

코디세핀이 마우스 복강 대식세포에서 전염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향

서민정^{1,2} · 강병원¹ · 김민정¹ · 이해현¹ · 서권일³ · 김광혁⁴ · 정영기^{1,2*}

¹동아대학교 Medi-Farm 산업화 연구사업단, ²동아대학교 생명공학과,
³순천대학교 식품영양학과, ⁴고신대학교 의과대학 미생물학교실

The Effect of Cordycepin on the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Mouse Peritoneal Macrophages

Min-Jeong Seo^{1,2}, Byoung-Won Kang¹, Min-Jeong Kim¹, Hye-Hyeon Lee¹, Kwon-il Seo³,
Kwang-Hyuk Kim⁴, and Yong-Kee Jeong^{1,2*}

¹Medi-Farm Industrialization Research Center, Dong-A University

²Department of Biotechnology, Dong-A University

³Department of Food Nutrition, Sunchon National University

⁴Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine

Abstract The effect of cordycepin purified from *Cordyceps militaris* on macrophage activation was investigated in peritoneal macrophages isolated from C57BL/6 mice. Lipopolysaccharide-induced mouse peritoneal cells showed that cordycepin treatment increased the expression of the inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-12, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), leading to early inflammation-mediated reactions, the activation of immunological responses, and T lymphocyte activation. T lymphocytes, activated by a greater production of IL-6, resulted in antibody-generating immune reactions, suggesting that cordycepin was effective at inducing immunological responses. Consistent with the increase in the inflammation-mediating factors including nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂), the toxic response of macrophages was activated and effectively induced inflammation. These findings demonstrate that cordycepin is involved in reducing cell injury provoked by inflammatory reactions. Therefore, these results suggest that cordycepin treatment of mouse peritoneal cells induces inflammation-mediated immunological responses and immunostimulation.

Keywords: cordycepin, cytokines, macrophage, inflammation

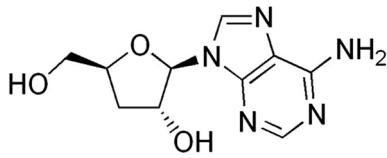
서 론

생체는 다양한 외부인자(병원성 미생물 등)로부터 방어작용을 하는데 이를 면역계라고 한다. 생체내의 면역계는 외부인자의 감염에 대하여 선천면역인 내재면역과 후천적으로 얻어지는 적응면역으로 구분될 수 있다. 적응면역은 B 림프구, T 림프구의 면역세포로 구성되어 외부 항원(antigen)에 대하여 특이적으로 작용하여 면역반응을 나타내며, 면역기억을 통하여 활성화된다(1). 그리고 내재면역은 대식세포(macrophage), 비만세포(mast cell), 수지상세포(dendritic cell), 호중구(neutrophils)와 같은 염증성 세포로 구성되어 있으며, 적응면역과 달리 기억과 항원에 대하여 비 특이적인 면역반응이다(2,3). 이러한 면역반응 중에서 외부인자를 탐식하여 제거하는 탐식세포로서 면역작용에 가장 중요한 역할은 대식세포가 담당하고 있으며, 외부인자에 반응하여 염증유발물질

을 분비함에 따라 염증성 면역반응을 보이는 것으로 알려져 있다(4). LPS (lipopolysaccharide)는 lipid A라 불리며 친수성의 복합 다당류가 결합되어 있는 인당지질(phosphoglycolipid)에 의해 형성 되어진 그람 음성세균의 내독소 성분이다(5). LPS에 노출된 대식 세포는 interleukin (IL)-1 β , IL-12, IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 분비하여 외부인자인 미생물에 대한 초기 염증반응을 매개하고 미생물을 제거하기 위하여 감염 초기에 외부인자를 탐식하는 작용을 한다(6-8). 탐식된 외부인자는 대식세포에 의해 제거되며 활성화된 대식세포에서 분비된 다양한 사이토카인에 의해 선천면역과 적응면역계의 활성화에 관여하게 되는데 특히 항원제시세포(antigen presenting cell)인 대식세포가 포식하여 제시한 항원을 T 림프구가 인식하면서 이루어진다(9).

