

돌외 에탄올 추출물의 생체방어력 증진효능

임선아 · 최현숙 · 황방연 · 이명구 · 이종길*

충북대학교 약학대학

Augmentation of Immune Responses by Oral Administration of *Gynostemma pentaphyllum* Ethanol Extract

Sun-A Im, Hyun-Suk Choi, Bang Yeon Hwang, Myung Koo Lee and Chong-Kil Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, 410, Sungbong-ro, Heungduk-gu, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – The immunomodulatory activities of the ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum*, termed hereafter as GPE, were examined in immunosuppressed mice as well as in normal mice in the present study. Oral administration of GPE into mice prevented dexamethasone (DEX)-induced immunosuppression as determined by the mitogen-induced proliferation of the splenocytes and the cytokine production (TNF- α , IL-1 β) in the whole blood culture. In addition, oral administration of GPE increased antitumor host defense in mice implanted with sarcoma-180 tumor cells. The immunoaugmenting activity of orally administered GPE was also confirmed in mice immunized with ovalbumin (OVA). Mice that were orally administered with GPE generated much more potent OVA-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses upon intravenous OVA injection compared to the untreated controls. These results demonstrate that oral administration of the ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* could be useful to increase host defense in immunocompromised situations such as stress- or tumor-induced immunosuppression.

Key words – *Gynostemma pentaphyllum*, Dexamethasone, Immunomodulation, Antitumor activity, Cytotoxic T lymphocytes.

돌외 (*Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Gynostemmae* Herba, 덩굴차 ; GP)는 산이나 숲속에서 자라는 덩굴성 여러해살이 식물이다. 줄기는 덩굴수염으로 다른 식물이나 물체에 감아 올라간다. 우리나라에서는 옛부터 돌외 덩굴을 걸어서 말려 덩굴차라고도 부르며, 건강차로 끓여 먹어 왔다. 민간요법에서 인삼 대용으로 사용하기도 하는데, 주로 제주도, 전라남도, 경상남북도, 울릉도에 야생으로 자란다. 돌외는 박과 (Cucurbitaceae)에 속하는 식물로 국내는 물론, 중국, 일본, 동남아시아 등의 지역에 폭넓게 분포되어 있다. *Gynostemma*는 30 여종이 알려져 있는데, 이 중에서 *pentaphyllum* 종이 널리 분포되고 있으며, 종, 성분 및 효능 연구 등이 폭넓게 진행되고 있다.

GP의 주성분은 사포닌 (saponins) 계열 화합물인 gypenosides이며, 100 여종이 분리되어 보고되고 있다¹⁾. Gypenosides는 기본 구조가 dammarane 형으로 ginsenosides

(ginseng saponin, *Panax ginseng*, 인삼)와 매우 유사하며, gypenosides 3, 4, 8, 12는 각각 ginsenosides Rb₁, Rb₃, Rd, F₂와 동일한 것으로 보고되었다²⁾. GP는 추출물 (ethanol 또는 수침 엑기스) 및 gypenosides를 사용하여 다양한 생리활성이 연구되고 있으며, 주요 생리활성으로는 항산화작용에 의한 superoxide anion 함량 감소 작용, 혈관내피세포 보호 작용^{3,4)}, 심혈관 기능개선 작용⁵⁾, 콜레스테롤 저하작용⁶⁾, 암세포 성장저해 작용⁷⁾, 항당뇨 작용⁸⁾, 간기능 보호 작용⁹⁾, 만성 기관지염 및 위궤양에 대한 항염증 작용^{9,10)} 등이 보고되었다.

