

대식세포에서 산더덕에 의한 NO 생성 및 싸이토카인 유도효과

소미선¹ · 이진실² · 이세윤^{3,*}

¹(주)마이크로비아 기술연구소, ²상명대학교 외식영양학과, ³수원대학교 화학과

Induction of Nitric Oxide and Cytokines in Macrophages by *Codonopsis lanceolata*

Mi-Sun So¹, Jin Sil Lee², and Seh-Yoon Yi^{3,*}

¹Microbia Corp. Limited Technical Research Institute

²Foodservice Management Nutrition, Sangmyung University

³Department of Chemistry, Suwon University

The immunomodulatory effect of *Codonopsis lanceolata* based on the production of cytokines and the activation of macrophage was studied. The mRNA expression of nitric oxide synthase (iNOS) was gradually induced after 24 hr treatment of *Codonopsis lanceolata*, and NO production was a maximum after 24 hr treatment with 1 mg/mL. RAW 264.7 cell on *in vitro* treatment with *Codonopsis lanceolata* induced mRNA of cytokines such as interleukin-1(IL-1) β , interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF)- α and interferon(IFN)- γ ; IL-1 β and IL-6 mRNA were gradually induced up to 24 hr. TNF- α mRNA was regularly induced up to 24 hr, and IFN- γ mRNA level was a maximum within 1 hr. These results suggest that *Codonopsis lanceolata* exerts as an effective immunomodulator and enhances antitumor activity of macrophages.

Key words: *Codonopsis lanceolata*, activated macrophage, immunomodulator

서 론

더덕(*Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook)은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 한국, 중국 등지에 분포하고 있으며, 뿌리를 캐어 말린 것을 사삼이라 하고 한방에서 강장제로 쓰며, 천식, 보익, 경풍, 한열, 보폐, 편도선염, 인후염, 기침, 거담 등의 약재로 쓰인다. 그윽한 향기와 맛이 나며, 약용보다는 식품으로서 우리에게 더욱 알려진 약초이다(1).

더덕에 함유된 성분으로는 arginine, potassium(2), stigmaterol, spinasterol(3), squalene, terpenoid, cycloartenol(4), N-formylharman, 1-carbomethoxy- β -carboline, perlolyrine, norharman(5) 및 휘발성 향기성분(6,7) 등의 유효성분이 알려져 있다. 국내에서 진행된 더덕에 관한 연구로는 더덕 에탄올 추출물의 항산화효과(8), 더덕 물 추출물의 중성지방 및 콜레스테롤의 축적을 억제하는 작용(9) 등의 약리작용이 있는 것으로 보고되었다. 더덕 물 추출물의 면역 증강 효과(10,11)를 조사한 연구 보고도 있다. 더덕 물 추출물은 흉선세포의 증식을 촉진하며, Th 세포를 활성화한다. 복강 대식세포의 일산화질소(nitrite oxide, NO)

생성을 억제하고, 사람 PMN 세포의 phagocytosis를 증가시킴으로써, 더덕이 생체 내에서 면역작용을 증강시킬 수 있다는 연구보고도 있다(12,13).

대식세포는 골수에서 생성되어 혈관 내에서는 단구로, 조직 내에서는 대식세포로 존재하며 미생물 감염에 대한 숙주의 방어와 항상성 유지의 역할을 한다. 대식세포는 T세포에서 생성되는 lymphokines에 의해 활성화 되어 superoxide(O₂⁻)나 hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 반응산소 중간물질이나 NO와 같은 반응질소 중간물질을 생성하여 탐식된 이물질을 분해시킨다. 또 대식세포는 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)과 같은 cytokine 및 NO를 생산하여 림프구나 종양세포에 세포독성을 나타낸다(14-17).

본 연구는 대식세포에 의해 유도되는 cytokine의 발현 양상과 NO 생산을 실험함으로써 활성화된 대식세포에서 산더덕의 효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

대식세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)과 1%의 antibiotic antimycotic(GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 RPMI 1640(GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 계대배양하였다.

