

Lipopolysaccharide로 활성화된 마우스 대식세포에서 艾葉 물추출물의 면역활성 연구

박완수*

경원대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Water Extract from *Artemisiae Argi Folium* on Mouse Macrophage Stimulated by LPS

Wansu Park*

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

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study is to investigate the effect of Water Extract from *Artemisiae Argi Folium* (WAAF) on mouse macrophage Raw 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS).

Methods : Cell viabilities were measured by MTT assay. And the intracellular productions of hydrogen peroxide (H₂O₂) were measured by dihydrorhodamine 123 assay. TNF- α and IL-6 production from Raw 264.7 were measured by ELISA method.

Results : The results of the experiment are as follows.

1. WAAF significantly increased the cell viability compared to the control group (treated with LPS only) at the concentrations of 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL.
2. WAAF significantly increased the intracellular production of H₂O₂ compared to the control group at the concentrations of 50, 100, 200 ug/mL.
3. WAAF significantly decreased the production of TNF- α compared to the control group at the concentrations of 100, 200 ug/mL.
4. WAAF significantly decreased the production of IL-6 compared to the control group at the concentrations of 50, 100, 200 ug/mL.

Conclusions : WAAF could be supposed to have the immune-modulating activity related with the macrophage's immunoactivity.

Key words : Macrophage, *Artemisiae Argi Folium*, Hydrogen Peroxide, TNF- α , IL-6

* 교신저자 : 박완수, 경기도 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학 병리학교실
· Tel : 031-750-8821 · E-mail : hangl98@naver.com
· 접수 : 2009년 2월 20일 · 수정 : 2009년 3월 15일 · 채택 : 2009년 3월 20일

서론

자가면역질환(自家免疫疾患; autoimmune disease)이란 인체 내의 면역체계가 정상적이면서 건강한 자신의 조직, 기관, 세포 등을 공격하는 질환을 의미하는 것으로, 아직까지 그 원인이나 자세한 기전에 대해서는 완전히 밝혀지지 않았으며 유전적 요소, 환경의 영향, 호르몬 분비이상 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 자가면역질환은 전신성 질환과 기관국한성질환으로 나뉘는데, 전신성 질환이란 자가면역반응의 대상이 되는 항원이 전신의 기관에 존재하는 것이며, 기관국한성 질환이란 체내에 있는 기관 중 어느 하나의 기관에 있는 항원에만 작용하는 면역질환이다. 전신성 자가면역질환에는 전신성 홍반성 낭창, 류마티스성 관절염, 다발성 근염, 피부경화증 등이 있으며, 기관국한성 자가면역질환에는 중증근무력증(myasthenia gravis), 아디손병(addison's disease; 부신피질기능부전병) 등이 있다^{3,4)}. 이러한 질환들은 면역체계이상의 원인을 완전히 알 수 없기 때문에 치료는 주로 염증반응의 억제에 중점을 두고 있다. 항체의 생성을 억제하는 약물들은 감염에 대항하는 인체의 면역기능을 떨어뜨리는 작용도 하기 때문에 주의해야 한다.

류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis; 만성염증성 관절염)은 대표적인 자가면역질환의 하나로서 신체의 결합조직, 특히 관절부위에 염증이 나타나는 질환이지만 전신질환이므로 신체 어느 곳이나 증세가 나타날 수 있고 여러 가지 전신 증상을 동반한다. 초기에는 주로 다발성 관절통, 즉 무릎, 발목, 발가락, 팔꿈치, 손목, 손가락 등의 관절부위에 통증이 나타나며 손가락 마디가 방추형으로 부으면서 통증이 생길 수도 있다. 이러한 증세들은 만성적으로 진행되어 차츰 관절의 변형, 종창, 근육위축 그리고 관절과피 등을 일으키게 된다^{5,6)}.

대식세포(大食細胞; macrophage)는 탐식세포(貪食細胞)라고도 하며 인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 백혈구이다. 대식세포가 외부의 자극 인자에 대응하여 발생하는 다양한 염증유발단백질(종양괴사인자나 cytokine)들이 염증과 관련된 다양한 질환의 발생과 밀접한 관계가 있음이 알려져 있다. 특히 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 경우에도 대식세포의 면역활성반응이 중요한 기전으로 인식되고 있을 뿐만 아니라⁷⁾, 대식세포의 oxidative radical 생성 감소가 류마티스성 관절염 유발을 촉진할 수 있다는 연구

도 보고되고 있다⁸⁾. 또한 종양괴사인자(TNF- α), interleukin (IL)-1, 그리고 interleukin (IL)-6 등의 전염증성인자들은 류마티스성 관절염 형성에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 이러한 전염증성인자들은 활성화된 대식세포로부터 많이 발생되는 것들이다.

