

LPS로 유도한 대식세포에서 MAP kinase의 억제에 의한 九寶飲의 NO, TNF- α , IL-6, IL-12 생성 억제 효과

이병순¹ · 신조영¹ · 이시형^{1,2,3*}

1: 원광대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 2: 원광대학교 한의학전문대학원, 3: 한국전통의학연구소

Effects of GuBoEum Inhibiting NO, TNF- α , IL-6 and IL-12 Production by Blocking MAP Kinase Activation in LPS-induced Murine Macrophages

Byung Soon Lee¹, Jo Young Shin¹, Si Hyeong Lee^{1,2,3*}

1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.
2: Department of Professional Oriental Medicine Graduate School of Wonkwang University.
3: Research Center of Traditional Korean Medicine

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of extract from GuBoEum(GBE) on the peritoneal macrophage. To evaluate anti-inflammatory effects of GBE, I measured cytokines (interleukin-6; IL-6, interleukin-12; IL-12, tumor necrosis factor- α ; TNF- α) and nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages. Furthermore, I examined molecular mechanism using western blot and also LPS-induced endotoxin shock. Extract from GBE does not have any cytotoxic effect in the peritoneal macrophages. Extract from GBE reduced LPS-induced IL-6, TNF- α , IL-12 and NO production in peritoneal macrophages. GBE inhibited the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) but not of p38, degradation of I κ B- α in the LPS-stimulated peritoneal macrophages. GBE inhibited the production of TNF- α , IL-6 and IL-12 in serum after LPS injection. These results suggest that GBE may inhibit the production of TNF- α , IL-6, and IL-12 through inhibition of ERK and JNK activation, and that GBE may be beneficial oriental medicine for inflammatory diseases.

Key words : GuBoEum(GBE), oriental medicine

서 론

九寶飲은宋代蘇軾,沈括의『蘇沈良方』¹⁾에“治積年肺氣”라고 처음收錄되었고 후대 의서에서는“治經年喘嗽 脈浮起於外感者”²⁾라 하여寒嗽,久嗽 등^{3,5)}에 응용하였다.

해수(기침)는 일종의 보호성 반사동작으로서 기도내의 분비물을 체외로 배제시키려는 본능적 행태인 동시에, 한편으로는 병리적 의의를 가진 기도질환의 상견증상이기도 하다. 해수는 호흡중추가 자극을 받아 일어나는 것으로서, 어떤 자극들은 호흡기관이 아닌 곳으로부터 오기도 하지만, 대부분은 호흡기관의 점막으

로부터 오며 미주신경과 설인신경이 이들 자극을 전달해주는 작용을 한다. 반사적으로 해수를 일으키는 원인으로는 기도점막이나 폐조직이 염증·부종·이물질 또는 과도한 분비물에 의한 자극과 압박을 받거나 흥막이 받는 자극 등을 들 수 있다⁶⁾.

Lipopolysaccharide (LPS)는 인체에 염증반응을 일으키는 내독소(endotoxin)로서⁷⁾ 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α ; TNF- α), Interleukin (IL)-1b, -6, -12 등과 같은 전염증성 세포활성 물질(pro-inflammatory cytokine) 및 nitric oxide (NO)를 유리시켜 염증반응을 일으킨다⁸⁾. 이 세포활성 물질들은 면역세포를 활성화시켜 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와주나, 과량 생산되면 정상조직까지 파괴시켜 쇼크를 야기하기도 한다⁹⁾.

최근 한약의 LPS로 유발된 염증관련 인자들의 발현 억제에 대한 실험적 연구들이 활발하다^{10,11)}.

* 교신저자 : 이시형, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 익산한방병원 6내과

· E-mail : lsh@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-859-2806

· 접수 : 2008/11/19 · 수정 : 2008/12/20 · 채택 : 2009/01/12

九寶飲은 이¹²⁾가 기관지 평활근 확장효과에 대해 보고한 바 있으나, 九寶飲이 전염증성 세포활성 물질과 NO의 생성에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 저자는 九寶飲의 항염증 효과를 검증하기 위해 복강 대식세포에 九寶飲을 전 처리하고 LPS로 자극한 후, NO, pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6, IL-12)의 발현과 작용기전을 조사하였다. 또한 생체 내에서 九寶飲의 효과를 규명하기 위하여 쇼크 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

C57BL/6 6주령 암컷 마우스를 (주)오리엔트바이오(S. Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 九寶飲은 《東醫寶鑑》³⁾에 기재된 내용을 근거로 하였고, 원광대학교 한의과대학 부속 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 1점의 내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. The Prescription of GuBoEum(GBE)

herbal name	amount(g)
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	4
<i>Menthae Herba</i> (薄荷)	4
<i>Ephedrae Herba</i> (麻黃)	4
<i>Cinnamomi Cortex</i> (桂皮)	4
<i>Mori Cortex</i> (桑白皮)	4
<i>Perillae Folium</i> (紫蘇葉)	4
<i>Arecae Pericarpium</i> (大腹皮)	4
<i>Mume Fructus</i> (烏梅)	4
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	4
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (生薑)	2
Total amount	38

3) 시약 및 기기

Fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서, 배양조는 Corning (Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 HEPES, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS (Serotype : 055: B5), Tris-HCl 등은 SIGMA (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2 Ab, anti-phospho-p38 Ab, anti-I κ -B- α Ab, anti-phospho-JNK Ab, anti-p38 Ab, anti-ERK 1/2 Ab, anti-JNK Ab는 Cell signaling (Denvers, USA)사에서 구입하였다. anti-mouse IL-6 Ab, anti-mouse TNF- α Ab, anti-mouse IL-12 Ab, 재조합 IL-6, TNF- α , IL-12는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

실험에 사용된 약제는 九寶飲 100 g을 1 l의 3차 증류수로 2시간 30분동안 전탕하여 거즈로 여과한 다음 -70 $^{\circ}$ C (Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, Freezing Dryer로 동결 건조시켜서 3.25 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말을 농도별로 생리식염수에 녹여 filter (0.2 μ m syringe filter)로 여과해서 사용하였다.

