 생성되어 혈액으로 들어간 뒤 성숙된 단핵구로 분

^{##} 제1저자, 교신저자 : 박완수, 경기도 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학 병리학교실

· Tel : 031-750-8821 · E-mail : hang198@naver.com

· 접수 : 2008년 5월 19일 · 수정 : 2008년 6월 12일 · 채택 : 2008년 6월 20일

화하여 약 8시간의 성장을 거치고 나서 조직으로 이동하여 특정한 조직의 대식세포가 되거나 혹은 수지상세포(dendritic cell)로 더욱 분화하게 된다. 대식세포가 위치하게 되는 인체 조직에 따라 상이한 기능을 나타내기 때문에 명칭도 달라지며 폐에 위치할 때는 '폐포대식세포(alveolar macrophage)', 결합조직에서는 '조직구(histocyte)', 간에서는 '쿠퍼세포(kupffer cell)', 신장에서는 '혈관간세포(mesangial cell)', 뇌에서는 '미세교세포(microglial cell)', 뼈에서는 '파골세포(osteoclast)' 등으로 분류되고 있다. 활성화된 대식세포는 잠재적 병원체를 제거하는 데 비활성되어 있을 때보다 더 효율적으로 활동하는데 대표적인 기능이 식세포작용(phagocytosis)과 면역매개물질들(inflammatory mediators)의 분비, T-세포의 활성화이다. 이외에도 활성화된 대식세포에 의해서 분비되는 세포독성 유발 단백질들은 암세포, 바이러스에 감염된 세포, 세포내 세균 등을 제거하는 역할을 한다. 또한 이러한 인체면역기능을 수행함에 있어 대식세포는 'Class II MHC 물질'을 대량으로 분비함으로써 T-헬퍼 림프구와 상호활성화를 이루기도 한다¹⁻¹¹⁾.

인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 대식세포는 독성약물이나 음주, 흡연 등에 의하여 독성이 유발되어 증식이 억제되는 것으로 알려져 있으며 이러한 대식세포에 유발되는 세포독성은 세포내 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS) 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 세포내 ROS의 생성억제가 대식세포에 유발되는 세포독성을 완화하는 기전으로 이해되고 있다.

대식세포와 관련된 한약재의 면역활성에 대한 많은 연구가 보고되어 있다¹²⁻¹³⁾. 면역기능 조절능을 가진 한약조성물 개발을 위하여 인삼(人蔘), 황기(黃芪), 황정(黃精), 맥문동(麥門冬), 현삼(玄參) 등 면역세포 생리활성과 관련성이 있는 것으로 알려져 있는 5가지의 약재들로 한약조성물 KOCO-P1을 제조한 후 마우스 대식세포에 대한 세포독성 유발여부와 독성물질(니코틴, 에탄올)에 의해서 유발되는 세포독성과 세포내 활성산소종의 증가를 억제하는 효과에 대하여 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 Tetrazolium salt

3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 Dimethyl Sulfoxide (DMSO), dihydrorhodamine 123 (DHR), Gallic acid (GA), Ethanol, Nicotine 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO₂ incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 인삼(人蔘; root of *Panax ginseng*; Ginseng Radix), 황기(단너삼; 黃芪; root of *Astragalus membranaceus*; Astragali Radix), 황정(충충둥글레; 黃精; root of *Polygonatum sibiricum*; Polygonati Rhizoma), 맥문동(麥門冬; root of *Liriope platyphylla*; Liriope Tuber), 현삼(玄參; root of *Scrophularia buergeriana*; Scrophulariae Radix)이며 모두 한국산을 사용하였다. 검정된 약재들은 경원대학교 한의과대학 본초학교실과 병리학교실에 나누어서 보관되었다.

3) 시료의 제조

위의 한약재로 구성된 시료 90g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출액을 filter paper로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 시료로 사용하였다.

2. 방법

1) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 mouse macrophage (Raw 264.7 cell line)이며 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당

1 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) 세포독성 검사(Cytotoxicity assay)

준비된 시료가 Raw 264. 7 cells에 나타내는 세포 독성 유발 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL을 각 well에 처리하고 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 20µl씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl 처리하고 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

Cell viability(%) = 100 × AT/ AC, AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.