Artemisia속에 속하는 식물 중 *Artemisia asiatica*, *Artemisia princeps* 등의 항염작용에 대해서는 이미 많은 연구가 진행되고 있으나, 황해쭈(*Artemisia argyi* Levl. et Vant.)이 대식세포에 미치는 영향에 대한 연구는 많지 않다.

본 연구에서는 온경지혈약(溫經止血藥)으로 분류되면서, 소복냉통(少腹冷痛), 월경부조, 궁랭불임(宮冷不孕), 토혈(吐血), 녹혈(衄血), 붕루경다(崩漏經多) 등을 치료하는 데 사용되는 애엽(*Artemisiae Argi Folium*; dry leaf of *Artemisia argyi* Levl. et Vant.)^{9,10)}의 물추출물이 Lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 마우스 대식세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 Lipopolysaccharide (LPS), Tetrazolium salt 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 Dimethyl Sulfoxide (DMSO), dihydrorhodamine 123(DHR) 등은 Sigma사(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, ELISA kit for TNF- α , IL-6는 Endogen제품을 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Eyela, Tokyo, Japan), freeze dryer(Eyela, Tokyo, Japan), deep freezer(Revco, NC, USA), microplate reader(Bio-Rad, CA, USA) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재 애엽(*Artemisiae Argi Folium*)은 한국 서해안에서 채취하여 검정한 후 사용하였으며, 검정된 약재들은 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

한국의 서해안에서 뿌리만 제거된 상태로 채취된 황해쑥(*Artemisia argyi* Levl. et Vant.)을 그늘에서 건조한 후, 잎부분 50 g을 따로 수집하여 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 이용, 건조하여 6 g(수득률 12%)의 애엽 물추출물(Water Extract of *Artemisiae Argi Folium*; WAAF)을 얻어 시료로 사용하였다.

2) Cell line

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

3) 세포 배양

Raw 264.7 cell은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin (100 ug/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 flask당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하고 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.

4) MTT assay

준비된 시료가 LPS에 의해서 유발되는 세포 생존율 감소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Mosmann 등¹¹⁻¹⁴⁾의 방법을 응용하여 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 uL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. LPS(2 ug/mL) 단독 혹은

은 배지에 녹인 시료(10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)와 함께 각 well에 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 배양액을 제거하고 배지에 녹인 1 mg/mL MTT (Sigma, MO, USA)를 100 uL씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 uL처리하고 37°C에서 2시간 방치 후, microplate reader (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Hydrogen peroxide(H₂O₂) assay

세포내 hydrogen peroxide (H₂O₂) 생성은 Roesler 등¹⁵⁻¹⁹⁾의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123 (DHR) assay를 실시하여 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 대식세포내에서 대량으로 발생하는 hydrogen peroxide의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay를 이용하여 측정할 수 있다. 본 실험에서는 LPS에 의해 유발하는 세포내 H₂O₂ 생성감소에 대한 시료의 영향을 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 uL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 시료를 처리하기 전에 우선 DHR (10 uM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. LPS (2 ug/mL) 단독 혹은 배지에 녹인 시료(50, 100, 200 ug/mL)와 함께 각 well에 처리하고 각각 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 microplate reader (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) TNF-α와 IL-6 생성에 대한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 시행

LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells의 TNF-α와 IL-6 생성과 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 다음과 같이 실험을 시행한다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 uL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을

phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. LPS (2 ug/mL) 단독 혹은 배지에 녹인 시료(50, 100, 200 ug/mL)와 함께 각 well에 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 채취하여 ELISA 법을 이용, 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 TNF- α 와 IL-6 생성에 대한 시료의 영향을 비교하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student t-test와 ANOVA test로 분석하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. WAAF가 LPS로 유발된 Raw 264.7 세포의 세포생존율에 미치는 영향

LPS(2 ug/mL)와 함께 WAAF(10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 세포생존율 감소를 10 ug/mL 이상의 농도에서 각각 122.83, 141.86, 181.83, 228.46, 325.53%로 유의($p < 0.05$)하게 증가시켰다(Fig. 1).

