

LPS로 급성 염증을 유발한 동물에 대한 용담초 추출물의 면역조절 효과

이효정^{1#}, 승윤철², 이명선^{1*}

1 : 대전대학교 자연과학대학 뷰티건강관리학과, 2 : 중부대학교 한방건강관리학과

Immune regulation effects of Gentianae Radix extract in LPS-induced acute inflammatory mice

Hyo-Jung Lee^{1#}, Yoon-Cheol Seung², Myung-Sun Lee^{1*}

1 : Department of Beauty and Healthy medicine, Daejeon University

2 : Department of Oriental Health Care, Joongbu University

ABSTRACT

Objective : The immune enhance is the main focus of current society that to increase resistance to invasion by pathogenic species of bacteria in body, stimulate the immune system and possibly protect against cancer or inflammatory disease. The present study aimed to evaluate the effect of Gentianae Radix extract on immune regulation in a LPS-induced mice model of acute inflammation.

Methods : Gentianae Radix extract was administered orally at doses of 200 mg/kg/day or 400 mg/kg/day for 2 weeks before a intraperitoneally injection of LPS (1 mg/kg of 0.9% saline). After LPS-intraperitoneal injection 3 hours, blood was collected by cardiac puncture under ether anaesthesia from all animals, for the immune regulate efficacy verification based on blood or serum biomarkers (i.e., immune cells, cytokine, PGE₂, ROS, and LTB₄) analysis.

Results : Compared to the control mice, the Gentianae Radix extract treatments significantly increased the count of immune cells (i.e., wite blood cell, neutrophils, and monocyte), and significantly reduced the lymphocyte. In addition, the Gentianae Radix extract treatments significantly decreased the pro-inflammatory cytokine (i.e., IL-1 β , IL-6, and TNF- α), and significantly increased IL-10 of anti-inflammatory cytokine. Furthermore, the Gentianae Radix extracts treatments significantly increased the levels of PGE₂ and significantly decreased the levels of ROS, and LTB₄.

Conclusions : The results indicate that Gentianae Radix extract alleviated acute inflammatory reaction though regulation of immune meditor. Thus, Gentianae Radix extract may raw material of development a health food and medicine option for the immune enhance.

Key words : acute inflammation, cytokine, immune, immune cell, LPS-induced

I. 서 론

현대인들은 최근 사회적으로 큰 이슈가 되고 있는 미세먼지와 같은 환경오염과 스트레스, 다양한 감염원에 의해 발생하는 면역기능 저하에 대하여 기본적인 항상성 유지를 위해 면역력과 관련된 식·의약품에 대한 관심이 높아지고 있다.

면역이란 특정한 병원체 또는 독소에 대해 생명체가 강한

저항을 나타내는 상태를 말하는데, 이를 구체화하면 면역기능은 감염성 질병으로부터 숙주를 보호하는 체계이며, 질병 발생과 직간접적으로 관련된 미생물에 대한 방어가 매우 중요하다고 할 수 있다.

일반적으로 면역반응은 방어에 관여하는 요소들이 침입자를 제거하는 방법을 갖추게 되는데, 이는 감염증에서 흔히 볼 수 있는 염증 반응(inflammation)이 대표적이다. 염증 반응은

*Corresponding author : Myung-Sun Lee, Daejeon University, Korea.

· Tel : +82-42-280-2393 · E-mail : leesun1460@hanmail.net

#First author : Hyo-jung Lee, Daejeon University, Korea.

· Tel : +82-42-933-1132 · E-mail : lhjs2s2@hanmail.net

· Received : 9 February 2018 · Revised : 4 March 2018 · Accepted : 15 March 2018

미생물의 산물인 lipopolysaccharide (LPS)나 박테리아 DNA, 바이러스 등의 자극에 의해 대식세포(macrophage)가 활성화되어 생성된 염증 매개 물질인 사이토카인(cytokine)을 생성하고 이들에 의해 활성화된 백혈구와 과립구, 대식세포 등과 같은 면역세포에 의해 이물질을 제거한 후 조직재생을 통해 종료된다¹⁻³⁾. 이와 같은 염증 반응의 결과, 인체에 올바르게 작용하면 미생물을 제거하지만, 종종 세포 또는 조직에 손상을 끼쳐 폐염, 간염, 기관지염 등과 같은 염증성 질환을 유도하는 감염증이 발생하기도 한다. 따라서 인체에서 안전하고 효과적인 염증 반응을 통해 면역력을 증진할 수 있는 천연물의 탐색을 통해 夏枯草⁴⁾, 紅景天⁵⁾, 白屈菜⁶⁾, 沙蔘⁷⁾, 忍冬藤⁸⁾ 등과 같은 단일 약재 등에 대해 실험적인 효능이 입증되었다.

