

## 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid의 항 감염성관절염효과

한 용 문<sup>#</sup>

동덕여자대학교 약학대학 면역 미생물학교실

(Received September 27, 2007; Revised November 22, 2007)

### Effect of 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid on Septic Arthritis Caused by *Candida albicans*

Yongmoon Han<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract** — A polymorphic fungus, *Candida albicans*, causes various forms of infections such as disseminated candidiasis and vaginitis. Recent reports indicate that the fungus is a main etiological agent for the arthritis. In search of new sources for treatment of the fungal arthritis, we examined 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -GA) against *C. albicans*-caused septic arthritis. The compound is isolated from Glycyrrhizae Radix that is known to have various immunomodulating activities and is one of the most popular herbal medicines. For induction of animal model of a septic arthritis, mice were given an emulsion form of *C. albicans* cell wall mixed with Complete Freund's Adjuvant (CFA) via footpad-injection. To determine prophylactic and therapeutic effects, the component was given to the animals before or after the induction of the arthritis, respectively. Data showed that intraperitoneal administration of 18 $\beta$ -GA resulted in reduction of the inflammation, indicating the component had both prophylactic and therapeutic activities. For investigation of mechanism of the 18 $\beta$ -GA, inhibitory effects on NO (nitric oxide) and on T-lymphocyte proliferation were determined. Results demonstrated that 18 $\beta$ -GA suppressed NO production from LPS (lipopolysaccharide)-treated macrophages and also inhibited proliferation of Con A (concanavalin A)-activated T-cells. Taken together, 18 $\beta$ -GA, a pentacyclic triterpene, has anti-arthritic activity against *C. albicans*-caused septic arthritis, possibly by blocking NO production and T-cell suppression.

**Keywords** □ septic arthritis, *C. albicans*, 18 $\beta$ -GA, immunomodulating, inflammation, NO, T-cells, mice

최근 전 세계적으로 천연물(natural product)의 효능에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 국내에서도 국가적 차원에서 천연물에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구의 일환으로, 본 연구에서는 천연물을 선정하여 감염성관절염에 대한 항염증효과를 조사하고자 하였다.

관절염은 관절기형으로 인한 통증으로 일상생활의 질을 저하시키는 고질적인 질환으로 다른 종류의 만성 질환보다 발병률이 높고 유병기간이 장기화되는 경우가 많아 문제가 되고 있다. 일반적으로 관절염은 노화에 의해 발병하는 퇴행성관절염인 골관절염(osteoarthritis)과 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)으로 구분된다. 류마티스 관절염의 경우에는 감염이 진행되는 동안 야기되는 일시적 관절염과 항생제요법으로 감염균을 제거 한

후에도 관절염이 지속되는 만성적 관절염이 있다. 후자와 같은 경우를 감염성관절염(Septic arthritis 또는 Infectious arthritis)이라고 한다. 이와 같은 Septic arthritis는 최근 증가하고 있는 추세인데, 이는 암환자, 당뇨병환자, 간 질환자, 신부전 환자, 저체중 신생아, 장기이식 수술시 면역억제제의 사용, AIDS(후천성 면역결핍) 환자 등의 증가에 기인하는 것으로 알려져 있다.<sup>1-3)</sup> Septic arthritis의 원인균으로, 세균 중에서는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이 가장 대표적이며 진균 중에서는 *Candida albicans*가 큰 비중을 차지하는 것으로 보고되고 있다.<sup>3-5)</sup> 특히, 이중에서도 *C. albicans*에 의한 관절염은 최근에 들어 점차 증가하고 있는 추세이다.<sup>4,5)</sup> 세균성 관절염 치료제는, 항생제와 항류마티스 약물을 병용하며 진균성 관절염의 경우에는 Azole 계열 약품과 polyene 계열의 amphotericin B 등의 항진균제를 단독 또는 병용하여 사용하지만<sup>6)</sup> 감염으로 인한 관절염이 아닌 경우에는 류마티스 관절염용 약물인 DMARDs(disease-modifying anti-rheumatic drugs)만을 환자에게 사용한다.<sup>7,8)</sup> 그러나 DMARDs