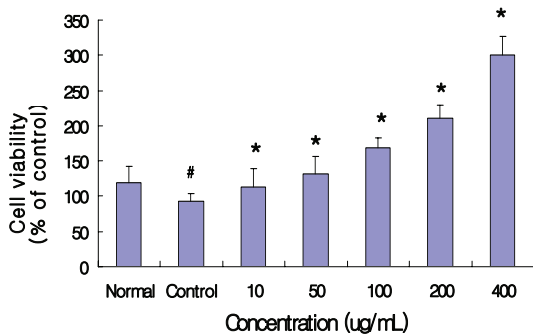


Fig. 1. Effect of WAAF on viability of Raw 264.7 mouse macrophage cells

Cell viability was determined using MTT assay and represented as the percent of control group. Cells were incubated with WAAF (10, 50, 100, 200, 400 ug/mL) and LPS (2 ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean \pm S.D. of five replications. Normal : Not treated with LPS. Control : Treated with LPS only. # : represents $p < 0.05$ compared to the normal. * : represents $p < 0.05$ compared to the control.

2. WAAF가 LPS로 유발된 Raw 264.7의 세포내 H₂O₂ 생성에 미치는 영향

LPS(2 ug/mL)와 함께 WAAF(50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포내 H₂O₂ 생성감소를 각각 229.0, 245.5, 277.9%로 유의($p < 0.05$)하게 증가시켰다(Fig. 2).

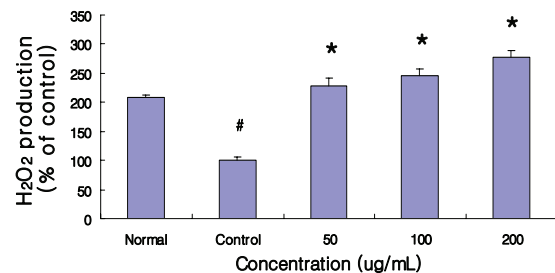


Fig. 2. Effect of WAAF on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂)

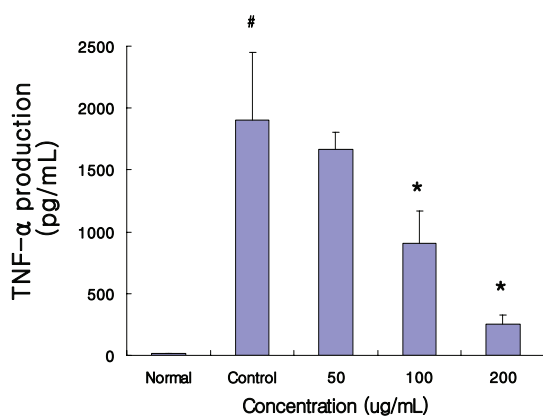
H₂O₂ production in Raw 264.7 mouse macrophage cells was measured by dihydrorhodamine 123 assay and represented as the percent of control group. Cells were incubated with WAAF (50, 100, 200 ug/mL) and LPS (2 ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean \pm S.D. of five replications. Normal : Not treated with LPS. Control : Treated with LPS only. # : represents $p < 0.05$ compared to the normal. * : represents $p < 0.05$ compared to the control.

3. WAAF가 LPS로 유발된 Raw 264.7의 TNF- α 생성에 미치는 영향

LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 TNF- α 의 생성 증가를 100, 200 ug/mL의 농도에서 유의($p < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 3).

4. WAAF가 LPS로 유발된 Raw 264.7의 IL-6 생성에 미치는 영향

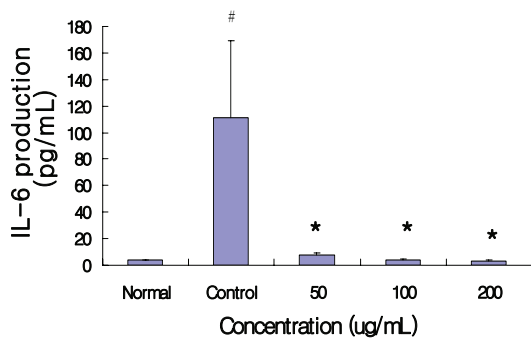
LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양



WAAF (ug/mL)	0	0	50	100	200
LPS (ug/mL)	0	2	2	2	2
mean	14.9	1900	1664	902.8	257.1
Std. Dev	3.75	548.7	143.3	269.4	69.9

Fig. 3. Effect of WAAF on the cellular production of TNF- α

TNF- α production from Raw 264.7 mouse macrophage cells (1×10^4 cells) was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with WAAF (50, 100, 200 ug/mL) and LPS (2 ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean \pm S.D. of five replications. Normal : Not treated with LPS. Control : Treated with LPS only. # : represents $p < 0.05$ compared to the normal. * : represents $p < 0.05$ compared to the control.



