

# Gallic acid가 Lipopolysaccharide로 활성화된 마우스 대식세포의 인터루킨 생성에 미치는 영향

박완수

경원대학교 한의과대학 병리학교실

Received : 10. 06. 06

Revised : 10. 09. 06

Accepted : 10. 09. 07

## Key Words:

Gallic acid,  
Macrophage,  
Interleukin,  
Inflammation,  
lipopolysaccharide.

## Inhibitory Effect of Gallic acid on Production of Interleukins in Mouse Macrophage Stimulated by Lipopolysaccharide

Wansu Park

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

### ABSTRACT

**Objectives:** Gallic acid (GA) is the major component of tannin which could be easily founded in various natural materials such as green tea, red tea, grape juice, and Corni Fructus. The purpose of this study is to investigate the effect of Gallic acid (GA) on production of interleukin (IL) in mouse macrophage Raw 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS).

**Methods:** Productions of interleukins were measured by High-throughput Multiplex Bead based Assay with Bio-plex Suspension Array System based on xMAP® (multi-analyte profiling beads) technology. Firstly, cell culture supernatant was obtained after treatment with LPS and GA for 24 hour. Then, it was incubated with the antibody-conjugated beads for 30 minutes. And detection antibody was added and incubated for 30 minutes. And Streptavidin-conjugated Phycoerythrin (SAPE) was added. After incubation for 30 minutes, the level of SAPE fluorescence was analyzed on Bio-plex Suspension Array System and concentration of interleukin was determined.

**Results:** The results of the experiment are as follows.

1. GA significantly inhibited the production of IL-3, IL-10, IL-12p40, and IL-17 in LPS-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells at the concentration of 25, 50, 100, 200 uM ( $p < 0.05$ ).
2. GA significantly inhibited the production of IL-6 in LPS-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells at the concentration of 50, 100, 200 uM ( $p < 0.05$ ).
3. GA diminished the production of some cytokine such as IL-4, IL-5, and IL-13 in LPS-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells.
4. GA did not show the inhibitory effect on the production of IL-1 $\alpha$  and IL-9 in LPS-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells.

**Conclusions:** These results suggest that GA has anti-inflammatory activity related with its inhibitory effects on the production of interleukins such as IL-3, IL-10, IL-12p40, IL-17, and IL-6 in LPS-induced macrophages.

## I. 서론

갈릭산(gallic acid; 몰식자산)은 탄닌(tannin)의 주요 구성성분으로 항산화작용(anti-oxidative activity)을 가지고 있는 대표적인 물질로서 녹차, 홍차, 포도주, 커피뿐만 아니라 산수유, 오미자, 산사자, 오배자 등의 한약재에도 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 최근 발효차 중의 미량성분인 gallic acid 산화물 purpurogallin carboxylic acid가 항염증효능이 있음이 보고된 바 있다<sup>8)</sup>.

인체 면역체계는 외부로부터 침입하는 다양한 형태의 병원체(pathogen)로부터 자신을 보호하는 생체방어기능을 발휘하는 것으로 다양한 면역염증세포들(immunoinflammatory cells)에 의해서 그 기능이 수행되며, 특히 대식세포(macrophage)는 병원체 침입의 초기단계에 침입한 항원을 '침입자'로 인식하고 인체 내의 다른 면역세포들에 적극적인 반응신호전달을 통하여 인체면역기능이 활성화되도록 한다<sup>9-10)</sup>. 대식세포의 이러한 병원체성 항원(pathogenic antigen)인식은 인터루킨(interleukin)과 같은 사이토카인(cytokine) 생성증가로 이루어지며 생성이 증폭된 각 종의 사이토카인에 의해서 다음 단계의 면역염증반응이 순차적으로 증폭발생한다. 그러므로 외부로부터 침입한 병원체에 의해 자극받은 대식세포의 인터루킨 증가는 침입한 병원체들을 제거하기 위한 필수적인 조건이다. 하지만 때로는 인터루킨의 생성이 지나치게 과잉되거나, 혹은 적절히 중단되지 않는다면 급만성의 염증성 질환이 유발될 수도 있다<sup>11-14)</sup>. 그러므로 활성화된 대식세포에 의한 인터루킨 과잉생성을 조절할 수 있는 물질발굴은 항염제 개발의 기본적 틀이 될 수 있다. 이에 저자는 식물성 한약재에 많이 포함되어 있는 갈릭산(GA)이 염증촉발 내독소(endotoxin)인 lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 인터루킨 생성증가에 미치는 영향에 대해서 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용된 시약 중 Gallic acid, Lipopolysaccharide(LPS), 1×PBS solution, 그리고 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma사(MO, USA)로부터