2) Peritoneal macrophage의 배양

실험 3일전에 실험 마우스에 염증 물질 (thioglycollate 2.5 ml)을 복강 내에 주입하고 실험당일 cervical dislocation으로 희생시킨 후 RPMI 1640 + 10% FBS medium 7 ml를 복강 내에 주입하여 1분간 마우스 복강을 마사지한 뒤 복강액을 뽑아낸다. 유출된 복강세포는 4 $^{\circ}$ C, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리한 후 10% FBS를 함유하고 1% penicillin이 보충된 RPMI 1640에 현탁한 후 cell을 counting해서 1 \times 10⁶ cells/ml로 6 cm Dish나 Plate에 seeding하고 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고 suspension 세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다.

3) MTT 분석

실험방법은 Kostova¹³⁾의 방법을 약간 변형하였다. 대식세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주 빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정하였다. 지수성장을 하는 세포들은 RPMI 1640배지에서 1 x 10⁶ cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 AETD로 처리하였다. 4시간 동안 배양한 후 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위하여 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해 완충액 (50% n,n-dimethylformamide을 포함하는 20% SDS 용액, pH 4.7)을 첨가하여 용해한 다음 20~24시간 동안 배양하였다. formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정하였다.

4) Nitric Oxide (NO) 농도의 측정

실험방법은 Lee¹⁴⁾의 방법을 약간 변형하였다. NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent : 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100 μ l씩 첨가하고 그 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 spectrophotometer (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

5) Cytokine의 측정

실험방법은 Huh¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하였다. TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12에 특이한 마우스의 monoclonal 항체로 코팅된 96-well plate를 0.05% Tween 20이 포함된 PBS로 washing하고 재조합된 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12를 희석하여 standard로 사용

한다. 희석액은 10 ng/ml로 시작하여 standard curve를 그리게 한다. 37°C에서 2시간동안 배양한 후 well을 다시 세척하고 각각에 biotinylated anti rat TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 0.2 g/ml를 넣는다. well을 세척한 후 avidin-peroxidase를 넣고 37°C에서 20분간 배양한다. 다시 well을 세척하고 ABTS substrate를 넣는다. 자동 microplate ELISA reader를 사용하여 405 nm로 분석한다.

6) RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

실험방법은 Chen¹⁶⁾의 방법을 약간 변형하였다. Total RNA는 Tri-zol (invitrogen, USA) 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 九寶飲을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml 씩 가해 세포를 포집한 후 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두세 번 잘 섞어준 뒤 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다. Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 간단히 기술하자면 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70°C에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase 을 첨가하고 42°C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초간 동안 30cycle 반복하였다. PCR반응이 끝난 후 1X 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10 μ l을 넣고 전기영동 한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

inos(306bp)	TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG (forward) GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG (reverse)
tnf- α (276bp)	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC (forward) TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT (reverse)
il-6(463bp)	CAT CCA GTT GCC TTC TTG GGA (forward) CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG (reverse)
il-12(110bp)	AGG CGA GAC TCT GAG CCA C (forward) CTT CAC ACT TCA GGA AAG TCT (reverse)
β -actin(514bp)	TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G (forward) TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C (reverse)

7) Western blot analysis

실험방법은 Lee¹⁴⁾의 방법을 약간 변형하였다. 복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60 mm culture dish에 1 \times 10⁶ cells/ml로 세포를 배양하고, serum free media (RPMI1640)로 12시간 starvation시킨 다음, 九寶飲 (500 mg/ml)으로 전 처리하고, 그 후 30분 후 LPS (500 ng/ml)로 자극한 다음, cold PBS로 3회 세척하였다. 시간별 (0, 15, 30, 60 min)로 cell을 harvest하여 cell을 얻은 후 원심분리 (5,000 rpm, 5min) 하여 그 상층액을 버리고

cell pellet를 수거하였다. Lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 ml + protease inhibitor 10 ml)를 넣어 단백질을 lysis시키고, 원심분리 (15,000 rpm, 20min)하여 찌꺼기를 침전시키고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질에 sampling buffer (4X)를 같이 넣어 섞은 다음, 그 sample을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 membrane에 옮기고 5% skim milk로 2시간 blocking하였다. ERK, p38, JNK의 인산화와 I κ B- α 를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

8) LPS 유도성 쇼크

실험방법은 Kawai¹⁷⁾의 방법을 약간 변형하였다. Endotoxin shock은 C57/BL6 mice (암컷, 7-8 주령) 마우스에 LPS (from E. coli serotype O55:B5, 50 mg/kg)를 복강주사 하여 유발하였다. 먼저 마우스를 10마리씩 3개의 군으로 나누고 첫 번째 군은 생리 식염수, 두 번째 군은 LPS (50 mg/kg)을 복강 주입한 집단, 세 번째 군은 九寶飲 (50 mg/kg, 500 mg/kg)을 매일 5일간 경구투여하고 LPS (50 mg/kg)를 주사하여 마우스의 생존율을 12시간 단위로 84시간동안 관찰하였다.