코디세핀(cordycepin)은 3'-deoxyadenosine으로서 *Cordyceps militaris*에서 유래된 물질로 알려져 있다(10). *C. militaris*는 서아시아 지역에 많이 서식하고 있으며, 예로부터 중국에서 널리 전통약 용버섯으로 알려진 동충하초로서 최근 연구에 따르면 이들의 추출물은 면역증강(11,12), 항암(10,13), 항염증(14) 등의 다양한 가능성이 있다고 보고되어 있다. 이러한 기능성을 가진 동충하초 유래의 코디세핀은 DNA의 구성물질 중 하나인 데옥시아데노신(deoxyadenosine)과 매우 유사한 아데노신의 3' 위치의 수산기가 탈리된 구조(Fig. 1)로서 유전자의 구성성분과의 경쟁적 작용으로

*Corresponding author: Yong-Kee Jeong, Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea
Tel: 82-51-200-7557
Fax: 82-51-206-0848
E-mail: ykj9912@dau.ac.kr
Received June 20, 2013; revised November 21, 2013;
accepted December 3, 2013



9-(3-Deoxy-β-D-ribofuranosyl) adenine

Fig. 1. Chemical structure of cordycepin.

인하여 항암(15,16), 항염증(17), 항산화(18), 면역증강(19) 등 다양한 생리기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

본 연구진에서는 이러한 다양한 기능성을 가지는 코디세핀의 함량을 증대시킨 동충하초(*C. militaris* JLM0636)를 육종하였으며 (20), 동충하초의 코디세핀의 함량 증대에 따른 기능성을 확인하기 위하여 면역증강효능을 검토하였다. 그 중 분리된 코디세핀에 대한 면역증강효과의 연구는 C57BL6 마우스의 비장세포로부터 Th1과 Th2 사이토카인의 분비효과 및 TNF-α, IL-6, IL-17A의 염증성 사이토카인의 발현에 대하여 본 연구진에서 보고하였으며 (21,22), 대식세포에 대한 면역활성 연구는 RAW 264.7 대식세포를 이용한 염증인자의 발현유무에 대한 연구가 보고된 바 있다(23).

따라서 본 연구진에서는 코디세핀 고함량 동충하초의 면역증강을 검토하기 위하여 C57BL6 마우스 복강 대식세포를 이용하여 코디세핀이 대식세포의 활성화에 미치는 영향에 대하여 확인하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

실험에 사용된 마우스는 수컷 C57/BL6 마우스로서 생후 6-8주령, 체중 20-25 g (Dhbiolink, Eumseong, Korea)을 구입하여 실험에 사용하였으며, 배지는 RPMI 1640 (Gibco BRL., Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS), 코디세핀은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였으며, LPS는 *Escherichia coli* (serotype O26:B6)에서 분리정제 된 제품을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 마우스 사이토카인 측정에는 ELISA MAX™ Deluxe set kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)을 사용하였으며, NO는 griess reagent (Promega, Madison, WI, USA), H₂O₂ 측정에는 hydrogen peroxide assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하였다. 흡광도 측정에는 microplate reader (Bio-Rad, Richmond, VA, USA)를 사용하여 측정하였다..

