

EtOH 등으로 유발된 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 효모균발효애엽 추출물의 영향

박완수*

경원대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of *Sacchromyces cerevisiae*-Fermented *Artemisiae Argi* Folium on Hydrogen Peroxide Production of Macrophage Treated with Toxicants

Wan Su Park*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

The effect of *Sacchromyces cerevisiae*-Fermented *Artemisiae Argi* Folium Water extract (AFS) on hydrogen peroxide production within mouse macrophage Raw 264.7 Cells treated with EtOH, gallic acid, Nicotine, Acetaminophen, and Acetaldehyde was investigated through this study. AFS (0~400 ug/mL) was simultaneously treated with EtOH, gallic acid, Nicotine, Acetaminophen, and Acetaldehyde. And the intracellular productions of hydrogen peroxide were measured by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. AFS restored the intracellular productions of hydrogen peroxide reduced by EtOH, gallic acid, Nicotine, Acetaminophen within Raw 264.7 Cells. AFS could be supposed to have the immunological activity concerned with macrophage's oxidative burst.

Key words : macrophage, *sacchromyces cerevisiae*, *artemisiae argi* folium, fermentation, hydrogen peroxide

서 론

황해쑥(*Artemisia argyi* L.)을 기원식물로 하는 애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 국화과에 속한 다년생 초본이다. 여름에 아직 꽃이 피지 않았을 때 잎을 채취하여 햇볕에 말린 후 사용된다. 약성(藥性)은 따뜻하나(溫) 독이 약간 있고(小毒) 맵고 쓴 맛(辛苦)을 가진 것으로 알려져 있으며, 경락을 따뜻하게 하고 출혈을 멈추며(溫經止血), 추운 기운을 없애고 통증을 멈추게(散寒止痛)하는 효능이 있어서 아랫배가 차가우며 아픈 것(少腹冷痛), 여성의 생리불순, 자궁이 냉하여 임신이 잘 안되는 경우(宮冷不孕), 월경혈이 지나치게 많은 경우(崩漏經多), 임신으로 인한 하혈(下血) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 또한 뜸치료의 기본 재료이며, 피부가려움증 치료를 위한 외용제의 원료가 되기도 한다¹⁾. 최근 한약의 안전성을 확보하고 효능의 증대를 위하여 한약재 발효에 대한 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 쑥의 발효

에 대한 연구 또한 보고되고 있다³⁾.

마크로파지(macrophage; 大食細胞)는 인체면역체계의 핵심 역할을 담당하는 세포로서 탐식세포(phagocyte)에 속하기도 한다. 외부로부터 인체에 침입하는 다양한 병원체(세균, 바이러스, 원충 등)를 제거할 뿐만 아니라, 체내에서 발생하는 암세포, 혹은 노화하여 자멸하는 인체세포의 잔유물 등을 포식하고 소화하는 기능도 담당하고 있다⁴⁾.

최근의 발표에 의하면, 대식세포의 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성·배출이 류마티스 관절염 발생을 억제하는 등 자가면역질환의 발병을 억제하는 데 중요한 역할을 하고 있다⁵⁾. 즉 대식세포에서 분출되는 ROS가 T cell 등의 과도한 림프구 활성화를 막을 수 있다는 것이다. 이것은 산화적 스트레스(oxidative stress)가 염증반응을 촉발한다는 기존의 이론과 상반되기는 하지만 류마티스성 관절염과 같은 난치성 자가면역질환의 치료법 개발과 관련하여 새로운 방향을 제시하는 것이다.

