J. Ginseng Res.
Vol. 22, No. 3, 181~187(1998)

활성화한 RAW 264.7 세포주에서 인삼 Polyacetylene류의 Nitric Oxide 생성저해

류재하 · 장세란 · 이소영 · 이화진 · 한용남[1]
숙명여자대학교 약학대학, [1]서울대학교 천연물과학연구소
(1998년 5월 10일 접수)

Inhibitors of Nitric Oxide Synthesis from Ginseng in Activated Macrophages

Jae-Ha Ryu, Se Ran Jang, So Young Lee, Hwa Jin Lee and Yong Nam Han[1]
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
[1]Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea
(Received May 10, 1998)

Abstract : Nitric Oxide (NO), derived from L-arginine, is produced by two types (constitutive and inducible) of nitric oxide synthase (NOS). The NO produced in large amounts by the inducible NOS is known to be responsible for the vasodilation and hypotension observed in septic shock. We have found three polyacetylene compounds which inhibited the production of NO in LPS-activated RAW 264.7 cells. Their structures were identified as panaxynol, ginsenoyne A and PQ-6 by the spectroscopic analysis (IC_{50} values were 32.3 μM, 2.3 μM, 1.5 μM, respectively). These polyacetylenes may be useful candidates for the development of new drug to treat endotoxemia and inflammation accompanied by the overproduction of NO.

Key words : Ginseng, polyacetylene, nitric oxide, macrophage, inhibitor, panaxynol, ginsenoyne A, PQ-6.

서 론

Nitric oxide(NO)는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등에서의 역할이 알려지고 있다. 그런데 NO를 생성하는 효소(NOS:nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS(c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS(i-NOS)의 두가지로 크게 분류된다.[1,2] 그리고 c-NOS는 다시 neuronal NOS (n-NOS)와 endothelial NOS(e-NOS)로 나누어 진다. 이 중 e-NOS는 Ca^{2+}과 calmodulin 의존성이며 혈관 내피세포에서 L-arginine을 기질로 NO와 citrulline을 생성하고 NO는 인접한 평활근을 이완함으로써 혈관을 확장시킨다. 그런데 e-NOS는 세포내 Ca^{2+}의 농도가 효소에 calmodulin이 결합될 수 있을 일정 수준 이상이 되어야 활성화되고 NO의 생성도 짧은 시간동안 소량에 그친다. 한편 i-NOS는 Ca^{2+} 의존성이 없으며, 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이와 같은 i-NOS는 외부상처에 대한 반응 및 염증같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 interleukin 1이나 tumor necrosis factor, 염증원인 내독소(lipopolysaccharide : LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되는 것으로 알려져 있다.[3,4]

특히 i-NOS에 의해 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등[5] 생체에 유해한 작용을 나

타낸다. 최근 패혈증 환자에게서 치명적인 문제가 되는 septic shock의 주요 원인이 대량의 NO생성에 의한 과도한 혈압강하 때문이라는 연구 보고가 있은 후, i-NOS 저해제가 septic shock을 방지할 수 있는 치료제로서 각광받고 있다.[6] 또한 염증상태에서 i-NOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라,[7] cyclooxygenase를 활성화하여[8,9] prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.[10,11] 따라서 i-NOS에 의한 NO의 생성을 저해하는 새로운 염증치료제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 알려진 NOS 저해제로는 NOS의 기질인 L-arginine의 구조유사체로서,[12] N^G-monomethyl-L-arginine(L-NMMA), N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), aminoguanidine,[13,14] 등과 같은 합성유기분자들이 대부분이다. 그리고 각종 염증치료제 및 항암제가 i-NOS 저해제로 보고되고 있으며,[7,15,16] 천연물에서 유래한 i-NOS 저해제가[17-20] 몇가지 알려지면서 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 천연물에서 유래한 i-NOS 저해제로는 cepharanthine 같은 bisbenzylisoquinoline alkaloids,[18] nicotine amide,[17] benzoquinone,[21] sesquiterpene lactone[22] 등이 있으며, 이들은 NOS의 mRNA 합성을 저해함으로써 그 활성을 나타낸다. 이에 본 논문에서는 인삼으로부터 i-NOS 저해활성을 가진 polyacetylene 성분들을 분리하여 그 구조를 확인하였다.

