

마우스 대식세포를 이용한 일당귀 물추출물의 항염효능 연구

한효상*

중부대학교 보건행정학과

Anti-inflammatory Effect of Angelicae acutilobae Radix Water Extract on LPS-stimulated Mouse Macrophages

Hyo-Sang Han*

Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the effects of Angelicae acutilobae Radix Water Extract (AA) on the production of cytokines in RAW 264.7 cell stimulated with lipopolysaccharide (LPS).

Method : RAW 264.7 cells were cotreated with AA (50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and lipopolysaccharide (LPS; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. After 24 hours treatment, using bead-based multiplex cytokine assay, concentrations of various cytokines such as interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), and macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α were measured.

Result : AA significantly inhibited LPS-induced production of IL-6 and MIP-1 α from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. AA significantly inhibited LPS-induced production of TNF- α from LPS-stimulated RAW 264.7 cells at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. AA significantly inhibited LPS-induced production of G-CSF and GM-CSF in RAW 264.7 cells at the concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusion : These results suggest that AA has anti-inflammatory effect related with its inhibition of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, and MIP-1 α in LPS-induced macrophages.

Key words : Angelica acutilobae Radix, macrophage, lipopolysaccharide, anti-inflammation, cytokine

서론

염증은 국소 부위에 부종, 발적 그리고 통증을 동반한 수분의 축적을 의미한다. 이러한 효과는 국소 모세혈관의 지름을 증가시키고, 혈류 속도의 감소 그리고 혈관벽의 투과성(permeability)을 증가시키는 것에서 온다¹⁾. 따라서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 등과 같은 염증 매개물질을 억제하는 물질을 발견한다면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다^{2,3)}.

한의학에서 많이 사용되고 있는 일당귀 또한 염증질환치료에도 많이 응용되고 있으므로, 대식세포(macrophage)에서 분비되는 염증매개인자들(proinflammatory mediators)에 대한 일당귀의 항염 효과를 충분히 검토할 필요가 있다고 사료된다.

當歸는 『神農本草經』⁴⁾ 中品에 처음 收載된 이후, 일당귀는 중화본초⁵⁾에 동당귀(東當歸)로 補血活血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있어 血虛證, 月經不調, 痛經, 經閉, 產後腹痛, 腸燥便秘를 치료한다고 하였다.

當歸의 기원식물로 대한민국약전⁶⁾에는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai (산형과 Umbelliferae)의 뿌리, 중국약전⁷⁾에는 당귀(當歸) *Angelica sinensis*(Oliv.)Diels의 뿌리, 일본약국방⁸⁾에는 일당귀 *Angelica acutiloba* Kitagawa 또는 북해도당귀 *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino (산형과 Umbelliferae)의 뿌리로 되어 있어 기원식물이 서로 다르다.

日本藥局方の 當歸 기원식물인 일당귀는 정유로서 ligustilide, sedanonic acid, safrole 등이 함유되어 있으며, 지방산으로서 palmitic acid, linolic acid, coumarin 유도체로서 bergaptene,

*교신저자 : 한효상, 충남 금산군 추부면 대학로 201, 중부대학교 보건행정학과
· Tel : 041-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr
· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 26 · 채택 : 2013년 11월 27일

scopoletin 등이 함유되어 있다⁹⁾.

일당귀의 약리작용에 대해서 함 등¹⁰⁾은 일당귀를 에탄올 추출한 디에틸 에테르 분획물들은 간암 세포의 생육을 억제시켜 항암 효과를 보고하였고, 디에틸 에테르 분획물들은 T세포와 B세포의 면역활성을 보고하였으며, 강 등¹¹⁾은 cyclophosphamide에 의하여 유발된 흰쥐의 빈혈에 대하여 백혈구수, 적혈구 용적(hematocrit, Hct)에 대하여 유의한 효과를 보고하였고, 윤 등¹²⁾은 지상부 추출액은 ether, ethyl acetate와 water 분획물에서, 지하부 추출액은 n-hexane, ether, ethyl acetate에서 항균활성을 보고하였다.