*Corresponding author: Seh-Yoon Yi, Microbia Corp. Limited Technical Research Institute, 2-2 Wawoo-ree Bongdam-eup Whasung city Kyunggi 445-743, Korea
Tel: 82-31-229-8068
E-mail: syyi0820@empal.com

산더덕 추출

용문산 산더덕 500 g에 증류수 5 L를 넣고 15°C에서 24시간 냉침하여 분획을 얻었다. 이 분획을 70% 에탄올로 침전시킨 후 침전물을 동결건조한 후 일정 농도를 만들기 위해 5 mg/mL로 물에 녹여 사용하였다.

세포 생존률

Cytokine에 의하여 생성되는 nitrite가 RAW 264.7 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 방법을 실시하였다. 이 방법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 formazan으로 전환되는데 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 먼저 RAW 264.7 세포 1×10^5 개/mL를 24 well plate에 1 mL 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 산더덕 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, phosphate buffered saline(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 5 mg/mL의 MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 50 µL를 각 well에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액을 버리고 isopropyl alcohol에 녹인 0.04 N HCl을 500 µL씩 넣어 formazin을 용해한 후, microplate reader (Model 550, Bio-Rad laboratories, Japan)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitrite 측정

Cytokine에 의하여 RAW 264.7 세포가 발생하는 nitrite를 측정하기 위하여 griess 반응을 이용하였다. 이 방법은 griess 시약의 diazogi가 nitrite를 만나면 분홍색으로 변하게 되는 색깔 반응을 이용한 것이다. 6 well plate에 2 mL씩 각 well당 1×10^6 개/mL의 세포를 phenol red가 포함되어 있지 않은 RPMI 1640에 심어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양 후, 산더덕 추출물 혹은 IFN- γ 를 처리하여 시간대별로 배양한 후 nitrite 측정을 위해 상층액 100 µL를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 넣어, 상온의 어두운 곳에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 UV 550 nm에서 흡광도를 측정하

였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준직선과 비교하여 산출하였다.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)법에 의한 iNOS 및 cytokine 유전자 발현 측정

100 mm dish에 1×10^7 개/mL(총 5×10^7 개) RAW 264.7 세포를 성장배지로 심어 24시간 동안 배양 후, 산더덕 추출물을 처리하여 시간별로 incubation한 후 RNA를 분리하기 위해 상층액을 버리고 1 mL의 TRIzol reagent(Invitrogen Life Technologies, USA)을 넣어 상온에서 3분간 반응시켜 1.5 mL tube에 모았다. 여기에 chloroform 200 µL를 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후, ice에서 10분간 보관하였다. 4°C에서 $12,000 \times g$ 으로 15분간 원심분리를 수행하여 상층액을 미리 차갑게 해둔 1.5 mL tube에 옮긴 후, 차가운 isopropanol을 동량 넣고 -20°C에서 1시간 incubation하였다. 4°C에서 $12,000 \times g$ 으로 20분간 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하고 RNA pellet에 75% ethanol 1 mL를 넣었다. 다시 4°C에서 $12,000 \times g$ 으로 5분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 RNA pellet을 clean bench에서 약 30분간 건조시킨 후, diethylpyrophosphate(DEPC) water 23 µL에 RNA pellet을 녹였다. RNA의 정량은 50배 희석한 후 UV/vis 분광광도계(SmartSpec™3000, Bio-Rad, USA)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RT/PCR Premix(Bioneer, Seoul, Korea)에 cytokine의 20 pmole/µL의 sense primer(Bioneer, Seoul, Korea) 1 µL와 20 pmole/µL의 antisense primer(Bioneer, Seoul, Korea) 1 µL, 1 µg의 RT 생성물, DEPC 처리된 증류수를 넣어 최종부피가 50 µL 되도록 한 후 RT-PCR(PTC-0200 DNA Engine, MJ Research Inc., USA)를 수행하였다. RT-PCR은 cDNA합성; 42°C, 60분, predenaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, 1분, annealing; 55-65°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 31 cycles한 다음, post-elongation; 72°C, 5분간 수행하였다. RT-PCR의 생성물은 0.1% ethidium bromide(EtBr; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 1% agarose gel(Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA)을 사용하여 75V에서 40분간 전기영동(MJ-105, Major Science Co., LD, Taiwan)하여 UV에서 관찰하였다. 각 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR analysis