실험재료 및 방법

1. 인삼의 활성분획의 제조

예비실험에서 비극성분획이 LPS로 활성화한 macrophage의 NO생성을 저해한다는 사실을 확인하였으므로[23] 다음과 같은 방법으로 비극성분획을 제조하였다. 경동시장에서 구입한 수삼 5 kg을 세절하여 메탄올로 환류냉각하여 3회 추출하였다. 추출물을 감압하에서 농축하여 메탄올 추출물(233 g)을 얻고, 이를 물에 분산하여 에테르로 3회 추출하였다. 추출물을 감압하에서 농축하여 지용성 분획 9 g을 얻었다.

2. 활성성분의 단리

지용성 분획 9 g에 대하여 이동상으로 Hexane/EtOAc(20:1→1:1)을 이용한 실리카겔 칼람 크로마토그래피를 행하였다. 이들 용출물을 크게 6개의 분획 PG-1(457 mg), PG-2(148 mg), PG-3(264 mg), PG-4(884 mg), PG-5(1800 mg), PG-6(405 mg)으로 나누고 각 분획에 대하여 LPS로 활성화한 macrophage에서 NO의 생성저해활성을 검정하였다. 칼람 분획 중 비교적 활성이 강한 PG-4(884 mg), PG-5(1800 mg), PG-6(405 mg)으로부터 실리카겔 칼람크로마토그래피를 반복하여 단일 활성성분 compound I(**1**, 980 mg), compound II(**2**, 16 mg), compound III(**3**, 27 mg)를 각각 순수하게 단리하였다.

(1) Compound I의 단리

PG-4(884 mg)와 PG-5(1800 mg) 분획을 합하여 이동상 Hexane/CH_2Cl_2(5:1)으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 행하고 역상 HPLC를(칼람:μ-Bondapak C-18, 3.9×300 mm, 이동상: MeOH/H_2O, 70:30) 이용하여 순도를 평가하여 단일 활성성분 compound I(**1**, 980 mg)을 분리하였다. Compound I에 대한 각종 분광학적 정보를 이용하여 구조분석을 행한 결과 panaxynol로 그 구조를 확인하였다.

compound I(panaxynol; heptadeca-1, 9-diene-4, 6-diyne-3-ol; $C_{17}H_{24}O_5$), ^{1}H-NMR(500 MHz, $CDCl_3$): δ0.82(3H, t, J=7.0 Hz, H-17), δ1.15~1.25(8H, m, H-13~H-16), δ1.29(2H, br t, J=6.9 Hz, H-12), δ1.95(2H, AB quartet, J=7.3 Hz, H-11), δ2.92(2H, br d, J=7.0 Hz, H-8), δ4.84(1H, br d, J=5.3 Hz, H-3), δ5.16(1H, ddd, J=10.2, 1.2, 1.1 Hz, H-1a), δ5.30(1H, dtt, J=10.5, 7.0, 1.6 Hz, H-9), δ5.41(1H, ddd, J=17.2, 1.2, 1.1 Hz, H-1b), δ5.44(1H, dtt, J=10.5, 7.3, 1.7 Hz, H-10), δ5.87(1H, ddd, J=17.2, 10.2, 5.3 Hz, H-2). ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$): δ14.09(q, C-17), δ17.67(t, C-8), δ22.63(t, C-16), δ27.18(t, C-11), δ29.14(t, C-14), δ29.17(t, C-13), δ29.22(t, C-12), δ31.81(t, C-15), δ63.53(d, C-3), δ63.98(s, C-6), δ71.29(s, C-5), δ74.18(s, C-4), δ80.28(s, C-7), δ117.04(t, C-1), δ121.88(d, C-9), δ133.09(d, C-10), δ136.12(d, C-2).

(2) Compound II의 분리

PG-6(405 mg)을 이동상 Hexane/EtOAc(20:1)으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 행하여 PG-6-1(4 mg), PG-6-2(42 mg), PG-6-3(248 mg), PG-6-4(54 mg)를 얻고 그 중 PG-6-2 소분획을 다시 이동상 Hexane/Acetone(15:1) 으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 행하고 역상 HPLC를(칼람 : μ-Bonda-

pak C-18, 3.9×300 mm, 이동상 : MeOH/H_2O, 70:30) 이용하여 순도를 평가하여 단일 활성성분 Compound II(**2**, 16 mg)를 분리하였다. 단일 활성성분에 대해 각종 분광학적자료를 이용하여 구조분석을 행한 결과 그 구조를 ginsenoyne A로 확인하였다.