4) 세포보호능(Cytoprotective effect) 탐색

준비된 시료가 GA, Ethanol, Nicotine에 의해서 유발되는 세포 독성을 방어하는 효과를 알아보기 위하여 Raw 264. 7 cells을 대상으로 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 독성물질 GA(100 µM), Ethanol(100 µM), Nicotine(1 mg/mL) 단독 혹은 시료(50 µg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 배지를 조심스럽게 제거하고 PBS에 녹인 1 mg/mL MTT(Sigma, USA)를 100 µl씩 각 well에 처리하고 알루미늄호일로 차광시킨 후 3시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 200 µl 처리한 뒤 37°C에서

1시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

Cell viability(%) = 100 × AT/ AC, AC- absorbance of control, AT-absorbance of tested extract solution.

5) Hydrogen peroxide (H₂O₂) assay

세포내의 hydrogen peroxide(H₂O₂)는 dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 이용하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 H₂O₂에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 mouse의 대식세포 내에서 대량으로 발생하는 reactive oxygen species (ROS)의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay을 이용하여 측정할 수 있다. 본 실험에서는 Ethanol, Nicotine 등이 유발하는 세포내 H₂O₂ 생성에 대한 시료의 억제 효과를 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 독성물질과 시료를 처리하기 전에 우선 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. Ethanol(100 µM), Nicotine(2 mg/mL) 단독 혹은 시료(200, 100, 50 µg/mL)와 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포내 H₂O₂ 생성은 다음 공식으로 계산되었다.

Intracellular productions of H₂O₂(%) = 100 × AT/ AC, AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준오차(Mean ± S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student *t*-test와 ANOVA test로 분석하여 *P* < 0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 시료의 제조

면역세포 생리활성실험을 위하여 인삼, 황기, 황정,

맥문동, 현삼을 같은 비율로 혼합하여 준비된 한약처방(90 g)을 전탕한 후 동결건조하여 18 g(수율: 20%)의 시료(KOCO-P1)를 얻을 수 있었다.

2. KOCO-P1이 Raw 264.7의 세포생존율에 미치는 영향

KOCO-P1이 포함된(10~200 ug/mL) 배지에 Raw 264.7 cells을 24, 48, 72 h 동안 배양한 결과 특이한 세포생존율 감소는 나타나지 않았다(Fig. 1~3).

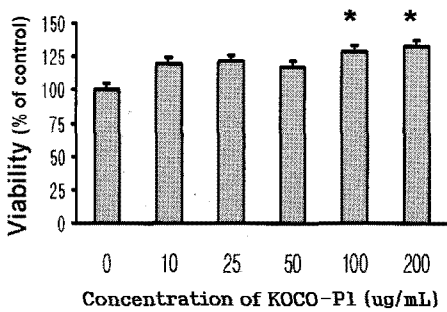


Fig. 1. Effect of KOCO-P1 on viability of Raw 264.7 mouse macrophage cells

Viabilities of cells were determined using MTT assay. Cells were incubated with KOCO-P1 for 24 h. Results are represented as mean ± S.E. * represents P<0.05 compared to the control(0 ug/mL).

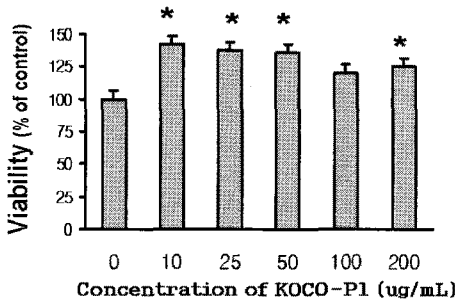


Fig. 2. Effect of KOCO-P1 on viability of Raw 264.7 mouse macrophage cells

Viabilities of cells were determined using MTT assay. Cells were incubated with KOCO-P1 for 48 h. Results are represented as mean ± S.E. * represents P<0.05 compared to the control (0 ug/mL).

3. 독성물질이 Raw 264.7에 유발하는 세포독성에 대한 KOCO-P1의 억제 효과

GA, EtOH, Nicotine이 마우스 대식세포에 유발하

는 세포독성에 대하여 KOCO-P1은 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4).

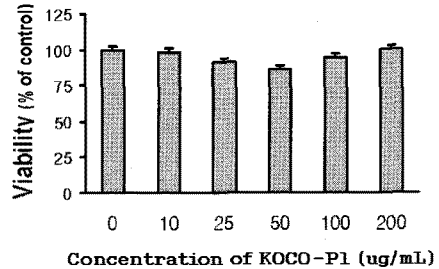


Fig. 3. Effect of KOCO-P1 on viability of Raw 264.7 mouse macrophage cells

Viabilities of cells were determined using MTT assay. Cells were incubated with KOCO-P1 for 72 h. Results are represented as mean ± S.E. * represents P<0.05 compared to the control(0 ug/mL).