WAAF (ug/mL)	0	0	50	100	200
LPS (ug/mL)	0	2	2	2	2
mean	3.5	111.1	7.6	3.8	3.3
Std. Dev	0.58	57.77	1.89	0.96	0.65

Fig. 4. Effect of WAAF on the cellular production of IL-6
IL-6 production from Raw 264.7 mouse macrophage cells (1×10^4 cells) was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cells were incubated with WAAF (50, 100, 200 ug/mL) and LPS (2 ug/mL) for 3 h. Results are represented as mean \pm S.D. of five replications. Normal : Not treated with LPS. Control : Treated with LPS only. # : represents $p < 0.05$ compared to the normal. * : represents $p < 0.05$ compared to the control.

한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 IL-6의 생성증가를 50 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의($p < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4).

고찰

온경지혈약(溫經止血藥)에 속하는 애엽(*Artemisia Argi Folium*)은 국화과의 다년생 초본 황해쭉(*Artemisia argyi* L.)의 잎을 여름에 꽃이 피지 않았을 때 채취하여 햇볕에서 말린 후 사용하는 것이다. 溫有小毒하고 辛苦之味를 갖고 있다. 肝, 脾, 腎 三經으로 歸經하며 散寒止痛, 溫經止血하는 효능이 있어서 少腹冷痛, 月經不調, 宮冷不孕, 吐血, 衄血, 崩漏經多, 妊娠性 下血 등을 치료한다⁹⁾. 주요한 성분으로는 휘발성 정유가 약 0.2-0.5% 함유되어 있는데, cineole가 약 50%, limonene, α -thujone, α -pinene, \square -pinene, α -terpineneol 등으로 구성되며, 진해거담평천(鎮咳祛痰平喘), 항혈액응고, 면역증강, 항균 등의 작용¹⁰⁾이 알려져 있다.

대식세포가 분비하는 cytokine들 중 특히 TNF- α 와 IL-6 생성 증가는 다양한 염증질환의 발생과 밀접한 관련이 있고, 자가면역질환과 관련해서는 최근 대식세포 내의 hydrogen peroxide 생성감소가 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 증상악화와 관련 있다는 연구들^{8,20-22)}이 보고되어 있다.

황해쭉과 같은 *Artemisia*속에 속하는 *Artemisia princeps*로부터 분리된 jaceosidin²³⁾, yomogin²⁴⁾ 등은 대식세포와 관련된 항염효능이 있는 것으로 보고된 바 있으나, 대식세포의 TNF- α , IL-6 생성에 대한 황해쭉 물추출물의 영향 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 인체 면역체계에 있어 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 면역활성과 관련하여 LPS로 마우스 대식세포의 생존을 감소, 세포 내 hydrogen peroxide 생성 억제, 염증유발 cytokine인 TNF- α 와 IL-6 생성 증가를 유발하고, 이에 대한 艾葉 물추출물(WAAF)의 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

LPS(2 ug/mL)와 함께 WAAF(10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양한 결과, LPS로 인한 세포생존을 감소를 10 ug/mL 이상의 농도에서 각각 122.83, 141.86, 181.83, 228.46, 325.53%로 유의($p < 0.05$)하게 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 50 ug/mL 이상의 농도에서는 normal군에 비해서도 더 증가하는 것으로 나타나 WAAF가 대식세포 자체의 생존율을 증가시키는

것으로 해석될 수 있으며, 이러한 생존율 증가는 대식세포의 감소와 관련된 면역력 약화 증상에 애엽이 응용될 수 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다(Fig. 1).

LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포 내 H₂O₂ 생성감소를 각각 229.0, 245.5, 277.9%로 유의($p < 0.05$)하게 증가시켰다(Fig. 2). 이 결과는 WAAF가 대식세포의 hydrogen peroxide 생성감소와 연계되는 류마티스성 관절염 등의 자가면역질환 증상개선의 가능성이 있음을 의미한다. 더욱이 H₂O₂와 같은 radical은 대식세포가 병원체를 포식하는 작용에 있어서 필수적인 요소이므로, WAAF가 대식세포의 H₂O₂의 생성을 증가시킴으로써 식균작용을 강화시킨다고 할 수 있다.

LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3 h 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 TNF- α 의 생성증가를 100, 200 ug/mL의 농도에서 유의($p < 0.05$)하게 감소시켰으며(Fig. 3), LPS(2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3 h 동안 배양한 결과에서는 LPS에 의해 유발된 세포의 IL-6의 생성증가를 50 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의($p < 0.05$)하게 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이로부터 WAAF가 대식세포의 염증유발 cytokine들의 생성을 억제함으로써 염증억제제로서의 가능성이 있음을 알 수 있다.