마우스 복강대식세포의 분리 및 배양

마우스 복강 대식세포를 얻기 위하여 CO₂ gas처리하여 희생시킨 마우스의 복강에 5 mL의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)을 주사하여 마사지한 후에 다시 주사기로 흡입하였다. 흡입된 복강세포는 300×g에서 10분간 원심분리 한 후 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 세포의 농도가 2×10⁵ cells/mL이 되도록 현탁하여 24 well tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 각각 1 mL씩 분주하였다. 준비된 세포배지에 LPS와 코디세핀을 최종농도가 2 μg/mL과 10 μg/mL가 되게 각각 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6, 24, 48시간 배양하였다. 코디세핀 10 μg/mL의 농도에서 비장세포를 배양하였을 때 tryptophan blue 염색법에 의한 세포독성을 나타내지 않으므로 이 농도를 처리농도로 하였다(24). 배양한 배양액은 300×g에서 10분간 원심분리 한 후 분리된 상층액을 취하여 -70°C에서 보관하여 사용하였다.

마우스 사이토카인 IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α의 측정

마우스 복강 대식세포로부터 분리되는 사이토카인 IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α를 각각 측정하였다. 측정은 96 well microplate에 마우스 cytokine IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α의 capture antibody를 coating buffer에 희석한 후 100 μL 분주하여 4°C에서 16-18시간 동안 방치하였다. Capture antibody를 코팅한 96 well microplate는 washing buffer (1 M phosphate buffer containing 0.5% Tween 40)으로 4회 washing한 후 assay diluent 200 μL를 분주하여 실온에서 1시간 동안 교반하여 반응하였으며, 반응 후 washing buffer로 세척하여 세포 배양액을 100 μL 분주하여 2시간 동안 반응하였다. 그리고 다시 washing buffer로 washing하여 detection antibody를 100 μL 분주 1시간 동안 반응하였으며, 이를 washing buffer로 세척 후 avidine-horseradish peroxidase를 100 μL 분주하여 30분간 반응하였다. 반응한 96 well microplate를 washing buffer로 washing하여 tetramethylbenzidine 액을 넣은 후 20분간 정지한 후 stop solution (2 N H₂SO₄)을 분주하여 반응을 정지하였으며, optical density는 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다

Nitric oxide (NO)의 측정

마우스 복강 대식세포로부터 NO의 생성은 세포배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로서 griess reagent를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 50 μL dmf griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 1% α-naphthylamide in H₂O) 50 μL와 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응하였으며, optical density는 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

Hydrogen peroxide (H₂O₂)의 측정

마우스 복강 대식세포로부터 H₂O₂의 생성은 H₂O₂에 의해 ferrous ions (Fe²⁺)에서 ferric ions (Fe³⁺)으로의 산화반응에 따라 측정하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 20 μL에 catalase 10 μL와 HPLC-grade water 10 μL를 각각 혼합한 후 working reagent (3,3-bis[N,N-di(carbosymethyl)amino-methyl]-o-cresolsulfonephthalin, sodium salt)을 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응하였으며, optical density는 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 측정하였다.

통계학적 분석

실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 실험성적은 평균±표준편차로 나타내었고, 각 군의 통계학적 검정에는 Microsoft excel program의 Student's t-test를 사용하여 p 값이 0.05 미만 수준에서 통계적 유의성을 검토하였다.

결과 및 고찰

IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α의 생성

대식세포에 의해 분리되는 사이토카인 중 IL-1β은 염증초기에 분리되어 숙주면역반응의 염증의 매개자로서 작용하며, IL-6는 염증반응으로부터 B 림프구의 항체 생성을 촉진시키고 T 림프구의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다(25). TNF-α는 세포독성물질로서 T 림프구에 작용하여 T 림프구의 활성화 성장을 조절하여 염증부위에서 생성이 증가된다(26). 그리고 IL-12는 단핵구, 대식세포, 수지상 세포와 B 림프구에서 생성되는 사이토카인으로 면역반응 초기에 자연살해세포(Natural killer cell, NK cell)와 T