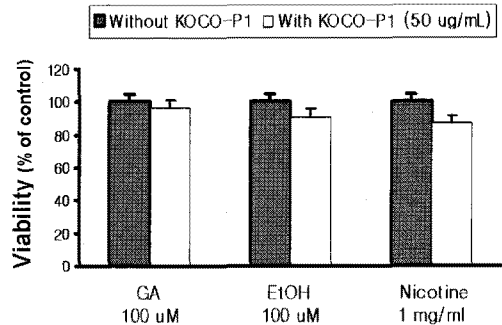


Fig. 4. Effect of KOCO-P1 on viability of Raw 264.7 mouse macrophage cells intoxicated by GA, EtOH, Nicotine

Viabilities of cells were determined using MTT assay. Cells were incubated with each toxicant and KOCO-P1 for 3 h. Results are represented as mean ± S.E.

4. 독성물질이 유발하는 Raw 264.7의 ROS 생성증가에 대한 KOCO-P1의 억제 효과

1) EtOH이 유발하는 Raw 264.7의 ROS 생성증가에 대한 KOCO-P1의 억제 효과

EtOH이 유발하는 Raw 264.7 cells의 ROS 생성증가에 대하여 KOCO-P1(200, 100, 50 ug/mL)이 유의한 억제 효과(P<0.05)를 나타내었다(Fig. 5).

2) Nicotine이 유발하는 Raw 264.7의 ROS 생성증가에 대한 KOCO-P1의 억제 효과

Nicotine이 유발하는 Raw 264.7cells의 ROS 생성

증가에 대하여 KOCO-P1(50ug/mL)이 유의한 억제 효과(P<0.05)를 나타내었다(Fig. 6).

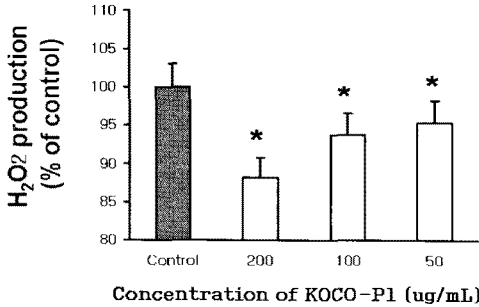


Fig. 5. Effect of KOCO-P1 on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂). H₂O₂ production in Raw 264.7 mouse macrophage cells was measured by dihydrorhodamine 123 assay

Cells were incubated with EtOH (100uM) and KOCO-P1(0, 200, 100, 50ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± S.E. * represents P<0.05 compared to the control (EtOH only).

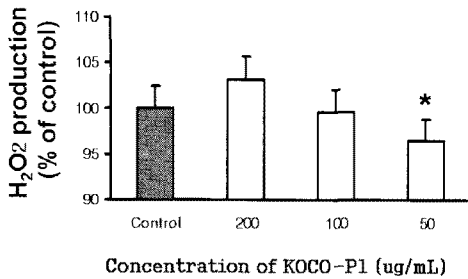


Fig. 6. Effect of KOCO-P1 on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂). H₂O₂ production in Raw 264.7 mouse macrophage cells was measured by dihydrorhodamine 123 assay

Cells were incubated with Nicotine (2mg/mL) and KOCO-P1 (0, 200, 100, 50ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean ± S.E. * represents P<0.05 compared to the control (Nicotine only).

고찰

대식세포와 관련되어 면역매개단백질인 사이토카인(cytokines), 즉 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF-α, IFN-α의 분비를 조절하거나 면역기능과 관련된 mRNA, protein 등의 발현을 조절할 할 수 있는 천연물에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다¹⁴⁻²⁰.

한의학의 중요한 병리기전 중에 '正氣在內 邪不可干, 邪之所湊 其氣必虛'이 있다. 여기서 '正氣, 其氣'는 인체에 침범하거나 발생하는 병적인 요소를 방어하고 제거할 수 있는 인체고유의 '생존능력·항병능

력'을 의미하는 것으로 오늘날 면역학의 대식세포 등 인체면역체계를 담당하는 면역세포의 활동을 포함한다고 할 수 있다. 그러므로 '正氣'를 보존하고 유지하는 방법에는 대식세포 등의 면역세포 활성을 적절히 유지하는 것도 포함될 수 있을 것이다.