이상과 같은 실험결과로 WAAF가 대식세포의 활성산소종 감소로 인한 류마티스성 관절염 증상악화를 완화함과 염증매개단백질 생성억제를 통한 염증억제의 효능이 있음을 알 수 있었으며, 면역질환치료제로서의 개발을 위해 앞으로 보다 정밀한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서 LPS로 유발되는 마우스 대식세포의 생존율감소, hydrogen peroxide 생성억제, TNF- α 와 IL-6의 생성증가에 대한 애엽(艾葉) 물추출물 WAAF가 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행한 결과 다음을 알 수 있었다.

1. WAAF는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 생존율감소를 50 ug/mL의 농도(3 h 배양)에서 모

두 유의($p < 0.05$)하게 증가시켰다.

2. WAAF는 LPS에 의해 유발된 세포내 H₂O₂ 생성 감소를 3시간의 배양에서는 50, 100, 200 ug/mL의 농도에서 각각 229.0, 245.5, 277.9%로 유의($p < 0.05$)하게 증가시켰다.
3. LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3 h 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 TNF- α 의 생성증가를 100, 200 ug/mL의 농도에서 유의($p < 0.05$)하게 감소시켰다.
4. LPS (2 ug/mL)와 함께 WAAF (50, 100, 200 ug/mL)가 포함된 배지에 Raw 264.7 cells을 3 h 동안 배양한 결과에서는 LPS에 의해 유발된 세포의 IL-6의 생성증가를 50 ug/mL 이상의 농도에서 모두 유의($p < 0.05$)하게 감소시키는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과를 WAAF가 대식세포와 관련된 자가면역질환, 과잉염증질환의 증상개선제로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 면역질환치료제로서의 개발을 위하여 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2009년도 경원대학교 지원에 의한 결과임

참고문헌

1. Ryan JG, Kastner DL. Fevers, genes, and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008 ; 321 : 169-84.
2. Bennett MK, Kirk CJ. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2008 ; 11 : 616-25.
3. Li L, Yi Z, Tisch R, Wang B. Immunotherapy of type 1 diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008 ; 56 : 227-36.
4. Farasat S, Aksentjevich I, Toro JR. Autoinflammatory diseases: clinical and genetic advances. *Arch Dermatol.* 2008 ; 144 : 392-402.
5. Danila MI, Hughes LB, Bridges SL. Pharmacogenetics of etanercept in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.*

- 2008 ; 9 : 1011-15.
6. Boyer JF, Cantagrel A, Constantin A. Impact of traditional therapies and biologics on cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008 ; 6 : 218-27.
 7. Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, Folco E, Iwasaka ML, Feinberg MW, Aikawa M, Libby P. Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF- κ B1 and attenuates macrophage activation. *J Biol Chem*. 2008 ; 283 : 9692-703.
 8. Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest*. 2007 ; 117 : 3020-8.
 9. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 405-7.
 10. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 309-311.
 11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 ; 65 : 55-63.
 12. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J Immunol Methods*. 1990 ; 131 : 165-72.
 13. Oez S, Platzer E, Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut*. 1990 ; 60 : 97-102.
 14. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986 ; 94 : 57-63.
 15. Roesler J, Hecht M, Freiherst J, Lohmann-Matthes ML, Emmendorffer A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr*. 1991 ; 150 : 161-5.
 16. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997 ; 1 : 145-57.
 17. van Pelt LJ, van Zwieten R, Weening RS, Roos D, Verhoeven AJ, Bolscher BG. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods*. 1996 ; 191 : 187-96.
 18. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, Fleisher TA. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 ; 111 : 374-9.
 19. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods*. 1998 ; 219 : 187-93.
 20. 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 : 1999-2002.
 21. Hultqvist M, Bäcklund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol*. 2007 ; 179 : 1431-7.
 22. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström BT, Tordsson J, Holmdahl R. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 ; 101 : 12646-51.
 23. Kim MJ, Han JM, Jin YY, Baek NI, Bang MH, Chung HG, Choi MS, Lee KT, Sok DE, Jeong TS. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Jaceosidin from *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *Arch Pharm Res*. 2008 ; 31 : 429-37.
 24. Ryu SY, Oak MH, Kim KM. Yomogin inhibits the degranulation of mast cells and the production of the nitric oxide in activated RAW 264.7 cells. *Planta Med*. 2000 ; 66 : 171-3.