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195  
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

는 항관절염효과가 작아 관절염의 완치율이 낮고 약물투여 중단 시에는 관절염이 재발함은 물론 증상이 악화될 위험이 높으며 신독성 및 간독성 등의 부작용이 있고, 장기복용 시 약물에 대한 내성증가 및 기회감염의 증가로 보편적으로 사용하기에는 제한이 있다.<sup>7-9)</sup> 또한, 증상완화를 위해 사용하는 NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs)의 경우 통증과 경직성 증상의 감소효과 이외에는 연골조직보호와 같은 근본적인 치료는 기대할 수 없고, COX-1 효소까지 함께 억제하기 때문에 위장관 장애, 간기능과 신장기능의 저하, 고혈압발생 등의 부작용이 수반되기도 한다.<sup>9)</sup> 따라서, 이러한 기존 치료제의 부작용과 단점 때문에 감염성 또는 퇴행성관절염과 같은 난치성 염증치료에 적용할 수 있는, 부작용이 적고 효과가 높은 새로운 물질 발견의 필요성이 요구되고 있다.

이 연구를 위해, 청열해독(淸熱解毒)에 적용되는 한약재에 대한 문헌고찰을 통해서 항염효과를 가질 것으로 예상되는 Glycyrrhizae Radix(감초)의 주요성분인 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -GA)의 항염증효과를 조사하였다. 18 $\beta$ -GA는 pentacyclic triterpene으로  $\beta$ -amyrin 계열에 속하는 성분으로,<sup>10)</sup> 이 성분은 triterpene 배당체로 감초의 지표성분인 glycyrrhizin의 비당부(aglycone)이기도 하다(Fig. 1). 이 18 $\beta$ -GA는 항괴양, 항종양, 항간독성, 면역조절효과 등의 생리활성효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>11-13)</sup> 본 연구에서 18 $\beta$ -GA의 항관절염 작용기전 조사를 위해 NO(Nitric oxide) 생성억제효과와 CD4+ T-lymphocyte 증식억제 효과를 검색하였는데, 이러한 방법을 선정하게 된 배경은 다음과 같다. 관절염형성과정에는 macrophage, B-lymphocyte, mast cells, fibroblast-like synoviocyte 등의 과다 활성화로 인해 분비되는 염증유발물질이 관여하고,<sup>14-16)</sup> CD4+ T-lymphocyte 증식에서 발생하는 염증성 cytokine 분비 또한 관절염을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>17-19)</sup> 그러므로 CD4+ T-cell을 조절하는 물질은 항관절염 효과가 있을 것으로 예상된다. 이를 근거로 하여, 본 연구에서는 18 $\beta$ -GA의 CD4+ T-lymphocyte 증식억제작용과 함께 NO 생성억제작용에 따른 감염성관절염치료 및 예방효과를 검색하기위해, 감염성 진균 중에서 가장 많은 문제를 야기하는 *Candida albicans*를 사용하여 *in-vivo* 조건하에서 조사하였다.

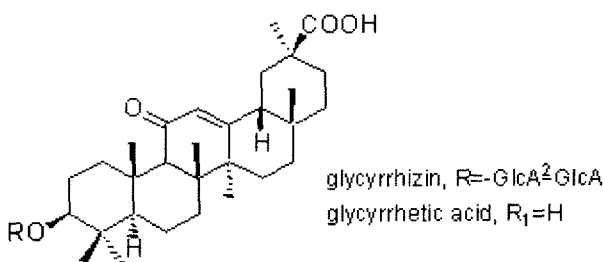


Fig. 1 - Chemical structure of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -GA).

