

補血 藥材인 당귀, 지황, 백작약, 하수오의 면역 촉진 효과 비교 분석

이금홍¹ · 강신성¹ · 안원근² · 이영선³ · 권영규 · 신상우*

대구한의대학교 한의과대학, 1: 경북대학교 자연과학대학 생물학과, 2: 부산대학교 나노과학기술대학 나노메디컬공학과,
3: 성덕대학 전통건강자원개발과

Comparison of Immune Promotion Effects of Water-extracted *Angelicae gigantis*, *Rehmanniae Radix*, *Paeoniae japonica* and *Polygoni multiflori Radix*

Geum Hong Lee¹, Shin Sung Kang¹, Won Gun An², Young Sun Lee³, Young Kyu Kwon, Sang Woo Shin*

College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1: Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
2: Department of Nanomedical Engineering, College of Nanoscience & Nanotechnology, Pusan National University,
3: Department of Traditional Health Resource Development, College of Sung Duk

Angelica gigantis (AG), *Rehamaninae Radix* (RR), *Paenia japonica* (PJ), and *Polygoni multiflori Radix* (PM) have been used as medicinal plants to tonify the blood. General fuction of the drugs have been known to nourish blood and control the heart and liver meridians. Recently, several studies have proposed mechanisms by which some oriental medicinal herbs work on the immune system. However, it is uncertain whether aqueous-extract of these drugs has immunomodulatory effect yet. In this study, I investigated the immune promotive effects of the water-extracted AG, RR, PJ and PM. The water-extracted AG, RR, PJ and PM inhibited NO production and iNOS expression in LPS stimulated RAW 264.7 macrophage cell line. Among these extracts, AG and PM induced expression of IL-2 and IFN γ in mouse spleen cells. In the flow cytometry analysis, PM-stimulated mouse spleen cells showed an increase in B-cell phenotype (CD45R/B220). The oral administration of *Polygoni multiflori* water-extracts to mice having S-180 abdominal dropsy cancer prolonged life-span more than control mice. These data suggest that among these extracts, PM has cellular and humoral immune-enhancement effect through IL-2 and IFN γ cytokine production, the regulation of NO production in macrophage cells and the B cell production in spleen cells.

Key words : tonify the blood, immune promotion, IL-2, IFN γ , NO, iNOS, CD45R/B220

서 론

免疫이란 생체가自己和非自己를 식별하는 기구이며, 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 비자기인 항원으로 인식하고 특이하게 반응하여 항체를 만들어 이를 배제함으로써 그 개체의 항상성을 유지하는 현상이다^{1,2)}.

이러한 면역의 개념은 한의학에 있어서 질병의 발생 및 발

전은 일정한 조건하에서의 邪正抗爭의 표현³⁾이라고 본 正邪論에서 찾아 볼 수 있다. 正은 正氣를 지칭하며 正氣는 인체의 일체 抗禦力을 통칭하고, 邪는 邪氣로서 邪氣는 인체 내외의 각종 발병인자를 총칭한다³⁾. 그러므로 正氣는 질병발생에 있어서 內의 근거가 되므로 인체의 正氣가 왕성하면 邪氣가 쉽게 침범하지 못하고, 邪氣는 正氣의 허한 틈을 타서 침범하여 비로서 질병이 발생한다. 따라서 正氣虛弱은 질병발생의 근본적 요인이 된다. 전통적으로 한의학에서 사용되는 많은 약제들은 숙주 방어 기능을 증가시키는 자양, 강장의 효과가 있음이 보고되고 있다⁴⁾. 최근에는 正氣를 회복시킴으로서 신체내 면역력을 조절하고 신체 방어기전에 효과적인 한약재를 탐색하는 연구가 활발히 진

* 교신저자 : 신상우, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : swshin@dh.u.ac.kr, · Tel : 053-770-2250

· 접수 : 2006/08/22 · 수정 : 2006/09/25 · 채택 : 2006/11/21

행되고 있다⁵⁻⁹⁾.

正氣를 補益하고 虛弱을 扶持하여 虛를 치료하는 補益藥의 종류는 氣血陰陽의 네 방면으로 나누어 補氣藥, 補陽藥, 補血藥, 補陰藥으로 분류된다¹⁰⁾. 이중 補血藥은 혈액을 보충하여 허증을 달래주는 효능을 가진 약재로서 개별 약재들의 면역조절에 미치는 영향에 관한 보고들이 있으나 보혈약재 간의 면역 촉진 효과 비교에 관한 구체적 연구는 아직 미흡한 실정이다.