구입하여 사용하였으며, interleukin 분석을 위한 multiplex cytokine assay kit는 Bio-rad사(CA, USA)와 Panomics사(CA, USA) 제품을 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였으며 본 실험에 사용된 기기는 Bio-plex 200(Bio-Rad, USA), CO<sub>2</sub> incubator (NUAIRE, USA), rotary vacuum evaporator(Eyela, Japan), air compressor(Tamiya, Japan), homogenizer(Omni, USA), research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Hanil, Korea), fume hood(Hanil), clean bench(Jeio thec, Korea), ultrasonic cleaner(Branson, USA), microplate reader (Bio-Rad), thermo aluminum bath(Fine PCR, USA), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), water bath(iNtRON biotech., Korea), ice-maker(Vision Scientific Co), freeze dryer(Eyela), deep freezer(Revco, USA) 등이다.

### 2. 방법

#### 1) Cell line

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

#### 2) 세포 배양

RAW 264.7 cells은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 ug/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells은 75cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후, 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하고 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음, 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

#### 3) 멀티플렉스 사이토카인 분석(multiplex cytokine assay)

LPS로 활성화된 RAW 264.7 cells의 각종 inter-

leukin 생성과 관련된 시료의 영향을 알아보기 위해 Yoon 등<sup>15)</sup>의 방법을 참고하여 다음과 같이 실험을 시행하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주되도록  $1 \times 10^5$  cells/mL의 cell을  $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간동안 배양한 후, 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ ) 단독 혹은 배지에 녹인 시료(50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ )와 함께 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 채취하여 다음의 멀티플렉스 어세이를 위하여 실시한다. 세포배양 상층액을 분주하기 전에 96 well plate 타입의 Filter plate를 wash buffer로 세척 후, 특정항체가 결합되어 있는 beads를 분주 후 다시한번 wash buffer로 세척한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 준비된 세포배양 상층액과 표준물질(standard antibody)을 각 well에 50  $\mu\text{L}$ 씩 분주한다. 분주가 끝나면 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 혼합된 Detection Antibody를 각 well에 25  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 잘 섞인 Streptavidin-PE를 각 well에 50 $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 실온에서 30분간 500 rpm의 속도로 shaking한다. 30분간의 shaking incubation이 끝나면 wash buffer를 이용, 3회의 세척을 실시한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 각 well에 Reading buffer를 120 $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 실온에서 5분간 500rpm의 속도로 shaking한 후 Bioplex-200을 이용, 각 target 물질들의 발현량을 측정, 비교한다.

### 3. 통계처리

실험성적은 평균치  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  SEM)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student t-test로 분석하여  $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결과

### 1. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-3 생성증가에 미치는 영향

LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-3 생성증가를 GA가 25  $\mu\text{M}$  이상의 모든 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 1).

### 2. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-10 생성증가에 미치는 영향

LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-10 생성증가를 GA가 25  $\mu\text{M}$  이상의 모든 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 2).

### 3. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-12p40 생성증가에 미치는 영향

LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-12p40 생성증가를 GA가 25  $\mu\text{M}$  이상의 모든 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 3).

### 4. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-17 생성증가에 미치는 영향

LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-17 생성증가를 GA가 25  $\mu\text{M}$  이상의 모든 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 4).

### 5. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-6 생성증가에 미치는 영향

LPS( $1 \mu\text{g/mL}$ )와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )

가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-6 생성증가를 GA가 50 uM 이상의 모든 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 5).

#### 6. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-4 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200 uM)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-4 생성증가를 GA가 25, 100 uM의 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 6).

#### 7. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-5 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200 uM)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-5 생성증가를 GA가 100 uM의 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 7).

#### 8. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-13 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200 uM)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과 LPS로 인한 IL-13 생성증가를 GA가 100 uM의 농도에서 유의( $p < 0.05$ )하게 감소시켰다(Fig. 8).

#### 9. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-1 $\alpha$ 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200 uM)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과, GA는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-1 $\alpha$ 의 생성증가에 대해서는 별다른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 9).

#### 10. GA가 LPS로 유발된 mouse macrophage RAW 264.7의 IL-9 생성증가에 미치는 영향

LPS(1 ug/mL)와 함께 GA(0, 25, 50, 100, 200 uM)가 포함된 배지에 RAW 264.7 cells을 24시간 동안 배양한 결과, GA는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-9의 생성증가에 대해서는 별다른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 10).

