

## 강황에서 종양괴사인자 생성을 억제하는 활성성분의 분리

조재열\* · 이종수 · 박지수 · 박명환

(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received November 10, 1997)

### Isolation of Inhibitory Components on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Production from *Angelica koreana*

Jae Youl Cho\*, Jongsoo Lee, Jisoo Park and Myung Hwan Park  
R & D Center, Daewoong Pharm. Co. Ltd., 223-23, Sangdaewon-Dong, Joongwon-Gu, Sungnam, Kyunggi-Do, 462-120, Korea

**Abstract** - The total ethanol extract of *Angelica koreana* radix (Umbelliferae) showed potent inhibitory effect on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production from LPS-stimulated RAW264.7 cells in screening studies on 118 Korean medicinal plants. The activity-guided fractionation of the total ethanol extract resulted in the isolation of 4 compounds, including active substances. The chemical structures of the compounds isolated were established by chemical and spectrometric analyses as imperatorin, isoimperatorin, osthol and oxypeucedanin. Among them, osthol, oxypeucedanin and isoimperatorin showed significant inhibitory activities on TNF- $\alpha$  production as  $54.3 \pm 2.1\%$ ,  $33.6 \pm 1.0\%$  and  $17.7 \pm 3.0\%$ , respectively, at  $12.5 \mu\text{g/ml}$ .

**Keywords** □ *Angelica koreana* radix (Umbelliferae), TNF- $\alpha$ , RAW264.7, lipopolysaccharide, ELISA, imperatorin, isoimperatorin, osthol, oxypeucedanin.

TNF- $\alpha$ 는 lipopolysaccharide(LPS)나 phorbol-12-myristate-13-acetate 등에 의해 macrophage 나 monocyte 등으로부터 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine이다.<sup>1-4)</sup> TNF- $\alpha$ 는 생성된 종양세포를 괴사시키는 항종양물질로 알려져 있었으나, 최근에는 많은 질환들에서 TNF- $\alpha$ 의 병리적 역할이 증명되면서, 알려지거나 염증반응의 주요 매개물질로 이해되고 있다.<sup>1-4)</sup>

TNF- $\alpha$ 의 대표적인 병리작용은 천식이나 아토피성 피부염 등과 같은 알려지정염증질환에서부터,<sup>2-4)</sup> 그람 음성균의 내독소에 의해 야기되는 패혈증이나<sup>5, 6)</sup> immunological liver injury 등<sup>7)</sup>과 같은 급성질환들, 전신홍반성낭창, 장기이식 및 류마티스성 관절염 등과 같

은 자가면역성 질환<sup>3, 4, 8)</sup>에서 확인되고 있다. 또한 최근에는 TNF- $\alpha$ 가 human immunodeficiency virus의 DNA복제를 촉진시키고, 암세포전이시 필수적인 혈관 신생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다.<sup>2)</sup>

이에 따라 많은 연구들은 TNF- $\alpha$ 생성이나 작용을 억제하는 억제약물 개발에 주력하고 있다. 이제까지 알려진 TNF- $\alpha$  억제제는 tyrphostin 계열의 protein tyrosine kinase 억제제,<sup>9)</sup> 세포내 cAMP 증가 유도 약물들,<sup>10)</sup> TNF- $\alpha$ 의 mRNA 분해를 촉진시키는 thalidomide,<sup>11)</sup> TNF- $\alpha$ 의 단백질 processing 억제제<sup>12, 13)</sup> 및 carbocyclic nucleoside 유도체들<sup>14-17)</sup> 등이 있다. 한편 오랫동안 질병의 예방이나 치료로 사용되어 왔던 천연물로부터 추출 정제되어 확인된 몇몇 화합물들도 보고되고 있는데, 대표적인 것이 parthenolide 등과 같은 sesquiterpene lactone 계열의 약물들과,<sup>18)</sup> pinoresinol과 같은 furofuran계열의

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

lignan류들<sup>19, 20)</sup> 및 bisbenzylisoquinoline alkaloids 계열의 화합물(berbamine, tetrandrine, isotetrandrine 및 fangchinoline) 등<sup>21-23)</sup>이 보고되고 있으나 아직 치료제로 개발되지는 않고 있는 실정이다.