인삼(人蔘)은 大補元氣, 固脫生津, 安神하는 효능이 있어 虛勞, 食少, 倦怠, 自汗暴脫, 驚悸, 健忘, 眩暈頭痛, 陽痿, 婦女崩漏, 小兒慢驚, 消渴, 頻尿, 久虛不復, 一切氣血津液不足 등을 치료하며, 황기(黃芪)는 生用하면 益衛固表, 利水消腫하여 自汗, 盜汗, 浮腫, 癰疽不潰 등을 치료하고 炙用하면 補中益氣하여 勞倦, 脾虛泄瀉, 脫肛, 崩帶 등을 치료하며, 황정(黃精)은 補中益氣, 潤心肺, 強筋骨하여 虛損寒熱, 肺癆咳血, 筋骨軟弱 등을 치료하며, 맥문동(麥門冬)은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하여 乾咳, 吐血, 咯血, 肺痿, 肺癰, 煩熱, 消渴, 便秘 등을 치료하며 현삼(玄參)은 滋陰清熱, 解毒滑腸하여 熱病傷陰, 煩渴, 溫毒發斑, 便秘, 骨蒸勞嗽, 目赤, 咽痛, 瘰癧, 白喉, 癰腫瘡毒 등을 치료하는 것으로 알려져 있다²⁰⁻²¹. 이러한 5가지의 한약재를 혼합, 열수추출한 한약조성물 KOCO-P1의 대식세포 관련 생리활성능을 조사하였다.

한약조성물 KOCO-P1의 수율은 20%로서 일반적인 한약재의 열수추출 수율과 크게 다르지 않았다.

KOCO-P1이 포함된(10~200 ug/mL) 배지에 Raw 264.7 cells을 24, 48, 72 h 동안 배양한 결과 특이한 세포생존율 감소는 나타나지 않았으며 이러한 결과로 KOCO-P1이 면역세포에 대하여 세포독성을 가지고 있지는 않음을 알 수 있었다(Fig 1~3).

GA, EtOH, Nicotine이 마우스 대식세포에 유발하는 세포독성에 대하여 KOCO-P1은 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 이러한 결과 GA, EtOH, Nicotine 등이 유발하는 대식세포의 생존율감소를 방어하지는 않음을 알 수 있었다(Fig. 4).

EtOH이 유발하는 Raw 264.7 cells의 ROS 생성증가에 대하여 KOCO-P1이 200, 100, 50 ug/mL의 농도에서 유의한 억제 효과(P<0.05)를 나타내었으며 Nicotine이 유발하는 Raw 264.7 cells의 ROS 생성증가에 대해서는 50ug/mL의 농도에서 유의한 억제 효과(P<0.05)를 나타내어 KOCO-P1이 음주나 흡연과 관련한 대식세포 내의 활성산소종 증가에 대하여 억제하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5, 6). 활성산소종이 증가된 대식세포에 의해 각종의 사이토카인 분비가 증가하며 과도한 사이토카인 분비의 증가는 다양한 병리적 현상들의 기본적 메커니즘으로 이해되고 있기 때문에 대식세포의 활성산소종 증가를

유발하는 과도한 음주와 흡연에 대한 대응물질 중에 KOCO-P1이 포함될 수 있을 것으로 판단된다.

결론

다양한 독성물질들에 의한 대식세포의 활성산소종 증가를 억제할 수 있는 신물질개발을 위해 한약조성물을 제조, mouse macrophage RAW 264.7 cells을 대상으로한 in vitro 실험을 통해 같은 결론을 얻었다.

1. 인삼(人蔘), 황기(黃芪), 황정(黃精), 맥문동(麥門冬), 현삼(玄蔘)을 같은 비율로 구성된 뒤 열추출하여 수율 20%의 한약조성물 KOCO-P1을 얻을 수 있었다.