GP 성분의 면역 기능 조절 작용은 비교적 최근에 연구되기 시작하였다. GP 차 (tea)의 경구투여는 cadmium의 경구투여로 감소된 비장세포 증식능을 회복시키는 것으로 보고되었다¹¹⁾. GP로부터 분리된 polysaccharide는 복강 macrophage를 활성화시켜 nitric oxide의 분비를 촉진시켰으며, TNF- α 의 분비도 농도 의존적으로 촉진시키는 것으로 밝혀졌다¹²⁾. 생쥐의 천식모델에 GP 차 (tea)를 경구투여했을 때 Th₂-type cytokine을 감소시킴으로써 염증반응을 감소시켰으며¹³⁾, GP

*교신저자(E-mail): cklee@chungbuk.ac.kr
(Tel): 043-261-2826

열수 추출물을 복강에 투여했을 때 혈청에서는 종류의 antibody 생산이 증가하였고 Concanavain A (Con A)의 자극에 의해 비장세포에서 분비되는 cytokine도 증가하는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. GP의 saponin은 세포배양 시에 첨가했을 때 nitric oxide의 분비를 직접적으로 촉진시켰고¹⁵⁾, 항원으로 immunization 된 생쥐에 GP 사포닌을 피하주사 했을 때 haemolytic effect가 적은 adjuvant로 효과가 있는 것으로 확인되었다¹⁶⁾.

생체는 다양한 정신적, 신체적 만성 스트레스 (stress)에 대응하여 반응한다. 스트레스에 대한 일차적 생리학적 반응은 시상하부 (CRH)-뇌하수체 전엽 (ACTH)-부신피질계 (glucocorticoids)와 교감신경-부신수질계 (catecholamines : dopamine, norepinephrine, epinephrine)를 분비하여 각종의 스트레스에 대하여 방어반응을 나타내는 것으로 밝혀졌다¹⁷⁾. 그러므로 만성적이고도 반복적인 스트레스에 노출되면 두통, 편두통, 피로감, 인지기능 저하, 우울증과 같은 신경계 증상과 더불어 면역기능의 저하가 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 스테로이드 호르몬인 glucocorticoids는 스트레스 시에 분비가 증가되는 것으로 알려져 있는데, 항염증제와 면역억제제로 널리 사용되고 있다¹⁹⁾. Glucocorticoids는 T 세포 및 macrophage로부터 생산되는 여러 종류 cytokine의 생산을 억제함으로써 면역반응을 억제하며, 대식세포의 세포 표면 분자의 발현과 탐식에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다¹⁹⁻²¹⁾.

본 연구에서는 GP 에탄올 추출물 (GPE)의 생체방어 증강효능을 glucocorticoids의 한 종류인 dexamethasone (DEX)을 경구투여하여 면역반응을 억제시킨 생쥐에서 조사하였고, 복강에 암을 이식한 생쥐에서는 항암효능을 조사하였으며, 정상생쥐에서는 GPE의 경구투여가 ovalbumin (OVA) 특이 T 세포의 활성화에 미치는 효능을 *in vivo* cytotoxic T lymphocytes (CTL) assay로 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - GP (*Gynostemma pentaphyllum* Makino)는 원광식품 (경남 거창군 남상면 둔동리)에서 구입하여 품종을 확인하였다 (표품 보관: 충북대학교 약학대학 생약학교실). GP의 잎 (leaves, 20 kg) 부위를 채취하여 음건한 후 세절한 다음 80% ethanol로 추출하고 증발 농축하여 GP 에탄올 추출물로 사용하였다(GPE, 2.1 kg). 실험동물은 ICR 및 C57BL/6 생쥐를 사용하였으며, 주야 주기 12 시간, 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 조건하에서 사육하였다.

DEX의 공급 - 실험에 사용된 생쥐는 6 주령의 수컷 C57BL/6 중으로 충북대학교 실험동물 지원센터의 semi-SPF system에서 사육하였다. GPE는 PBS에 녹인 후, 30 및 90 mg/kg으로 매일 오전에 21일간 경구투여 하였으며, GPE

투여 17 일째부터 DEX을 음용수에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 녹여 4 일간 자유 공급하였다.