본 연구에서는 애엽을 효모균의 일종인 *Sacchromyces cerevisiae*로 발효시켜 얻은 시료(AFS)가 EtOH, Gallic acid(GA), Nicotine, Acetaminophen(AAP), Acetaldehyde(AC) 등에 의해서

* 교신저자 : 박완수, 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2009/04/24 · 수정 : 2009/05/11 · 채택 : 2009/06/02

유발되는 마우스 대식세포 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성저하에 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 Gallic acid, dihydrorhodamine 123 (DHR) 등은 Sigma사(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 동결건조기(Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), 초저온냉동고(Revco, USA), microplate reader (Bio-Rad, USA) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재 애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 한국 서해안에서 채취, 검정한 후 사용하였으며 검정된 약재(No. 2008-01-0016)는 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

(1) 애엽 추출물 제조

艾葉 50 g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출이 끝난 뒤 추출액을 여과용지(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 뒤 발효할 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 6 g을 얻었으며 수율은 12%였다.

(2) 효모균발효애엽 추출물(AFS) 제조

위에서 만들어진 艾葉 물추출물을 이용하여 효모균발효 애엽추출물(AFS)을 다음과 같이 제조하였다.

① 조효소 조제 : 조효소제인 3 g α -herbzyme (한국효소, 한국)에 증류수 100 mL 을 가하고 37°C에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

② 열수출하여 건조한 艾葉 추출물(3.0 g, pH:5.44)을 screw cap tube에 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL을 첨가하여 37°C에서 2시간 효소반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

④ *Sacchromyces cerevisiae* STV89를 위 ③의 추출물에 4%씩 접종하여 37°C에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 측정된 pH는 5.42였다.

⑥ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리한 후 동결건조하여 효모균발효 애엽추출물(AFS) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

2) Cell line

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

3) 세포 배양

Raw 264.7 cells은 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 세포배양기에서 37°C, 5% CO₂의 조건하에 배양되었다. Cells이 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식되면, 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 75 cm² flask 당 3 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 계대배양하였다.

4) Dihydrorhodamine 123 (DHR) assay

Cell 내의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성은 Roesler 등⁶⁻¹⁰의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123 (DHR) assay를 실시하여 측정하였다. 즉, DHR은 비형광물질이지만 cell 내에서 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 oxidative reaction을 일으키는 물질들로 인해 macrophage 내에서 대량으로 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay를 이용하여 측정할 수 있는 것이다. 본 실험에서는 EtOH, GA, Nicotine, AAP, AC 등이 유발하는 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 시료의 영향을 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 각 well 당 100 μ l씩 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 μ M)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 다음으로 배지에 녹인 시료(0, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)와 독성물질들(EtOH, GA, Nicotine, AAP, AC)을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정, 비교하였다.

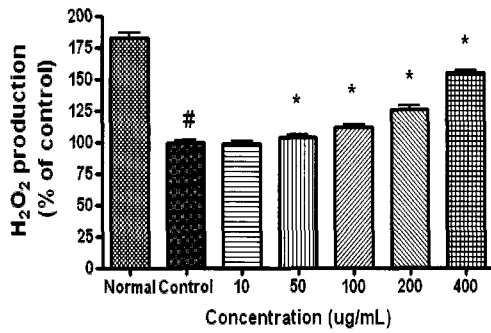
3. 통계처리

실험성적은 평균치 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 나타내었고, 통계적 유의성 검정은 ANOVA test와 Student t-test를 이용하여 P<0.05 수준에서 실시하였다.

결 과

1. EtOH의 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFS 영향

EtOH(100 μ M)로 mouse macrophage Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 50 μ g/mL 이상의 농도에서 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 1).

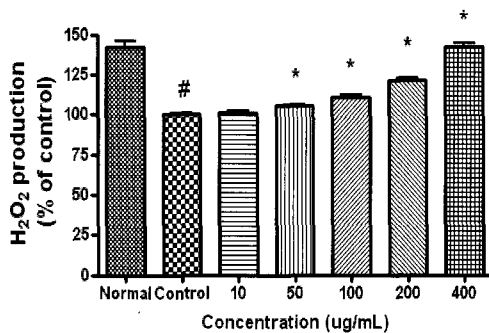


AFS(ug/mL)	0	0	10	50	100	200	400
EtOH(100 uM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	183.04	100	99.02	103.93	111.31	125.74	155.10
SD	3.28	1.48	1.21	1.92	2.26	2.75	2.01

Fig. 1. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of Raw 264.7 cell treated with EtOH (100 uM). Cells were incubated with AFS for 24 hr with EtOH. Results are represented as mean ± S.D. AFS : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with EtOH. Control : Treated with EtOH only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

2. Gallic acid(GA)의 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성 억제에 대한 AFS 영향

GA(100 uM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 GA에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 50 µg/mL 이상에서 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 2).