compound II (ginsenoyne A; 9, 10-epoxy-heptadeca-1, 16-diene-4, 6-diyne-3-ol; $C_{17}H_{22}O_2$), ^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ1.39~1.57(8H, m, H-11~H-14), δ1.91(1H, brd, J=6.5 Hz, 3-OH), δ2.07(2H, m, H-15), δ2.38(2H, dd, J=17.7, 7.1 Hz, H-8a), δ2.71(1H, dd, J=17.7, 5.5 Hz, H-8b), δ2.97(1H, br td, J=6.2, 4.2 Hz, H-10), δ3.15(1H, ddd, J=7.1, 5.5, 4.2 Hz, H-9), δ4.93(1H, br d, J=5.5 Hz, H-3), δ4.94(1H, ddd, J=17.1, 3.3, 1.6 Hz, H-17a), δ5.00(1H, ddd, J=10.2, 3.3, 1.2 Hz, H-17b), δ5.26(1H, ddd, J=10.2, 1.5, 0.9 Hz, H-1a), δ5.47(1H, ddd, J=17.1, 1.5, 0.9 Hz, H-1b), δ5.81(1H, ddt, J=17.1, 10.3, 6.7 Hz, H-16), δ5.95(1H, ddd, J=17.1, 10.2, 5.5 Hz, H-2). ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$):δ19.44(t, C-8), δ26.30(t, C-12), δ27.46(t, C-11), δ28.75(t, C-14), δ28.89(t, C-13), δ33.62(t, C-15), δ54.25(d, C-9), δ56.87(d, C-10), δ63.49(d, C-3), δ66.29(s, C-6), δ70.87(s, C-5), δ74.89(s, C-4), δ75.00(s, C-7), δ114.40(t, C-17), δ117.19(t, C-1), δ135.98(d, C-2), δ138.91(d, C-16).

(3) Compound III의 분리

PG-6-3(248 mg)을 이동상 Hexane/Acetone(10:1)으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 행하여 PG-6-3-1(130 mg), PG-6-3-2(73 mg), PG-6-3-3(12 mg), PG-6-3-4(57 mg)을 얻고 그중 PG-6-3-4(57 mg)을 다시 이동상 Hexane/Acetone(10:1)으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 행하고 역상 HPLC를(칼람: μ-Bondapak C-18, 3.9×300 mm, 이동상 : MeOH/H_2O, 70:30) 이용하여 순도를 평가하여 단일 활성성분 compound III(**3**, 27 mg)을 얻었다. 단일 활성성분에 대한 각종 분광학적 정보를 이용하여 구조분석을 행한 결과 그 구조를 PQ-6로 확인하였으며 이는 인삼에서 처음 분리된 polyacetylene 성분이었다.

Compound III(PQ-6; 8-acetoxy-9, 10-epoxy-heptadeca-1-ene-4, 6-diyne-3-ol; $C_{19}H_{26}O_4$, ^{1}H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ0.88(3H, t, J=7.0 Hz, H-17), δ1.22-1.40(10H, m, H-12~H-16), δ1.55(2H, m, H-11), δ2.11(3H, s, 8-acetyl methyl), δ3.02(1H, td, J=6.0, 3.8 Hz, H-10), δ3.21(1H, dd, J=7.7, 3.8 Hz, H-9), δ4.93(1H, br d, J=5.3 Hz, H-3), δ5.25(1H, d, J=7.7 Hz, H-8), δ5.26(1H, br d, J=10.2 Hz, H-1a), δ5.47(1H, br d, J=17.0 Hz, H-1b), δ5.93(1H, ddd, J=17.0, 10.2, 5.3Hz, H-2). ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$): δ14.03(q, C-17), δ20.61(acetyl methyl), δ22.57(t, C-16), δ26.47(t, C-12), δ27.53(t, C-11), δ29.13(t, C-14), δ29.26(t, C-13), δ31.68(t, C-15), δ56.37(d, C-9), δ57.94(d, C-10), δ61.72(d, C-3), δ63.37(d, C-8), δ69.91(s, C-5), δ70.48(s, C-6), δ74.70(s, C-4), δ78.70(s, C-7), δ117.42(t, C-1), δ135.60(d, C-2), δ168.89(acetyl carbonyl).