생쥐의 비장세포 증식능 분석 - 생쥐 비장으로부터 비장세포를 분리하여 ACK lysis buffer (0.15 M NH_4Cl , 1 M KHCO_3 , 0.2 mM EDTA)로 적혈구를 제거한 후, 96-well microtiter plate에 1×10^6 cells/well로 가한 다음, concanavalin A (Con A), anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) 또는 lipopolysaccharide (LPS)를 농도별로 첨가하여 혼합 배양하였다. 배양 54 시간 후, [^3H]-thymidine을 각 well에 0.5 μCi 씩 가한 다음, 18시간 더 배양한 후, 세포를 automatic cell harvester를 이용하여 glass filter 상에 수확하였다. Glass filter에 존재하는 [^3H]-thymidine의 양은 scintillation cocktail을 첨가하여 microbetacounter (Wallac, USA)로 측정하였다.

전혈배양 및 cytokine 분석 - 생쥐 배대정맥으로부터 분리한 혈액 500 μL 에 2.5 IU/mL의 heparin과 penicillin 및 streptomycin이 첨가된 RPMI-1640을 2 mL 가하여 polypropylene tube에 1 mL 씩 나눈 다음, LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 첨가 후, 48 시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, polypropylene tube를 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음, 상등액을 분리하였으며, 상층 액에 존재하는 TNF- α 및 IL-1 β 양은 각 cytokine에 대한 ELISA kit (BD Biosciences)를 사용하여 제조자가 원하는 방법으로 분석하였다²²⁾.

항암효능 측정 - Sarcoma 180 암세포에 대한 GPE의 항암효능은 ICR 계통의 생쥐를 이용하여 측정하였으며, GPE는 총 6 일 동안 1일 1회 복강 주사 (1 mg/mouse)하였다. GPE 투여 4일째 되는 날에 sarcoma 180 암세포를 복강에 4×10^5 cells/mouse로 이식하였고, GPE 투여 8일이 되는 날에 생쥐를 CO_2 gas로 치사시킨 후, PBS를 5 mL씩 복강에 주사하여, 복강 세척액을 얻었다. 복강 세척액을 PBS로 세척한 후, 적혈구를 ACK lysis buffer로 제거하였으며, 형광물질 FITC를 결합시킨 anti-mouse CD45 mAb로 staining하여 FACS Canto (Becton-Dickinson)로 분석하였다²³⁾.

항원 특이 CTL 유도 활성화 확인 - GPE의 OVA 특이 T 세포 활성화 효능은 C57BL/6 계통의 생쥐를 이용하여 측정하였다. GPE는 21동안 경구투여 (30, 90 mg/kg) 하였으며, GPE의 OVA 특이 T 세포의 활성화 효능을 CTL assay로 확인하기 위하여 희생 7 일 전 꼬리 미정맥을 통하여 soluble OVA를 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 농도로 투여하였다. OVA 미정맥 투여 7일 후, OVA [257-264]로 pulse 된 비장세포를 CFSE로 label한 다음 미정맥 투여하여 target 세포로 하였다. Target 세포 미정맥 투여 18시간 후 생쥐의 비장과 림프노드를 분리하여 target 세포가 OVA 미정맥 투여에 의해 생성된 OVA 특이 T 세포에 의해 파괴되는 정도를 FACS Canto (Becton-Dickinson)로 분석하였다²⁴⁾.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 자료 분석은 Student's *t*-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 GPE의 경구투여가 생체방어력을 증강시킬 수 있는지 조사하였다. GPE를 경구투여한 생쥐에 DEX를 음용수로 경구투여한 후, 생쥐로부터 비장세포를 분리하여 mitogen 자극에 의해 증식되는 정도를 정상 대조군과 비교하였으며, 생쥐로부터 분리한 혈액에 LPS를 첨가하여 배양한 후 cytokine의 생산능력을 비교하였다. GPE의 항암효능은 ICR 생쥐에 sarcoma 180 암세포 이식 전후로 GPE를 투여한 후 암세포와 면역세포를 FITC-conjugated anti mouse CD45 mAb로 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. 정상 생쥐에서 GPE의 OVA 특이 T 세포의 활성화 효능은 *in vivo* CTL assay로 확인하였다.