## 실험재료 및 방법

### 실험동물

6~7 주령의 BALB/c 암컷생쥐(Charles River Lab, NY, USA)를 사용하였으며 멸균된 사료(Orient Inc, Seoul, Korea) 및 물을 제공하고, 실험동물이 이를 자유롭게 먹도록 하였다. 구입한 생쥐는 실험실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험하였고, 동물 관리는 동덕여자대학교 동물관리규정에 따라 실험동물을 관리하였다.

### 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -GA)

18 $\beta$ -GA는 Sigma에서 구입하였으며, 실험에 사용하기 전에 endotoxin 오염여부를 상업용 endotoxin 검색 kit(Sigma)을 사용하여 endotoxin 혼재유무를 확인 한 후에 본 실험에 사용하였다.

### C. albicans cell wall extract (CACW)의 분리

C. albicans의 세포벽분리는 본 연구실의 이전 연구에서 보고한 방법을 사용하였다.<sup>20-22)</sup> 이 방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. GYEP(glucose-yeast extract peptone) 액체배지에 배양한 C. albicans 균을 수집하여 disodium EDTA(0.1 M; pH 7.5)와 trisodium EDTA(0.1 M; pH 9.0)로 연속 처리하고 0.3 M 2-mercaptoethanol로 30분 동안 실온에서 처리한 후 상등액을 수집하여 투석막(Sigma, St. Louis, MO, USA; membrane cut-off =12,000 Da)에 넣고 멸균된 탈 이온수를 투석액으로 하여 3일 동안 투석하였다. 투석이 완료된 후 투석막 내부물질을 동결건조(Eyela FD-1000, Tokyo, Japan)하여 분말화 하였다. 추출한 세포벽은 desiccator안에 저장보관 하였다.

### C. albicans기인성 관절에 대한 18 $\beta$ -GA의 효과검색

본 연구실의 이전 연구에서 정립된 관절염동물모델<sup>1)</sup>을 사용하여 18 $\beta$ -GA의 항관절염효과를 검색하였다. 간략히 기술하면, 1 ml CFA(Complete Freund's Adjuvant; GibcoBRL, NY, USA)와 1 ml DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline solution; Sigma)에 용해한 C. albicans cell wall(CACW; 1 mg)을 혼합하여 sonicator(Sonics & Materials Inc, CT, USA)로 유회시킨 후 syringe를 이용하여 50  $\mu$ l/mouse 용량으로 생쥐의 오른쪽 발바닥(footpad)에 피하주사하여 족부종을 유발시킨 후 이 생쥐에게 18 $\beta$ -GA를 1회 1 mg/mouse 농도로 3일에 한번씩 3회 복강 내로 투여하였다. 음성대조군 생쥐에게는 18 $\beta$ -GA 대신 희석액으로 사용한 DPBS를 투여하였다. 예방효과를 검색하기 위하여 족부종 유발을 시작한 날짜(0 일)를 기점으로 하여 -9, -6, -3 일에 18 $\beta$ -GA를 먼저 투여하고 마지막 약물투여 3일 후에 상기 방법에 따라 족부종을 유발하기 위해 CACW와 CFA의 혼합물(CACW/CFA)을 접종하였다. 그리고 치료효과를 검색하기 위해서 CACW/CFA

을 상기 방법처럼 생쥐에 접종하고 3, 6, 9일에 18 $\beta$ -GA를 투여하였다. 족부종의 정도는 3일에 한번씩 dial calipers(Mitatoyo Co., IL, USA)로 측정하였다. 각 그룹은 생쥐 5마리씩으로 구성하였다. 부종억제정도는[(약물투여군의 일정시간 후의 평균 부종율-대조군의 일정시간후의 평균 부종율)/대조군의 일정시간 후의 평균부종율] $\times 100$ 으로 계산하여 부종억제율(%)로 환산하였다.