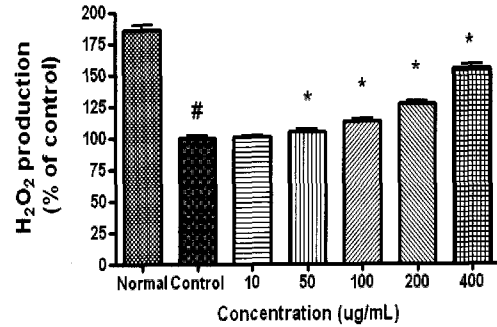
AFS(ug/mL)	0	0	10	50	100	200	400
GA(100uM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	142.61	100	101.15	105.54	110.51	121.59	142.00
SD	3.06	1.21	1.61	0.69	1.68	1.43	2.36

Fig. 2. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of Raw 264.7 cell treated with Gallic acid (GA; 100 uM). Cells were incubated with AFS for 24 hr with GA. Results are represented as mean ± S.D. AFS : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with GA. Control : Treated with GA only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

3. Nicotine의 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFS 영향

Nicotine(1 mM)으로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100,

200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 50 µg/mL 이상에서 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 3).

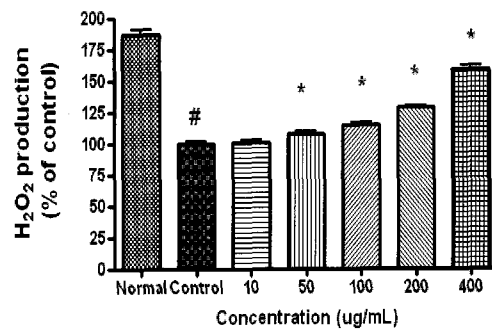


AFS(ug/mL)	0	0	10	50	100	200	400
Nicotine(1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	185.62	100	100.41	104.68	112.74	126.81	154.90
SD	3.98	1.64	1.56	1.54	2.25	1.98	2.53

Fig. 3. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of Raw 264.7 cell treated with Nicotine (1 mM). Cells were incubated with AFS for 24 hr with Nicotine. Results are represented as mean ± S.D. AFS : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with Nicotine. Control : Treated with Nicotine only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

4. AAP의 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFS 영향

AAP(2 mM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 AAP에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 50 µg/mL 이상에서 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 4).

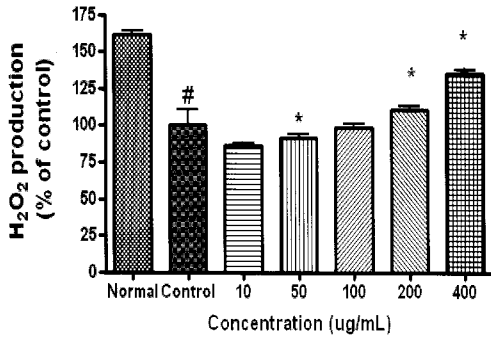


AFS (ug/mL)	0	0	10	50	100	200	400
Acetaminophen (2 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	187.16	100	100.99	107.77	114.55	128.45	158.50
SD	3.53	1.55	1.49	1.95	1.74	1.67	3.02

Fig. 4. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of Raw 264.7 cell treated with Acetaminophen (AAP; 2 mM). Cells were incubated with AFS for 24 hr with AAP. Results are represented as mean ± S.D. AFS : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with AAP. Control : Treated with AAP only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

5. Acetaldehyde(AC)의 Raw 264.7 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFS 영향

AC(200 uM)으로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 AC에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성감소를 10 ug/mL의 농도에서는 더욱 감소시켰으나 200 ug/mL의 농도에서는 유의성 있게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 5).