Mitogen 유도 비장세포 증식능 비교분석 - GPE의 경구투여가 DEX 경구투여로 면역이 저하되는 것을 예방할 수 있는지 확인하기 위하여 GPE를 매일 오전에 21일간 생쥐에 경구투여 하였으며, GPE 투여 17 일째부터 DEX을 음용수에 20 µg/mL로 녹여 4 일간 자유 공급하였고, 22일째 되는 날 생쥐를 희생시켜 비장과 혈액을 분리하여 실험하였다. DEX만 경구투여한 생쥐로부터 분리된 비장세포는 LPS, anti-CD3 mAb 및 Con-A의 자극에 의해 증식되는 정도가 정상 대조군에 비하여 20-30% 감소하였으나 GPE (90 mg/kg/day)의 경구투여에 의해 유의성 있게 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

전혈배양에서 LPS 자극에 의한 cytokine 생산능 비교 분석 - 생쥐로부터 분리한 혈액의 전혈 배양액에 LPS를 100 µg/mL 농도로 첨가했을 때, TNF-α는 정상군에 비하여 DEX만 공급한 실험군에서 감소되었으나, GPE을 90 mg/kg/day로 경구투여한 경우에는 감소되지 않고 정상수준이었다

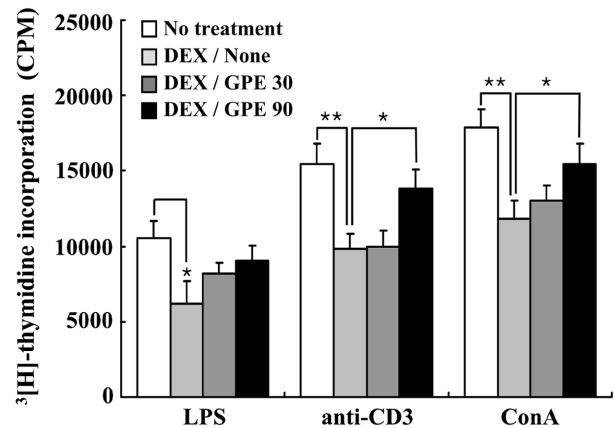


Fig. 1. Proliferation of splenocytes in response to mitogenic stimuli. Mice were administered by orally twice a day with different concentration of GPE for 21 days and dexamethasone (20 µg/mL) contained drinking water was feed for 4 days (on day 17, 18, 19, 20). Total spleen cells (1×10^6 /well) from C57BL/6 mice were cultured in the presence of ConA (1 µg/mL), anti-CD3 antibody (100 ng/mL) or LPS (100 ng/mL) for 3 days. DNA synthesis of splenocytes were measured by 3 H-thymidine incorporation for the final 18 h of the culture period. Values are means±SD. *p<0.05, **p<0.01 compared to control levels.

(Fig. 2a). IL-1β 역시 LPS를 100 µg/mL 농도로 첨가하였을 때, 정상군에 비하여 DEX를 공급한 실험군에서 감소되는 것으로 확인되었으나, GPE를 경구투여한 실험군에서는 감소되지 않고 정상군과 비슷한 수준을 유지하였다 (Fig. 2b).

생체는 각종 스트레스에 대한 방어작용의 하나로 스테로이드 호르몬인 glucocorticoids를 분비하는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾, 스트레스로 인해 분비되는 glucocorticoids에 의하여 생체방어력이 감소하는 것으로 밝혀졌다^{18,19)}. 면역억제제로