### 18 $\beta$ -GA의 nitric oxide(NO) 생성억제검색

본 연구실의 이전 실험에 사용한 방법<sup>1)</sup>을 통해 18 $\beta$ -GA의 NO 생성억제여부를 검색하였다. 즉, RAW264.7 monocyte/macrophage cell line을 RPMI 1640 배지(Sigma)에 배양한 후 다양한 농도의 18 $\beta$ -GA로 처리하고, Griess 시약을 사용하여 NO 생성 억제 유무를 검색하여 항염증효과 여부를 조사하였다.

### 18 $\beta$ -GA의 T-lymphocyte 증식억제효과

6주령의 Balb/c 암컷생쥐에서 splenocyte를 무균조작으로 채취하여 RPMI 1640 배지에 넣고 35°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 본 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 이 splenocytes (5 $\times 10^6$  cells/well)에 concanavalin A(5 mg/ml; C2010; Sigma)를 투여하고 다양한 농도(5~80 mM)의 18 $\beta$ -GA를 첨가하였다. 이를 동일한 배양조건에서 72시간 배양한 다음 CCK-8(Cell Count Kit-8; Dojindo Lab; Japan)를 투여하고 3시간 더 배양한 후에 T-lymphocytes의 증식억제효과를 검색하였다.

### 통계 처리

실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차(Mean $\pm$ S.E.)로 계산하였다. 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였고 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 실험결과 및 고찰

### C. albicans 기인성 관절염에 대한 예방효과

생쥐에 18 $\beta$ -GA 또는 DPBS를 먼저 투여하고, 이 후 C. albicans 세포벽으로 족부종을 유발시킨 예방효과조사결과에서 18 $\beta$ -GA를 투여받은 생쥐는 성분대신 DPBS를 투여 받은 대조군에 비해서 족부종이 감소되었다(Fig. 2). 즉, 관측 6일째는 음성대조군과 비교할 때 대략 15% 정도의 족부종 감소가 있었으며 12일, 15일에는 35%와 38% 정도로 족부종이 억제되어 C. albicans로 유발된 감염성관절염에 대해 18 $\beta$ -GA가 항관절염효과를 가진다는 것을 알 수 있었다( $P < 0.05$ )(Fig. 2). 이 18 $\beta$ -GA의 항관절염효과는 총 30일의 관찰기간 종료 때 까지 음성대조군 생쥐의 족부종과 비교 했을 때 그 억제정도가 전반적으로 지속적으로 유지됨을 알 수 있었으며, 반복실험에서도 유사한 결과가 관찰되었다.

### C. albicans 기인성 관절염에 대한 치료효과

생쥐에 족부종을 먼저 유발시킨 다음에 약물(18 $\beta$ -GA)을 투여하여 치료효과를 검색한 결과에서도 18 $\beta$ -GA의 감초성분은 항관절염효과가 검색되었다(Fig. 3). 하지만 예방효과의 결과와 비교

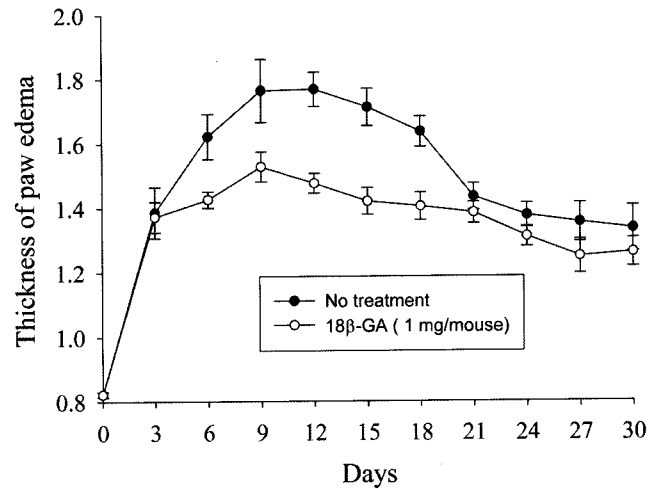


Fig. 2 - Prophylactic effect of 18 $\beta$ -GA on *C. albicans* cell wall (CACW)-induced septic arthritis. The 18 $\beta$ -GA resulted in reduction of footpad-edema of the mice groups that were treated with 18 $\beta$ -GA when compared to mice groups that received only DPBS instead of 18 $\beta$ -GA. Difference between the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Repeated experiments displayed the similar results. Thickness of the edema was measured by a dial gauger in arbitrary unit (AU). Each group contained five mice. Bar indicates SE.