2. KOCO-P1(10~200 ug/mL)은 Raw 264.7 cells에 대하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

3. EtOH이 유발하는 Raw 264.7 cells의 ROS 생성 증가에 대하여 KOCO-P1이 200, 100, 50ug/mL의 농도에서 유의한 억제 효과($P<0.05$)를 나타내었다.

4. Nicotine이 유발하는 Raw 264.7 cells의 ROS 생성 증가에 대해서는 50ug/mL의 농도에서 유의한 억제 효과($P<0.05$)를 나타내었다.

이상의 결과를 통하여 인삼, 황기, 황정, 맥문동, 현삼으로 구성된 한약조성물 KOCO-P1이 마우스 대식세포에 세포독성을 유발하지 않으면서 EtOH과 Nicotine이 유발하는 대식세포 내 활성산소종 증가를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으며 향후 대식세포 내 활성산소종 증가억제 효과를 규명하기 위하여 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology (5th ed.). New York : W.H.Freeman and Company. 2003 : 38-9.

2. Seo BW, Kim EH, Park SK, Jang MH, Choi SM, Lee EY. Effects of Anemarrhenae Rhizoma on LPS-stimulated Expression of COX-2 and iNOS in mouse BV2 microglial cells. 대한침구학회지. 2005 ; 22(2) : 155-62.

3. Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell

migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP) / macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia. Biomed Res. 2008 ; 29(2) : 77-84.

4. Okamoto H, Hoshi D, Kiire A, Yamanaka H, Kamatani N. Molecular targets of rheumatoid arthritis. Inflamm Allergy Drug Targets. 2008 ; 7(1) : 53-66.

5. Hausmann M, Rogler G. Immune-non immune networks in intestinal inflammation. Curr Drug Targets. 2008 ; 9(5) : 388-94.

6. Hubbard LL, Ballinger MN, Wilke CA, Moore BB. Comparison of conditioning regimens for alveolar macrophage reconstitution and innate immune function post bone marrow transplant. Exp Lung Res. 2008 Jun ; 34(5) : 263-75.

7. Bradley EW, Oursler MJ. Osteoclast culture and resorption assays. Methods Mol Biol. 2008 ; 455 : 19-35.

8. Yuan A, Chen JJ, Yang PC. Pathophysiology of tumor-associated macrophages. Adv Clin Chem. 2008 ; 45 : 199-223.

9. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008 May ; 9(5) : 503-10.

10. Feng R, Desbordes SC, Xie H, Tillo ES, Pixley F, Stanley ER, Graf T. PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ; 105(16) : 6057-62.

11. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys. 2008 ; 473(2) : 132-8.

12. Shen B, Hagiwara M, Yao YY, Chao L, Chao J. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. Hypertension. 2008 ; 51(5) : 1358-65.

13. Jofre-Monseny L, de Pascual-Teresa S, Plonka E, Huebbe P, Boesch-Saadatmandi C, Minihane AM, Rimbach G. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages. Br J Nutr. 2007 ; 97(5) : 864-71.

14. An HJ, Jeong HJ, Um JY, Park YJ, Park RK,

Kim EC, Na HJ, Shin TY, Kim HM, Hong SH. Fructus Ligustrum lucidi inhibits inflammatory mediator release through inhibition of nuclear factor-kappaB in mouse peritoneal macrophages. J Pharm Pharmacol. 2007 ; 59(9) : 1279-85.

15. An HJ, Kwon KB, Cho HI, Seo EA, Ryu DG, Hwang WJ, Yoo SJ, Kim YK, Hong SH, Kim HM. Solanum nigrum produces nitric oxide via nuclear factor-kappaB activation in mouse peritoneal macrophages. Eur J Cancer Prev. 2005 ; 14(4) : 345-50.

16. Jang MH, Jung SB, Lee MH, Kim CJ, Oh YT, Kang I, Kim J, Kim EH. Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. Neurosci Lett. 2005 ; 380(1-2) : 26-31.

17. Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. Atractylodes japonica suppresses

lipopolysaccharide-stimulated expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. Biol Pharm Bull. 2004 ; 27(3) : 324-7.

18. Zhao BS, Huo HR, Ma YY, Liu HB, Li LF, Sui F, Li CH, Guo SY, Jiang TL. Effects of 3-phenyl-propenal on the expression of toll-like receptors and downstream signaling components on raw264.7 murine macrophages. Am J Chin Med. 2008 ; 36(1) : 159-69.

19. Li H, Wang L, Yang Z, Kitanaka S. Kadsuralignans H-K from Kadsura coccinea and their nitric oxide production inhibitory effects. J Nat Prod. 2007 ; 70(12) : 1999-2002.

20. 전국한의학대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 192, 532, 535, 589, 595.

21. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 422-8.