補血藥의 대표 약물로는 當歸, 地黃, 白芍藥, 何首烏 등을 들 수 있다. 그 중에서 當歸 (*Angelicae gigantis Radix*)는 산형과 (*Umbelliferae*)에 속한 여러 해 살이 풀로 가을에 뿌리를 채취하여 건조시켜 사용한다. 주요 성분은 ligustilide와 N-butylidene phthalide가 가장 많고 β -pinene, α -pinene, camphene, allo-ocimene, 6-n-butyl-cycloheptadiene-1,4, 2-methyldodecane-5-one, acetophenone, β -bisabolene, isoacoraene, acoradiene, chamigrene, α -cedrene, n-butyl-tetrahydrophthalide, n-butyl-phthalide, p-cymene, β -phillandrene, mycene, β -ocimene-X 등이 함유되어 있으며, 약리 작용으로는 보혈 및 활어 작용, 자궁수축 및 이완 작용, 심혈관계통에 대한 작용, 진통·소염·항균·간기능보호 작용, 항암 작용, 비타민 E 결핍증에 대한 길항 작용, 장관평활근 억제 작용이 있다¹¹⁾. 地黃 (*Rehmanniae Radix*)은 기타 동속식물인 현삼과 (*Scrophulariaceae*)의 뿌리를 사용하는 것으로 주요성분은 catalpol, rehmannin, aucubin, rehmannioside A·B·C·D, leonuride, monomelittoside 및 dihydrocatalpol 등을 함유하고 있으며, 약리 작용으로 항노화 작용, 갑상선기능 항진에 대한 개선 작용이 있다. 白芍藥 (*Paeoniae japonica Radix*)은 작약 (*Paeonia lactiflora Pallas*) 또는 모란과 (*Paeoniaceae*)의 뿌리를 사용하며, 주성분으로 peoniflorine, oxypaeoniflorine, albiflorine, benzoylpeoniflorine, paeonol, triterpenoids, 정유 화합물을 함유하고 있다. 약리 작용으로는 중추신경계 억제 작용, 평활근이완 작용, 혈소판응집 억제 작용, 항염증 작용, 항스트레스효과 및 항경련 효과 등이 보고되고 있으며¹²⁾, 관상동맥과 말초혈관을 확장시키는 작용을 하며 백일해, 천식, 선천성 및 후천성 근강직증, 당뇨병을 치료하는데 적용하고 있다. 何首烏 (*Polygoni multiflori Radix*)는 마디풀과 (*Polygonaceae*)의 덩이 뿌리를 사용하는 것으로 주요 성분은 lecithin과 hydroxyanraquinone 유도체로 chrysofanol, emodin, physcion, questin과 polygonimitin B, C를 함유하고 있다. 약리 작용으로는 조혈 작용, 면역증강 작용, 혈중지질강화 작용, 항노화 작용, 간기능보호 작용, 심근허혈에 대한 보호 작용, 암, 변비, 만성 불면증, 경부 림프절결핵, 간이나 비장이 허약할 때 사용하며, 사람의 임파구 유약화 반응을 촉진하며, 만성기관지염 환자의 치료에 적용하였을 때, 분비형 면역글로불린 A를 현저하게 상승시켰다¹³⁻¹⁶⁾. 이들 약물은 면역조절에 영향을 주는 것으로 보여지나 정확한 작용기전은 밝혀지지 않은 실정이다.

이에 저자는 補血 약재 중 대표약물인 당귀, 지황, 백작약, 하수오의 면역조절 작용을 비교하고자 RAW264.7 세포주의 증식능과 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포의 cytokine 생성, 마우스 비장의 B세포에 미치는 영향 및 S-180 복수암에 의한 마우스 생존율을 확인하기 위한 연구를 수행 하여

유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 검액의 준비

실험에 사용한 補血 藥材는 (Table. 1)과 같다. 실험에 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Oriental Crude Drugs for tonifying the blood(補血)

Oriental Crude Drug	Scientific name
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>
地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>
白芍藥	<i>Paeoniae japonica Radix</i>
何首烏	<i>Polygoni multiflori Radix</i>

상기 약물 40 g씩을 증류수 1200 ml에 첨가하고 2시간 동안 중탕하여 검액 700 ml를 각각 추출하였다. 추출한 검액들은 멸균 거여즈를 이용하여 1차 여과한 다음 3,000 rpm하에서 15분간 원심분리를 실시하여 상층액만을 채취하고 이를 1.2 μ m와 0.45 μ m의 membrane filter (Milipore Co., USA)로 여과하여 사용하였다.

2. 실험동물

무균 환경에서 사육된 6주령의 암컷 ICR 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. ICR 마우스는 독성 약리작용 내분비 영향에 대한 실험 등 각종 연구용으로 이용범위가 넓다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 급여하면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 55±2%를 유지하였다.

3. 면역억제제 준비

Methotrexate (MTX: C₂₀H₁₁N₈O₅, Sigma, U.S.A)를 RPMI 1640 media에 20 mg/ml의 농도로 녹여서 사용하였다.

4. 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 마쇄한 후 4℃ Hanks Balanced Salt Solution (GibcoBRL, NY)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800 rpm에서 30분 원심 분리하여 임파구 층을 수거한 후, RPMI 1640 (GibcoBRL) media로 1회 더 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4% trypan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

5. 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoBRL)에 10% heat-inactivated

fetal bovine serum (GibcoBRL)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (GibcoBRL)을 첨가하여 100 mm dish에 80% 세포의 밀도를 유지하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

6. 비장세포 증식능 분석

마우스 비장세포를 2×10⁵ cells/100 µl 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가하여, 전체 부피가 100 µl가 되게 조정하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 임 파구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다. 48시간 배양한 배양액 100 µl에 시약을 20 µl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

7. Nitrite assay

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess (Sigma) 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% a-naphthylamide in H₂O) 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