9) In vivo 실험모델

九寶飲 추출물을 한 군에 6마리씩 마리당 50 mg/kg과 500 mg/kg 두 가지 농도를 5일간 경구투여 한 뒤 LPS (50 mg/kg)를 복강주사 하였다. 그 후 3시간 후에 마우스를 마취하여 심장에서 마우스 혈액을 1 ml 실린지로 뽑아낸 후 2,000 rpm으로 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액 serum만 분리하였다. 이 분리한 serum을 ELISA법으로 TNF- α , IL-6, IL-12를 정량하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 student's t-test에 준하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 九寶飲이 대식세포의 독성에 미치는 영향

九寶飲의 세포독성을 알아보기 위하여 마우스의 대식세포에 九寶飲 추출물 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml를 처리하고, 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 九寶飲 추출물은 0.1 mg/ml에서는 97.3 \pm 4.3%, 0.5 mg/ml에서는 98.5 \pm 3.3%, 1.0 mg/ml에서는 96.5 \pm 4.5%로 九寶飲은 대식세포에 대한 독성작용이 없었다(Fig. 1).

2. 九寶飲이 NO 생성에 미치는 영향

九寶飲의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대식세포에 LPS로 자극한 후 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 九寶飲 추출물 (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml)로 30분간 전처리하고, LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정하였다. 그 결과, 대조군에서는 NO의 생성이 45.016 \pm 1.756 μ M 이었으나, 九寶飲 추출물을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml로 전처리한 실험군에서의 NO의 생성은 각각 29.97 \pm 0.985 μ M, 19.157 \pm 0.804 μ M, 19.753 \pm 0.837 μ M로

나타났고, NO생성을 유도하는 iNOS mRNA 역시 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2).

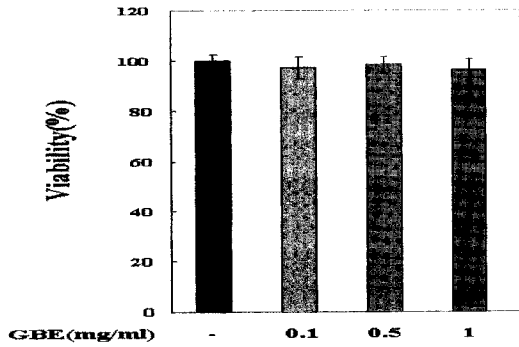


Fig. 1. The effect of GBE on cytotoxicity in peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were incubated for 24 hrs in the presence or absence of GBE at indicated dose. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data show the means value of three independent experiment and error bars show standard deviation.

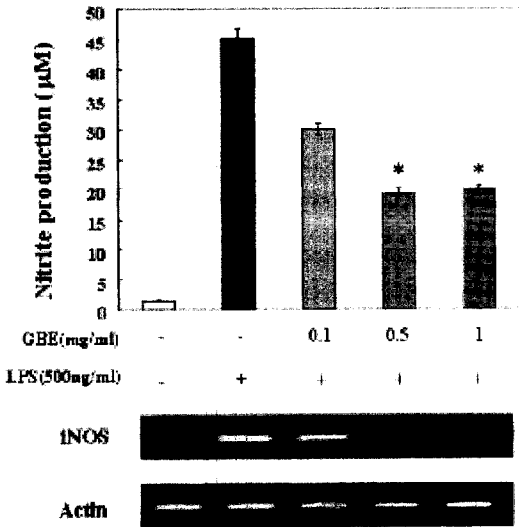


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by GBE. Cells were pretreated with or without extract of GBE at indicated concentration for 30 min, and then stimulated in the presence of LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. NO production and the level of iNOS mRNA was measured by the method of Griess and RT-PCR respectively. Data are means of three independent experiment (*p<0.05).

3. 九寶飲이 종양괴사인자 (TNF- α) 발현에 미치는 영향

九寶飲 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도되는 TNF- α 의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 九寶飲 추출물을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml)로 30분간 전처리한 후 LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정 한 결과, 대조군에서는 TNF- α 의 생성이 1.111 \pm 0.23 ng/ml 이었으나, 九寶飲 추출물을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml로 전처리한 실험군에서의 TNF- α 의 생성이 각각 0.061 \pm 0.008 ng/ml, 0.064 \pm 0 ng/ml, 0.063 \pm 0.008 ng/ml로 나타내었고, TNF- α 의 mRNA는 그림과 같이 억제하였다(Fig. 3).

4. 九寶飲이 IL-6 발현에 미치는 영향

九寶飲 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도되는 cytokine들

의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위하여 IL-6의 생성을 조사하였다. 九寶飲 추출물을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml)로 30분간 전처리한 후 LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정 한 결과, 대조군에서는 IL-6의 생성이 17.616 \pm 0.6 ng/ml 이었으나, 九寶飲 추출물을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml로 전처리한 실험군에서의 IL-6의 생성은 각각 6.676 \pm 0.406 ng/ml, 3.512 \pm 0.202 ng/ml, 1.987 \pm 0.248 ng/ml로 나타내었다. 따라서 九寶飲 추출물은 LPS에 의한 IL-6 생성을 농도 의존적으로 억제 하였고 또한 그림과 같이 IL-6 mRNA 역시 같은 결과를 얻었다(Fig. 4).

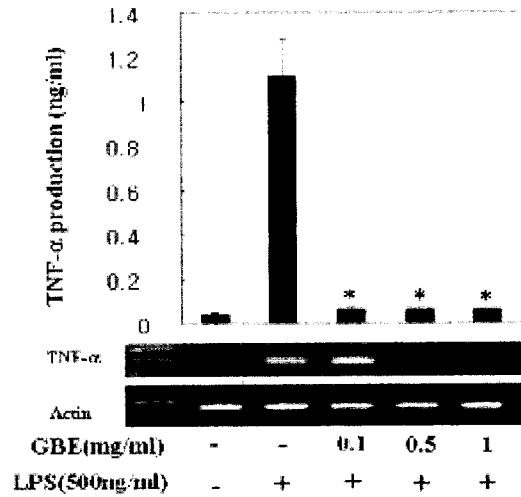


Fig. 3. The effect of GBE on the production of TNF- α in peritoneal macrophages stimulated with LPS. Cells were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30 min, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. TNF- α production and the level of TNF mRNA were measured by ELISA and RT-PCR respectively. Detail experimental methods were described materials and methods. Data are means of three independent experiment (*p<0.05).