한편 저자 등도 TNF- $\alpha$  억제 효과를 가지는 새로운 계열의 선도화합물을 천연물로부터 도출할 목적으로 국내산 생약들 약 120여종에 대한 일차 스크리닝 연구를 실시하여 강활을 포함한 10여종의 생약들이 total ethanol extract에서 50% 이상의 높은 억제 효과를 나타낸다는 사실을 확인한 바 있다.<sup>20)</sup> 따라서 본 연구에서는 강활로부터, LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 억제효과를 가지는 단일 화합물에 대한 구조 동정이 요구되어, activity-guided fractionation 방법으로 활성 성분들의 분리를 시도하였으며, 그 결과 활성을 나타내는 몇몇 화합물들을 분리하였기에 이에 보고하고자 한다. 또한 신약개발 관점에서 이들 물질들에 대한 선도화합물로서의 가능성 유무를 함께 고찰해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

**시약 및 재료** - 실험에 사용된 강활(*Angelica koreana* radix Umbelliferae)은 경동시장에서 구입하였다. 시약으로서 대조약물로 사용된 pentoxifylline, theophylline 및 LPS(*E. coli* 0111 : B4)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였다. Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 실험하였다. 또한 세포배양시 사용된 penicillin, streptomycin, RPMI 1640 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 그외 사용된 모든 시약은 특급이상 및 Sigma제품을 이용하였다. Column chromatography용 silica gel 60 및 precoated silica gel 60 CF254 T.L.C. plate는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, TNF- $\alpha$  enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 Amersham Life Science(Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 사로부터 구입하여 정량에 이용하였으며, ELISA reader로는 Spectramax 250 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사

용하였다.

**Activity-guided fractionation에 의한 활성물질의 분리** - 강활(500 g)을 70%에탄올로 환류시키면서 3시간씩 3회 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압농축하여 114 g의 total ethanol extract(crude extract)를 얻었다. Crude extract를 증류수에 현탁시킨 후 methylene chloride( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), ethyl acetate(EtOAc), *n*-butanol(*n*-BuOH) 순으로 용매분획하였다. 또한 각각의 용매분획에 대한 TNF- $\alpha$  억제 활성을 조사하여 가장 높은 억제효과를 나타낸  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  분획으로부터 활성성분을 도출하기 위해 preparative thin layer chromatography 및 수회 column chromatography를 통한 activity-guided fractionation을 수행하였으며, 최종분획으로부터 수종의 물질을 분리하였다. 분리된 물질은 <sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C NMR 및 X-ray crystallography를 통하여 구조분석을 실시하였다.

**약물처리** - 시험약물 및 추출물은 propylene glycol 89.1%, 에탄올 10% 및 dimethylsulfoxide 0.1% 비율로 조제된 vehicle을 100%로 하여 녹인 후 다시 배지를 이용하여 각각의 농도로 희석하였다. 또한 약물처리시 각 well당 vehicle의 농도는 LPS로 자극된 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$  생성 분비에 영향을 미치지 않는 농도인 0.1% 이하로 하였다.

**In vitro TNF- $\alpha$  생성 및 정량** - Murine macrophage cell line인 RAW264.7세포를 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서  $1 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5%  $\text{CO}_2$  및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다. 이후 전배양 배지를 제거하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50  $\mu\text{l}$ 와 450  $\mu\text{l}$ 의 LPS(최종농도 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 함유 배지를 well에 동시 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하고, 상층액의 일부를 취해 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다.

TNF- $\alpha$ 의 정량은 TNF- $\alpha$  ELISA kit를 이용하여 정량하였다. TNF- $\alpha$ 의 정량한계는 5 pg/ml 이하였으며 standard TNF- $\alpha$ 에 대한 표준곡선의  $r^2$ 값은 0.99 이상이었다.