8. RT-PCR을 이용한 iNOS 및 사이토카인 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee (TEL-TEST, INC)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% diethyl pyrocarbonate가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 µl를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 µl를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70% DEPC-ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 5× RT buffer 2 µl (10 mM dATP 0.25 µl, 10 mM dGTP 0.25 µl, 10 mM dTTP 0.25 µl, 10 mM dCTP 0.25 µl, MMLV reverse transcriptase (200 U/µl) 0.25 µl, RNase inhibitor (28 U/µl) 0.25 µl, 50 uM oligo dT primer 0.5 µl, DEPC-distilled water 4 µl)를 PCR tube에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 10× PCR buffer 3 µl (25 mM MgCl₂ 1.8 µl, 10 mM dATP 0.3 µl, 10 mM dGTP 0.3 µl, 10 mM dTTP 0.3 µl, 10 mM dCTP 0.3 µl, 50 uM sense 및 antisense primer 0.25 µl, Tag polymerase (5 U/µl, Promega Co.) 0.25 µl)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 µl 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 µl 첨가하

여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94°C에 3분간 1 cycle 반응 후 94°C 45초, 57°C 45초, 72°C 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이 오니아사 (Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequence used for detection of Th1/Th2 type cytokine and iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5' -CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3'
	5' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'
IL-2	5' -GTG CTC CTT GTC AAC AGC GC-3'
	5' -GAG CCT TAT GTG TTG TAA GC-3'
IFNγ	5' -CAT GAA AAT CCT GCA GAG CC-3'
	5' -GGA CAA TCT CTT CCC CAC CC-3'
iNOS	5' -GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3'
	5' -GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'

9. Western blotting을 이용한 iNOS 단백질발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin 10 µg/ml Na₃VO₄, 10 µg/ml Na₅P₂O₇)를 가하여 (100 µl/1×10⁶ cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 µg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 3% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응사이 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham/Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

10. Flow cytometer를 이용한 마우스 비장세포의 세포표현형 분석

각 실험군 비장세포의 B 세포 표현형 변화를 조사하기 위하여 마우스 비장세포에 각각의 항약재를 처리하고 48시간 배양한 후 배양된 비장세포를 수거하여 차가운 wash buffer (HBSS, 2% FBS, 0.1% sodium azid, 1% HEPES buffer)로 세척한 후 1 µl (1 ug/million cells)의 FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal Ab로 염색한 후 4°C에서 30분간 반응 시킨 후 차가운 wash buffer로 2번 세척한 후 flow cytometry (Becton Dickison, FACSCalibur, France)를 이용하여 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

11. 하수오에 대한 S-180 복수암 유발 마우스에서의 생존율 측정
 S-180 종양세포는 한국세포주은행 (KCLB)으로부터 분양 받아 8~12주령된 ICR 마우스의 복강에서 계대 배양하여 사용하였다. 하수오 추출액의 면역증강 효과를 조사하기위해 마우스의 실험군을 하수오 추출액 (2 mg/kg p.o)투여군과 PBS 투여군의 2군으로 나누어 각 군당 8마리씩 배치하였다. 종양세포를 복강투여하기 전 3주간 하수오 추출액을 경구투여한 후 S-180 종양세포를 1×10^6 cells/100 μ l의 농도로 조정하여 복강에 투여하였다. 종양세포 투여 후 하수오 추출액 경구 투여군에는 이들 추출액을 음용수에 3%되게 희석하여 제공하고, 생리식염수 투여군에는 음용수를 제공하면서 복수암 진행에 따른 치사율을 조사하였다.

결 과

1. 補血藥인 당귀, 지황, 백작약, 하수오 열수추출액이 비장세포 증식능에 미치는 영향

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 살펴보았다. 각 약재별 열수추출액을 농도별(10, 100 μ g/ml)로 분리된 마우스 비장세포에 처리하여 관찰하였다. 그 결과 마우스 비장세포의 증식능은 하수오 열수추출액의 경우 10 μ g/ml에서 2.14 ± 0.06 , 100 μ g/ml에서 2.06 ± 0.03 으로 유의성 있게 증가하였고, 당귀 열수추출액은 100 μ g/ml에서 1.87 ± 0.08 의 유의성 있는 증가를 보였다. 반면, 지황과 백작약 추출물은 세포증식능의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

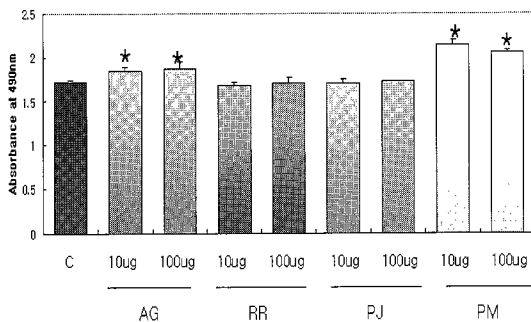


Fig. 1. Effect of various herbal extracts on the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with 10 or 100 μ g/ml extract of *Angelicae gigantis* Radix (AG), *Rehmanniae* Radix (RR), *Paeoniae japonica* Radix (PJ), *Polygoni multiflori* Radix (PM) for 24 hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean \pm S.D. in triplicate cultures. The statistics program used was Turkey. * indicates significant difference ($p < 0.05$).

2. 면역억제제 처리 마우스 비장세포에서 비장세포 증식능에 미치는 영향

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 면역억제제에 의해 저하된 마우스 비장세포 증식능에 대한 영향을 알아보기 위하여, methotrexate (MTX) 면역억제제를 마우스 비장세포 증식능이 50% 억제되는 농도 (100 μ g/ml)에 당귀, 지황, 백작약 및 하수오의 열수추출액과 병용 처리하여 MTX에 의한 세포증식 억

제에 미치는 효과를 살펴보았다. MTX 면역억제제와 병용 처리시 하수오 열수추출액의 경우 10 μ g/ml에서 1.11 ± 0.08 , 100 μ g/ml에서 1.29 ± 0.03 의 세포증식 억제가 현저하게 감소되었으며, 당귀 열수추출액은 100 μ g/ml에서 0.79 ± 0.03 의 세포증식 억제가 감소되었고, 지황과 백작약에서는 변화가 일어나지 않았다(Fig. 2).