본 연구에서는 일당귀의 항염 효과에 대하여 알아보기 위하여 일당귀를 열수추출하여 얻은 시료(Angelicae acutilobae Radix Water Extract; AA)를 대상으로 lipopolysaccharide(LPS)로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7 cells의 IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α 등의 사이토카인(cytokine) 생성증가에 대한 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 일당귀(Angelicae acutilobae Radix; Angelica acutiloba의 뿌리)는 한국 대구의 옴니허브 주식회사로부터 2012년 8월에 구입(No. 2012-0819)하였으며, 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 마우스 복강 대식세포(mouse macrophage line)인 RAW 264.7 cells로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로는 Dulbecco's modied essential medium(DMEM, Sigma, USA), penicillin(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA), FBS(Sigma, USA), Multiplex cytokine assay kit(Panomics, USA) 등이 사용되었다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 deep freezer(Ilshin Lab Co, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(In-Tron biotech., Korea), ice-maker(Vision Scientific Co, Korea), 원심분리기(Hanil, Korea), 세포배양기(NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), Bio-Plex 200(Bio-Rad, USA), 생물현미경(Olympus, Japan), fume hood(Hanil, Korea), 무균작업대(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA) 등이다¹³⁾.

2. 방법

1) 일당귀 열수추출물 제조

일당귀 50 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 mL와 함께 넣은 뒤 탱크이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 23.1 g을 얻었으며, 수율은 46.2 %였다.

2) 세포 배양

RAW 264.7 cells는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL, streptomycin(100 ug/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 세포 배양기에서 배양되었다. RAW 264.7 cells를 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3 일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다¹³⁾. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양 용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 세포 배양기에서 배양하였다¹³⁾.

3) 사이토카인(Cytokine) 분비 측정

사이토카인 분비와 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Politch 등¹⁴⁾을 참조하여 Bio-Plex Cytokine Assay를 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 uL씩 넣고 세포 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어준 뒤 각 well에 LPS 1 ug/mL를 단독 혹은 다양한 농도의 시료와 함께 배지에 담아 처리하고 24 시간 동안 배양하였다¹⁴⁾. 배양이 끝나면 상등액(cell culture supernatant)을 채취하여 filter plate(96 well type)에 미리 준비되어 있던 antibody-conjugated capture beads와 결합시켰다. 결합된 capture beads가 담긴 filter plate의 각 well을 150 uL의 wash buffer로 세척하였다¹⁴⁾. 세척이 끝난 뒤 각 well에 detection antibody를 추가한 후 30 분간 배양하였고, 배양이 끝난 뒤 wash buffer로 3 회 세척하고 각 well에 streptavidin-PE를 분주한 뒤 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 30 분간 진동배양(shaking)하였다. 배양이 끝나면 wash buffer로 3 회 세척한 뒤 각 well에 120 uL의 reading buffer를 분주하고 상온에서 300~500 rpm의 조건으로 5 분간 진동배양(shaking)한 후 Bio-Plex array reader(Bio-Plex 200)을 이용, 측정하고자 하는 사이토카인(cytokine)의 양을 조사, 비교하였다¹⁴⁾. 조사된 사이토카인(cytokine)들은 IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α 이다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 mean ± SD로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Mann-Whitney test로 분석하여 P-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다¹⁴⁾.

결 과

1. IL-6의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AA를 24 시간 동안 RAW 264.7에 처리한 결과 LPS에 의한 IL-6 생성증가(27,194 pg/mL)를 50 ug/mL의 농도(26,305 pg/mL)에서 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

2. TNF-α 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AA를 24 시간 동안 RAW 264.7 cells에 처리한 결과 LPS에 의한 TNF-α 생성증가(6,622 pg/mL)를 100 ug/mL의 농도(6,315 pg/mL)에서 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

3. G-CSF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AA를 24 시간 동안 RAW 264.7에 처리한 결과 LPS에 의한 G-CSF 생성증가(27,595 pg/mL)를 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 26,906 pg/mL, 27,191 pg/mL로 모두 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

4. GM-CSF의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AA를 24 시간 동안 RAW 264.7에 처리한 결과 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가(17,529 pg/mL)를 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 14,340 pg/mL, 15,250 pg/mL로 모두 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

5. MIP-1α의 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 AA를 24 시간 동안 RAW 264.7에 처리한 결과 LPS에 의한 MIP-1α 생성증가(27,114 pg/mL)를 50 ug/mL의 농도에서 26,362 pg/mL로 유의하게 억제하였다(Fig. 1).