Oligonucleotides		Sequence	Size (bp)
iNOS	5'-primer	5'-CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC-3'	499
	3'-primer	5'-CTGAGGGCTCTGTTGAGGTC-3'	
TNF- α	5'-primer	5'-GCGACGTGGAAGTGGCAGAAG-3'	340
	3'-primer	5'-TCCATGCCGTTGGCCAGGAGG-3'	
IL-1 β	5'-primer	5'-TGAAGGGCTGGTTCCAAACCTTTGACC-3'	361
	3'-primer	5'-TGTCCATTGAGGTGGAGAGCTTTCAGA-3'	
IL-6	5'-primer	5'-ACCCCTCCTGTCTTCCTCCTG-3'	155
	3'-primer	5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3'	
IFN- γ	5'-primer	5'-AGGTCAACAACCCACAGGTCCA-3'	397
	3'-primer	5'-CCAGATACAACCCCGCAATCAC-3'	
β -actin	5'-primer	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	349
	3'-primer	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

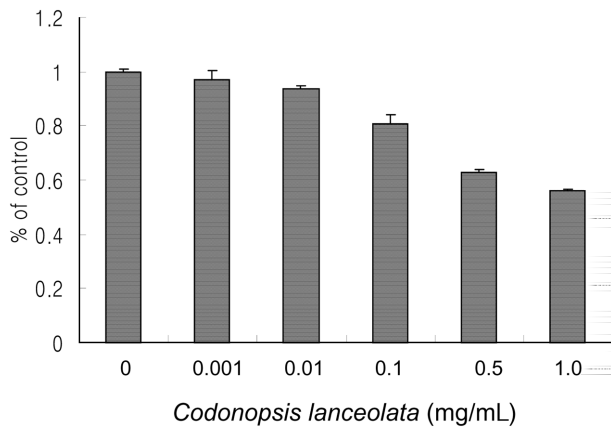


Fig. 1. Effects of *Codonopsis lanceolata* on the proliferation of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS. Each well of a 24 well plate was seeded with 1×10^5 cells. Then incubated with *Codonopsis lanceolata*. After 2 days incubation, the cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels. The assay was performed in triplicate.

결과 및 고찰

산더덕 추출물이 RAW 264.7 세포의 증식에 미치는 영향

RAW 264.7 세포를 산더덕 추출물로 활성화시킨 후 세포 증식에 미치는 효과를 알아보았다. 자극되지 않은 배지에서 48시간 배양된 세포의 증식을 100으로 하고, 산더덕 추출물로 활성화된 시험군의 세포증식을 측정된 결과, 세포증식 억제율은 Fig. 1과 같다. 산더덕 추출물의 농도의 증가에 따라 세포의 증식의 억제율은 증가하였으며 1 mg/mL로 활성화 된 RAW 264.7 세포의 경우 56%까지 세포증식이 억제되었다. NO 생산의 측정을 위해 산더덕 추출물 1 mg/mL의 농도로 자극을 주었으며 싸이토카인의 발현을 관찰하기 위해 80%의 세포 성장률을 갖는 농도인 0.1 mg/mL의 추출물을 사용하여 다음 실험을 하였다.

대식세포의 NO 생산

NO는 free radical중의 하나로서, 매우 불안정한 분자이다. NO는 산소나 superoxide에 의하여 NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4 , nitrite(NO_2^-) 및 nitrate(NO_3^-)와 같은 안정한 nitrogen oxide로 바뀌어진다(18). NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 만들어지며, NOS는 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS(eNOS) 및 neuronal NOS(nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류할 수 있다(19).