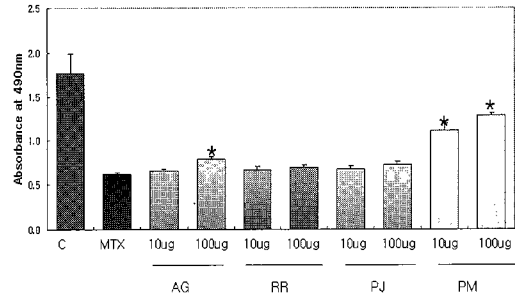


Fig. 2. Effect of various herbal extracts on the cell proliferation in MTX-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/ml) were cultured with 10 or 100 μ g/ml extract of *Angelicae gigantis* Radix (AG), *Rehmanniae* Radix (RR), *Paeoniae japonica* Radix (PJ), *Polygoni multiflori* Radix (PM) for 24 hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as mean \pm S.D. in triplicate cultures. The statistics program used was Turkey. * indicates significant difference ($p < 0.05$).

3. 마우스 비장세포에서 사이토카인 IL-2, IFN γ 생성에 미치는 영향

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 Th1 type 사이토카인에 미치는 효과를 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 분리하여 각 약재를 추출물에 농도에 따른 IL-2, IFN γ 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 대조약물로는 T세포 특이 mitogen인 concanavalinA (Con. A; Sigma, U.S.A)를 사용하였다. 그 결과 하수오의 경우 100 μ g/ml에서 유의성 있게 발현이 증가하였으며 당귀에서는 IL-2, IFN γ 유전자가 약하게 발현되었고, 백작약은 IL-2 유전자만 약하게 발현되었고, 지황에서는 관찰대상 유전자가 모두 발현되지 않았다(Fig. 3).

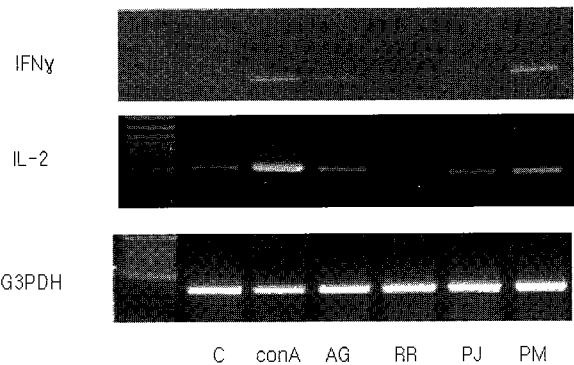


Fig. 3. Effect of various herbal extracts on cytokine gene expression in mouse spleen cells. Mouse spleen cells were incubated with various herbal extract in mouse spleen cells for 24 hr. Total RNA was prepared, and expression of IFN γ and IL-2 cytokine gene were analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control gene. C : control, conA : concanavalinA, *Angelicae gigantis* Radix (AG), *Rehmanniae* Radix (RR), *Paeoniae japonica* Radix (PJ), *Polygoni multiflori* Radix (PM).

4. RAW 264.7 에서 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 RAW 264.7 세포주에서 NO 생성능에 관한 효과를 살펴보기 위하여 RAW 264.7 세포주에 당귀, 지황, 백작약 및 하수오를 100 µg/ml의 용량으로 처리하고 24시간 배양하여 NO 생성능을 조사하였다. 하수오 열수추출액의 경우 대조군에 비해 7.85±0.17의 확인한 NO 생성능이 증가함이 관찰되었고, 당귀에서도 NO 생성능이 1.55±0.09로 유의하게 증가하였다. 반면 지황과 백작약에서는 NO 생성능의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4). NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR 기법을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 큰 쪽으로 증가하였던 하수오, 당귀 열수추출액에서 iNOS 유전자 발현이 관찰되었고, NO 생성능의 변화가 없었던 지황, 백작약 열수추출액에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

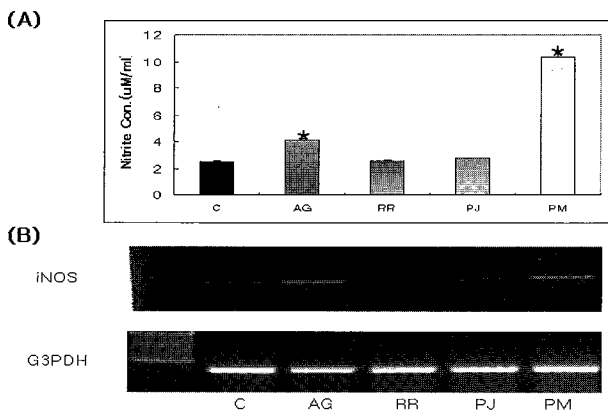


Fig. 4. Effect of various herbal extracts on NO production and iNOS mRNA expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with various herbal extracts for 24 hr. (A) The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. (B) Total RNA was prepared, and iNOS was analyzed by RT-PCR. G3PDH was used as control gene. C : control, *Angelicae gigantis* Radix (AG), *Rehmanniae* Radix (RR), *Paeoniae japonica* Radix (PJ), *Polygoni multiflori* Radix (PM). The statistics program used was Turkey. * indicates significant difference (p<0.05).