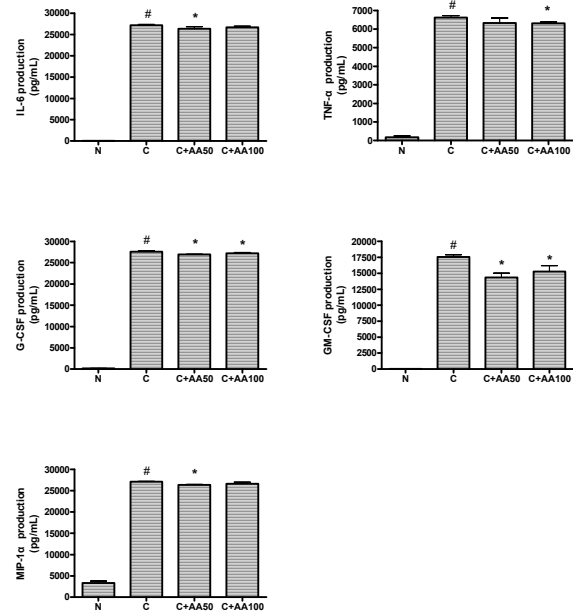


Figure 1. Effects of AA on cytokine production (IL-6, TNF-α, G-CSF, GM-CSF, MIP-1α) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells measured by Multiplex bead-based cytokine assay after 24 hours incubation. Normal group (N) was treated with media only. Control group (C) was treated with LPS (1 ug/mL) only. C+AA50 group was cotreated with LPS and 50 ug/mL of Angelicae acutilobae Radix water extract, C+AA100 group was cotreated with LPS and 100 ug/mL of Angelicae acutilobae Radix water extract. Values are the mean ± SD of more than three independent experiments. # P < 0.05 vs. Normal. * P < 0.05 vs. Control.

고 찰

당귀는 일본약국법⁹⁾에 “일당귀 *Angelica acutiloba* Kitagawa 또는 북해도 당귀 *Angelica acutiloba* Kitagawa var. sugiyamae Hikino(산형과 Umbelliferae)의 뿌리를 보통 열탕에 데친 것” 이라고 수재되어 있다.

일당귀의 정유성분으로는 alpha pinei(31.59%), nonane(24.85%), myrcene(4.81%), camphene(3.70%), gamma terpi(1.26%) 등이 알려져 있다¹⁵⁾. 약리작용으로는 최근에 Hydrocortisone acetate로 유발한 어혈병태모형의 혈액학적 변화에 미치는 효과를 보고하였다¹⁶⁾.

이와 같은 약리작용에 대한 연구를 살펴볼 때 항암, 면역 활성화, 빈혈에 대한 효과, 항균활성 등의 다양한 효능이 있는 것으로 보인다. 그러나 일당귀의 약리중 각각의 질환별 해당 면역매개인자들에 대한 연구는 보고되었으나 일당귀 물추출물을 이용하여 다양한 염증매개인자들에 대한 연구는 부족한 것으로 판단되었다. 이미 Lee 등³⁾은 일당귀의 80% 에탄올 추출물이 염증반응으로 유발된 인간비만세포의 종양괴사인자(tumor necrosis factor), 인터루킨(interleukin)-6, 인터루킨(interleukin)-8의 방출을 억제함에 대해서 보고한 바가 있으나, 대식세포(macrophage)에 대한 항염연구에 대한 보고는 아직까지 많이 이루어지지 않고 있다.

대식세포(macrophage)는 외부로부터 인체에 침입하는 다양한 병원체를 제거할 뿐만 아니라, 체내에서 발생하는 암세포 혹은 노화하여 자멸하는 인체세포의 잔유물 등을 포식하고

소화하는 기능도 담당하고 있다¹⁷⁾.

본 연구에서는 일당귀의 항염 효과를 알아보기 위해, 일당귀를 열수 추출하여 제조한 시료(AA)를 대상으로 LPS로 유발된 RAW 264.7 cells의 IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α 등의 사이토카인(cytokine) 생성 증가를 유발하고, 이에 대한 일당귀 물추출물(AA)의 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 본 연구는 AA가 100 ug/mL의 농도까지 마우스 대식세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않음을 확인하고 다음 실험을 진행하였다.