3. NO 생성저해활성의 검정

(1) RAW 264.7 세포의 배양

Macrophage계열의 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS DMEM으로 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하고 1주일에 2번 계대배양하여 유지하였다.

(2) 시료의 처리

RAW 264.7 세포주를 10% FBS DMEM으로 8×10^5 cell/m*l*로 하여 24 well plate에 1 m*l*씩 분주하여 2시간 동안 부착시키고 새로운 10% FBS DMEM으로 교환한 다음 (−)LPS, (+)LPS, 시료처리군으로 나누어 각각 3 well씩 처리하였다. 37℃, 5% CO_2 incubator에서 20시간 배양 후 각 well의 배양액으로 유리된 NO를 측정하였다. 사용한 세포의 단백질량을 측정하기 위해 바닥에 부착된 세포를 PBS로 2회 세척하고 0.5 N-NaOH 500 μ*l*를 이용하여 100℃에서 30분간 단백질을 용해하였다. Bradford 법으로[24] BSA를 표준물질로 하여 단백질의 양을 결정하였다.

(3) Griess시약을 이용한 NO의 정량

RAW 264.7 세포주에 LPS와 시료를 처리하여 20시간 배양한 배양액 100 μ*l*를 96 well plate에 취하고 Griess시약[25] 150 μ*l*씩을 가하고 10분 동안 반응을 시킨 다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이는 NO가 매우 불안정하여 NO_2 로 즉시 변환되므로 NO_2 를 정량하는 방법으로서 sodium nitrite를 NO_2 표준품으로 하여 검량선을 작성하였다.

결과 및 고찰

LPS로 활성화한 macrophage에서 NO 생성을 저해하는 활성성분을 분리하기 위하여 인삼의 비극성 분획으로부터 실리카겔을 이용한 칼람크로마토그래피를 반복하여 세가지의 유효성분을 확인하였다. 이들의 순도는 HPLC를 이용하여 확인하였고, 구조는 NMR, Mass, IR 등의 각종 분광학적 분석으로부터 이미 천연으로부터 알려진 구조들인 panaxynol,[26] ginsenoyne A,[27] PQ-6[28]으로 각각 확인하였다. 이들의 각종 분광학적 자료는 문헌에 알려진 수치와 매우 잘 일치하였다. 이들 중 PQ-6는 미국인삼(*Panax quinquefolium*)에서 보고되었으나 고려인삼(*Panax ginseng*)에서는 본 연구에서 처음으로 분리된 화합물이었다(Fig. 1).

LPS(1 μg/ml)를 이용하여 macrophage계열의 RAW 264.7 세포주를 활성화하면 세포배양액으로 유리되는 NO의 농도가 약 20~30 μM로 현저히 증가하였다. LPS로 활성화할 때 인삼으로부터 분리한 시료를 처리하면 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소하는 결과를 보여주었다(Fig. 2). NO의 생성을 50% 저해하는 농도를 IC_{50}으로 표현하였을 때, 인삼으로부터 활성성분으로 분리한 panaxynol, ginsenoyne A, PQ-6의 IC_{50}값은 각각 32.3 μM, 2.3 μM, 1.5 μM이었다. 이때 양성 대조군으로 NOS의 저해제로 알려져

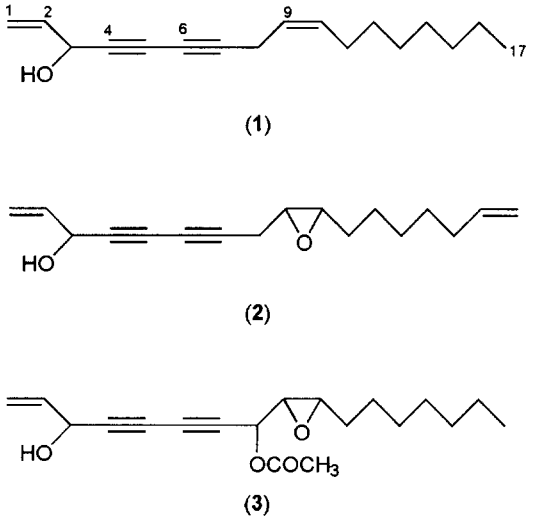

Fig. 1. Structures of panaxynol (**1**), ginsenoyne A (**2**) and PQ-6 (**3**) isolated from *Panax ginseng*.