본 연구에 사용된 용담초(龍膽草, *Gentianae Radix*)는 청열약으로 성질이 차고 쓴맛을 지니며 淸熱燥濕, 瀉肝定驚의 효능이 있어, 濕熱의 黃疸, 陰腫陰瘡, 帶下, 濕疹, 고열의 驚厥, 肝火로 인한 脇痛, 頭痛, 目赤, 耳聾 등의 증상을 치료하는 것으로 알려져 있으며, 이뇨작용, 소염작용, 녹농균, 변형균, 티푸스균, 황색포도상구균 및 일부 진균 억제작용 등의 약리작용을 가지고 있다^{9,10)}. 용담초 단일 약재에 관련된 국내 연구로는 최 등¹¹⁾의 약리 활성연구와 김 등¹²⁾의 염증성 매개체 억제 연구가 진행되어 RAW 264.7 세포에서 독성이 나타나지 않고 nitric oxide 및 염증성 사이토카인 생성의 억제를 규명한 바 있다.

이에 본 연구에서는 최 등¹¹⁾과 김 등¹²⁾의 in-vitro 연구를 통해 밝혀진 항염증 효능에 착안하여 2주간의 용담초 추출물 투여를 진행하고 LPS를 체내에 주입함으로써 면역력 증진에 따른 염증 반응에 대한 신속하고 효과적인 제거능을 면역과 관련된 다양한 혈액학적 인자를 통해 확인한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 조제

본 실험에 사용한 중국산 용담초는 대원약업사 (Korea)에서 구매하여, 물 500 ml에 용담초 50 g을 넣어 100℃에서 3시간 동안 추출하였다. 이후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하고 얻은 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 5.8 g (수득률 11.6%)의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

연구에 사용된 시약은 Lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), PBS (Welgene Inc., Korea), Ethyl ether (Samchun, Korea), Microtainer® tube with Dipotassium EDTA (BD Co., U.S.A.), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Mouse reactive oxygen species ELISA kit (MyBioSource, U.S.A.), Prostaglandin E2 ELISA kit (Elabscience, U.S.A.), LTB₄

parameter assay kit (R&D system, U.S.A.) 등을 사용하였으며, 기기는 환류 추출기(Mtops, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (IlShinBio, Korea), deep freezer (Sanyo, Japan), centrifuge (Sigma CO., U.S.A.), Luminex (Millipore, U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

3. 동물 및 사양관리

수컷 5주령의 ICR 마우스는 나라바이오텍 (Korea)사에서 구매하였고, 동물은 실험 당일까지 할란사료(2018S, Hanlan, U.S.A.)와 음수를 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 50~60%, 낮과 밤 주기 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 후 경희대학교 동물실험 윤리위원회 가이드라인 (KHUASP(SE)-17-013)에 따라서 수행되었다.

4. 그룹 배분 및 LPS 주입

2주간의 적응기 이후 자유 식이를 진행하는 정상군 (Normal) 과 증류수만을 투여하는 대조군 (Control), 용담초 추출물을 200, 400 mg/kg/day로 투여하는 실험군 등 총 4개 그룹으로 나누어 매일 오후 2시에 oral zonde를 이용하여 200 μl를 2주간 경구 투여하였다. 2주간의 경구 투여 종료 후 대조군과 실험군은 1 mg/kg 농도의 LPS를 복강 주사를 통해 체내에 주입하고 3시간 후에 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 채혈을 진행하였다.

5. 면역세포 수 측정

심장 천자법을 이용하여 채취한 혈액을 EDTA 튜브에 담아 백혈구 및 백혈구 내 호중구, 대식세포, 림프구 비율 등은 서울의과학연구소 (Korea)에 분석 의뢰하였다.

6. 염증 반응 관련 매개체 측정

심장 천자법을 이용하여 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 통해 염증 반응 관련 매개체인 Cytokine 및 reactive oxygen species: ROS, prostaglandin E2; PGE₂, leukotriene B4; LTB₄ 등을 Luminex 또는 ELISA 기법을 통해 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다.

7. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 평균값±표준 편차 (mean ± S.D.) 로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. 면역세포 수

혈액 내 백혈구 수, 백혈구 내 단핵구 및 호중구, 림프구 비율 등의 면역세포 수를 측정하였다. 백혈구 수와 백혈구 내 호중구

비율은 용담초 추출물을 400 mg/kg/day로 경구 투여한 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Table 1).

백혈구 내 대식세포 및 림프구 비율은 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day으로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가 또는 감소를 보였다(Table 1).

Table 1. Effects of Gentiana Radix extract on levels of immune cells in the blood of LPS-induced acute inflammation mice

immune cells	Groups			
	Normal	Control	Gentiana Radix extract	
			200 mg/kg/day	400 mg/kg/day
WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	1.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	1.3 \pm 0.9	2.3 \pm 0.4**
neutrophil (% of WBC)	29.1 \pm 3.8	28.5 \pm 2.2	28.3 \pm 4.4	40.1 \pm 6.8**
monocyte (% of WBC)	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1 ⁺⁺⁺	0.7 \pm 0.1*	0.8 \pm 0.1*
lymphocyte (% of WBC)	29.8 \pm 1.0	46.3 \pm 2.3 ⁺⁺⁺	36.2 \pm 1.8**	33.8 \pm 3.0**

The results were expressed as mean \pm S.D. from 6 acute inflammation mice. The statistical significance of differences between normal and control groups (++ : $p < 0.01$) or control and experimental groups (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

2. 사이토카인(cytokine) 생성량

혈청 중 염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α 등) 생성량은 대조군에서 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보인 반면, 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로

경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Table 2).

또한, 항염증성 사이토카인 IL-10 생성량은 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day으로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Table 2).

Table 2. Effects of Gentiana Radix extract on levels of cytokine in the serum of LPS-induced acute inflammation mice

immune cells	Groups			
	Normal	Control	Gentiana Radix extract	
			200 mg/kg/day	400 mg/kg/day
IL-1 β (pg/ml)	10.1 \pm 5.7	602.7 \pm 85.8 ⁺⁺⁺	320.8 \pm 16.4 ^{***}	315.9 \pm 23.2 ^{***}
IL-6 (pg/ml)	63.0 \pm 4.4	27708.4 \pm 324.7 ⁺⁺⁺	18916.3 \pm 644.8 ^{***}	10818.3 \pm 448.6 ^{***}
TNF- α (pg/ml)	118.8 \pm 12.5	856.9 \pm 45.1 ⁺⁺⁺	672.1 \pm 61.5 [*]	467.2 \pm 52.5 ^{***}
IL-10 (pg/ml)	31.8 \pm 4.4	124.6 \pm 26.5 ^{##}	297.4 \pm 43.5 ^{**}	348.6 \pm 22.8 ^{***}

The results were expressed as mean \pm S.D. from 6 acute inflammation mice. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and experimental groups (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

3. PGE₂ 생성량

혈청 중 PGE₂ 생성량은 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 1).

4. ROS 생성량

혈청 중 ROS 생성량은 대조군에서 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보인 반면, 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2).

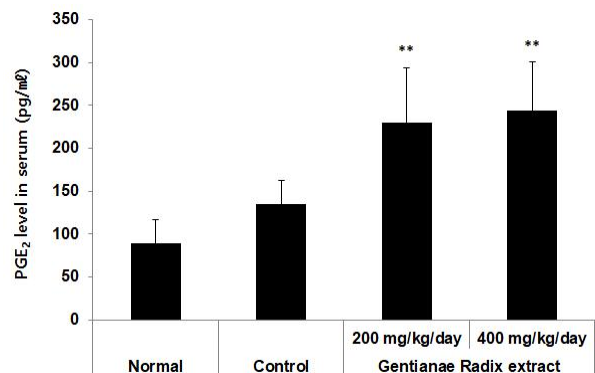


Fig. 1. Effects of Gentiana Radix extract on levels of PGE₂ in the serum of LPS-induced acute inflammation mice.

The results were expressed as mean \pm S.D. from 6 acute inflammation mice. The statistical significance of differences between control and experimental groups (** : $p < 0.01$) based on ANOVA with student's *t*-test determined.