## IV. 고찰

Gallic acid(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; Pyrogallol-5-carboxylic acid)는 ‘몰식자산’이라고도 하며 산수유, 오미자, 삼백초 등의 한약재에 존재하는 탄닌(tannin)을 구성하는 주요 페놀성 물질로서, 분자량은 170이며 항산화(antioxidation), 항돌연변이(antimutagenic), 항알러지(antiallergic) 등의 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

대식세포(大食細胞; macrophage)는 식균세포라고도 불리우며 인체 면역체계에서 중요한 생체방어역할을 하는 백혈구의 일종이다. 인체 내의 모든 조직(tissue)에 분포하며 박테리아나 바이러스 등 외부로부터 침입하는 병원체를 인지하고 제거하는 기능을 수행할 뿐만 아니라 체내에서 일반 세포의 노쇠화로 인하여 발생하는 부산물과 암 세포 등을 제거하는 역할도 하는 등, 이른바 ‘비정상적인 체내존재물’에 대한 탐식작용을 관장한다고 할 수 있다. 혈액 중에 있는 식균세포는 단핵구(monocyte)라고도 한다. 대식세포는 외부에서 세균이나 바이러스와 같은 병원체가 침범하였을 때 인터루킨과 같은 다양한 염증촉발물질을 분비함으로써 인체가 신속하게 침입병원체를 제거하도록 유도하는 작용을 하며 이로 인해 염증반응이 유발된다. 이와 같이 인체의 자기방어작용 중의 하나인 염증반응이 과도해지거나 소멸되지 않고 지속되면 각종의 급만성 염증질환이 발생하게 되는 것이다. 즉, 대식세포가 외부의 자극 인자에 대응하여 생성하는 다양한 염증촉발물질(proinflammatory mediator)이 급성호흡기질환과 같은 급성염증질환 뿐만 아니라 류마티스성 관절염과 같은 만성염증질환 악화인자로 인식되고 있는 것이다<sup>17)</sup>.

LPS는 그람음성균의 세포벽에 위치하는 지질다당체의 일종으로서 대식세포로 하여금 염증촉발물질의 급격한 생성증가를 유발한다. 그러므로 LPS와 같은 내독소(endo-

toxin)에 의한 과도한 염증반응을 적절히 조절할 수 있는 활성이 항염제제개발의 중요한 검색지표가 되기도 한다.

LPS에 의해 자극된 대식세포가 과잉생성하는 염증매개물질 중에 대표적인 것이 인터루킨(interleukin)이다. 많은 종류의 인터루킨 중 IL-17은 최근 문제가 되고 있는 신종플루와 같은 급성호흡기염증질환에 있어서 혈액내 농도가 증가하는 것으로 알려져있으며, IL-12와 같은 경우는 류마티스성 관절염(rheumatic arthritis)이나 다발성 경화증(Multiple sclerosis)과 같은 자가면역질환(autoimmune disease)의 경우에 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. IL-3의 경우에는 알러지성 질환에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, IL-10은 전신성 홍방선 낭창(systemic lupus erythematosus)과 같은 자가면역질환에서 증가하는 것으로 알려져 있다. IL-6는 건선(psoriasis)이나 자궁내막증식증(endometriosis)에서 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup>

본 연구의 실험결과 GA는 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-3, IL-10, IL-12p40, 그리고 IL-17 생성증가를 25, 50, 100, 200 uM의 농도에서 모두 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰으며, IL-6의 생성증가에 대해서는 50 uM 이상의 모든 농도에서 모두 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰으며, IL-4, IL-5, IL-13 생성증가에 대해서는 부분적인 농도에서 감소를 나타내었다. 내독소의 자극으로 인한 대식세포의 인터루킨 생성증가는 세포내 전사인자 중의 하나인 nuclear factor kappaB(NF-kappaB)의 활성화에 기인하며 GA가 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포내 NF-kappaB의 활성화를 억제함이 이미 보고된 바<sup>9)</sup> 있기 때문에 본 실험에서 GA가 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포들의 IL-3, IL-10, IL-12p40, IL-6 생성증가를 억제함도 NF-kappaB의 활성억제에 기인하는 것으로 판단된다. 그밖에 IL-1 $\alpha$ 와 IL-9의 생성증가에 대해서는 GA가 별다른 변화를 나타내지 않았다.