**통계처리** - 각 data는 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였으며 p값이 0.05미만일 때 유의성있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

**활성물질의 구조분석** - 가장 높은 활성을 나타낸 분획에 대한 주성분을 분리하기 위해 silica gel column에서 수회 chromatography하여 결정화상태로 유도한 후 4종의 순수 화합물을 얻었다(Scheme 1). 분리된 물질들은 <sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C NMR 및 X-ray crystallography(데이터는 제시하지 않았음)를 통하여 구조분석을 실시한 결과, Fig. 1에서 처럼 imperatorin(mp 103~104°), isoimperatorin(mp 109~110°), osthol(mp 83~84°) 및 oxypeucedanin(mp 139~140°)으로 동정되었으며, 각 분석결과(NMR data: Table I)는 문헌<sup>24-26)</sup>에서 보고된 것과 일치하였다. 즉 <sup>1</sup>H NMR 결과는 Kim 등(1989)과 Woo 등(1982)이 보고<sup>25, 26)</sup>한 chemical shift값과 비교하면 측정편차(±0.1 Hz) 내에서 동일하였으며, <sup>13</sup>C NMR spectra 결과 역시, 동일한 경향을 보였다. Imperatorin의 <sup>13</sup>C chemical shift 값을 바탕으로 isoimperatorin의 값과 비교하면, 두 화합물은 화합구조상 위치 이성질체 관계가 있기 때문에, 각 탄소의 값은 각각 동일하나, C-5와 C-8의 값이 152.7 ppm과 94.2 ppm인데 비해 113.3 ppm과 125.9 ppm의 결과로써 quaternary와 tertiary carbon 구조임을 식별할 수 있어 isoimperatorin 임을 동정할 수 있었다. 또한 oxypeucedanin의 경우는 isoimperatorin의 탄소번호별 chemical shift값이 상호간에 잘 일치하고 있으나,

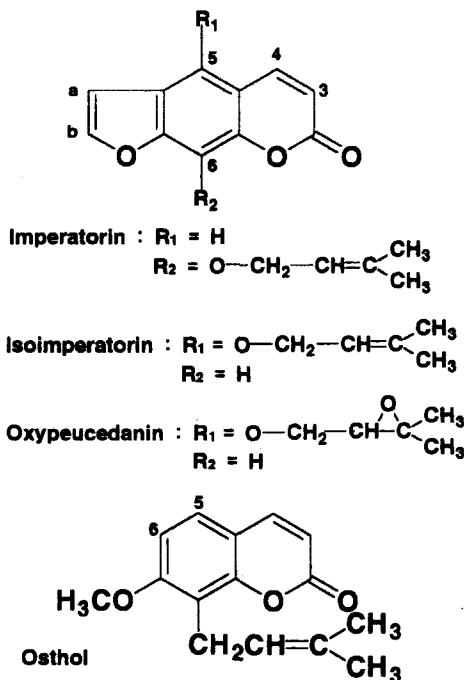


Fig. 1 - Chemical structures of isolated components.

C-2'와 C-3'의 값이 각각 119.1 ppm과 139.6 ppm인데 비해 61.0 ppm과 58.2 ppm의 결과로써 탄소-탄소 구조가 이중 및 단일 결합으로 동정되어 쉽게 확인이 가능하였다. Osthol의 경우도 <sup>13</sup>C NMR 및 <sup>1</sup>H NMR spectra 결과가 문헌의 결과<sup>24)</sup>와 잘 일치되었다.

<i>Angelica koreana</i> (radix) 500 g extracted with 70% ethanol concentrated in vacuum Total ethanol extract (114 g, 100 µg/ml <sup>a</sup> ) Solvent extraction CH <sub>2</sub> Cl fraction (20.6 g, 50 µg/ml) Preparative TLC loaded 10.7 g with CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (50:1)				
Fr-1 (0.45 g)	Fr-2 (1.99 g)	Fr-3 (0.53 g)	Fr-4 (0.87 g)	Fr-5 (25 µg/ml) (2.10 g)
chromatographed over silica gel with <i>n</i> -hexane:EtOAc (5:1)				
Fr-2-1 (23.5 mg)	Fr-2-2 (99.5 mg)	Fr-2-3 (109.3 mg)	Fr-2-4 (16.9 mg)	(12.5 µg/ml)
crystalized in MeOH				
Imperatorin (18.5 mg)	isoimperatorin (31.3 mg)	oxypeucedanin (15.2 mg)	osthol (23.7 mg)	

Schem 1 - Extraction and isolation of inhibitory components by activity-guided fractionation from *Angelica koreana*.  
<sup>a</sup> indicates a final concentration for assay.