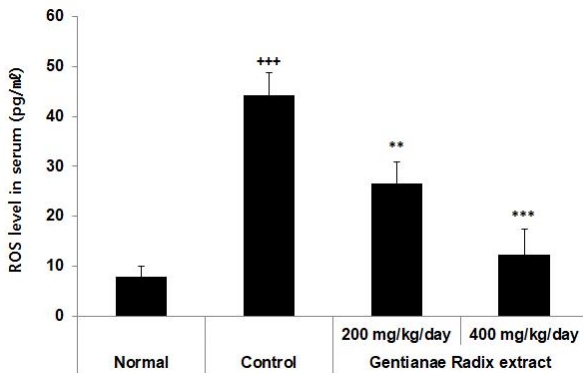


Fig. 2. Effects of Gentiana Radix extract on levels of ROS in the serum of LPS-induced acute inflammation mice. The results were expressed as mean \pm S.D. from 6 acute inflammation mice. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and experimental groups (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) based on ANOVA with student's t-test determined.

5. LTB₄ 생성량

혈청 중 LTB₄ 생성량은 대조군에서 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보인 반면, 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

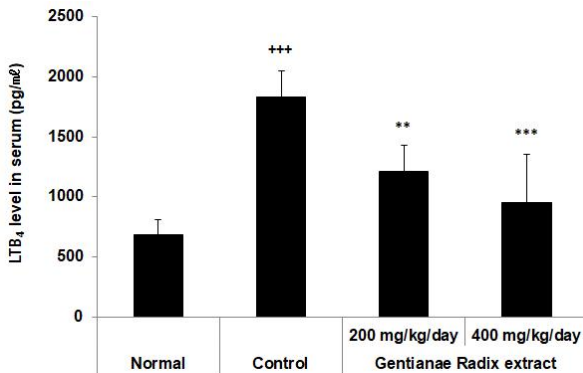


Fig. 3. Effects of Gentiana Radix extract on levels of LTB₄ in the serum of LPS-induced acute inflammation mice. The results were expressed as mean \pm S.D. from 6 acute inflammation mice. The statistical significance of differences between normal and control groups (+++ : $p < 0.001$) or control and experimental groups (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) based on ANOVA with student's t-test determined.

IV. 고 찰

염증 반응은 인체를 보호하기 위해 발열, 통증, 부종과 같은 증상을 통해 생체 조직의 유해한 자극원을 제거하는 대표적인 선천 면역 반응으로 세포 손상 억제와 동시에 괴사된 세포 및 조직 제거를 진행하여 암, 당뇨, 천식 등의 만성 질환으로 발전되는 것을 방어하게 된다¹³⁾. 이와 같은 염증 반응은 미생물에 의한 상처 또는 감염, 수술, 화학물질 등 다양한 원인에 의해 발생하게 되는데, 급성 염증 반응의 특징은 면역세포인 백혈구 이동의 증가이다. 이로 인해 혈관계, 면역계, 조직의 손상이

있는 세포들에 퍼져나가면서 면역반응을 강화시킨다.

백혈구는 인체에서 탐식 작용, 항원 제시, 이상세포 살해 등의 기능을 수행하게 되는데, 백혈구계 인자인 호산구와 대식세포 등은 염증이 일어나는 조직으로 혈관외유출 (extravasation)을 일으켜 살균 및 탐식 기능을 수행하며, 림프구는 급성 염증 반응이 올바르게 제거되지 않으면 대식세포와 함께 만성 염증 단계를 증대하게 된다^{3,14)}. 본 연구에서 용담초 추출물을 400 mg/kg/day로 경구 투여한 실험군에서 대조군에 비해 백혈구와 백혈구 내 호중구 수의 유의성 있는 증가를 보였다. 또한, 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 백혈구 내 대식세포 수의 유의성 있는 증가, 백혈구 내 림프구 수의 유의성 있는 감소를 보였다. 이와 같은 결과는 용담초 추출물의 섭취가 선천 면역을 강화하여 LPS를 체내에 주입하였을 때 염증 반응이 빠르게 효과적으로 나타나 급성 염증 단계에서 면역세포가 빠르고 효과적으로 작용함으로써 만성 단계로 넘어가는 것을 방어하고 있음을 보여주고 있다.