RAW 264.7 세포의 NO production에 대한 산더덕 추출물의 효과를 실험한 결과 RAW 264.7 세포의 배양액에 추출물의 농도를 달리 하였을 때, Fig. 2와 같이 NO의 생성이 농도 의존적이었다. 산더덕 추출물의 투여 24시간 후, 농도 0.001 mg/mL에서 $6.3 \mu M$ 의 NO가 생성되었으며, 1 mg/mL의 농도에서 $8.1 \mu M$ 의 NO가 생성되었다. 산더덕 추출물 1 mg/mL에서 NO production은 최대량에 도달하였다. 산더덕 추출물 농도에 따라 NO 생성이 증가됨을 보여 농도 의존적인 면역활성을 관찰하였다. 특히 산더덕 추출물 1 mg/mL 처리시 NO 생성량은 IFN- γ 50 ng/mL 처리 시 보다 증가하여 강한 면역반응을 보였다.

NO 합성효소 발현

iNOS는 바이러스를 포함하는 전염성의 병원체에 대하여 방

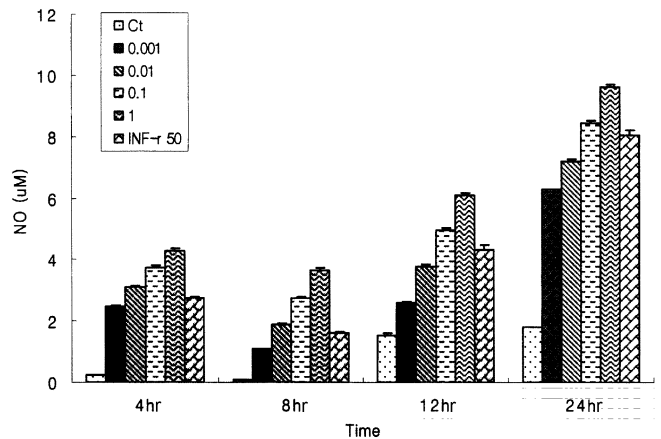


Fig. 2. Effects of *Codonopsis lanceolata* on nitric oxide production by RAW 264.7 cells.

Codonopsis lanceolata enhanced NO production. RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) were plated in 6 well plate for 24 hr and then incubated with *Codonopsis lanceolata* simultaneously. The concentration of *Codonopsis lanceolata* was mg/ml and IFN γ was ng/ml. The nitrite accumulation of cultured media was determined by Griess reaction. Each value represents mean SEM (n=3).

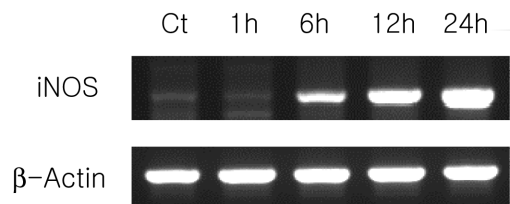


Fig. 3. *Codonopsis lanceolata* enhanced iNOS mRNA induction.

RT-PCR analysis of iNOS mRNA induction by *Codonopsis lanceolata*: semiquantitative RT-PCR products from untreated (control) and *Codonopsis lanceolata* (0.1 mg/mL)-stimulated macrophage at various times were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis.

어하는 중요한 역할을 하며, 여러 염증 질환, 순환계 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려지고 있다(20,21).

NO를 생산하는 효소인 iNOS의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR법을 이용하여 관찰하였다. 산더덕 추출물(0.1 mg/mL)과 함께 시간별로 배양한 RAW 264.7 세포주에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR법으로 iNOS의 mRNA를 증폭시켜 비교하였다. 그 결과, 무처리군에서는 iNOS가 유도되지 않았고, 산더덕 추출물을 처리한 군에서는 시간이 지날수록 iNOS의 발현이 유도되었다(Fig. 3). 이 결과로 NO의 생성은 iNOS의 유전자의 발현에 의한 직접적인 생성이라 판단하였다.