5. LPS로 자극된 RAW 264.7에서 NO 생성 조절능 및 iNOS 단백질 발현 억제 효과

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제능 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 LPS와 이들 약재를 동시에 처리하여 NO 생성능의 조절 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 8.2±0.15로 유의하게 증가하였으며, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리하였을 때, 백작약은 5.85±0.02로 감소하였으나, 당귀는 2.12±0.1, 지황은 1.77±0.04, 하수오는 2.77±0.01로 LPS 단독 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5). NO 생성과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과에서는 LPS와 약재를 동시에 처리하였을 때, 백작약에서는 거의 iNOS 단백질 발현이 관찰되지 않았고, 당귀, 지황, 하수오에서 약하게 iNOS

단백질 발현이 관찰되었다(Fig. 5).

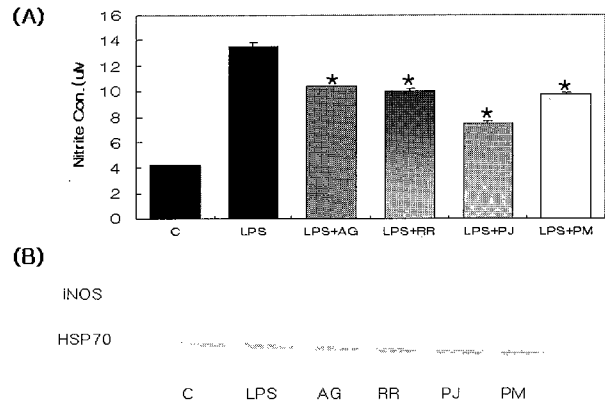


Fig. 5. Effect of various herbal extracts on the NO production and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with 1 µg/ml LPS in the presence of various herbal extracts for 24 hr. (A) The amount of NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. (B) The protein extracts were prepared, and then analyzed for iNOS expression by Western blotting. HSP70 was used as control protein. C : control, LPS : lipopolysaccharide, *Angelicae gigantis* Radix (AG), *Rehmanniae* Radix (RR), *Paeoniae japonica* Radix (PJ), *Polygoni multiflori* Radix (PM). The statistics program used was Turkey. * indicates significant difference (p<0.05).

6. Flow cytometer를 이용한 마우스 비장세포의 CD45R/B220의 변화

당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출물이 B 세포에서의 작용에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포를 분리하여 각 추출액을 100 µg/ml 농도로 처리한 후 FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody를 이용하여 분석하였다. 대조약물로는 B세포 특이 mitogen인 LPS를 처리하여 비교하였다. FACS를 이용한 분석 결과, 하수오 추출액에서는 CD45R/B220의 증가가 관찰되었으나, 당귀, 지황, 백작약에서는 별다른 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 6).

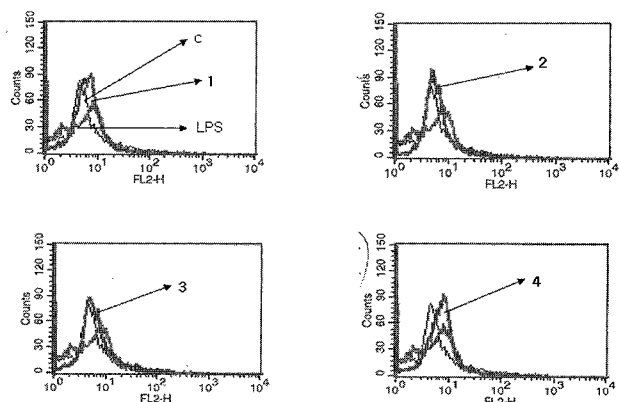


Fig. 6. Flow cytometry analysis of various herbal extracts-treated mouse spleen cells. Mouse spleen cells (4×10⁵ cell/ml) were incubated with various herbal extracts or LPS for 48 hr. The cultured spleen cells were stained with FITC-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 and analyzed by flow cytometry. C : control, LPS : lipopolysaccharide, 1 : *Angelicae gigantis* Radix (AG), 2 : *Rehmanniae* Radix (RR), 3 : *Paeoniae japonica* Radix (PJ), 4 : *Polygoni multiflori* Radix (PM).

Table 3. Survival rate S-180 bearing mice treated with *Polygoni multiflori Radix* (PM) extract.

Day	NO. of surviving mice/ group										
	0	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Control	8/8	8/8	8/8	6/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
PM (2mg/kg)	8/8	8/8	8/8	6/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	0/8