면역세포 중 급성 및 만성 단계에 모두 관여하는 대식세포는 사이토카인 분비를 통해 염증 단계를 정상화 시키는 역할을 하게 된다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 등은 염증 발생에 관여하는 염증성 사이토카인으로 림프구를 활성화하고 염증 반응을 야기시키며, 반대로 IL-10은 염증 억제에 관여하는 항염증성 사이토카인이자 면역조절 사이토카인으로써 B세포의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 본 연구에서 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군에서 대조군에 비해 염증성 사이토카인의 유의성 있는 감소와 항염증성 사이토카인의 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 급성 염증 반응에 대해 용담초 추출물의 투여가 사이토카인 조절에 따른 염증 반응 억제 효능을 보여주고 있으며, 면역세포 결과와 부합되는 기전이 나타나 용담초 추출물이 선천 면역 반응에 따른 만성 염증으로의 전환을 억제하고 있음을 더욱 증명하고 있다.

위와 같은 결과를 더욱 심도 있게 확인하고자 급성 염증 단계에서 만성 염증 단계로 진행될 경우 반응하는 매개체들을 확인하고자 하였다.

만성 염증으로의 전환 시 PGE₂는 발열, 혈관 확장 등 급성 염증 반응의 주된 증상을 주관한다¹⁹⁾. ROS는 계속되는 급성 염증 반응 시 파고리소좀 (phagolysosome)을 통해 식작용으로 이입된 미생물을 제거하며²⁰⁾, LTB₄는 호중구에서 잠재적인 화학주성인자 (chemoattractant)이자 ROS를 형성하고 백혈구의 부착과 활성을 증대시키는 역할을 하게 된다²¹⁾. 본 연구에서 용담초 추출물을 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 대조군에 비해 PGE₂ 생성량의 유의성 있는 감소와 ROS 및 LTB₄ 생성량의 유의성 있는 증가를 보였다. 이와 같은 결과는 PGE₂ 생성이 증가된 결과를 통해 염증 반응의 주된 반응을 바탕으로 침투된 이물질 제거를 신속하게 진행하며, 만성 염증 단계로의 전환을 방어하는 것을 ROS 및 LTB₄ 결과를 통해 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 용담초 추출물은 면역력 증진 효능을 통해 체내에 이물질 침투 시 발열, 혈관 확장, 통증 등의 염증 반응의 증상을 바탕으로 면역세포 및 사이토카인 조절을 통해 만성 염증 단계로의 전환을 효과적으로 낮추는 것이 혈액 바이오마커 검증을 통해 입증되었다. 따라서 용담초 추출물은

선천 면역을 높일 수 있는 식·의약품 소재로 활용될 수 있다고 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 용담초 추출물의 면역 증진 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 2주간 200 mg/kg/day과 400 mg/kg/day 용량을 투여한 후 LPS를 체내에 투입하여 급성 염증을 유발하고 획득한 혈액 바이오마커를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 용담초 추출물을 400 mg/kg/day로 경구 투여한 실험군에서 대조군에 비해 백혈구 수와 백혈구 내 호중구 수의 유의성 있는 증가를 보였으며, 200, 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 백혈구 내 대식세포와 림프구 수의 유의성 있는 증가 또는 감소를 보였다.
2. 용담초 추출물을 200, 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 대조군에 비해 IL-1 β 및 IL-6, TNF- α 생성량의 유의성 있는 감소를 보였으며, IL-10 생성량의 유의성 있는 증가를 보였다.
3. 용담초 추출물을 200, 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 대조군에 비해 PGE2 생성량의 유의성 있는 증가를 보였다.
4. 용담초 추출물을 200, 400 mg/kg/day로 경구 투여한 두 실험군은 대조군에 비해 ROS 및 LTB4 생성량의 유의성 있는 감소를 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 용담초 추출물의 섭취는 급성 염증 시 혈액 내 백혈구 수, 백혈구 내 단핵구 및 호중구 수가 증가함으로써 감염성 질환 및 외부물질에 대한 방어기능을 수행하는 것이 확인되었다. 또한, 용담초 추출물은 염증 반응에 대해 염증과 면역촉진 사이토카인의 길항작용과 더불어 급성 염증에서 만성 염증단계로의 전환을 방지하는 PGE₂의 증가, 백혈구의 부착과 활성을 중재시키고 호중구에서 잠재적인 화학적 물질이자 ROS를 형성하는 LTB₄의 감소 결과는 용담초 추출물이 급성 염증 유발 시 신속하고 효과적인 방어를 할 수 있음을 나타내고 있다. 특히, 용담초 추출물의 농도 의존적인 효능 결과를 바탕으로 최적의 섭취 농도를 확보하는 연구가 보강된다면 선천 면역을 높여 체내 외부물질 침투에 대한 1차적 방어를 효과적으로 할 수 있는 우수한 천연물로 판단된다.