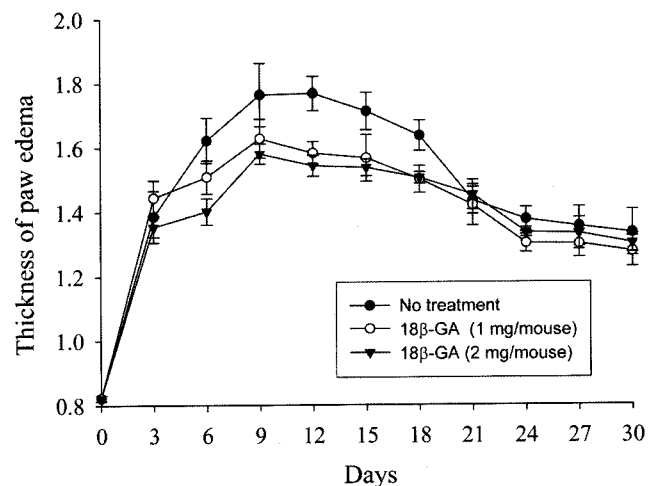
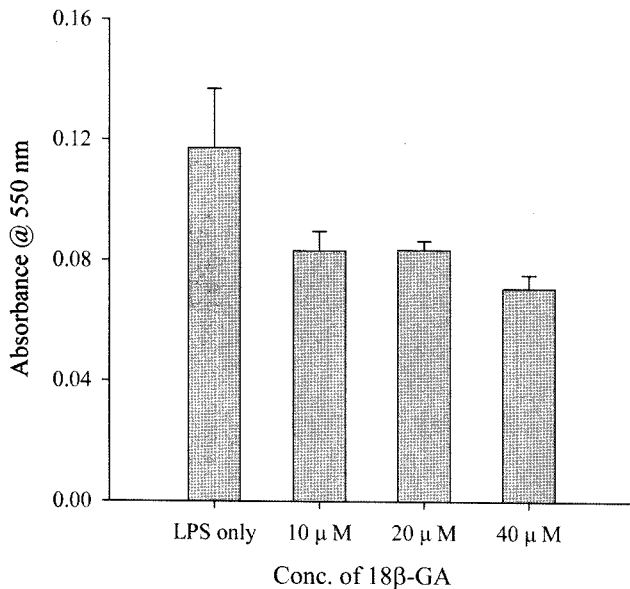


Fig. 3 - Therapeutic activity of 18 $\beta$ -GA against the septic arthritis. Mice having septic arthritis caused by *C. albicans* cell wall mixed with CFA had reduced footpad-edema when they were treated with 18 $\beta$ -GA. Repeated experiments displayed the similar results. Thickness of the edema was measured by a dial gauger in arbitrary unit (AU). Each group contained five mice. Bar indicates SE.