Table I—<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data

Carbon	Imperatorin		Isoimperatorin		Osthol		Oxypeucedanin	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
C-2	-	161.0	-	161.3	-	161.4	-	161.0
C-3	6.38(d)	115.1	6.23(d)	112.6	6.26(d)	117.9	6.34(d)	113.1
C-4	7.78(d)	144.8	8.12(d)	139.5	7.63(d)	143.7	8.23(d)	139.0
C-4a	-	116.9	-	107.5	-	113.0	-	107.4
C-5	7.38	113.6	-	152.7	7.31(d)	126.1	-	152.5
C-6	-	126.3	-	114.2	6.85(d)	107.3	-	114.1
C-7	-	149.0	-	158.1	-	152.8	-	158.0
C-8	-	126.3	7.10	94.2	-	121.0	7.22	94.9
C-8a	-	140.2	-	149.0	-	160.1	-	148.3
a	6.83(d)	147.0	6.93(q)	144.9	-	-	6.97(t)	145.3
b	7.71(d)	107.1	7.57(d)	105.1	-	-	7.63(d)	104.5
C-1'	5.02	70.6	4.89(d)	72.3	3.55(d)	25.8	4.46(dd)	72.3
							4.62(dd)	
C-2'	5.62	120.1	5.52(tq)	119.1	5.24(tq)	77.1	3.25(q)	61.1
C-3'	-	132.1	-	139.6	-	132.7	-	58.3
C-4'	1.74	18.6	1.68	18.2	1.69	17.9	1.35	19.0
C-5'	1.76	26.3	1.78	25.8	1.86	21.9	1.43	24.6
-OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	3.94	56.0	-	-

Spectra were measured at 300 MHz in CDCl<sub>3</sub> and chemical shifts are expressed in δ with TMS as internal standard. Signals are designated as follows : s: singlet, d: doublet, t: triplet, and q: quartet.

**TNF-α 억제 효과** - 강활의 crude extract 및 solvent fractionation 후 각 분획의 TNF-α 억제효과를 Table II에 나타냈다. 결과에서 처럼 crude extract는 70.2%의 높은 억제 결과를 보였는데, 이와같은 결과는 Lee 등이 보고<sup>27)</sup>한 interleukin-8에 대한 강활의 억제 결과에서 보여주었던 20%~49%의 억제 결과와는 다른 것으로 나타나, TNF-α 억제효과를 나타내는 분획 혹은 성분들과 interleukin-8을 억제하는 분획 혹은 성분들은 서로 다른 것으로 판단된다.

분리된 각 성분들의 TNF-α 억제 결과는 Table II에 나타냈다. 결과에서 처럼 가장 높은 억제효과를 보인 화합물은 osthol로서 54%였으며, oxypeucedanin(33%) 및 isoimperatorin(18%) 순으로 억제효과를 나타냈다. 한편 isoimperatorin의 이성체인 imperatorin은 억제효과를 나타내지 않았다. 따라서 osthol의 경우 분자량

Table II—Inhibitory effect of *Angelica koreana* on TNF-α production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Fraction	% Inhibition of TNF-α production
Total ethanol extract <sup>a</sup>	70.2±2.1**
Solvent fractions <sup>b</sup>	
Methylene chloride	74.9±1.5**
Ethyl acetate	59.6±3.7**
<i>n</i> -Butanol	11.4±2.4
Water	-1.9±2.1

RAW264.7 cells (1×10<sup>6</sup> cell/ml) were stimulated with 1 μg/ml of LPS with testing samples. Supernatants were collected after 6 h and assayed by ELISA. Basal level of TNF-α in culture medium at no stimulation was 0.5 ng/ml to 1 ng/ml. However, stimulation by LPS produced a large amount of TNF-α (65 ng/ml~70 ng/ml).