AFS (ug/mL)	0	0	10	50	100	200	400
Acetaldehyde (200 uM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	161.9	100	86.53	91.80	98.86	111.26	135.70
SD	2.32	11.09	1.68	2.11	2.02	1.98	2.13

Fig. 5. Effect of AFS on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of Raw 264.7 cell treated with Acetaldehyde(200 uM). Cells were incubated with AFS for 24 hr with Acetaldehyde. Results are represented as mean ± S.D. AFS : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Sacchromyces cerevisiae*. Normal : Not treated with Acetaldehyde. Control : Treated with Acetaldehyde only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

고찰

애엽(艾葉; *Artemisiae Argi* Folium)은 간(肝), 비(脾), 신(腎) 등의 경락으로 귀경(歸經)하며 한사(寒邪)를 제거하고, 통증을 그치게 하며, 경락을 따뜻하게 하여 지혈을 멈추게 하는(溫經止血) 효능이 있어서 소복(少腹)이 차고 아픈 것, 부인의 월경불순, 자궁이 냉하여 임신이 잘 안되는 경우(宮冷不孕), 붕루경다(崩漏經多), 임신으로 인한 하혈(下血), 허한성(虛寒性) 출혈(出血)을 치료하는 것과¹⁾, 진해거담평천(鎮咳祛痰平喘) 작용, 항혈액응고 작용, 면역강화 작용, 항균 작용 등이²⁾ 있는 것으로 알려져 있다. 그 주요한 약리성분으로는 Jaceosidin, scopoletin, Artemininolides B·C·D, Eudesmanolides 등¹¹⁻¹⁶⁾이 보고되어 있다.

최근의 연구들¹⁷⁻¹⁹⁾에서 macrophage의 ROS 생성·배출이 류마티스 관절염 발생을 억제하는 등 자가면역질환의 발병을 조절하는 데 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 그러므로 다양한 독성물질에 의한 대식세포의 활성산소종 생성감소는 자가면역질환의 유발가능성을 오히려 높인다고 할 수 있다. 본 연구에서는 EtOH, GA, Nicotine, AAP, AC 등에 의해서 발생하는 대식세포의 세포내 hydrogen peroxide 생성감소에 대하여 효모균발효 애엽추출물(AFS)이 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

EtOH(100 uM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 또한 GA(100 uM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 GA에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. Nicotine(1 mM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발한 경우에도 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 Nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. AAP(2 mM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과에서도 AAP에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 그러나 AC(200 uM)로 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFS(0, 10, 50, 100, 200, 400 ug/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과에서는 AFS가 10 ug/mL의 농도에서는 더욱 감소시켰으나 200 ug/mL의 농도에서는 유의하게(p<0.05) 회복시켜 저농도와 고농도에서 상반되는 결과를 나타내었다.

이상의 결과를 요약하면 황해쑥(*Artemisia argyi* L.)을 기원으로 하는 애엽(*Artemisiae Argi* Folium)을 효모균(*Sacchromyces cerevisiae* STV89)으로 발효시켜 얻은 물추출물(AFS)이 EtOH, GA, Nicotine, AAP 등의 독성물질에 의해서 유발되는 대식세포 내의 hydrogen peroxide 생성감소를 유의하게 회복시키는 활성을 가지고 있으며 이러한 활성은 AFS가 대식세포의 활성산소종 생성감소로 인해서 유발될 수 있는 자가면역질환의 증상개선에 응용될 수 있음을 의미한다.