이와 같은 실험결과는 GA가 인터루킨의 증가와 연관된 다양한 염증질환들, 예를 들면, IL-3 증가와 관련된 알러지성 질환, IL-10 증가와 관련된 루프스병, IL-12 증가와 관련된 류마티스성 관절염, IL-17과 관련된 급성호흡기염증질환, IL-6 증가와 관련된 건선(psoriasis) 등에 응용될 수 있음을 의미한다. 그러므로 GA가 많이 포함된 산수유와 같은 한약재들을 대상으로 다양한 급만성염증질환에 대한 염증억제효능을 검사하는 것도 의미가 있을 것이다. 앞으로 GA가 많이 함유된 한약재들을 이용한 염증질환치료제 개발을 위해 보다 정밀한 연구가 필요한 것으로

생각된다.

## V. 결론

본 연구에서는 LPS로 유발되는 마우스 대식세포 RAW 264.7의 인터루킨(IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17) 생성증가에 대해 갈릭산(GA)이 미치는 영향을 알아보기 위한 in vitro 실험을 수행한 결과 다음을 알 수 있었다.

1. GA는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-3, IL-10, IL-12p40, 그리고 IL-17 생성증가를 25, 50, 100, 200 uM의 농도에서 모두 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰으며, IL-6의 생성증가에 대해서는 50 uM 이상의 모든 농도에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소시켰다.

2. GA는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-4, IL-5, IL-13 생성증가에 대해서는 부분적인 농도에서 감소를 나타내었다.

3. GA는 LPS에 의해 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 IL-1 $\alpha$ 와 IL-9의 생성증가에 대해서는 별다른 변화를 나타내지 않았다.

이상의 실험결과는 GA가 내독소로 인한 IL-3, IL-10, IL-12p40, IL-17, IL-6의 생성증가를 억제하는 항염활성이 있음을 의미하는 것이며, 앞으로 GA가 많이 포함된 한약약침의 항염효능에 대한 보다 정밀한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2010년도 경원대학교 연구비지원 및 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2010-0022919)에 의하여 수행된 연구결과입니다.

## VI. 참고문헌

1. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. *Korean J Pharmacogn*. 1993; 24: 177-182.
2. Lee JY. Iridoid glycosides of *Cornus officinalis*. MS thesis. Seoul National Univ, Seoul, Korea, 1981.
3. KI, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and antioxidative activities of *Corni fructus* extracts. *Korean J Postharvest Sci Technol*. 1999; 6: 99-103.
4. Kim YH. Isolation of constituents from the fruits *Cornus officinalis*. Siebold. 1999; 14: 287-292.
5. Guilian T, Zhang T, Yang F, Ito Y. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2000; 886: 309-312.
6. Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chem Soc*. 2005; 22: 157-167.
7. Park YK, Whang WK, Kin HI. The antidiabetic effects of extract from *Cornus officinalis* seed. *Chung-Ang J Pharm Sci*. 1995; 9: 5-11.
8. 주진우. 발효차중의 미량성분인 gallic acid 산화물 purpurogallin carboxylic acid의 항염증 효과. *한국식품과학회지*. 2008; 40: 707-711.
9. Ryan JG, Kastner DL. Fevers, genes, and innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 321: 169-184.
10. Bennett MK, Kirk CJ. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2008; 11: 616-625.
11. Li L, Yi Z, Tisch R, Wang B. Immunotherapy of type 1 diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008; 56: 227-236.
12. Farasat S, Aksentijevich I, Toro JR. Autoinflammatory diseases: clinical and genetic advances. *Arch Dermatol*. 2008; 144: 392-402.
13. Danila MI, Hughes LB, Bridges SL. Pharmacogenetics of etanercept in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2008; 9: 1011-1015.
14. Boyer JF, Cantagrel A, Constantin A. Impact of traditional therapies and biologics on cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008; 6: 218-227.
15. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2009; 125(2): 286-290.
16. Negi AS, Darokar MP, Chattopadhyay SK, Garg A, Bhattacharya AK, Srivastava V, Khanuja PS. Synthesis of a growth promoter from gallic acid. *Bioorg Medic Chem Let*. 2005; 15: 1243-1247.
17. Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, Folco E, Iliasaca ML, Feinberg MW, Aikawa M, Libby P. Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF-kappaB1 and attenuates macrophage activation. *J Biol Chem*. 2008; 283: 9692-9703.
18. Luo Y, Liu M, Yao X, Xia Y, Dai Y, Chou G, Wang Z. Total alkaloids from *Radix Linderae* prevent the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing NF-kappaB and MAPKs activation. *Cytokine*. 2009; 46(1): 104-110.
19. Lin YL, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF-kappaB in macrophages. *Eur J Pharmacol*. 1999; 367(2-3): 379-388.