Data represent mean±SEM of 3 observations.

<sup>a</sup> This sample was assayed at 100 μg/ml as a final concentration

<sup>b</sup> All samples were assayed at 50 μg/ml as a final concentration

\*\* p<0.01 compared to control.

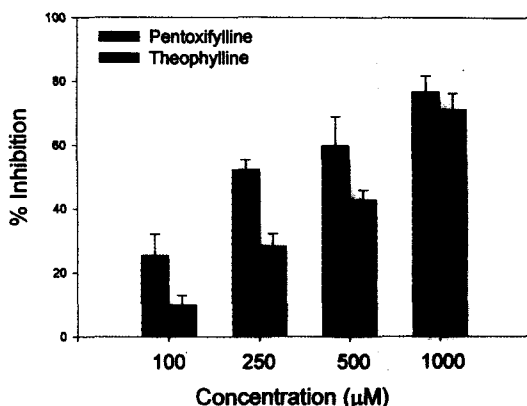


Fig. 2—Effect of nonselective cAMP phosphodiesterases (pentoxifylline and theophylline) on TNF-α production in RAW264.7 cells stimulated with 1 μg/ml of LPS.

**Table III**—Inhibitory effect of major components isolated from *Angelica koreana* on TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

Component <sup>a</sup>	Conc. ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	% Inhibition of TNF- $\alpha$ production
Imperatorin	46.2	-1.4 $\pm$ 1.0
Isoimperatorin	46.2	17.7 $\pm$ 2.3*
Osthol	51.2	54.3 $\pm$ 2.1**
Oxypeucedanin	43.7	33.6 $\pm$ 1.0**

RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with 1  $\mu$ g/ml of LPS with testing samples. Supernatants were collected after 6 h and assayed by ELISA. Basal level of TNF- $\alpha$  in culture medium at no stimulation was 0.5 ng/ml to 1 ng/ml. However, stimulation by LPS produced a large amount of TNF- $\alpha$  (65 ng/ml~70 ng/ml) from RAW264.7 cells.

Data represent mean $\pm$ SEM of 3 observations.

<sup>a</sup> All samples were assayed at 12.5  $\mu$ g/ml as a final concentration

<sup>b</sup> Molar concentration at 12.5  $\mu$ g/ml

\* p<0.05 compared to control

\*\* p<0.01 compared to control

으로 환산된 IC<sub>50</sub>(50% inhibitory concentration)는 50  $\mu$ M 정도로 예상된다. 그러나 정확한 결과는 이후 농도 의존성 실험을 통해 보다 명확히 확인될 수 있을 것으로 판단된다. 이와같은 예상치는 TNF- $\alpha$  억제효과가 이미 알려진 cAMP phosphodiesterase 억제제인 pentoxifylline(약 250  $\mu$ M)이나 theophylline(약 540  $\mu$ M) 및 furofuran 형의 lignan인 pinoresinol(약 70  $\mu$ M)이나 eudesmin(약 60  $\mu$ M)의 IC<sub>50</sub> 값보다 우수한 것으로 나타났다.<sup>19, 20</sup> 그러나 이미 보고된 1~10  $\mu$ M 수준의 bisbenzylquinoline alkaloids보다는 1/40~1/4의 활성을 갖는다.<sup>21-23</sup>

분리된 성분들로부터 TNF- $\alpha$  억제효과에 대한 구조 활성 상관관계(structure-activity relationship)를 살펴보면 furan 고리 대신 모핵내 C7 위치에 methoxy 기를 가진 osthol이 가장 높은 억제효과를 나타낸 것으로 보아, 이들 moiety는 TNF- $\alpha$  억제 활성에 매우 중요한 부분으로 판단된다. 그러나 furan 고리를 가지고 있는 oxypeucedanin이나 isoimperatorin 역시 유의적인 억제효과를 나타냈는데, 이들 구조는 공통적으로 동일 방향(모핵의 C5 위치)의 lipophilic moiety (3-methyl-2-butenyl 기 혹은 [(2S)-3,3-dimethyloxiran-2-yl] methoxyl 기)를 함유하고 있다. 따라서 이와같은 결과는 coumarin 유도체들의 TNF- $\alpha$  억제효과는 furan고리의 존재 및 moiety의 방

향 등에 의해 영향받는다를 것을 시사한다. 따라서 이들 구조의 적절한 조절은 우수한 TNF- $\alpha$  억제 약물의 새로운 모핵으로서 가치있을 것으로 판단된다.