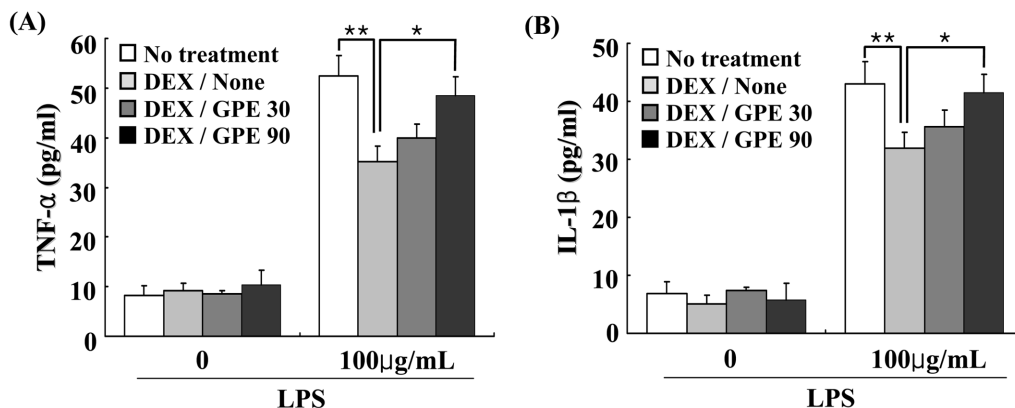


Fig. 2. LPS-induced cytokine release in whole blood culture. Mice were administered by orally twice a day with different concentration of GPE for 21 days and dexamethasone (20 µg/mL) contained drinking water was feed for 4 days (on day 17, 18, 19, 20). Mice whole blood, obtained from the vein, was diluted five-fold with medium and incubated in the presence of LPS (100 µg/mL) for 48 h. The amounts of cytokine in the blood culture supernatant were measured by ELISA. Values are means±SD. *p<0.05, **p<0.01 compared to control levels.

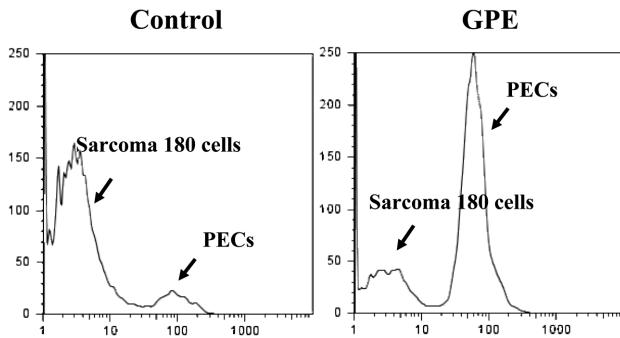


Fig. 3. Flow cytometric analysis of the antitumor activity. GPE were injected into ICR strain of mice (i.p., 1 mg/mouse) once a day for 6 consecutive days. On day 4 from the initiation of GPE injection, sarcoma 180 cells (4×10^5 cells/mouse) were inoculated into peritoneum. PECs were collected four days after the inoculation of sarcoma 180 cells, and stained with FITC-conjugated anti-CD45 monoclonal antibody. CD45-negative histogram represents sarcoma 180 cells, and CD45-positive histogram represents host cells of hematopoietic origin. Values are means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control levels.

도 사용되고 있는 glucocorticoids는 T 세포 및 macrophage의 cytokine 생산능과 대식세포의 세포표면 분자의 발현 및 탐식을 억제하는 것으로 보고되었으며¹⁹⁻²¹⁾, CD4+CD8+인 미성숙 흉선세포의 apoptosis 유도시킴으로써 T 세포의 기능을 저하시키고 흉선을 위축시키는 것으로 밝혀졌다²¹⁾. 본 연구에서는 GPE의 경구투여가 glucocorticoids의 한 종류인 DEX의 경구투여에 의한 mitogen 유도 비장세포 증식능 저하를 예방하는 것으로 확인되었는데, 이는 *Gynostemma pentaphyllum* 차 (tea)의 경구투여가 cadmium의 경구투여로 감소된 비장세포 증식능을 회복시켰다는 보고¹¹⁾와 일치하는 결과이다. GPE의 경구투여는 DEX의 경구투여에 의한 mitogen 유도 비장세포 증식능과, 전혈배양에서 LPS 자극에 의한 cytokine 생산능 저하를 예방하였다. 이러한 결과는 GPE의 경구투여가 DEX의 경구투여에 의한 면역저하를 예방함을 입증하는 것이며, 더 나아가 GPE가 스트레스로 인하여 면역이 저하되는 것을 예방할 수 있다는 가능성을 제시하는 것이다.