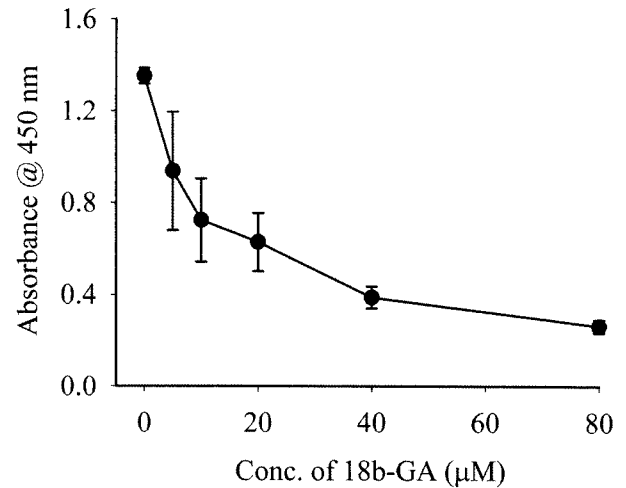
할 때, *C. albicans* 기인성 관절염에 대한 관절염치료효과는 다소 떨어짐이 관측되었다(Fig. 2 & 3). 한편, 족부종 염증이 가장 절정에 이르는 6일째서부터 18일째 까지의 기간 동안에 음성대조군과 비교했을 때 대략 20% 정도의 족부종 감소가 유지됨을 알 수 있었다( $P < 0.05$ )(Fig. 3). 또한 18β-GA의 농도가 증가하면 더 높은 항관절염 치료효과가 관측되어 이 효과는 농도의존적임을 알 수 있었다(Fig. 3).

#### NO 생성억제효과

18β-GA가 나타내는 항관절염효과의 작용기전을 검색하기 위해 우선적으로 관절염 발생시 염증부위로 이동하여 부종을 유발하는 macrophage와 활성화된 macrophage에 의한 NO 생성에 대하여 18β-GA의 NO 생성억제효과를 조사하였다. 실험결과, 18β-GA로 처리한 macrophage에서의 NO 생성량은 감소되었으나 LPS만으로 처리한 macrophage(양성대조군)과 비교할 때 그 효과가 현저하지는 않았다(Fig. 4). 10 mM의 18β-GA 농도로 처리했을 경우에는 대략 40%의 NO 생성이 억제되었다( $P < 0.05$ )(Fig. 4).



**Fig. 4** – Inhibitory effect of 18β-GA of NO production from LPS-treated macrophages. To determine if 18β-GA has inhibitory activity on NO production, RAW 264.7 macrophage cell line that was activated with LPS was treated with this 18β-GA, and NO production were measured with use of the Griess reagent. Results showed that the component blocks NO production from the LPS-activated macrophages. Addition of 18β-GA (10 μM) to the LPS-activated macrophages reduced approximately 35% of the NO production as compared with LPS-activated macrophages that received DPBS (diluent) ( $P < 0.05$ ). These values were averages of triplicate repeated experiments. Bar indicates SE.



**Fig. 5** – Suppressive effect of 18β-GA suppresses on the proliferation of T-cells activated with Con A. To determine if T-cells were partially responsible for the reduction of septic arthritis, effect of 18β-GA on T-cell proliferation was examined. Results displayed that the proliferation was inhibited by treatment of the component. At 40 μM of the component, there was almost 80% reduction of the proliferation ( $P < 0.05$ ). This effect was dose-dependent. These values were averages of triplicate repeated experiments. Bar indicates SE.

#### T-lymphocyte 증식억제효과

T-lymphocyte는 관절염을 악화시키는 것으로 보고되고 있다. 이를 근거로 하여 18β-GA의 항관절염 작용기전을 조사하기 위해서 이 감초성분의 T-lymphocyte 증식억제에 대한 효과를 검색하였다. 즉, T-lymphocyte의 증식을 촉진하는 것으로 알려진 concanavalin A(Con A)로 처리한 다음에 이 감초성분을 투여해서 18β-GA의 T-lymphocyte 증식억제효과를 측정하였다. 실험결과, 40 mM의 농도에서는 거의 80% 이상의 T-lymphocyte의 증식억제효과가 있었으며( $P < 0.05$ ), 이 억제효과는 농도의존적이었다(Fig. 5).