References

1. Byun SH, Yang CH, Kim SC. Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. The Korea Journal of

- Herbology. 2005 ; 20(2) : 7-16
2. Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis. Nature. 2008 ; 457(7225) : 36-7.
3. Choi HJ, Sim BY, Joo IH, Yoo SK, Kim DH. Study of Innate Immunity Suppression of Yeonsan Ogye listed on Dong-eui-bo-gam. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2016 ; 30(4) : 236-41.
4. Seo BI, Kim SH. The effects of Prunellae Spica on immune response and anti-allergic reaction. The Korea Journal of Herbology. 1997 ; 12(1) : 7.
5. Kim JY, Lee YJ. A study on the effects of Rhodiola rosea root on the immune system. The Korea Journal of Herbology. 2008 ; 23(4) : 179-89.
6. Roh SS. The Effects of Chelidonii Herba on the Proliferation of Eosinophils and Activation of Immuno-cells in Asthma-induced Mouse. The Korea Journal of Herbology. 2008 ; 23(2) : 99-109.
7. Shin DH, Seo YB. The Experimental Studies on the Immunomodulatory Effects of Adenophorae Radix. The Korea Journal of Herbology. 2000 ; 15(1) : 31.
8. Lee YC, Kwon TH, Ok IS, Seo CW, Kim YJ, Roh SS, Seo YB. The experimental Studies on the immunomodulatory effects of Lonicerae Caulis et Folium—the effects of Lonicerae Caulis et Folium on cytokines production in mice splenocytes. The Korea Journal of Herbology. 2005 ; 20(4) : 141-9.
9. Boo YM, Kwon DY, Seo BI, Choi HY, Lee JH. Medicinal Herbalogy. Seoul : Younglimsa. 2012 : 227-9.
10. Yun YI, Lee HS, Jung MJ, You SI, Song YS, Kwon DY. Antimicrobial Effects of Ethanol Extract of Yongdamgosam-hwan against Streptococcus mutans. The Korea Journal of Herbology. 2015 ; 30(6) : 55-61.
11. Choi HW, In MH, Mun YJ, Lim KS, Woo WH. Study on Pharmacological Activation as Cosmetic Material of Gentianae scabrae bunge Extract. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2015 ; 29(3) : 223-9.
12. Kim MS, Cho WJ, Hwang SY, Lee JR, Park SJ, Kim SC, Jee SY. Inhibitory effect of Gentianae Radix MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 2008 ; 21(2) : 28-38.
13. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. Clinical & Experimental Immunology. 2007 ; 147(2) : 227-35.
14. Choi SM, Lee KY, Lee HS, Hong JH, Lee MH, Lee

- BC. A case of meningococcal meningitis with complement 9 deficiency. *Korean Journal of Pediatrics*, 2005 ; 48(1) : 101-3.
15. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nature Reviews Immunology*. 2007 ; 7(1) : 52.
 16. Song KK, Park MY, Choi HY, Kim JD. Anticancer and Related Immunomodulatory and Anticachexic Effects of Insamyangyoung-tang Extracts on Non Small Cell Lung Carcinoma, NCI-H520, Xenograft Mice. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2013 ; 27(1) : 63-77.
 17. Park GB, Park YC. Effects of Mahaenggamseok-tang-gagambang on Immune Cells and Cytokines in OVA-Induced Asthmatic Mice. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2009 ; 23(3) : 590-8.
 18. Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999 ; 265(1) : 194-9.
 19. Chandrasoma P, Taylor CR, Wells KE. Concise pathology. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1995 ; 96(5) : 1227.
 20. Hino S, Kito A, Yokoshima R, Sugino R, Oshima K, Morita T, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Matsuda T. Discharge of solubilized and dectin-1-reactive β -glucan from macrophage cells phagocytizing insoluble β -glucan particles: involvement of reactive oxygen species (ROS)-driven degradation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012 ; 421(2) : 329-34.
 21. Crooks SW, Stockley RA, Leukotriene B4. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998 ; 30(2) : 173-8.