경구투여 GPE의 항암효능 – ICR 생쥐에 sarcoma 180 암세포 이식 전후로 GPE를 투여한 후, GPE의 항암효능을 확인하였다. 암세포가 증식하면 이에 대항하기 위하여 대식세포나 림프구 등 여러 가지 면역관련 세포들이 복강내로 유입되는데 이들을 통칭하여 복강유입세포 (peritoneal exudated cells, PEC)라고 한다. 본 연구에서는 PEC와 sarcoma 180 세포를 구별하여 분석하고자, 백혈구를 인식하는 pan-leukocyte 항체인 FITC-conjugated anti mouse CD45 mAb로 PEC를 염색하여 sarcoma 180 세포와 구별되게 한 후 FACS로 분석하였다. Fig. 3과 같이 PEC와 sarcoma 180의 정확한 구분이 가능하였으며, FACS로 분석한 결과, GPE를 투여한 실험군에서 sarcoma 180 세포가 33.93% 감소하였고, PEC가 150% 증가하여 항암효능을 나타내었다 (Table 1).

경구투여 GPE의 항원 특이 CTL 유도효능 – 정상 생쥐에서 GPE의 OVA 특이 T 세포의 활성화 효능을 *in vivo* CTL assay로 확인한 결과, OVA (100 μ g/mice)를 투여한 대조군에서는 OVA 특이 CTL 유도활성이 비장에서는 51%, 림프노드에서는 49%로 나타났으며, GPE를 경구투여한 실험군에서 CTL 유도활성이 비장에서는 73%, 림프노드에서 69%로 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig 4).

본 연구에서 GPE의 경구투여는 sarcoma 180 암세포에 대한 항암면역기능을 증강시키며, 정상 생쥐에서도 항원 특이 CTL 유도를 증강시키는 생체방어력 증강효능을 갖고 있음을 입증하였다. 이는 GP 추출물의 복강투여에 의해 혈청 antibody의 생산이 증가하였고, Con A 자극에 의한 비장세포의 cytokine 생산도 증가하였으며¹⁴⁾, GP 사포닌의 피하주사가 adjuvant로 효과를 나타냈다는 보고와¹⁵⁾와 더불어 GPE 성분이 생체방어력을 증강시키는 효능이 있음을 입증하는 것이다.

또한 이러한 결과는 GPE의 경구투여에 의한 항암효능이 암세포에 직접 작용하는 것이 아니라, 생체방어력을 증강시킴으로써 나타남을 입증하는 것이다. 특히, GPE의 경구투여가 DEX로 면역이 저하되는 것을 예방할 수 있다는 사실은 스트레스로 인하여 면역이 저하되는 것을 예방할 수 있을 뿐 아니라, 생체방어력을 증강시킴으로써 항암효능을 나타낼 수 있다는 가능성을 제시하는 것이다.

Table 1. Antitumor activity of GPE on sarcoma 180 cells

	Dose (/mouse/day)	Total cells		Sarcoma 180 cells		PEC	
		Number (1×10^6)	Number (1×10^5)	Number (1×10^5)	% inhibition ^a	Number (1×10^5)	% increase ^b
Control	PBS	118.25	69.77	47.30	-	47.30	-
GPE	1	92.65	46.12	70.95	33.93	70.95	150

^aPercent inhibition was calculated as follows: $\{(CN-TN)/CN\} \times 100$, where CN and TN stand for the number of sarcoma 180 cells of the control group and the GPE treated group, respectively.

^bPercent increase was calculated as follows: $\{(TN-CN)/CN\} \times 100$, where CN and TN stand for the number of PEC of the control group and the GPE treated group, respectively.