IL-1 β , IL-6 mRNA 발현 유도

IL-1은 17 kD의 cytokine으로서 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증 매개성 cytokine이다. IL-1은 두 개의 유전자 산물인 IL-1 α 와 IL-1 β 가 있다. 활성화된 대식세포는 IL-1 β mRNA 양이 IL-1 α mRNA 양보다 10-50배 이상 많기 때문에 IL-1 β 가 주된 IL-1이 되고 있다(22). IL-1 β 는 TNF- α 와 더불어 iNOS의 발현을 유도할 수 있다(20,21).

IL-6는 감염과 조직손상에 따른 생체의 주요한 반응 매개물질로서 23-30 kD의 다양한 크기를 갖는 인산화 당단백 폴리펩타이드이다. IL-6 유전자 발현은 TNF- α , IL-1, IFN과 같은 다

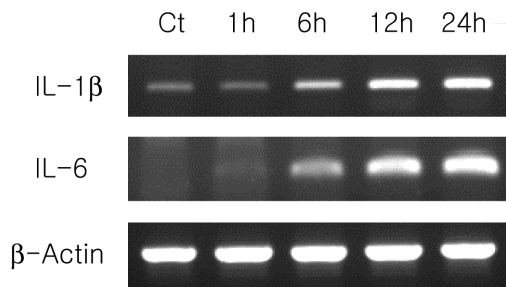


Fig. 4. IL-1 β and IL-6 mRNA induction by *Codonopsis lanceolata*.

Semi-quantitative RT-PCR products from untreated (control) and *Codonopsis lanceolata* (0.1 mg/mL)-treated RAW 264.7 cell at various times were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis. The levels of mRNA in RAW 264.7 cell incubated with *Codonopsis lanceolata* were normalized to control.

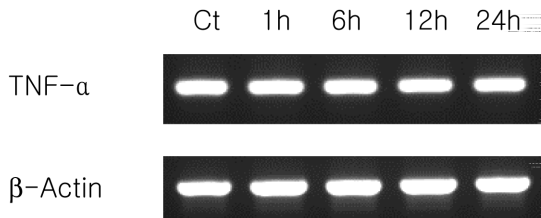


Fig. 5. TNF- α mRNA expression by *Codonopsis lanceolata*.

Semi-quantitative RT-PCR products from untreated (control) and *Codonopsis lanceolata* (0.1 mg/mL)-treated RAW 264.7 cell at various times were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis. The levels of mRNA in RAW 264.7 cell incubated with *Codonopsis lanceolata* were normalized to control.

양한 염증반응성 매개물질에 의해 자극된다. 일반적으로 IL-6은 섬유세포, 단핵세포, 대식세포, 내피세포, 각질세포, 자궁 내막 간질세포에서 생성되어 급성 염증 반응을 촉진하거나 억제시키는 것으로 알려져 있다(23,24). 성장 조절 효과를 가지는 IL-6의 발현은 활성화된 대식세포의 항종양 작용에 있어서 cytostatic/cytocidal factor와 관련이 있다(25,26).

RAW 264.7 세포에 산더덕 추출물 0.1 mg/mL을 첨가하여 0, 1, 6, 12, 24시간 동안 배양한 후 세포의 RNA를 추출하였다. RT-PCR을 수행하여 cytokine의 mRNA 발현량을 분석한 결과 IL-1 β 와 IL-6 mRNA 발현은 24시간까지 점차적으로 유도되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이것은 산더덕 추출물이 proinflammatory cytokine의 중요한 inducer임을 보여준다.

TNF- α mRNA의 발현 양상

TNF는 두 종류가 있는데, TNF- α 는 주로 단핵구나 대식세포에서 생산되고 TNF- β 는 주로 림프구에서 생산된다. 이 중 TNF- α 는 염증 매개성 cytokine으로서 생체 내에서 단독 또는 IL-1, IFN- γ 와 같은 cytokine과 작용하여 종양의 혈관을 손상시킴으로써 종양 괴사를 유발시키거나 미생물에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시킨다(27,28). 하지만 방사선이나 극심한 자극체에 대해서는 급격한 과다 생성은 생체에 매우 해로운 영향을 미친다(17). TNF- α 는 조직, 장기, 종양 cell line의 광범위한 종류에서 iNOS의 발현을 유도할 수 있다(20,21).