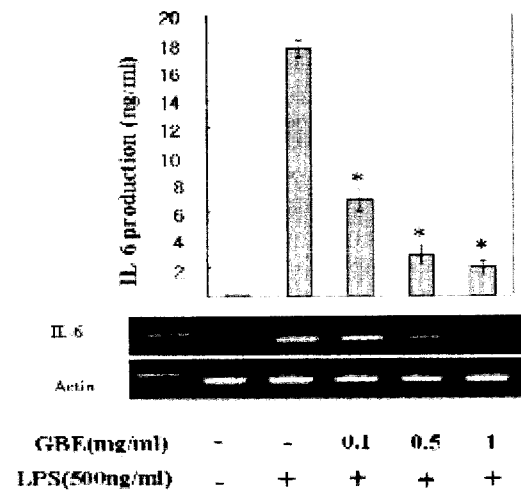


Fig. 4. The effect of GBE on the production of IL-6 in peritoneal macrophages stimulated with LPS. Cells were pretreated with or without extract of GBE at indicated concentrations for 30 min, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. IL-6 production and the level of IL-6 mRNA were measured by ELISA and RT-PCR respectively. Detail experimental methods were described materials and methods. Data are means of three independent experiment (*p<0.05).

5. 九寶飲이 IL-12 발현에 미치는 영향

九寶飲 추출물이 대식세포에서 LPS로 유도되는 cytokine들의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위하여 IL-12의 생성을 조사하였다. 九寶飲을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml)로 30분간 전처리한 후 LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액을 ELISA 방법으로 측정된 결과, 대조군에서는 IL-12의 생성이 3.867±0.567 ng/ml 이었으나, 九寶飲 추출물을 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml로 전처리한 실험군에서는 각각 0.477±0.027 ng/ml, 0.183±0.015 ng/ml, 0.044±0.01 ng/ml로 나타내었고, IL-12 mRNA는 그림과 같이 0.5 mg/ml과 1 mg/ml 농도에서 억제하였고 0.1 mg/ml에서는 약간 억제하였다(Fig. 5).

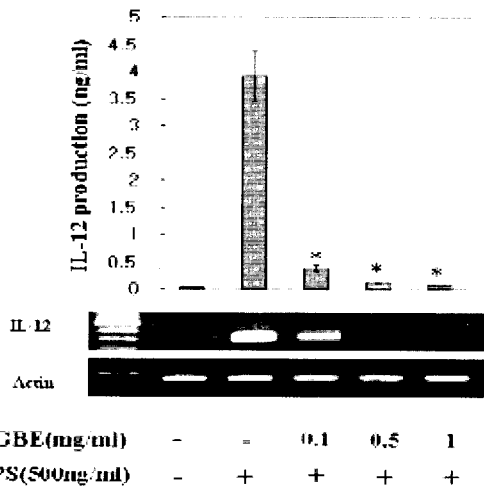


Fig. 5. The effect of GBE on the production of IL-12 in peritoneal macrophages stimulated with LPS. Cells were pretreated with or without extract of GBE at indicated concentrations for 30 min, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hrs. IL-12 production and the level of IL-12 mRNA was measured by ELISA and RT-PCR respectively. Detailed experimental methods were described materials and methods. Data are means of three independent experiments (* $p < 0.05$).

6. MAPK와 NF- κ B 활성에 미치는 九寶飲의 영향

LPS는 MAPK (ERK1/2, p38, JNK) 및 NF- κ B의 활성화를 유도해서 각종 염증성 세포활성물질들을 분비한다. NF- κ B는 자극이 없는 상태에는 세포질에서 I κ B- α 와 결합되어 존재한다. 하지만 활성화시킬 수 있는 신호가 존재하면 먼저 I κ B- α 가 분해되고 NF- κ B는 핵으로 이동하여 다양한 세포활성물질을 생산하게 된다. 九寶飲 500 mg/ml로 30분간 전처리하고, LPS (500 ng/ml)로 자극하였다. 그 후 시간별 (0, 15, 30, 60 min)로 western으로 분해 정도를 조사하였다. 그 결과, 九寶飲 추출물이 LPS에 의한 I κ B- α 의 분해 및 p38의 인산화를 억제하지 못하였다. 하지만 ERK와 JNK의 인산화는 억제하였다(Fig. 6).

7. 九寶飲이 LPS induced Endotoxin shock에서 마우스 생존율에 미치는 영향

九寶飲이 LPS induced Endotoxin shock에서 마우스 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 九寶飲 추출물을 마우스

한 군에 10마리씩 마리당 50 mg/kg과 500 mg/kg 두 가지 농도로 5일 동안 매일 경구투여 한 뒤, 5일째 경구투여 직후 3시간 뒤에 LPS (50 mg/kg)를 복강주사 하였다. 그 후 12시간 단위로 84시간 동안 마우스의 생존율을 조사하였다. LPS만 복강주사한 군에서는 주입 후 60시간까지 모든 개체가 죽는 결과를 보였다. 그러나 九寶飲 추출물을 500 mg/kg 경구 투여한 군에서는 72시간째와 84시간째 20%의 생존율을 나타내었다(Fig. 7).