## 결 론

감초성분인 18β-GA에 대한 다양한 약물학적 효과를 연구한 결과가 보고되고 있으나, *C. albicans*로 기인되는 감염성관절염에 대한 효과는 아직 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 이에 대한 조사를 위해서 본 연구실에서 고안한 기존의 감염성 관절염 동물모델을 사용하였다. 염증을 유발시키기 위해서 CFA를 병용한 이유는 관절염 형성을 증진시키기 위함이었다.<sup>1)</sup> 이 *C. albicans* 기인성 관절염 Balb/c 생쥐(동물)모델을 사용하여 조사한 결과, 18β-GA는 감염성 관절염에 대해서 예방효과 뿐만 아니라 치료효과도 있음이 규명되었다. 치료효과의 경우에는 농도 의존적으로 항 관절염효과가 관측되었고, 관절염 유발이 증가해

서 감소되는 기간(Fig. 2 참조. 3일~15일 기간)에는 2 mg 18 $\beta$ -GA로 처리했을 경우 1 mg 18 $\beta$ -GA로 처리했을 때보다 더 높은 치료효과를 보였다. 이 항 감염성관절염 효과의 작용기전을 조사하기 위해서 먼저 macrophage에서 생성되는 NO의 양을 대조군의 경우와 비교하였다. 결과적으로 18 $\beta$ -GA가 macrophage의 활성을 억제하여 NO 생성을 감소시킴을 Griess 시험법으로 확인할 수 있었다. 이 결과를 고찰할 때, 관절염이 유발되면 macrophages가 그 관절염 발생부위로 유입되어 부종이 형성되고,<sup>15,22)</sup> 자극된 macrophage에서 NO가 생성 분비되어서 주변의 세포와 조직을 파괴하기 때문에 통증이 야기되는데,<sup>14,23)</sup> 이 감소 성분은 관절염부위에 유입된 macrophages로부터 NO 생성을 억제하여 *C. albicans*로 인한 관절성 염증을 감소시키는 것으로 사료된다. 최근에는 CD4+ T-lymphocyte가 관절염유발에 관여하는 것으로 보고되고 있는데, 면역학적 방법으로 anti-CD4 monoclonal antibody를 관절염 치료제로 적용하고자 하는 추세이기도 하다.<sup>24,25)</sup> 이를 근거로 해서 본 연구에서는 18 $\beta$ -GA의 T-lymphocyte에 대한 증식억제효과를 검색한 바, 이 감소 성분은 Con A로 처리된 T-lymphocyte의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 그러므로 18 $\beta$ -GA의 항 감염성관절염의 작용기전은 NO 생성억제와 함께 T-cell의 증식억제에 의한 것으로 고려되어 진다. 본 연구결과를 종합하면, 천연물에서 획득되는 감초의 18 $\beta$ -GA 성분이 *C. albicans*로 기인되는 관절염의 치료에 효과가 있다는 사실과 그 작용기전이 규명되었고, 이는 18 $\beta$ -GA가 부작용이 심한 기존의 *Candida*성 관절염 치료제를 대신할 수 있는 방안으로 사용될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 본 연구실에서는 이 결과를 바탕으로 하여, 더욱 효과적인 18 $\beta$ -GA의 전달을 위해 이 성분을 liposome에 포접시킨 제형을 개발하여 항 감염성 관절염효과를 증대시키는 연구가 현재 진행 중에 있다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2006년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