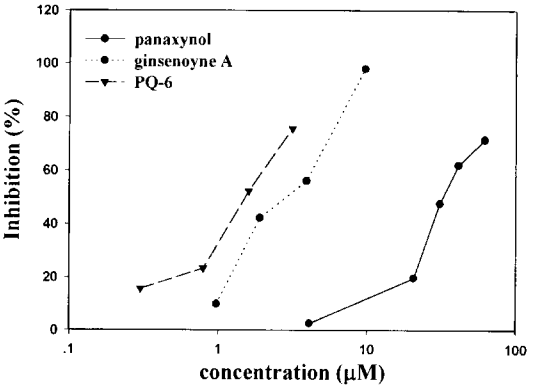

Fig. 2. Ginseng polyacetylenes inhibit the production of NO released into the media of LPS-activated RAW 264.7 cells. Conditioned media were collected after 20 hr activation and the NO_2^- levels were assayed as described in the materials and methods section. Results showed the representative inhibition of NO_2^- production expressed as % control (LPS alone).

있는 L-NMMA 0.1 mM을 사용하였다. 이들 중 활성이 비교적 약한 panaxynol의 3번 위치에 acetyl기를 도입하였을 때 활성이 3배 정도 증가되는 것을 관찰하였으며, 구조 중에 acetyl기를 함유한 PQ-6와 더불어 acetyl기가 NO 생성저해활성에 유리한 관능기인 것으로 추정되었다.

이와 같은 활성에 대한 기전을 규명하기 위하여 NOS에 대한 기질경쟁성, NOS효소 자체에 대한 저해활성 및 NOS의 유도저해활성 등에 대해 검토하기 위하여 가장 활성이 강한 PQ-6를 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. Fig. 3에 나타낸 것과 같이 L-arginine 구조 유사체로서 L-arginine에 대한 기질경쟁제인 L-NMMA(0.1 mM)를 처리하였을 때에는 NO 생성이 현저히 감소하였으나 기질인 L-arginine (1 mM)의 과량첨가에 의해 NO의 생성이 3배이상 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 PQ-6 (3 μM)에 의한 NO 생성저해활성은 L-arginine에 첨가에 의해서도 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 PQ-6의 NO 생성저해활성은 L-NMMA와 같은 L-arginine기질에 대한 경쟁에 의한 것이 아닌 것임을 알 수 있었다.

Fig. 4는 LPS로 macrophage를 활성화할 때 PQ-6를 처리하는 방법을 달리하였을 때의 결과이다. 즉, PQ-6 또는 L-NMMA존재하에 세포를 20시간 배양한 후에 LPS를 20시간 처리한 경우(전처리), 시료를

LPS와 동시에 20시간 처리한 경우(병용처리), 및 세포를 LPS존재하에 20시간 동안 배양하여 세포의 활성화를 완료한 후 LPS가 포함되지 않은 배양액으로 교체하고, PQ-6 또는 L-NMMA를 처리한 것(후처리)의 세 그룹으로 나누어 관찰한 결과이다. 결과에서 보는 바와 같이 L-NMMA의 경우 전처리의 경우는 NO 생성저해활성이 관찰되지 않은 반면 PQ-6는 후처리의 경우 활성이 거의 관찰되지 않았다. 즉, LPS로 활성화하는 과정에 PQ-6가 존재할 때 NO의 생성억제활성이 관찰되고 활성화가 완료된 후에는 활성이 관찰되지 않는 것으로 보아 PQ-6는 i-NOS의 유도단계를 저해하며, 유도된 i-NOS에 대한 효소활성의 저해효과는 없는 것으로 확인되었다. 그리고 PQ-6를 전처리한 후 제거한 경우는 NO 생성저해활성을 나타내지 않을 것으로 기대되었음에도 불구하고 52.5%의 저해를 나타내는 결과로 부터 PQ-6가 20시간 동안 세포에 처리될 때 세포내로 유입되어 그 영향을 나타내는 것으로 추정이 되었다. 한편 L-NMMA는 알려진 바와 같이 기질인 L-arginine과의 경쟁으로 NOS 효소활성에 대한 저해활성을 통하여 병용처리 및 후처리의 경우에도 NO의 생성량을 감소시켰다. 이와 같은 결과를 재확인 하기 위하여 PQ-6의 처리시간에 대한 시간의존성실험을 행한 결과를