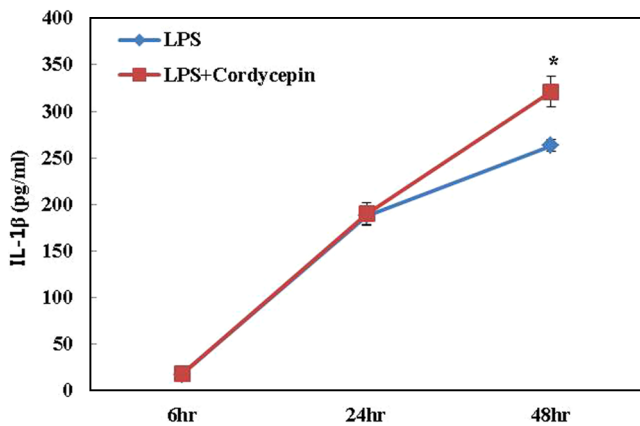


Fig. 2. Production of IL-1 β cytokine by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 μ g/mL cordycepin and 2 μ g/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control p <0.05.

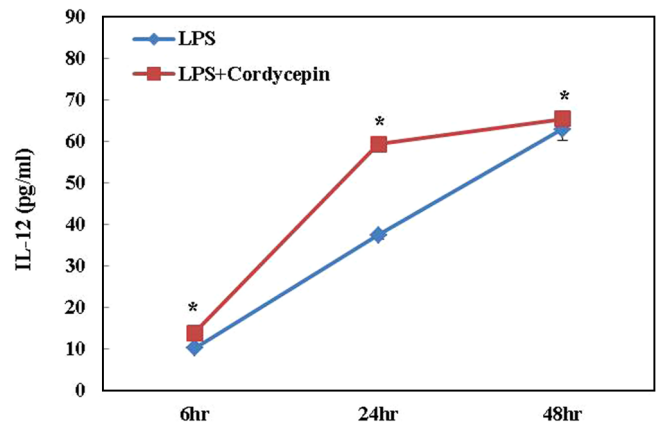


Fig. 4. Production of IL-12 cytokine by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 μ g/mL cordycepin and 2 μ g/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control p <0.05.

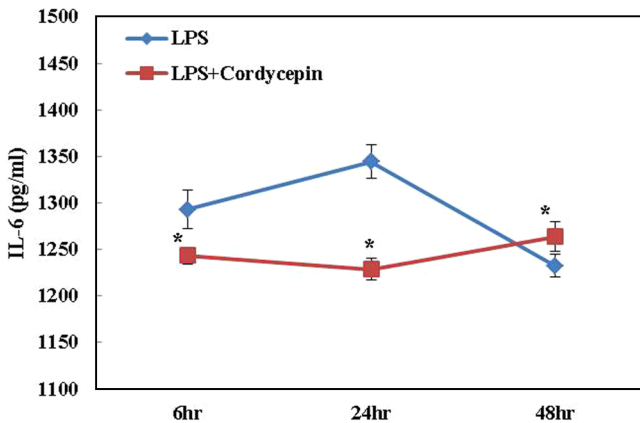


Fig. 3. Production of IL-6 cytokine by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 μ g/mL cordycepin and 2 μ g/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control p <0.05.

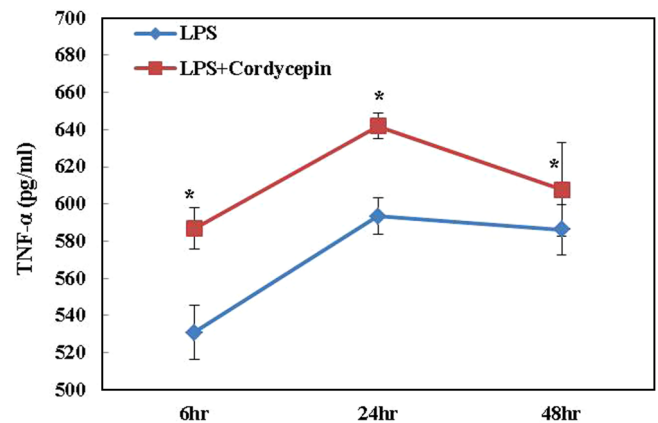


Fig. 5. Production of TNF- α cytokine by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 μ g/mL cordycepin and 2 μ g/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean \pm SD. *Significant difference from control p <0.05.