사이토카인(cytokine)은 현재 약 35종의 인터루킨(interleukin)계, 48종의 케모카인(chemokine)계, 두 그룹으로 나누어지는 인터페론(interferon)계, 집락자극인자(colony stimulating factor)계, 성장인자(growth factor)계 및 종양괴사인자(Tumor necrosis factor, TNF)계 등이 사이토카인(cytokine)이라 불리며 현재까지 200여종 이상의 단백질질이 사이토카인(cytokine)에 속하게 된다¹⁸⁾.

염증 반응을 매개하는 사이토카인(cytokine)으로는 단핵구와 대식세포에서 분비되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등이 대표적이다. IL-6는 단핵구나 대식세포에서 분비되며 림프구를 활성화시켜 항체생산을 증가시키는 것으로, IL-6의 level은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다¹⁹⁾. AA가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 IL-6 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

TNF- α 는 면역 세포들의 집합과 면역 매개 물질들의 생산을 자극하는데 중요한 역할을 담당하여, 인체 내의 미생물들을 포식하는 대식 세포의 능력을 증진시키고 육아종(granuloma)을 형성하는 등, 숙주의 방어 기전에 있어서도 핵심적인 역할을 수행한다²⁰⁾. AA가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 TNF- α 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 TNF- α 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

G-CSF는 내피(endothelium), 대식세포(macrophage)나 많은 면역세포(immune cell)들에서 분비되며, 골수에서 과립구(granulocyte)와 줄기세포(stem cell)을 생산하도록 자극하는 성장인자(growth factor)이자 사이토카인(cytokine)이다. G-CSF-receptor는 골수의 미성숙세포에 존재하며, G-CSF에 의해 자극되면 성숙 과립구로 증식·분화하기 시작하며, 의학적으로 G-CSF는 백혈구 생성을 촉진하여 혈중 조혈모세포의 수를 증가시키고, 암환자의 항암화학요법(chemotherapy) 이후 호중구 감소 증을 회복시키는데 사용한다²¹⁾. AA가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 G-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 G-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

GM-CSF는 백혈구의 성장과 감염부위에 대식세포(macrophage)가 집락화 되도록 자극하는 역할 등을 하는 것으로 알려져 있다^{22,23)}. AA가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 GM-CSF 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50, 100 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 GM-CSF 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

MIP-1 α 는 호중구(neutrophil)의 침윤을 촉진시켜 염증반응을 증가시키는 물질로 발견됐으며, 이후, 조혈줄기세포, 급

성골수성 백혈병 줄기세포, 표피성 각질세포 및 T 림프구 등 여러 종류의 세포들에 대하여 증식을 억제하는 성질이 밝혀지게 되었다²⁴⁾. AA가 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 MIP-1 α 생성증가에 미치는 영향을 비교하기 위해 24시간동안 처리한 결과 50 ug/mL의 농도에서 LPS에 의한 MIP-1 α 생성증가를 유의하게 억제시켰다.

이와 같이 AA가 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 다양한 사이토카인(cytokine) 생성증가를 유의하게 억제함은 AA가 대식세포의 염증매개인자과잉생성으로 인한 각종의 염증성질환악화, 예를 들면 TNF- α 와 IL-6의 생성과잉과 관련된 류마티스성관절염 악화²⁵⁾, MIP-1 α , G-CSF의 증가로 인한 폐렴 및 급성 호흡기질환의 악화²⁶⁾, GM-CSF의 증가로 인한 자궁내막증식증(endometriosis) 유발촉진²⁷⁾ 등을 완화할 수 있는 항염효능이 있는 것으로 해석될 수 있다. 향후 일당귀 물추출물을 이용한 항염치료제 개발을 위하여 분자수준의 기전연구 등 더욱 세심한 연구가 요구되어지는 바이다.

결론

본 연구에서 일당귀를 열수 추출하여 얻은 시료(AA)를 대상으로 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α 등의 사이토카인(cytokine) 생성증가에 대한 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS(1 ug/mL)와 함께 AA(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 IL-6, MIP-1 α 의 생성증가를 50 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.
2. LPS(1 ug/mL)와 함께 AA(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 TNF- α 의 생성증가를 100 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.
3. LPS(1 ug/mL)와 함께 AA(50 and 100 ug/mL)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells를 24 시간 동안 배양한 결과, LPS에 의해 유발된 세포의 G-CSF, GM-CSF의 생성증가를 50, 100 ug/mL의 농도에서 유의하게 억제하였다.