결론

효모균발효액 추출물 AFS는 EtOH(100 uM), GA(100 uM), Nicotine(1 mM), AAP(2 mM) 로 유발된 mouse macrophage Raw 264.7 세포 내의 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게 회복, 세포내 활성산소종 생성을 증가시켰으며 AC(200 uM)에 의한 대식세포내의 hydrogen peroxide 생성억제에 대해서는 200 ug/mL의 농도에서 유의한 회복을 나타내었다. 이렇게 다양한 독성물질들에 의한 대식세포 내 활성산소종 생성감소를 AFS가 회복시킨다는 것은 대식세포의 활성산소종 배출로 개선될 수 있는 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 치료에 AFS가 응용될 수 있음을 나타내는 것이다. 그러므로 앞으로 효모균발효액 추출물이 자가면역질환 증상개선에 미치는 영향에 대하여 보다 많은 연구가

필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 "2007년도 경원대학교 신입교수연구과제지원" 사업에 의하여 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 405-407, 1991.
2. 許浚. 東醫學研究所 譯. 東醫寶鑑. 서울, 여강출판사, p 2758, 1994.
3. 한효상, 박완수, 이영종. 艾葉 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구, 대한본초학회지 23(3):103-112, 2008.
4. Ripoll, V.M., Meadows, N.A., Raggatt, L.J., Chang, M.K., Pettit, A.R., Cassady, A.I., Hume, D.A. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene*. 413(1-2):32-41, 2008.
5. Hultqvist, M., Olofsson, P., Holmberg, J., Bäckström, B.T., 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*. 101(34):12646-12651, 2004.
6. Jirapongsananuruk, O., Malech, H.L., Kuhns, D.B., Niemela, J.E., Brown, M.R., Anderson-Cohen, M., Fleisher, T.A. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol*. 111(2):374-379, 2003.
7. Freitas, M., Porto, G., Lima, J.L., Fernandes, E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst in vitro. *Talanta*. 78(4-5):1476-1483, 2009.
8. Avendaño, A., Sales-Pardo, I., Marin, L., Marin, P., Petriz, J. Oxidative burst assessment and neutrophil-platelet complexes in unlysed whole blood. *J Immunol Methods*. 339(2):124-131, 2008.
9. van Pelt, L.J., van Zwieten, R., Weening, R.S., Roos, D., Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods*. 191(2):187-196, 1996.
10. Roesler, J., Hecht, M., Freihorst, J., Lohmann-Matthes, M.L., Emmendorffer, A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr*. 150(3):161-165, 1991.
11. Lv, W., Sheng, X., Chen, T., Xu, Q., Xie, X. Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway. *J Biomed Biotechnol*. 2008: 394802, 2008.
12. Yin, Y., Gong, F.Y., Wu, X.X., Sun, Y., Li, Y.H., Chen, T., Xu, Q. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol*. 120(1):1-6, 2008.
13. Kim, M.J., Han, J.M., Jin, Y.Y., Baek, N.I., Bang, M.H., Chung, H.G., Choi, M.S., Lee, K.T., Sok, D.E., Jeong, T.S. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Jaceosidin from *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *Arch Pharm Res*. 31(4):429-437, 2008.
14. Lee, S.H., Bae, E.A., Park, E.K., Shin, Y.W., Baek, N.I., Han, E.J., Chung, H.G., Kim, D.H. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* in IgE-induced hypersensitivity. *Int Immunopharmacol*. 7(13):1678-1684, 2007.
15. Lee, S.H., Kim, H.K., Seo, J.M., Kang, H.M., Kim, J.H., Son, K.H., Lee, H., Kwon, B.M., Shin, J., Seo, Y. Arteminolides B, C, and D, new inhibitors of farnesyl protein transferase from *Artemisia argyi*. *J Org Chem*. 67(22):7670-7675, 2002.
16. Tan, R., Jia, Z. Eudesmanolides and Other Constituents from *Artemisia argyi*. *Planta Med*. 58(4):370-372, 1992.
17. Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K.S., Mattsson, R., Holmdahl, R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest*. 117(10):3020-3028, 2007.
18. Hultqvist, M., Bäcklund, J., Bauer, K., Gelderman, K.A., Holmdahl, R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol*. 179(3):1431-1437, 2007.
19. Gelderman, K.A., Hultqvist, M., Olsson, L.M., Bauer, K., Pizzolla, A., Olofsson, P., Holmdahl, R. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal*. 9(10):1541-1567, 2007.