RAW 264.7 세포에 산더덕 추출물 0.1 mg/mL을 첨가하여 0, 1, 6, 12, 24시간 동안 배양한 후 세포의 RNA를 추출하였다.

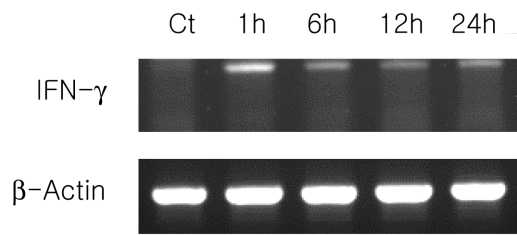


Fig. 6. IFN- γ produced from RAW 264.7 cell cultured with *Codonopsis lanceolata*.

RT-PCR analysis of IFN- γ mRNA level of *Codonopsis lanceolata*-treated macrophages: RT-PCR products from untreated (control) and *Codonopsis lanceolata* (0.1 mg/mL)-stimulated macrophage at various times were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis.

RT-PCR을 수행하여 cytokine의 mRNA 발현량을 분석한 결과 TNF- α 의 양은 시간이 지나도 일정함을 알 수 있었다(Fig. 5). 산더덕에 의해 세포내 일정한 농도를 유지하여 다른 사이토카인류와 같이 긍정적인 영향을 줄 것으로 예측된다.

IFN- γ mRNA 발현 양상

IFN-은 바이러스성 질환에 대한 숙주방어작용을 하는 바이러스억제제이다. 바이러스와 비활성바이러스에 의해 감염되면 거의 모든 동물세포에서는 바이러스 증식을 저해하는 IFN-의 합성과 분비가 유도된다. IFN-은 IFN- α , IFN- β 과 IFN- γ 등 항원성이 다른 3가지가 알려져 있다. IFN- α 는 백혈구, IFN- β 은 섬유아세포, IFN- γ 은 T세포로부터 만들어진다. IFN-은 항바이러스 작용을 통해 각종 바이러스질환의 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

산더덕 추출물에 의한 IFN- γ mRNA의 유도를 확인한 결과 IFN- γ mRNA의 발현량은 산더덕 추출물 처리 후 증가하였으며 1시간일 때 가장 높은 발현을 관찰하였다(Fig. 6). 이 결과로 산더덕은 IFN- γ 의 즉각적인 발현으로 바이러스에 대한 예방 및 치료기능을 예측할 수 있다.

요 약

대식세포는 IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ 의 중요한 근원이고, 전염성의 병원체와 종양 세포에 대해 저항하는 주요한 effector 세포이다. 이것은 cytokine signal에 의해 세포과파가 되도록 활성화 된다. 이번 연구에서 우리는 산더덕의 물 추출물이 cytokine, nitric oxide와 같은 effector 분자를 유도하기 위해 대식세포를 활성화하는지를 알아보기 위하여 실험하였다. 산더덕 추출물에 의한 대식세포의 NO 생성은 농도 의존적이고, 시간 의존적이었다. iNOS는 시간이 지날수록 발현이 유도되었다. 산더덕 추출물에 의한 IL-1과 IL-6 mRNA 유도는 시간 의존적으로 증가되었고, 처리 후 24시간에 최고점에 도달하였다. 이것은 활성화된 대식세포가 종양세포를 죽일 수 있음을 말한다. TNF- α mRNA의 양은 시간이 지나도 일정하였고, IFN- γ mRNA의 양은 산더덕 추출물의 처리 1시간 후에 빠르게 강화되었다. 이러한 결과로부터 산더덕은 효과적인 면역조절자이고 대식세포의 항종양활성을 강화함을 알 수 있다.