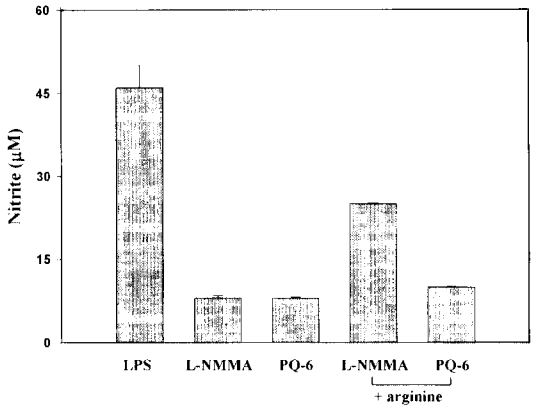

Fig. 3. Effects of NO production by PQ-6 (3 μM) and L-NMMA (0.1 mM) in LPS-activated RAW 264.7 cells, and the effect of the followed addition of L-arginine into the culture media. The media were exchanged by fresh one after 20 hr LPS-activation with effectors. After the further 20 hr incubation with or without the addition of L-arginine (1 mM), the amounts of NO_2^- were determined. Results represent the mean±S.D. of three experiments.

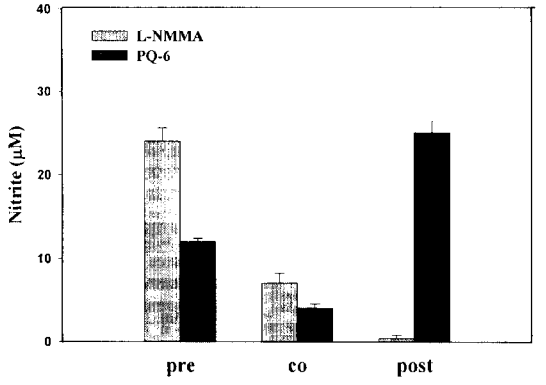

Fig. 4. Effects of PQ-6 (3 μM) and L-NMMA (0.1 mM) on the NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells. pre:cells were incubated with effectors for 20 hr and then activated with fresh media containing LPS for 20 hr. co : cells were incubated with effectors in the culture media containing LPS for 20 hr. post : cells were activated by LPS for 20 hr and then incubated in the fresh media containing effectors for 20 hr. Results represent the mean±S.D. of three experiments.

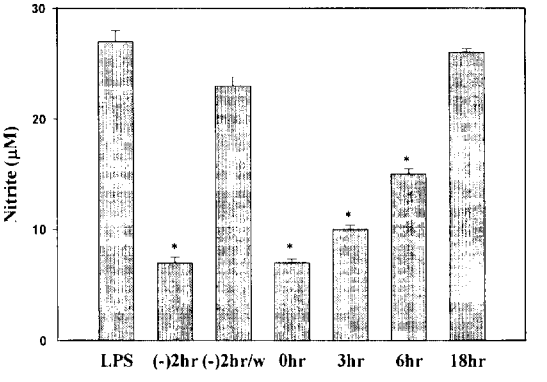

Fig. 5. Time course of inhibition of NO production by PQ-6 (3 μM) in LPS-activated RAW 264.7 cells. PQ-6 was treated to RAW 264.7 culture media at different times before/after activation with LPS. LPS : LPS alone. (-) 2hr : treated at 2 hr before LPS-activation. (-) 2 hr/w : treated at 2 hr before LPS-activation and the media was exchanged by fresh one. 0hr : co-treated with LPS. 3 hr (6 hr, 18 hr) : treated at 3 hr (6 hr, 18 hr) after addition of LPS into culture media. After 20 hr LPS-activation, NO_2^- assay was performed. Results are mean±S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control, *$p<0.001$.

Fig. 5에 나타내었다. LPS를 처리하는 시점을 0시간으로 정하고 전처리를 (−)로 표현하였을 때 2시간 전처리와 병용처리의 경우에 가장 강력한 활성을 나타내었고 후처리 시간이 길어질수록 즉, 세포를 LPS로 활성화하는 동안 시료의 처리 시간이 짧을수록 NO생성저해활성도 약화되었다. 이와 같은 결과로부터 LPS로 활성화한 macrophage에서 PQ-6가 NO의 생성을 저해하는 것은 NOS의 유도단계를 저해하는 것에 기인하는 것으로 확인하였으며, panaxynol과 ginsenoyne A도 동일한 기전으로 NO의 생성저해활성을 나타낼 것으로 예상하였다.