림프구에 작용하여 interferon- γ (INF- γ)의 생산을 유도하는 세포성 면역작용을 한다(27).

사이토카인 IL-1 β , IL-12, IL-6, TNF- α 의 분비량 측정은 C57BL/6 마우스 복강으로부터 분리된 대식세포에 2 μ g/mL의 LPS를 처리하여 세포를 자극시킨 후 10 μ g/mL의 코디세핀을 처리하였을 때 분비되는 각각의 사이토카인을 6, 24, 48시간 동안 측정하여 확인하였다.

그 결과 IL-1 β 의 분비는 LPS에서 17.50 \pm 0.00, 188.00 \pm 10.66, 263.00 \pm 6.36 pg/mL로 시간에 따라 분비량이 증가하였으며, LPS와 코디세핀을 함께 처리하였을 때 18.00 \pm 2.12, 190.00 \pm 12.02, 321.00 \pm 16.26 pg/mL를 나타내어 LPS를 단독으로 처리하였을 때 보다 코디세핀을 함께 처리하였을 때 후기에 분비량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2). IL-6의 분비는 LPS에서 1,292.75 \pm 20.76, 1,344.50 \pm 18.38, 1,232.25 \pm 12.37 pg/mL의 분비를 나타내었으며, LPS와 코디세핀을 함께 처리하였을 때 1,243.50 \pm 9.19, 1,228.75 \pm 11.67, 1,263.50 \pm 15.87 pg/mL를 나타내어 6, 24시간에 LPS보다 낮은 분비를 나타내었으나, 48시간 이후 분비량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 그리고 IL-12의 분비는 LPS에서 10.12 \pm 0.18,

37.37 \pm 0.88, 63 \pm 2.83 pg/mL의 분비를 나타내었으며, LPS와 코디세핀을 함께 처리하였을 때 13.75 \pm 0.36, 59.38 \pm 0.18, 65.5 \pm 0.00 pg/mL로 LPS보다 코디세핀을 함께 처리하였을 때 높은 분비량을 나타내었다(Fig. 4). 또한 TNF- α 의 분비는 LPS에서 530.88 \pm 14.50, 593.38 \pm 9.90, 586.25 \pm 13 pg/mL의 분비를 나타내었으며, 코디세핀을 함께 처리하였을 때 586.88 \pm 11.31, 642.00 \pm 6.89, 607.75 \pm 25.28 pg/mL로 LPS만 자극하였을 때 보다 높은 분비량을 확인하였다(Fig. 5).

이 결과로부터 코디세핀은 마우스 복강 대식세포가 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 초기 염증매개성 사이토카인 IL-1 β 의 분비량이 증가하여 초기 염증성 면역반응을 활성화시키는 것으로 사료된다. 또한 자연면역에서 적응면역으로의 전환은 대식세포와 같은 자연면역세포에서 분비되는 IL-12와 TNF- α 와 같은 사이토카인의 자극에 의해 T 림프구의 활성화로서 이루어지는데, 코디세핀에 의해 분비량이 증가함에 따라 T 림프구의 활성화에 의한 적응면역으로 전환을 효율적으로 유도하는 것으로 사료된다. 그리고 대식세포에 의한 IL-6의 분비는 B림프구의 활성화를 유도하는 도움 T 림프구의 성숙을 유도하는 사이토카인으로서 주로