### 문 헌

- Han, Y. : Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritis. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 1049 (2005).
- Lee, S. and Han, Y. : Isolation and analysis of ginkgolides compound from EGb 761. *Dongduk Pharm. Res.* **7**, 39 (2003).
- Cuende, E., Barbadillo, C. E., Mazzucchelli, R., Isasi, C., Trujillo, A. and Andreu, J. L. : *Candida* arthritis in adult patients who are not intravenous drug addicts: report of three cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* **22**, 224 (1993).
- Lerch, K., Kalteis, T., Schubert, T., Lehn, N. and Grifka, J. : Prosthetic joint infection with osteomyelitis due to *Candida albicans*. *Mycoses.* **46**, 462 (2003).
- Azaceta, G., Olave, T., de los Martires, L. D., Delgado, C., Gutierrez, M. and Palomera, L. : Successful lipid-complexed amphotericin B treatment of *Candida* arthritis in a lymphoma patient. *Rev. Rhum. Engl.* **66**, 434 (1999).
- Choi, I. S., Kim, S. J., Kim, B. Y., Joh, J. W., Kim, Y. I., Lee, S. K., Huh, W. S., Oh, H. Y., Kim, D. J., Kim, Y. G., Kim, M. K., Ko, Y. H. and Lee, B. B. : *Candida* polyarthritis in a renal transplant patient: case report of a patient successfully treated with amphotericin B. *Transplant Proc.* **32**, 1963 (2000).
- Lee, D. M. and Weinblatt, M. E. : Rheumatoid arthritis. *Lancet.* **358**, 903 (2001).
- Felson, D. T., Anderson, J. J. and Meena, R. F. : Use of short-term efficacy/toxicity tradeoffs to select second-line drugs in rheumatoid arthritis: a metaanalysis of published clinical trials. *Arthritis Rheum.* **35**, 1117 (1992).
- Bauer, H. and Marker-Hermann, E. : Therapy with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Orthopade.* **32**, 1088 (2003).
- Ukil, A., Biswas, A., Das, T. and Das, P. K. : 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid triggers curative Th1 response and nitric oxide up-regulation in experimental visceral leishmaniasis associated with the activation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* **175**, 1161 (2005).
- Carlo, F., Mario, P. and Gioglio, P. : Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *FARMACO* **53**, 22 (1998).
- Jeong, H. G., You, H., Park, S. J., Moon, A. R., Chung, Y. C., Kang, S. K. and Chun, H. K. : Hepatoprotective effects of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol. Res.* **46**, 221 (2002).
- Berg, A. J., Wolbink, G. J. van Dijk, H. and Labadie, R. P. : Inhibition of human complement by glycyrrhetic acid. *Immunology* **90**, 115 (1997).
- Kinne, R. W., Brauer, R., Stuhlmüller, B., Palombo-kinne, E. and Burmester, G.-R. : Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2**, 189 (2000).
- Nissler, K., Pohlers, D., Huckel, M., Simon, J., Brauer, R. and Kinne, R. W. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 1470 (2004).
- Paniagua, R. T., Sharpe, O., Ho, P. P., Chan, S. M., Chang, A., Higgins, J. P., Tomooka, B. H., Thomas, F. M., Song, J. J., Goodman, S. B., Lee, D. M., Genovese, M. C., Utz, P. J., Steinman, L. and Robinson, W. H. : Selective tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate for the treatment of autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* **116**, 2633 (2006).

- 17) Colic, M., Vucevic, D., Kilibarda, V., Radicevic, N. and Savic, M. : Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes *in vitro* stimulated with concanavalin A. *Phytomedicine*. **9**, 117 (2002).
- 18) Gao, X., Deeb, D., Media, J., Divine, G., Jiang, H., Chapman, R. A. and Gautam, S. C. : Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant *in vitro* and *in vivo* immunological effects. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 2427 (2003).
- 19) Ranjan, D., Chen, C., Johnston, T. D., Jeon, H. and Nagabhushan, M. : Curcumin inhibits mitogen stimulated lymphocyte proliferation, NFkappaB activation, and IL-2 signaling. *J. Surg. Res.* **121**, 171 (2004).
- 20) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 21) Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).
- 22) Han, Y., Ulrich, M. A. and Cutler, J. E. : Candida albicans mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**, 1477 (1999).
- 23) Lotito, A. P., Muscara, M. N., Kiss, M. H., Teixeira, S. A., Novaes, G. S., Laurindo, I. M., Silva, C. A. and Mello, S. B. : Nitric oxide-derived species in synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol.* **31**, 992 (2004).
- 24) Pohlers, D., Nissler, K., Frey, O., Simon, J., Petrow, P. K., Kinne, R. W. and Brauer, R. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin. Exp. Immunol.* **135**, 409 (2004).
- 25) Nissler, K., Pohlers, D., Hckel, M., Simon, J., Brauer, R. and Kinne, R. W. : Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 1470 (2004).