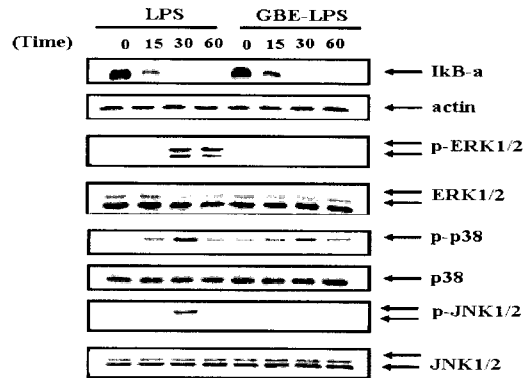


Fig. 6. Effects of GBE on the expression of I κ B- α degradation but not MAP kinase activation. Cells were pretreated with or without each extract at indicated concentrations for 30min, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for indicated time(min). Detailed methods were described Materials and Methods

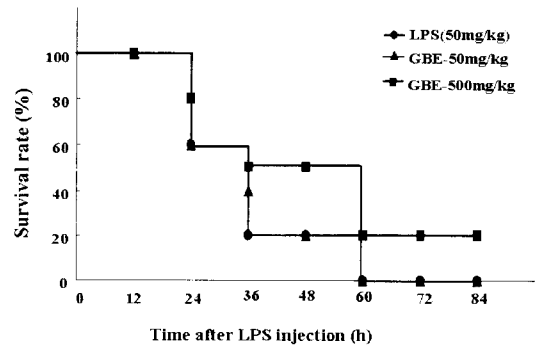


Fig. 7. Effects of GBE on the LPS induced Endotoxin shock. GBE was orally given to the mice (n=10 per group) at 50 mg/kg and 500 mg/kg for 5 days and were injected i.p. with 50 mg/kg of LPS. Survival was monitored for 84 hrs. Similar results were obtained in two additional independent experiments.

8. 九寶飲이 혈청내 TNF- α , IL-6, IL-12 발현에 미치는 영향

九寶飲 추출물을 6마리씩 마리당 50 mg/kg과 500 mg/kg 두 가지 농도를 이용하여 5일 동안 매일 경구투여 후 LPS (50 mg/kg)를 복강주사 한 뒤 염증성 세포활성물질의 생성을 혈청에서 조사하였다. IL-12의 생산량은 정상군에서 0.85±0.16 ng/ml, LPS만 경구투여한 군에서 21.54±1.23 ng/ml로 정상군에 비해 생산량이 증가했으며, 九寶飲 추출물을 50 mg/kg과 500 mg/kg 투여군은 각각 19.23±0.75 ng/ml, 16.49±1.03 ng/ml로 고농도에서 억제를 보였다. IL-6의 생산량은 정상군에서 0.06±0.03 ng/ml, LPS만 경구투여한 군에서 17.50±1.36 ng/ml로 정상군에 비해 생산량이 증가했으며, 九寶飲 추출물을 50 mg/kg과 500 mg/kg 투여군은 각각 13.61±1.46 ng/ml, 11.12±2.33 ng/ml로 두 군 모두에서 감소를 보였다. TNF- α 의 생산량은 정상군에서 0.27±0.19

ng/ml, LPS만 경구투여한 군에서 2.44 \pm 0.37 ng/ml로 정상군에 비해 생산이 증가했으며, 九寶飲 추출물을 50 mg/kg과 500 mg/kg 투여군은 각각 2.12 \pm 0.29 ng/ml, 1.86 \pm 0.24 ng/ml로 고농도에서 억제를 보였다(Fig. 8).

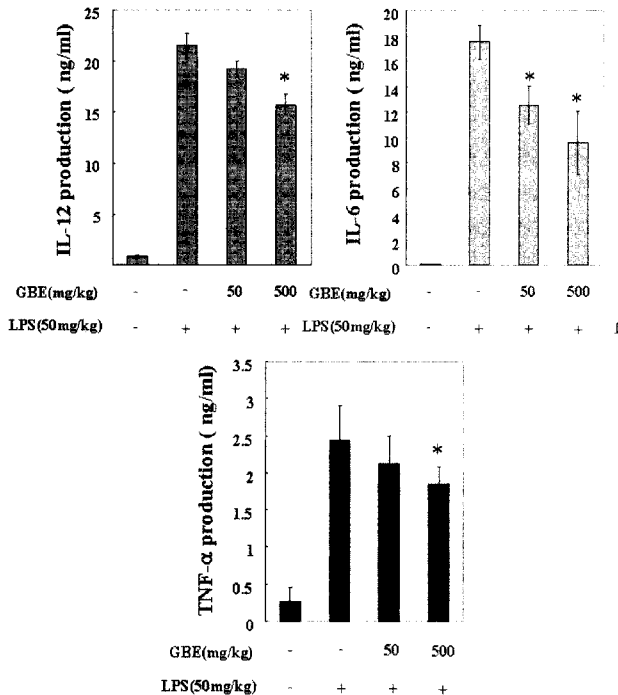


Fig. 8. Effect of GBE on LPS-induced TNF- α , IL-6 and IL-1 β production in serum. GBE was orally given to the mice (n=6 per group) at 0.05 g/kg and 0.5 g/kg for 5 days. The serum samples were taken from the mice at 0 and 3 hrs after challenge with LPS. The amount of TNF- α , IL-6 and IL-12 were measured as described in the materials and methods. Data represent the mean \pm SEM of two separate experiments performed in duplicate. (*p<0.05)

고찰

韓醫學에서 咳嗽은 有聲有痰한 것으로, 咳는 有聲無痰하여 肺氣가 損傷되어 不清한 것이며 嗽은 有痰無聲하여 脾濕이 動하여 痰이 된 것¹⁸⁾으로 나누지만 臨床에서는 咳나 嗽의 명확한 구분이 어려워 咳嗽라 通稱 한다^{19,20)}.