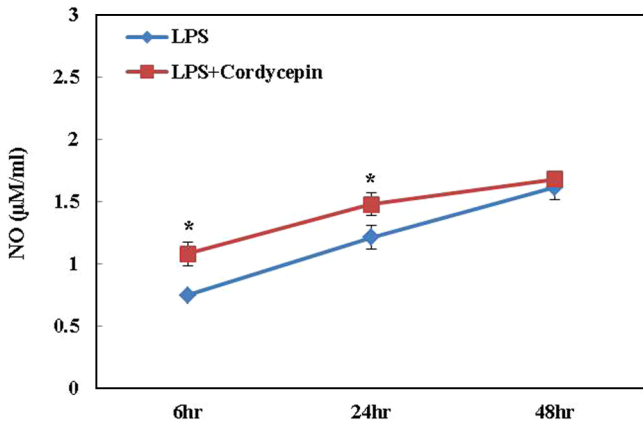


Fig. 6. Production of NO by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 µg/mL cordycepin and 2 µg/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean±SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

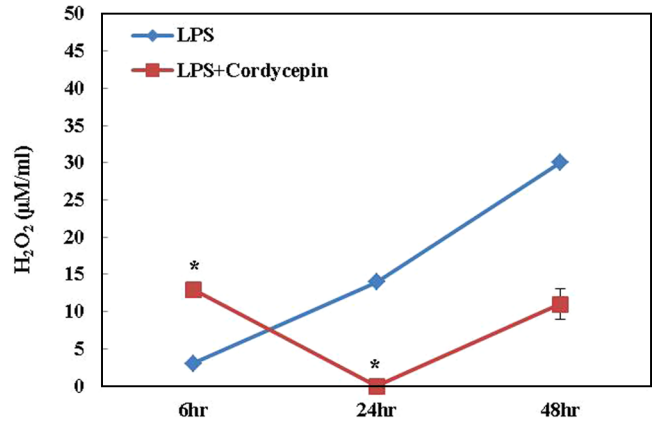


Fig. 7. Production of H₂O₂ by cordycepin and LPS in peritoneal macrophages. Macrophages were cultivated with 10 µg/mL cordycepin and 2 µg/mL LPS for 6, 24, 48 h respectively. Data are shown as mean±SD. *Significant difference from control $p < 0.05$.

후기에 작용하여 활성화를 나타내는데 코디세핀에 의해 후기의 분비량이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 초기의 생성은 LPS 보다 낮은 생성을 나타낸 것은 초기 자연면역반응에서 대식세포에 의한 염증반응을 효과적으로 유도하기 위하여 IL-12와 TNF- α 의 활성화를 촉진하여 세포독성 및 NK cell의 작용을 활성화하기 위하여 초기에 낮은 분비량을 나타내었으며, 후기에 B 림프구에 의한 항체생성 면역으로 전환하기 위한 T 림프구의 활성화를 분비량이 증가하는 것으로 사료된다.

따라서 코디세핀은 염증반응에서 대식세포에 의해 다양한 염증매개성 사이토카인을 분비함으로써 다양한 염증반응을 유도하여 선천면역의 상승작용을 보이고, 적응면역반응세포인 T 림프구와 B 림프구를 활성화 시킴으로써 인하여 면역증강작용을 나타낼 것으로 사료된다.

NO의 생성

NO는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine에 의해 합성되며, 세포 내 자극에 의해 신경전달, 혈액응고 및 혈압조절과 같은 다양한 생리적 역할을 한다. 하지만 세포 외 자극으로 활성화되어 세포 내 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성이 증가되면 대식세포의 세포독성작용에 지대한 역할을 보임으로써 조직손상, 유전자 변이, 신경손상 등과 같은 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(28-30).

마우스 복강으로부터 분리된 대식세포에 2 µg/mL의 LPS를 처리하여 세포를 자극시킨 후 10 µg/mL의 코디세핀을 처리하였을 때 생성되는 NO를 nitrate양으로 6, 24, 48시간 동안 측정하였다 (Fig. 6). 그 결과 LPS를 처리하였을 때 0.75±0.00, 1.21±0.09, 1.61±0.09 µM/mL으로 시간에 따라 분비량이 증가하였다. 코디세핀을 함께 처리하였을 때 1.08±0.09, 1.48±0.09, 1.68±0.00 µM/mL의 분비를 나타내어 초기의 생성이 LPS 보다 높은 분비량을 나타내었으며, 후기에 유사한 분비량을 나타내었다. 따라서 코디세핀은 세포 내에서 초기 NO의 생성을 증가시켜 대식세포의 독성작용을 활성화 시킴으로써 면역에 의한 염증 반응을 활성화하는 것으로 사료된다.