고찰 및 결론

한의학은 正氣 위주의 질병관을 가지고 있는데, 正氣虛는 모든 질병을 일으키는 내적 조건이므로, 正氣는 인체의 생리활동을 정상적으로 유지시키고 내외의 병인으로부터 인체를 방어하며 질병으로부터 회복시키므로 疾病因子에 관한 것보다는 인체의 생활 능력과 疾病에 대한 抵抗能力을 증시하여 치료방법이 대부분 인체의 氣의 보존과 배양을 목표로 하고 있다³⁾. 이러한 관점은 서양 의학 중에서 생체의 방어기능에 관계된 면역학적 관점과 많은 유사성을 가지고 있어, 현대 의학에서 다루는 면역학적 개념과 밀접한 관련이 있다고 할 수 있다. 생체방어체계란 외부로부터 자기 자신을 보호하기 위해 사용되는 생물체의 수단으로, 그중 면역계는 침입한 항원에 대하여 활성화되는 각종 면역세포들의 작용으로 숙주를 방어한다. 이 면역세포들의 증식, 분화, 및 작용기전은 다양한 종류의 외부자극에 의해 조절, 활성화된다¹⁷⁾. 면역반응은 면역계가 이물질에 대하여 반응하는 현상으로 크게 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나눌 수 있으며, 생체내에는 혈액, 임파선, 비장 및 위장관 등 여러 조직 및 기관에 면역기능을 수행하기 위해 많은 면역세포들이 존재한다. 면역에 관여하는 세포로는 T 세포, B 세포, 대식세포 및 NK 세포 등이 있으며, 이들 중 면역반응을 담당하는 주된 세포는 T 세포, B 세포, 대식세포로 알려져 있다¹²⁾.

補血藥은 補益藥의 하나로 혈액보충에 주된 역할을 하며 허증을 달래주는 효능의 약물로서, 임상 상 사용되는 대표적인 약물로는 當歸, 地黃, 白芍藥, 何首烏 등을 들 수 있다. 이들 補血藥材는 인체의 면역력을 조절하는 작용과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되나, 아직 이에 대한 구체적인 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 補血藥의 대표약물인 당귀, 지황, 백작약 및 하수오에 의한 면역조절의 영향을 조사하기 위하여, 마우스 비장세포 증식능, RAW 264.7 세포주의 NO 생성능 및 iNOS 유전자 발현, 마우스 비장세포의 Th1 사이토카인의 발현, CD45R/B220 변화, S-180 복수암 유발에 따른 마우스 생존율 실험을 수행하였다.

비장은 면역력을 알아보는 중요한 2차 장기로서 적색수질은 대식세포와 많은 적혈구로 이루어진 sinusoid로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳이며, 백색수질은 T 세포로 이루어진 periarteriolar lymphoid sheath (PALS)를 형성하여 동맥을 둘러싸고 있다. PALS의 바깥쪽에 위치한 marginal zone은 primary lymphoid follicle로 형성되어 있으며 B 세포가 풍부하다. 이러한 이유로 면역력을 볼 수 있는 좋은 재료로 사용된다.

본 실험에서는 대표적인 補血藥인 당귀, 지황, 백작약 및 하수오 열수추출액이 비장세포 증식능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 약제별 열수추출액을 농도별 (10, 100 µg/ml)로 처리하여 관찰하였다. 마우스 비장세포의 증식능은 하수오 열수추출액의 경우 10 µg/ml 와 100 µg/ml 모두에서 유의성 있게 증가하였고, 당귀 열수추출액에서는 약간의 증가를 보였다. 반면, 지황과 백작약 추출물은 세포증식능의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

Methotrexate (MTX)는 암의 성장을 억제하는 세포독성물질로 각종 암의 치료에 광범위하게 사용되며, MTX는 비타민인 엽산의 대사길항제로 핵산의 합성을 억제해 세포재생 및 증식을 막으며, 면역억제제로서 생체에 투여하게 되면 DNA 합성을 저해하고 세포 독성 작용에 의해 골수가 억제되어 백혈구 감소 현상을 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²¹⁾. 면역억제제에 의해 저하된 세포의 회복 효과를 알아보기 위하여, 대표적인 補血藥들이 MTX 처리에 의한 세포증식억제에 미치는 효과를 조사하였다. MTX 면역억제제와 병용 처리하였을 때 하수오 열수추출액에 의한 세포증식 억제가 현저하게 감소되었으며, 당귀에서는 다소 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 이상의 결과로 볼 때 마우스 비장세포의 증식이 유의하게 증가하였고, 면역억제제로 면역이 억제된 상황에서도 세포증식이 증가하였으므로, 하수오는 비장세포 증식능이 있음을 알 수 있다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증 등의 반응에 중요한 역할을 하는데, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여 하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 활성산소와 IL-1, TNF-α 및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다^{22,23)}. 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 중간물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1, TNF-α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 산화질소 (nitric oxide; NO)는 reactive oxygen species (ROS)의 일종으로 nitric oxide synthethases (NOSs)에 의해 합성되며 신체의 다양한 생리적 과정에 관여하는데, NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 나눌 수 있다. cNOS는 Ca²⁺/calmodulin 의존성으로 단시간 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리 기능을 담당하며, 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS) 등이 있는데, 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 반면, iNOS는 세포내 Ca²⁺의 농도에 비의존성이며, lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다²⁴⁻²⁹⁾. NO는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로, T 세포에서 유래된 사이토카인이나 외부 항원의 자극에 의해 활성화되어 생성되며 leishmaniasis, listeriosis 및 tularemia 등 세포 내 감

염을 일으키는 미생물에 방어능, tuberculosis, leprosy 및 암 등에 면역능을 부여하는 것으로 알려져 있고, 또한 대식세포가 생성하는 NO가 필요 이상으로 생성되면 혈관확장, 염증반응에 의한 조직 손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있어 대식세포의 면역반응 조절연구에 많이 이용되고 있다³⁰⁾. NO는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저농도의 NO는 신경전달물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고되어 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키거나 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절 할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다²⁵⁻²⁷⁾.