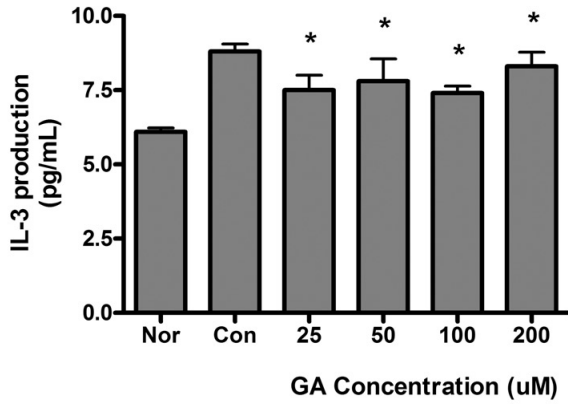


Fig. 1. Effect of GA on production of IL-3 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

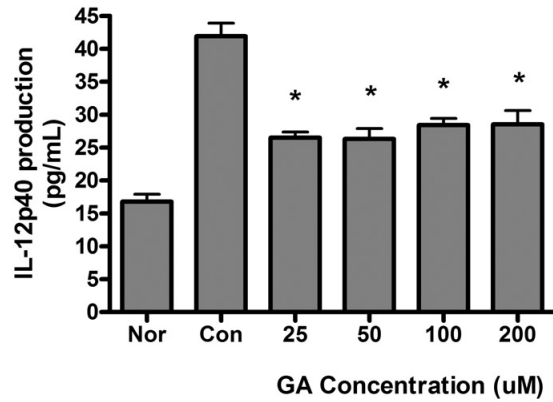


Fig. 3. Effect of GA on production of IL-12p40 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

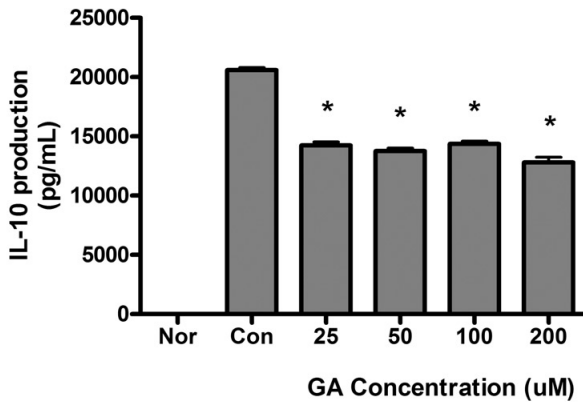


Fig. 2. Effect of GA on production of IL-10 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

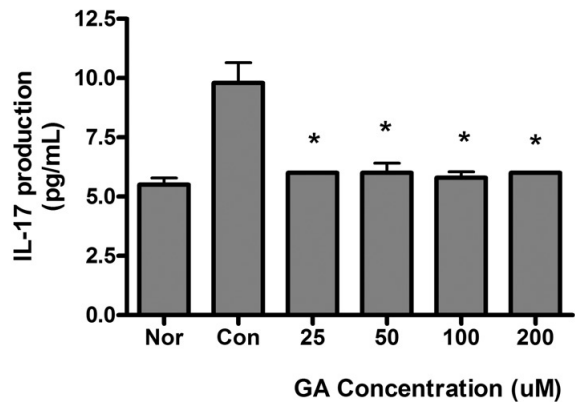


Fig. 4. Effect of GA on production of IL-17 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

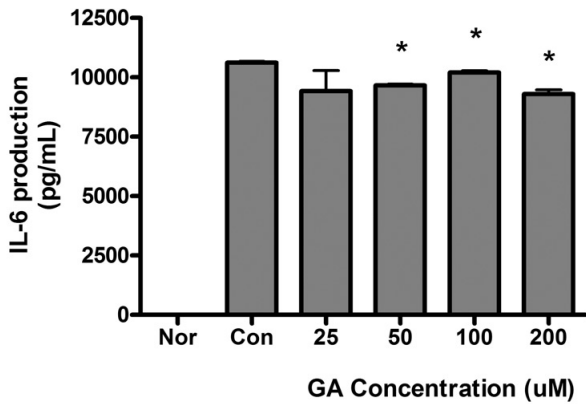


Fig. 5. Effect of GA on production of IL-6 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