H₂O₂의 생성

H₂O₂는 세포 내 대사 과정 중에 생성되는 free radical의 한 종

류로서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이라고 하며, 이는 강력한 산화력을 가지고 있어서 염증반응에서 다량 생성되어 세포의 손상을 초래한다고 알려져 있다(28).

마우스 복강으로부터 분리된 대식세포에 2 µg/mL의 LPS를 처리하여 세포를 자극시킨 후 10 µg/mL의 코디세핀을 처리하였을 때 생성되는 H₂O₂ 양을 6, 24, 48시간 동안 측정하였다(Fig. 7). 그 결과 LPS에서 3.00±0.01, 14.00±0.00, 30.00±0.26 µM/mL으로 시간에 따른 분비량이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 코디세핀을 함께 처리하였을 때 10.56±0.44, 0.00±0.00, 8.58±2.20 µM/mL으로서 LPS보다 초기생성은 약 3배 이상 높은 분비를 나타내었으며 후기에 그 분비량이 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과로서 코디세핀에 의하여 대식세포가 LPS 자극에 의해 분비되는 H₂O₂의 양이 증가함에 따라 초기에 염증반응을 활성화하여 면역반응을 효과적으로 유도하는 것으로 사료된다. 또한 후기에 H₂O₂의 분비량이 감소함에 따라 세포의 산화에 의한 세포손상으로부터 보호작용을 함께 나타낼 것이라고 사료된다.

요 약

본 연구는 동충하초(*Cordyceps militaris*) 유래의 기능성 물질인 코디세핀의 면역활성을 검증하기 위하여 C57BL6 마우스 복강 대식세포를 이용하여 코디세핀이 대식세포의 활성화에 미치는 영향에 대하여 시험하였다. 그 결과 LPS에 의해 유도된 마우스 복강세포는 코디세핀의 작용에 의해 IL-1 β , IL-12, TNF- α 의 염증성 사이토카인의 생성이 증대되어 초기 염증매개 반응을 유도하여 선천면역반응의 활성화와 그리고 면역작용에 있어 후기 적응면역의 전환으로의 T 림프구의 활성화가 예상된다. 또한 IL-6의 생성증대로 활성화된 T 림프구에 의해 B 림프구의 항체생성반응을 매개하는 면역반응도 상승할 것으로 사료된다. 그리고 대식세포에 의한 염증반응에서 염증매개자인 NO와 H₂O₂의 생성을 증대시킴에 따라 대식세포의 독성작용을 활성화시켜 염증반응을 효과적으로 유도할 것으로 보이며, 또한 H₂O₂의 후기 생성을 저해하였는데 이는 염증반응에 유도될 수 있는 세포의 손상으로부터 세포를 보호할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 코디세핀은 외부인자로부터 염증매개성 면역반응의 증강작용을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산) 기술개발사업 (610003-03-1-SB110)의 연구비지원에 의해서 수행되었습니다.