본 실험에서 補血藥의 대표적인 약재들의 RAW 264.7 세포주의 NO 생성능에 관한 효과를 살펴본 결과, 하수오 열수추출액의 경우 대조군에 비해 확연하게 NO 생성능이 증가함이 관찰되었고, 당귀에서도 NO 생성능이 유의하게 증가하였다. 반면 지황과 백작약에서는 NO 생성능의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4). NO 생성 기작에 관한 iNOS mRNA 유전자 발현의 관련성을 조사하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, NO 생성능이 큰 폭으로 증가하였던 하수오, 당귀 열수추출액의 경우에 iNOS 유전자 발현이 증가되었으나, NO 생성능의 변화가 없었던 지황, 백작약 열수추출액에서는 iNOS 유전자 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

대표적인 補血藥들이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO생성 억제능에 미치는 효과를 살펴본 결과, LPS 단독 처리시에는 NO 생성능이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, LPS와 각각의 약재를 동시에 처리 시, 백작약에서 크게 감소하였고, 당귀, 지황, 하수오에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5). NO 생성 조절과 관련된 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 확인한 결과, LPS 자극에 의해 단백질 발현이 강하게 유도되었으며, 백작약에서는 거의 iNOS 단백질 발현이 관찰되지 않았고, 당귀, 지황, 하수오에서 약하게 iNOS 단백질 발현이 관찰되었다(Fig. 5). 이상의 결과를 볼 때, 대표적인 補血藥들 중 하수오가 NO 생성능과 과도한 NO 억제능이 가장 우수하고, 당귀에서도 NO 생성능과 과도한 NO 억제능이 나타났으며, 백작약에서는 과도한 NO 억제능에서만 우수한 효과가 관찰 되었다.

사이토카인은 선천 및 적응면역의 활성화 단계 및 실행 단계에서 생산되어 염증반응을 자극하거나 저해하는 선천면역의 조절 매개자의 역할을 하며, 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되며, 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 적응면역의 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{23,31)}. 세포성 면역반응은 T 세포에 의한 면역반응으로 T 세포는 Th1 림프구나 Th2 림프구로 분화되며, 이들 두 림프구는 상호 길항작용에 의해 면역체계를 유지한다. 주로 Th1 림프구는 지연형 과민반응, 항미생물반응 및 종양에 관한 숙주면역반응에 관여하며, Th2의 경우 즉시형 과

민반응, 천식 및 알러지 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 많은 연구에서 한약재의 이러한 Th1 type 관여 면역반응과 Th2 type 면역반응을 조사하기 위해 Th1세포와 Th2 type에서 분비되는 사이토카인 발현에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다^{23,31,32)}. IFN γ 는 Th1 아집단의 특정 사이토카인으로, T 림프구와 NK 세포가 대식세포를 활성화하여 포식된 미생물을 죽이도록 하는 방법을 제공하며, 미감작 CD 4^+ 세포의 Th1 세포로의 분화를 촉진시키고 Th2 세포의 증식을 억제하며, 마우스의 B 세포에 작용하여 IgG2a로의 전환을 촉진시키고 IgG1과 IgE 같은 IL-4 의존성 동형 전환을 저해 한다^{32,33)}. IL-2는 항원 인식으로 T 세포에 의해 생성되며 항원 특이세포를 증식시키고, NK 세포 등 다른 면역세포의 증식과 분화를 촉진시키며, 항원으로 활성화된 T 세포의 세포사멸을 가능케 한다^{32,33)}.

본 실험에서 대표적인 補血藥들이 T 세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 마우스 비장세포의 사이토카인 유전자 발현 변화를 조사한 결과, 하수오의 경우 IL-2, IFN γ 의 유전자가 발현되었으며, 당귀에서는 IL-2, IFN γ 유전자가 약하게 발현되었고, 백작약은 IL-2 유전자만 아주 약하게 발현되었고, 지황에서는 관찰대상 유전자가 모두 발현되지 않았다(Fig. 3). 이 결과를 볼 때 대표적인 補血藥들 중에 당귀와 하수오는 Th1 type인 IFN γ 와 IL-2 유전자 발현이 나타났으며, 각 약재들의 면역반응 조절에 이들 사이토카인이 관여 할 것으로 생각된다.

모든 혈액세포와 면역세포는 조혈줄기세포에서 분화되어 형성된다. 조혈줄기세포가 분화됨에 따라 면역세포의 표면에는 각기 독특한 유형의 세포 표면 단백질을 발현하는데, 이를 CD (cluster of differentiation)라고 하며, 림프구 분화의 다양한 표식자에 대해 특이적인 단일클론 항체의 군을 의미한다^{34,35)}. CD45RB는 백혈구 공통 항원으로 주로 조혈세포에서 발현되며 T 세포 및 B 세포의 항원 수용체 매개적 신호전달에 중요한 역할을 하는 티로신 인산분해 효소인 CD45의 아형이다.

본 실험에서 대표적 補血藥들이 체액성 면역반응에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 마우스 비장세포에 B 세포 특이 표현형의 항체를 이용하여 표현형의 변화를 관찰한 결과, 하수오에서 CD45R/B220의 증가가 관찰되었으나, 당귀와 지황, 백작약에서는 특별한 변화가 없었다. 위의 결과로 볼 때, 하수오는 체액성 면역반응과 세포성 면역반응 모두에 관여하고, 당귀는 주로 세포성 면역반응에 관여함을 알 수 있다.