이상의 실험결과는 AA가 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포의 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 성장인자(growth factor) 등의 염증매개물질 생성증가를 유의하게 억제함을 나타내는 것이며, 이는 AA가 염증매개물질의 증가로 인한 창창(腫脹), 통증(痛症) 등을 개선할 수 있는 염증완화제로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 일당귀 물추출물의 항염효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

References

1. Peter Parham, Myeonyeokhak, Seoul : LifeScience, 2006 : 235.

2. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 2004 ; 70(2) : 93-103.
3. Lee K, Sohn Y, Lee MJ, Cho HS, Jang MH, Han NY, Shin KW, Kim SH, Cho IH, Bu Y, Jung HS. Effects of *Angelica acutiloba* on mast cell-mediated allergic reactions in vitro and in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012 ; 34(4) : 571-7.
4. Wu B. *Shennongbencaojing*. Beijing : Renminweishengchubanshe. 1982 : 64.
5. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. *Zhonghuabencao*. Vol. 5. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999 : 874-5.
6. Korea Food and Drug Administration. *The Korean Herbal Pharmacopoeia*. Seoul, Korea Food and Drug Administration. 2012 : 26-7.
7. The Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010*. Beijing : China Medical Science and Technology Press. 2010 : 144.
8. Ministry of Health, labour and Welfare. *Japanese Pharmacopoeia*. Tokyo : Ministry of Health, labour and Welfare. 2006 : 490-5.
9. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH, Hanbangyakhak. Seoul : Shinilbukseu. 2007 : 337-43.
10. Ham MS, Kim SS, Hong JS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Lee HY. Screening and Comparison of Active Substances of *Angelica gigas* Nakai Produced in Kangwon and *Angelica acutiloba* Kitogawa Produced in Japan. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol.* 1996 ; 24(5) : 624-9.
11. Kang SA, Jang KH, Lee JE, Ahn DK, Park SK. Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats. *Korean J Food Sci Technol.* 2003 ; 35(6) : 1204-8.
12. Yun KW, Choi SC. Antimicrobial Activity in 2 *Angelica* Species Extracts. *Korean J Plant Res.* 2004 ; 17(3) : 278-82.
13. Ryu HW, Kim YS, Lim EM. The Antiinflammatory Effects of *Chaenomelis Fructus* Herba Water Extract on Mouse RAW 264.7 Cell. *The J Orient Obstet Gynecol.* 2012 ; 25(3) : 1-15.
14. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod.* 2007 ; 22(11) : 2928-35.
15. Park CH, Juliani HR, Park HW, Yu HS, Simon JE. Comparison of essential oil composition between *Angelica gigas* and *Angelica acutiloba*. *Korean J Plant Res.* 2003 ; 6(3) : 183-7.
16. Song SH, Seo BI, Kim HK, Park JH. The Effects of *Angelicae Gigantis Radix*, *Angelicae Acutilobae Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* Extract on Hydrocortisone Acetate-Induced Model of Blood Stasis. *Kor J Herbology.* 2004 ; 19(1) : 13-21.
17. Ripoll VM, Meadows NA, Raggatt LJ, Chang MK, Pettit AR, Cassady AI, Hume DA. Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene.* 2008 ; 413(1-2) : 32-41.
18. Kim HS. *The Cytokines : An Overview*. Yeungnam Univ J of Med. 2010 : 27(1) : 1-7.
19. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003 ; 37(6) : 355-61.
20. Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 ; 350(21) : 2167-79.
21. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Tamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Ono M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature.* 1986 ; 319(6052) : 415-8.
22. Doyle SE, Gasson JC. Characterization of the role of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit in the activation of JAK2 and STAT5. *Blood.* 1998 ; 92(3) : 867-76.
23. Bartocci A, Pollard JW, Stanley ER. Regulation of colony-stimulating Factor 1 during pregnancy. *J Exp Med.* 1986 ; 164(3) : 956-61.
24. Park JK, Kim JK. Influence of MIP-1 Alpha on the CD4+ Th Lymphocytes. *J Korean Surg Soc.* 2004 ; 66(2) : 81-8.
25. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology.* 2008 ; 47(11) : 1635-40.
26. Mikhak Z, Farsidjani A, Luster AD. Endotoxin augmented antigen-induced Th1 cell trafficking amplifies airway neutrophilic inflammation. *J Immunol.* 2009 ; 182(12) : 7946-56.
27. Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser I. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Human Reproduction.* 2009 ; 24(7) : 1695-1703.