요 약

인삼의 지용성 분획으로부터 LPS로 활성화된 macrophage에 의한 NO 생성저해활성을 가지는 물질을 규명하기 위하여, 생쥐대식세포주 RAW 264.7 세포를 LPS로 처리하여 i-NOS를 유도하여 생성된 NO를 NO_2 량으로 정량하는 방법을 사용하였다. 이때 인삼 시료를 처리하여 시료에 의한 활성을 추적하면서 활성물질을 단리하였다. 활성을 나타내는 세가지의 polyacetylene류의 구조를 panaxynol, ginsenoyne A, PQ-6로 확인하였으며, 이들의 IC_{50}은 각각 32.3 μM, 2.3 μM, 1.5 μM이었다. 이와 같은 인삼 polyacetylene류들의 활성은 macrophage에서 LPS에 의한 i-NOS의 유도과정을 차단함에 기인한다는 것임을 확인하였다.

감사의 말씀

이 연구는 1997년 고려인삼학회 및 보건복지부 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 9265 (1987).
2. Angus, J. A. and Cocks, T. M. : *Pharmacol. Ther.*, **41**, 303 (1989).
3. Knowles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 1042 (1990).
4. Rees, D. D., Cellek, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 541 (1990).
5. Nathan, C. : *FASEB J.*, **6**, 3051 (1992).
6. Wolfe, T. A. and Dasta, J. F. : *Ann. Pharmacother.*, **29**, 36 (1995).
7. Aeberhard, E., Henderson, S. A., Arabolos, N. S., Griscavage, J. M., Castro, F. E., Barrett, C. T. and Ignarro, L. J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 1053 (1995).
8. Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7240 (1993).
9. Salvemini, D., Seibert, K., Masferrer, J. L., Misko, T. P., Currie, M. G. and Needleman, P. : *J. Clin. Invest.*, **93**, 1940 (1994).
10. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan,C. F. and Wahl, S. M. : *J. Exp. Med.*, **178**, 749 (1993).
11. Barnes, P. J. and Liew, F. Y. : *Immunology Today*, **16**, 128 (1995).
12. Moore, W. M., Webber, R. K., Jerome, G. M., Tjoeng, F. S., Misko, T. P. and Currie, M. G. : *J. Med. Chem.*, **37**, 3886 (1994).
13. Griffith, M. J. D., Messent, M., Macallister, R. J. and Evans, T. W. : *Br. J. Pharmcol.*, **110**, 963 (1993).
14. Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R. and Currie, M. G. : *Eur. J. Pharmacol.*, **233**, 119 (1993).
15. Park, E., Schuller-Levis, G. and Quinn, M. R. : *J. Immunol.*, **154**, 4778 (1995).
16. Brouet, I. and Ohshima, H. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 533 (1995).
17. Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. and Drapier, J. C. : *Biochem. J.*, **297**, 53 (1994).
18. Kondo, Y., Takano, F. and Hoj, H. : *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1887 (1993).
19. Guha, K. P., Mukherjee, B. and Mukherjee, R. : *J. Nat. Prod.*, **42**, 1 (1979).
20. Yu, S. M. : *Biochem. J.*, **303**, 289 (1994).
21. Niwa, M., Nakamura, N., Kitajima, K., Ueda, M., Tsutsumishita, Y., Futaki, S. and Takaishi, Y. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 367 (1997).
22. Park, H.-J., Jung, W.-T., Basnet, P., Kadota, S.

and Namba, T. : *J. Nat. Prod.*, **59**, 1128 (1996).
23. Se Ran Jang, MS thesis, Sookmyung Women's University, Seoul, 1997.
24. Bradford, M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
25. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : *Anal. Biochem.*, **126**, 131 (1982).
26. Shim, S. C., Koh, H. Y. and Han, B. H. : *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **4**, 183 (1983).
27. Hiracura, K., Morita, M., Nakajima, K., Ikeya, Y. and Mitsuhashi, H. : *Phytochemistry*, **30**, 3327 (1991).
28. Fujimoto, Y., Wang, H., Kirisawa, M., Sayoh, M. and Takeuchi, N. : *Phytochemistry*, **31**, 3499 (1992).