S-180 복수암 유발 마우스에서 하수오 열수추출액이 마우스 생존에 미치는 영향을 관찰 한 결과 하수오 추출액 경구 투여군에서는 12일째 2마리가 사망하기 시작해서 17일째까지 2마리의 생존율을 보인 반면 대조군인 생리식염수투여군에서는 12일째 2마리가 사망하고 13일까지 1마리의 생존율을 관찰하여 하수오 투여군에서 4일더 생존일수가 연장됨이 관찰되었다 (Table. 1).

이상의 결과로 보아 대표적인 補血 藥材인 당귀, 지황, 백작약 및 하수오중에서 하수오가 세포증식능, 사이토카인 유도능, 면역억제제 MTX (methotrexate)처리에 의한 회복능, S-180 복수암 세포진행 억제에서 상대적으로 가장 유의성 있는 생체면역반응 효과를 가진다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

- 김세종. 면역학. 서울, 고려의학, pp 1-21, 1994.
- 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울, 서울대학교 출판부, pp 1-3, 1986.
- 전국한의과대학 병리학교실. 한방병리학. 서울, 한의문화사, pp 128-132, 2004
- 이영선, 한옥경, 박찬우, 전태원, 이은실, 신상우, 김광중, 김효정. 韓方混合液 APA-01의 면역 증강 효과. 동의생리병리학회지, 16:483-489, 2002.
- 길영성, 정승기, 이형구. 어성초 및 삼국음이 면역기능에 미치는 영향. 대한의학학회지, 16:295-318, 1995.
- 김기환, 이인란, 정인성, 정희용, 윤연숙. 항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현. 고려인삼학회지, 22:324-330, 1998.
- 백남인, 김영숙, 경중수, 박기현. 황기의 간기능 보호성분. 생약학회지 27:111-116, 1996.
- 조성기, 문혜선, 윤연숙, 홍석일, 함용호, 정인성, 박은규. 當歸 추출물이 면역계에 미치는 영향. 대한면역학회지 12:113-118, 1990.
- 표명윤, 양기숙, 현수미. 상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향. 응용약물학회지, 9:194-200, 2001.
- 전국 한의과대학 본초학교수. 本草學. 서울, 영림사, pp 331-346, 544, 1991.
- Chang G.T., Min S.Y., Kim J.H., Kim S.H., Kim J.K., Kim C.H. Anti-thrombic activity of Korean herbal medicine, Dea-Jo-Whan and its herbs. Vascular Pharmacology, 43:283-288, 2005.
- 박혜란, 정우희, 정일윤, 이성태, 조성기. 백작약 조다당분해에 의한 대식세포 활성화를 통한 암세포 증식 억제. 한국식품영양과학회지, 32:149-154, 2003.
- 문관심. 약초의 성분과 이용. 과학·백과사전출판사, pp 245-246, 430-553, 1982.
- 김동현, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 白何首烏藥液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4 抑制效果. 대한침구학회지, 20:42-52, 2003.
- Lee Y.J., Son Y.J. The Effects of Polygoni multiflori Radix and Cynanchi wilfordii Radix on the Blood Lipids and Enzymes of hypercholesterolic Rats. Kor. J. Herbology 14:69-76, 1999.
- Liu, Z.L., Song, Z.Q., Zhang, L., Li, S.L. Influence of process methods on contents of chemical component Radix Polygoni Multiflori. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 30:336-340, 2005.
- Kim, J., Ryu, H.S., Shin J.H., Kim H.S. In vitro and Ex vivo Supplementation of Houttuynia cordata Extract and Immunomodulating Effect in Mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 34:167-177, 2005.
- 김창환, 고희균, 배원영. 황기수침이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 양향. 대한침구학회지, 11:49-66, 1994.
- 김일영, 이상재, 김광호. 何首烏가 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한예방의학학회지, 4:152-169, 2000.
- 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유발된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 동국대학교대학원 박사학위논문. 1996.
- Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Suh, S.I., Shin, S.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Lee, E.S., Kim, K.J., Kim, H.J. Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. J Ethnopharmacol 84:193-198, 2003.
- Haslberger, A., Romanin, C., Koerber, R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. Mol Biol Cell 3:451-460, 1992.
- Shacter, E., Arzadon, G.K., Williams, J.A. Stimulation of interleukin-6 and prostglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. Blood 82:2853-2864, 1993.
- 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가?, 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39:52-63, 1999.
- Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci 69:625-635, 2001.
- Ishihara, T., Okura, T., Kohno, K., Tanimoto, T., Ikegami, H., Kurimoto, M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J Ethnopharmacol 2:141-150, 2000.
- Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406:301-309, 2000.
- Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol 35:21-38, 2000.
- 강 준, 송호섭. 蜂藥液과 Melittin이 RAW 264.7細胞의

- NO, iNOS 및 MAPK에 미치는 影響. 대한침구학회지 21:107-119, 2004.
30. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J chin Med 28:217-226, 2000.
31. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A. and Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211:24-32, 1996.
32. Abbas, Lichtman, 강재성 외譯. 세포분자면역학. 서울, 범문사, pp 243-274, 2004.
33. Janeway. 김태규 외譯. 면역생물학. 서울, 라이프사이언스. pp 307-356, 2002.
34. 타다 토미오. 황상의譯. 면역의 의미론. 서울, 한울, pp 75-87, 100-103, 1998.
35. Roitt. 김주덕 외譯. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사, pp 35-62, 1991.