咳嗽의 原因에 따라 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 熱(火)의 六氣의 外因으로 인한 外感咳嗽과 臟腑 機能失調의 內因으로 인한 內傷咳嗽로 分類하는데¹⁹⁻²¹⁾ 東醫寶鑑³⁾에서는 風嗽, 寒嗽, 熱嗽, 濕嗽, 鬱嗽, 勞嗽, 食積嗽, 氣嗽, 痰嗽, 乾嗽, 血嗽, 酒嗽, 久嗽, 火嗽, 夜嗽, 天行嗽가 있다 하여 咳嗽을 16種으로 細分하여 各各 症狀, 治方을 提示 하였다.

九寶飲은 주로 寒嗽와 久嗽에 사용한다고 하였는데, 寒嗽의 原因은 外感寒邪, 風寒으로 인하거나 寒包熱, 肺脾皆受寒邪로 起因하며, 症狀은 憎寒發熱 無汗惡寒 煩燥不渴 鼻塞聲重 胸中緊滿 聲啞 脈緊 遇寒咳甚 등이 나타난다²¹⁾.

久嗽은 담이 멎쳐 폐와 위에 오랫동안 붙어 있는 것이 아교 같아, 肺氣가 순조롭게 오르내리지 못해서 생기는데, 혹 濕과 痰이 겹쳐 생기기도 한다. 증상은 咳嗽動引百骸하고 氣促, 臍下逆

奔而上한다^{32,21)}.

九寶飲은 陳皮, 薄荷, 麻黃, 桂皮, 桑白皮, 紫蘇葉, 杏仁, 大腹皮, 甘草, 生薑, 烏梅로 構成되어 있으며, 藥物의 個別 作用을 살펴보면²²⁻²⁵⁾ 陳皮는 性味가 辛·苦·溫 하며 理氣健脾, 燥濕化痰하는 作用이 있어 藥理學적으로 刺戟性 祛痰作用이 있고 喘息을 가라앉히며 항알레르기 효과가 있으며 薄荷는 性味가 辛·涼하여 辛涼性 解表藥으로 發散風熱하는 作用이 있어 風熱症에 使用하며 藥理學적으로 解熱, 消炎作用 및 呼吸氣道의 粘液 分泌를 增加시키며 桂皮는 性味가 辛·甘·熱하여 溫中補陽, 散寒止痛하는 作用이 있어 藥理學적으로 鎮靜, 鎮痛, 解熱作用 등이 있고, 桑白皮는 性味가 甘·寒하여 瀉肺平喘, 行水消腫하는 作用이 있어 가벼운 鎮咳 作用과 鎮靜, 鎮痛, 鎮痙作用이 있고 麻黃은 性味가 辛·溫하며 發寒解表, 宣肺平喘하는 作用이 있어 藥理學적으로 ephedrine의 혈관수축작용이 있으며 杏仁은 性味가 甘·苦·溫하여 止咳平喘 潤腸通便하는 作用이 있어 藥理學적으로 鎮咳平喘 作用이 있고 紫蘇葉은 性味가 辛·溫하여 發汗解表하는 作用이 있으며 藥理學적으로 解熱作用을 보이며 기관지 평활근의 경련을 풀어주며 大腹皮는 性味가 辛·溫하여 行氣寬中 利水消腫하는 作用이 있고 藥理學적으로는 항보체 활동작용을 억제하는 作用을 하고 甘草는 性味가 甘·平하여 調和諸藥하며 潤肺止咳하는 作用으로 藥理學적으로는 平滑근 이완작용과 소염, 항알러지, 진해거담작용을 하고 生薑은 性味가 辛·溫하여 發汗解表, 潤肺止咳하는 作用으로 藥理學적으로 항염증작용 및 진통작용이 있으며 烏梅는 性味가 酸·平하며 收斂하는 作用이 있고 藥理學적으로는 신체 면역기능을 증강시킨다.

九寶飲의 연구로 이¹²⁾는 기관지 平滑근에 미치는 영향에 대한 연구를 하였지만, 九寶飲에 대한 전염증성 활성물질 (TNF- α , IL-6, IL-12)과 NO의 생성에 대한 연구는 없었다.

먼저 九寶飲이 대식세포에 대한 독성 여부를 알아보기 위하여 MTT방식으로 조사한 결과, 모든 농도에서 대식세포에 대한 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

NO는 NOS (nitric oxide synthase)에 의하여 L-arginine의 산화로부터 합성되며²⁶⁾, 특히 대식세포가 interferon- γ 또는 LPS로 자극될 때 iNOS (inducible NOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다^{25,26)}. 이렇게 생성된 NO는 혈관내피세포에서는 혈압조절인자, 신경세포에서는 신경자극전달물질, 대식세포에서는 항암 혹은 항미생물 효과를 나타낸다²⁹⁻³¹⁾. 하지만 과도한 NO는 정상세포를 죽이거나 염증을 촉진시키는 작용을 한다. 九寶飲은 LPS로 유도한 NO의 생성을 모든 농도에서 억제하였으며, iNOS mRNA 수준에서 역시 농도 의존적으로 억제하였다. 즉, 九寶飲이 iNOS의 유도를 억제하여 NO 생성을 억제 하였다(Fig. 2).

TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되는 전염증성 세포활성물질로 천식이나 류마티스 관절염 등 여러 가지 질환의 염증 반응 조절에 관여 하는 것으로 알려져 있다³²⁾. TNF- α 는 염증의 활성화, 호중구 활성화, 시상하부의 열, 간장에서의 급성단백질 합성, 근육의 이화작용, 세포 고사 등의 역할을 하지만, 다량의 TNF- α 의 발현은 심근 수축력 감소, 혈압강하, 대사과정의 손상을 유발하기도 한다³²⁻³⁵⁾. 九寶飲은 TNF- α 의 생성을 mRNA 수준에

서 억제하였을 뿐만 아니라 단백질 수준에서도 현저하게 억제하였다(Fig. 3). 하지만 *in vivo*에서는 TNF- α 의 생성을 미약하게 억제 하였다(Fig. 8). 특히 TNF- α 는 내독소에 대한 쇼크에 주요한 물질 중에 하나로 알려져 있다. 九寶飲이 내독소에 의한 쇼크를 미약하게 억제하는 이유 중의 하나가 *in vivo*에서 TNF- α 의 생성의 억제가 미약해서 이런 결과를 보일 것으로 사료된다.

IL-6은 간세포에서 급성 단계 단백질 (acute-phase protein)을 합성하고 전염증성 세포활성물질로 알려져 있다³⁶⁾. IL-6은 면역반응과 염증 조절에 중요한 작용을 하며, 과량으로 생성되면 류마티스 관절염, Crohn씨병 등의 염증성 질환이 발생된다³⁷⁾. 九寶飲은 IL-6의 생성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 억제하였다(Fig. 4 & 8). 이는 염증이 생성되기 전 단계에서도 염증을 억제할 수 있는 것을 의미한다.

IL-12는 직접 혹은 IFN-g를 통하여 IL-4 전사과정을 억제하고, T helper (Th) 1 세포의 면역 반응을 촉진하여 IFN-g의 생성을 증가시키고, Th2 세포 반응을 억제하여 세균 및 바이러스를 제거하게 한다³⁸⁻⁴⁰⁾. 九寶飲은 IL-12의 생성을 *in vitro*에서 현저하게 억제하였으며, *in vivo*에서 억제하였다(Fig. 5 & 8).

LPS에 의해 세포활성물질 및 NO의 생성은 nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 활성화에 의존한다^{41,42)}. MAPK는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질과 세포핵 내부로 전달하는 과정의 대표적인 신호 전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다고 알려져 있고, 활동성 분해 단백질 효소 (MAPK)의 활성화에 의해서 다양한 염증성 매개물질을 생산하거나 세포소멸에 관여하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾.

LPS는 다양한 염증성 매개물질들을 생성한다. 또한 이런 염증성 매개물질들은 NF- κ B의 활성화와 MAPK (ERK, p38, JNK)의 인산화를 통하여 생산된다⁴⁴⁾. 九寶飲이 NO, TNF- α , IL-6, IL-12의 생성을 억제하기 때문에 어떤 기전으로 이런 물질들의 생성을 억제하는 가를 조사하였다. 세포질에 존재하는 NF- κ B는 I κ B- α 와 결합되어 존재한다. NF- κ B가 활성화되기 위해서는 I κ B- α 가 분해되고 NF- κ B는 핵으로 이동하여 DNA kB 부분과 결합하여 NO, TNF- α , IL-6, IL-12를 생산하게 된다. 먼저 I κ B- α 의 분해정도를 실험한 결과 九寶飲은 I κ B- α 의 분해를 억제하지 못하였다(Fig. 6). 즉, NF- κ B의 활성을 억제하지 못하였다. 또한 MAPK의 활성화에 의해서도 다양한 염증성 매개물질을 생산한다. ERK, p38, JNK의 인산화 정도를 조사하였다. 九寶飲은 ERK 및 JNK의 인산화를 현저하게 억제하였다(Fig. 6). 따라서 九寶飲은 ERK와 JNK의 인산화를 억제하여 NO, TNF- α , IL-6, IL-12의 생성을 억제했을 것으로 사료된다.

*In vivo*에서 구보음의 효과를 알아보기 위하여 LPS 유도성 쇼크 실험을 한 결과 九寶飲이 고농도의 구보음을 투여한 마우스는 약 20%의 생존율을 보였다(Fig. 7). 이 결과는 Fig. 8의 실험 결과와도 일치하는 경향을 보였다. LPS 유도성 쇼크는 TNF와 다양한 염증성 세포활성물질에 의해서 유도되는데, *in vivo*에서 九寶飲의 TNF, IL-6, IL-12의 생산억제 효과는 미약하였다.

결론적으로, 九寶飲은 ERK와 JNK의 인산화를 억제하여

TNF- α , IL-6, IL-12의 생성을 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 억제했을 것으로 사료된다.

결 론

九寶飲의 항염증 효과를 검증하기 위해 복강내 대식세포에 九寶飲을 전처리하고 LPS로 자극한 후, NO의 생성, TNF- α , IL-6, IL-12의 생성과 LPS로 유도한 쇼크에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

九寶飲의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 九寶飲은 대식세포에 독성을 나타내지 않았다. 九寶飲은 대식세포에서 LPS에 의한 NO생성을 억제 하였다. 九寶飲은 대식세포에서 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, IL-12 생산을 억제하였다. 九寶飲 처리 시 LPS에 의한 MAPK 구성요소 중 p38 과 NF- κ B의 활성은 억제하지 못하였으나, ERK1/2와 JNK의 인산화는 억제하였다. 九寶飲은 *in vivo*에서 LPS에서 의한 쇼크에서 72, 84시간째에도 20%의 생존율을 나타내었다. 九寶飲은 *in vivo*에서 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, IL-12의 생성을 미약하게 억제하였다.