References

- Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327: 291-295 (2010)
- Janeway CJ. How the immune system works to protect the host from infection. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7461-7468 (2001)
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826 (2007)
- Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, Folco E, Ilasaca ML, Feinberg MW, Aikawa M, Libby P. Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF-kappa B1 and attenuates macrophage activation. *J. Biol. Chem.* 283: 9692-9703 (2008)
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8: 217-225 (1994)
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Innate immunity: Tenney S. Kuby Immunology.* 6th ed. Freeman Press, New York, NY, USA. pp. 52-73 (2007)
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Acute and chronic inflammation: Mitchell S. Pathologic basis of disease.* 7th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, USA. pp. 47-86 (2006)
- Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol.* 35: 655-677 (1995)
- Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res.* 40: 97-112 (2007)
- Park C, Hong SH, Lee JY, Kim GY, Choi BT, Lee YT, Park DI, Park YM, Jeong K, Choi YH. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol. Rep.* 13: 1211-1216 (2005)
- Han JY, Im J, Choi JN, Lee CH, Park HJ, Park DK, Yun CH, Han SH. Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soy-beans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells. *J. Ethnopharmacol.* 127: 55-61 (2010)
- Kim CS, Lee SY, Cho SH, Ko YM, Kim BH, Kim HJ, Park JC, Kim DK, Ahn H, Kim BO, Lim SH, Chun HS, Kim DK. *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-gamma production. *J. Ethnopharmacol.* 120: 366-371 (2008)
- Lee H, Kim YJ, Kim HW, Lee DH, Sung MK, Park T. Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 670-674 (2006)
- Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharmacol.* 96: 555-561 (2005)
- Choi S, Lim MH, Kim KM, Jeon BH, Song WO, Kim TW. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. *Toxicol. Appl. Pharm.* 257: 165-173 (2011)
- Jeong JW, Jin CY, Park C, Hong SH, Kim GY, Jeong YK, Lee JD, Yoo YH, Choi YH. Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells. *Toxicol. In Vitro.* 25: 817-824 (2011)
- Jeong JW, Jin CY, Kim GY, Lee JD, Park C, Kim GD, Kim WJ, Jung WK, Seo SK, Choi IW, Choi YH. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int. Immunopharmacol.* 10: 1580-1586 (2010)
- Ramesh T, Yoo SK, Kim SW, Hwang SY, Sohn SH, Kim IW, Kim SK. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) attenuates age-related oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in rats. *Exp. Gerontol.* 47: 979-987 (2012)
- Zhou X, Meyer CU, Schmidtke P, Zepp F. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Pharmacol.* 453: 309-317 (2002)
- Cha JY, Ahn HY, Cho YS, and Je JY. Protective effect of cordycepin-enriched cordyceps militaris on alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rat. *Food Chem. Toxicol.* 60: 52-57 (2013)
- Jeong MH, Seo MJ, Park JU, Kang BW, Kim KS, Lee JY, Kim GY, Kim JI, Choi YH, Kim KH, Jeong YK. Effect of cordycepin purified from *Cordyceps militaris* on Th1 and Th2 cytokines in mouse splenocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1161-1164 (2012)
- Seo MJ, Kim MJ, Lee HH, Park JU, Kang BW, Kim KY, Ryu EJ, Kim JI, Kim KH, Jeong YK. Effect of Cordycepin on the expression of the inflammatory cytokines TNF-alpha, IL-6, and IL-17A in C57BL/6 mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 156-160 (2013)
- Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang YS, Chung NS, Hwang KC, Kim TW. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol.* 545: 192-199 (2006)
- Barbara BM, Stanley MS. *Methods in Cellular Immunology.* W. H. Freeman & Co Ltd., Oxford, UK. pp. 16-17 (1980)
- Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* 65: 4-10 (2007)
- Balkwill FR, Maylor MS, Malik S. Tumor necrosis factor as an anti-cancer agent. *Eur. J. Cancer. Clin. On.* 26: 641-644 (1990)
- Wattford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth. F. R.* 14: 361-368 (2003)
- Lee JY, Ko SH, Lee YJ, Lee SY, Park HJ, Shin TY, Jeon H. Anti-inflammatory Effect of MeOH Extract of cibotium barometz in IFN-gamma and LPS-stimulated mouse peritoneal macrophage. *Korean J. Pharmacogn.* 41: 108-114 (2010)
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754 (2013)
- Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and N G-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316: 209-215 (1996)