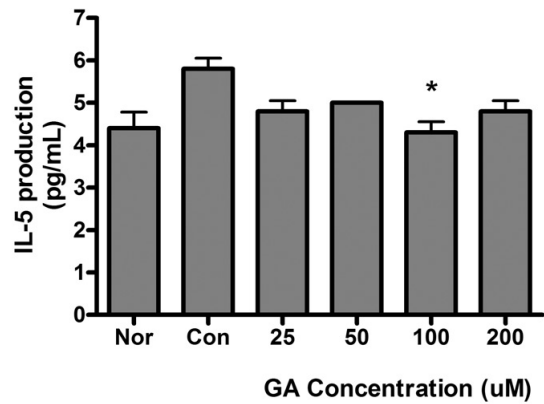


Fig. 7. Effect of GA on production of IL-5 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

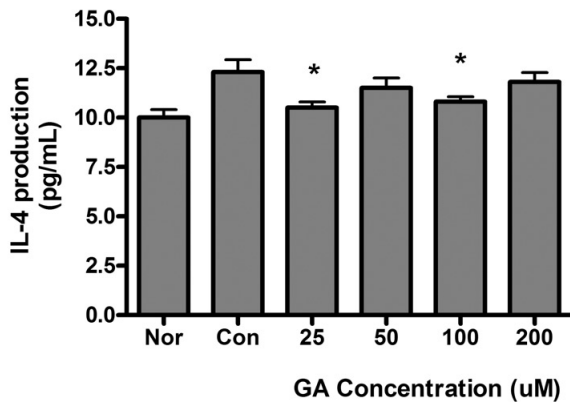


Fig. 6. Effect of GA on production of IL-4 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

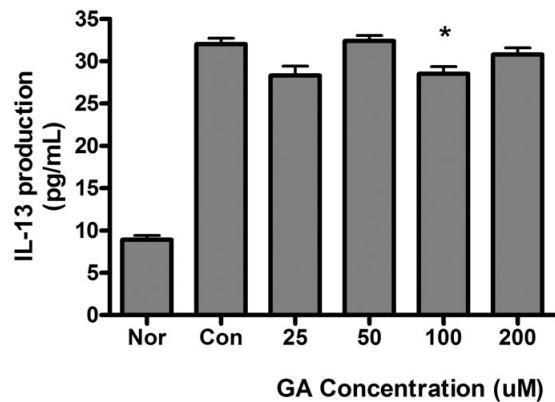


Fig. 8. Effect of GA on production of IL-13 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.



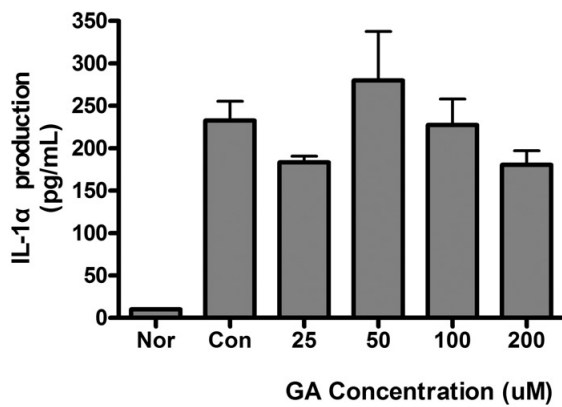


Fig. 9. Effect of GA on production of IL-1 $\alpha$  in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.

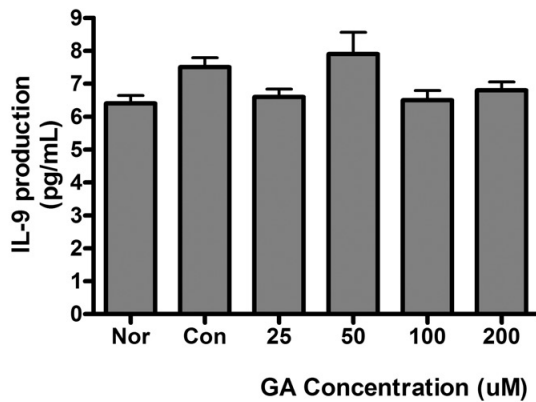


Fig. 10. Effect of GA on production of IL-9 in RAW 264.7 cells using Bioplex cytokine assay. Cells were incubated with LPS (1 ug/mL) and GA (0, 25, 50, 100, 200 uM) for 24 h. Results are represented as mean  $\pm$  SEM. Nor : Normal group treated with culture media only. Con : Control group treated with LPS only. \* represents  $p < 0.05$  compared to the control.