이상의 결과는 九寶飲이 ERK1/2, JNK의 활성을 억제하여 TNF- α , IL-6, IL-12 생성을 억제하였다. 하지만 *In vivo*에서 전염증성 세포활성물질 생성의 억제 효과는 미세한 감소효과를 보여 주었고, 마우스 생존율은 얼마간의 유의한 차이가 있었다.

따라서 이러한 결과는 만성염증을 동반한 기침에 사용 할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 蘇軾, 沈括. 蘇沈良方(欽定四庫全書 卷6). 서울, 대성문화사, p 251, 1995.
2. 吳克潛. 古今醫方集成 卷2. 서울, 성보사, p 39, 1980.
3. 東醫寶鑑國譯委員會. 對譯東醫寶鑑. 서울, 법인문화사, p 1232, 1243, 1999.
4. 김정제 편저. 진료요감. 서울, 동양의학연구소, 상권 p 589, 하권 p 417, 1983.
5. 김규동. 동의내과학. 서울, 여강출판사, p 129, 1992.
6. 申天浩 編譯. 病症 診治. 서울, 成輔社, p 151, 1990.
7. 新谷太. Pathophysiology로 이해하는 내과학 (감염학). 서울, 정담, p 9, 2002.
8. Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 176(6):3635-3641, 2006.
9. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2(8):675-680, 2001.
10. 이경희, 김홍렬, 정희재, 이형구. LPS로 유발된 대식세포의 염증반응에 대한 淸上補下湯의 효과. 대한한방내과학회지

- 29(1):12-24, 2008.
11. 이병삼, 김홍렬, 김진주, 정승기, 이형구, 정희재. 解熱湯이 LPS로 자극된 대식세포에 있어 염증관련 Cytokine 발현억제에 미치는 효과. 대한한방내과학회지 29(2):334-347, 2008.
 12. 이승우, 한상환. 九寶飲이 Sensitized Rat의 氣管支平滑筋에 미치는 影響. 대한한방내과학회지 14(2):1-19, 1993.
 13. Kostova, I., Momekov, G., Tzanova, T., Karaivanova, M. Synthesis, Characterization, and Cytotoxic Activity of New Lanthanum(III) Complexes of Bis-Coumarins. *Bioinorg Chem Appl.* 25651: 1-9, 2006.
 14. Lee, S.J., Lim, K.T. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai regulates expression of iNOS and COX-2 in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol.* 45(6):990-1000, 2007.
 15. Huh, J.E., Yim, J.H., Lee, H.K., Moon, E.Y., Rhee, D.K., Pyo, S. Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF-kappaB activation in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol.* 7(13):1825-1833, 2007.
 16. Chen, C.H., Sheu, M.T., Chen, T.F., Wang, Y.C., Hou, W.C., Liu, D.Z., Chung, T.C., Liang, Y.C. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 72(8):1001-1009, 2006.
 17. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11(1):115-122, 1999.
 18. 劉河間. 劉河間傷寒三六書. 서울, 정보사, p 77, 1976.
 19. 歐陽忠興, 柯新橋. 中醫呼吸病學. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 53-55, 1994.
 20. 洪素蘭, 陳永輝, 裴曉華. 實用中醫呼吸病學. 北京, 中國中醫藥出版社, p 65, 67, 68, 1995.
 21. 전국한의과 대학 폐계내과학 교실 편저. 동의폐계내과학. 서울, 한 문화사, p 147, 148, 163, 2002.
 22. 辛民敎. 臨床本草學. 서울, 영림출판사, p 175, 254, 261, 380, 382, 519, 528, 564, 581, 599, 1989.
 23. 李尙仁외. 韓藥臨床應用. 서울, 정보사, p 36, 39, 47, 52, 205, 225, 229, 323, 389, 475, 481, 1998.
 24. 安德均. 韓國本草圖鑑. 서울, 교학사, p 40, 45, 46, 434, 463, 602, 739, 1999.
 25. 金護哲. 韓藥藥理學. 서울, 집문당, p 63, 68, 82, 252, 266, 278, 364, 434, 490, 2001.
 26. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109-142, 1991.
 27. 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.
 28. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol.* 76: 119-123, 2001.
 29. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 78: 915-918, 1994.
 30. Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 100(10):2417-2423, 1997.
 31. Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C. and Brecht, D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and a 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 84: 757-767, 1996.
 32. Stankiewicz, W., Dabrowski, M.P., Chcialowski, A., Plusa, T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm.* 11(5):307-312, 2002.
 33. Vilcek, J., Lee, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions, *J Biol Chem,* 266(12):7313-7316, 1991.
 34. Beutler, B., Cerami, A. The biology of cachectin/ TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev. Immunol.* 7: 625-655, 1989.
 35. Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine, *Immunol. Today.* 18(10):487-492, 1997.
 36. Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature,* 324(6092):73-76, 1986.
 37. Nishimoto, N., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. Anti-interleukin 6 antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis.* 59: i21-27, 2000.
 38. Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M., Mackay, I.S., Kay, A.B., Hamid, Q.A. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol,* 97(6):1356-1365, 1996.
 39. Gajewski, T.F., Fitch, F.W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T

- lymphocyte clones. *J Immunol.* 140(12):4245-4252, 1988.
40. Stephen, T., Holgate. The epidemic of allergy and asthma. *Nature.* 402: B2-4, 1999.
41. 과학기술부. 염증조절기작에 의거한 항염증 물질 검색시스템 및 항염증제 개발, 2002.
42. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J.* 368: 121-129, 2002.
43. 이정재. a-MSH 유도성 멜라닌 합성에 있어서 감초 추출물의 역할과 작용기전. 전북대학교 대학원, 2001.
44. Mogensen, T.H., Paludan, S.R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(1):131-150, 2001.