문 헌

1. Kim JH, Chung MH. Pharmacognostical studies on *Codonopsis*

- lanceolata*. Korean J. Pharmacog. 6: 43-47 (1975)
2. Chung MS. Composition and color of *Codonopsis lanceolata* affected by cultivation methods. Korean J. Diet. Cult. 14: 529-534 (1999)
 3. Yang HS, Choi SS, Han BH, Kang SS, Woo WS. Sterols and tripenoids from *Codonopsis lanceolata*. J. Pharm. Soc. Korea 19: 209-215 (1975)
 4. Chung BS, Im DS. On the composition from *Codonopsis lanceolata* (Benth. et Hook). Program the 25th annual convention of the pharmaceutical Society of Korea (1976)
 5. Chang YK, Kim SY, Han BH. Chemical studies on the alkaloidal constituents of *Codonopsis lanceolata*. Yakhakhoeji 30: 1 (1986)
 6. Park JY, Kim YH, Kim KS, Kwag JJ. Volatile flavor components of *Codonopsis lanceolata* Traut. (Benth. et Hook). J. Korean Agric. Chem. Soc. 32: 338-343 (1989)
 7. Kim JH, Kim KR, Kim JJ, Oh CH. Comparative sampling procedures for the volatile flavor components of *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 171-176 (1992)
 8. Maeng YS, Park HK. Antioxidant activity of ethanol extract from Dodok (*Codonopsis lanceolata*). Korean J. Food Sci. Technol. 23: 311-316 (1991)
 9. Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. Effects of *Codonopsis lanceolata* water extract on the level of lipid in rats fed high fat diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 940-944 (1998)
 10. Lee YJ, Kim JM, Jung YM. Effect of *Codonopsis pilosuls* on the cellular immunity. Korean J. Vet. Publ. Hlth. 19 (1995)
 11. Lee JH. Immunostimulative effect of hot-water extract from *Codonopsis lanceolata* on lymphocyte and clonal macrophage. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 732-736 (2002)
 12. Suh JS. Effect of *Codonopsis lanceolata* Radix water extract on immunocytes. Korean J. Food Nutr. 9: 379-384 (1996)
 13. Suh JS, Eun JS. Isolation of active components on immunocytes from *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Nutr. 31: 1076-1081 (1998)
 14. Higuchj M., Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanisms act as synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144: 1425-1431 (1990)
 15. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211: 24-32 (1996)
 16. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF- and IFN- γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine 6: 399-406 (1994)
 17. Yoon CY, Shin DH, Hong CM, Lee WK, Jang DD, Cho JC, Ahn JK, Ahn DK, Lee MS. The suppressive effects of cortex mori on NO, TNF- α and IL-1 production by macrophage. Korean J. Vet. Publ. Hlth. 22: 3 (1998)
 18. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. Annu. Rev. Physiol. 57: 737-769 (1995)
 19. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthase. Biochim. Biophys. Acta. 1411: 217-230 (1999)
 20. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin. Exp. Immunol. 113: 147-156 (1998)
 21. Oshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat. Res. 305: 253-264 (1994)
 22. Oh JS, Im GY, Teong J, Lee HC, Chung SS. Effect of steroid hormone on the expression of cytokine genes in the peritoneal macrophages of mouse. J. Korean Cancer Assoc. 26: 607-617 (1994)
 23. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehagal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor-associated with infractional. J. Clin. Invest. 85: 1392-1408 (1990)
 24. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 74: 1-10 (1989)
 25. Hamiton TA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophage activation. Immunol. Today 8: 151-158 (1987)
 26. Paulnock DM. Macrophage activation by T cells. Cur. Opin. Immunol. 4: 344-349 (1992)
 27. Cybulsky MI, Movat HZ, Dinarello CA. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in acute inflammation. Ann. Inst. Pasteur. Immunol. 138: 505-512 (1987)
 28. Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. J. Immunol. 143: 2894-2899 (1989)
 29. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu. Rev. Immunol. 13: 251-276 (1995)

(2004년 6월 18일 접수; 2004년 8월 18일 채택)