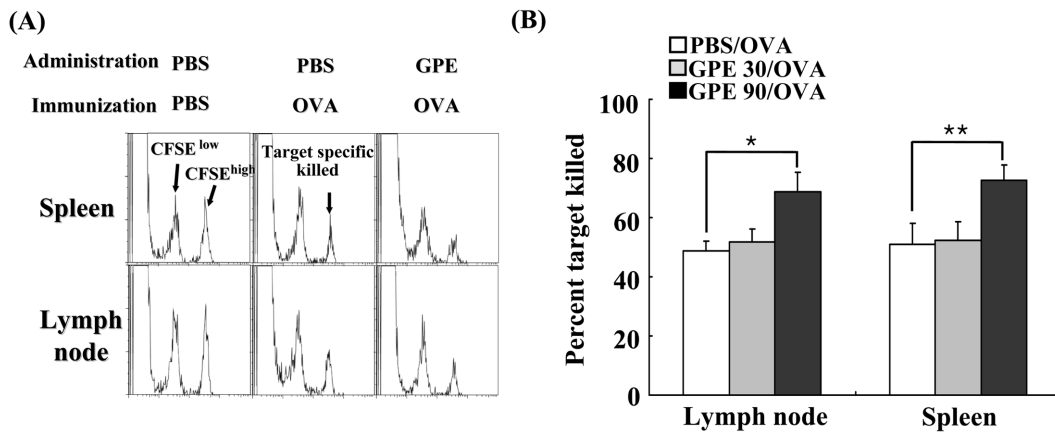


Fig. 4. Effects of GPE on the induction of OVA-specific CTLs. Mice were administered with GPE for 20 days. OVA (100 µg) was injected intravenously on day 13. A 1:1 mixture of each target cell population was injected (i.v.) into recipient mice on day 20 and specific cytotoxicity was determined 18 h later. Representative histograms of the spleen and lymph node cells shown in (A), and the percentages of specific killing of OVA[257-264] peptide-pulsed target cells were shown in (B). Values are means±SD. *p<0.05, **p<0.01 compared to control levels.

결론

생쥐에서 GPE의 경구투여가 DEX 경구투여로 면역이 저하되는 것을 예방할 수 있는지 확인한 결과, GPE의 투여가 DEX에 의한 면역저하를 예방하는 것을 확인할 수 있었다. GPE를 경구투여 했을 때, sarcoma 180 암세포를 이식한 생쥐에서 항암면역반응을 증가시키는 것으로 확인되었으며, 정상 생쥐에서 GPE의 OVA 특이 T 세포의 활성화 효능을 *in vivo* CTL assay로 확인한 결과, GPE가 정상 생쥐에서도 항원 특이 CTL 유도를 증가시키는 면역증강효능을 갖고 있음을 입증하였다.

사사

본 연구는 지식경제부-한국산업기술평가원 지원 지역혁신센터사업(RIC) ‘생물건강산업개발연구센터’의 연구비로 수행되었음.

인용문헌

1. Yoshikawa, K., Mitake, M., Takemoto, T. and Arihara, S. (1987) Studies on the constituents of Curcubitaceae plants. XVII. On the saponins constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Yakugaku Zasshi*. **107**: 355-360.
2. Kuwahara, M., Kawanishi, F., Komiya, T. and Oshio, H. (1989) Dammarane saponins from *Gynostemma pentaphyllum* Makino and isolation of malonylginsenosides -Rb1, -Rd, and malonylgypenoside V. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 135-139.
3. Wang, Z. J. and Luo, D. H. (2007) Antioxidant activities of

different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Carbohydr. Polymers*. **68**: 54-58.

4. Huang, T. H., Tran, V. H., Roufogalis, B. D. and Li, Y. (2007) Gypenoside XLIX, a naturally occurring PPAR-alpha activator, inhibits cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and activity in human endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **565**: 158-165.
5. Circosta, C., De Pasquale, R. and Occhiuto, F. (2005) Cardiovascular effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Phytomedicine* **12**: 638-643.
6. Megallia, S., Aktanb, Fugen., Daviesc, N. M. and Roufogalisa, B. D. (2005) Phytopreventative anti-hyperlipidemic effects of *Gynostemma Pentaphyllum* in rats. *J. Pharm. Pharmacol. Sci.* **8**: 507-515.
7. Hou, J., Liu, S., MA, Z., Lang, X., Wang, J., Wang, J. and Liang, Z. (1991) Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Makino on the immunological functions of cancer patients. *J. Trad. Chin. Med.* **11**: 47-52.
8. Norberg, A., Hoa, N. K., Liepinsh, E., Van Phan D., Thuan, N. D., Jörnvall, H., Sillard, R. and Ostenson, C. G. (2004) A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Biol. Chem.* **279**: 41361-41367.
9. Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J. and Lee, S. G. (1993) Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Am. J. Chin. Med.* **21**: 59-69.
10. Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D. and Amornlerdpison, D. (2004) The anti-gastric ulcer effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Phytomedicine* **11**: 431-435.

11. Suntararuks, S., Yoopan, N., Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Nookabkaew, S., Satayavivad, J. (2008) Immunomodulatory effects of cadmium and *Gynostemma pentaphyllum* herbal tea on rat splenocyte proliferation. *J. Agric. Food. Chem.* **56**(19): 9305-9311.
12. Yang, X., Zhao, Y., Yang, Y., Ruan, Y. (2008) Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J. Agric. Food. Chem.* **56**(16): 6905-6999.
13. Huang, W. C., Kuo, M. L., Li, M. L., Yang, R. C., Liou, C. J., Shen, J. J. (2008) *Gynostemma pentaphyllum* decreases allergic reactions in a murine asthmatic model. *Am. J. Chin. Med.* **36**(3): 579-592.
14. Huang, W. C., Kuo, M.L., Li, M. L., Yang, R. C., Liou, C. J., Shen, J. J. (2007) Extract of *Gynostemma pentaphyllum* enhanced the production of antibodies and cytokines in mice. *Yakugaku. Zasshi.* **127**(5): 889-896.
15. Tanner, M. A., Bu, X., Steimle, J. A., Myers, P. R. (1999) The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. *Nitric Oxide.* **3**(5): 359-365.
16. Sun, H., Zheng, Q. (2005) Haemolytic activities and adjuvant effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Phytother. Res.* **19**(10): 895-900.
17. Ulrich-Lai, P. M and Engeland, W. C. (2005) Sympatho-adrenal activity and hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. In Steckler, T., Kalin, N. H., Reul, J. M. H. M. (ed.). Handbook of stress and the brain, Part I, 419-436, Elsevier.
18. Kovacs, K. J., Mikios, I. H. and Bali, B. (2005) Psychological and physical stressors. In Steckler, T., Kalin, N. H., Reul, J. M. H. M. (ed.). Handbook of stress and the brain, Part I, 775-792, Elsevier.
19. Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B.E., Socci, C., Carlo, V. (1999) Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.* **162**(11): 6473-6481.
20. Tuckermann, J. P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R., Neumann, A., Illing, A., Clausen, B. E., Stride, B., Förster, I., Habenicht, A. J., Reichardt, H. M., Tronche, F., Schmid, W., Schütz, G (2007) Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J. Clin. Invest.* **117**(5): 1381-1390.
21. Newton, R. (2008) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* **55**: 603-613.
22. Godoy-Ramirez, K., Franck, K., Mahdaviifar, S., Andersson, L., Gaines, H. (2004) Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **292**: 1-15.
23. Im, S. A., Oh, S. T., Song, S., Kim, M. R., Kim, D. S., Woo, S. S., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K. (2005) Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int. Immunopharmacol.* **5**(2): 271-279.
24. Lee, Y. H., Lee, Y. R., Im, S. A., Park, S. I., Kim, K. H., Gerelchuluun, T., Song, S., Kim, K., Lee, C. K. (2007) Calcineurin inhibitors block MHC-restricted antigen presentation in vivo. *J. Immunol.* **179**(9): 5711-5716.

(2009년 1월 16일)