Coumarin 유도체들은 antimutagenesis,<sup>28-30</sup> larvicidal activity<sup>31</sup>) 및 antiplatelet aggregation<sup>32</sup>) 등의 작용과, 특히 osthol은 항알러지 작용<sup>33</sup>)과 hepatitis B virus의 세포의 분비를 억제<sup>34</sup>)하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 성분들이 cytokine 억제에 미치는 영향 등은 아직 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구 결과는 coumarin 유도체들의 TNF- $\alpha$  억제작용에 대한 최초의 보고로 사료되며, osthol이 나타내는 항알러지 작용은 TNF- $\alpha$  억제에서 기인된 약효의 일부로 판단될 수 있다. 한편 강황에 대한 세포독성 성분들은 bisabolangelone 계열의 화합물들로서 coumarin 유도체와는 다른 것으로 보고되고 있다.<sup>35</sup>)

## 결 론

강황로 부터 TNF- $\alpha$  억제효과를 가지는 활성성분을 분리하기 위해 total ethanol extract로부터 solvent fractionation과 preparative TLC 및 silica gel column chromatography 등을 이용한 activity-guided fractionation으로 주성분들인 coumarin 유도체들(imperatorin, isoimperatorin, osthol 및 oxypeucedanin)을 분리하였다. 이중 osthol, oxypeucedanin 및 isoimperatorin은 12.5  $\mu$ g/ml 농도에서 각각 54.3 $\pm$ 2.1%, 33.6 $\pm$ 1.0% 및 17.7 $\pm$ 3.0%의 유의적인 억제효과를 나타냈다. 따라서 이후에는 osthol이 가지는 정확한 TNF- $\alpha$  억제 작용 및 기전연구와 함께 *in vivo*에서의 약리작용 등에 관한 연구가 계속 진행되어야 하겠다.

## 문 헌

- 1) Vileek, J. and Lee, T. H. : Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J. Biol. Chem.* **266**, 7313 (1991).
- 2) Sekut, L. and Connolly, K. M. : Pathophysiology and regulation of TNF- $\alpha$  in inflammation. *Drug News Perspect.* **9**, 261 (1996).
- 3) Beutler, P. B. : *Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine.* Raven

- press, New York (1992).
- 4) Manogue, K. R., Van Derventer, J. H. and Cerami, A. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  or cachectin. In *The Cytokine Handbook*, Thomson, A. (Ed). Academic Press, Inc., San Diego, p. 241 (1992).
  - 5) Bamkey, P. E. and Cerra, F. B. : Hepatic dysfunction in shock and organ failure. In *Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure*, Schlag, G. and Redl, H. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 948-960 (1993).
  - 6) Zentella, A., Manogue, K. and Cerami, A. : The role of cachectin/TNF- $\alpha$  and other cytokines in sepsis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **367**, 9 (1991).
  - 7) Tiegs, G., Wolter, M. and Wendel, A. : Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 627 (1989).
  - 8) Firestein, G. S. : Rheumatoid synovitis and pannus. In *Rheumatology*, (eds. Klippel, J. and Dieppe, P.) Mosby, St. Louis, pp. 3.12.1-3.12.30 (1994).
  - 9) Novgrodzki, A., Vanichkin, A., Patya, M., Gazit, A., Osherov, N. and Levitzki, A. : Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* **264**, 1319 (1994).
  - 10) Han, J., Thompson, P. and Beutler, B. : Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signalling pathway. *J. Exp. Med.* **172**, 391 (1990).
  - 11) Moreira, A. L., Sampaio, E. P., Zumuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K. A. and Kaplan, G. : Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor- $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* **177**, 1675 (1993).
  - 12) McGeehan, G. M., Becherer, J. D., Bast, R. C., Biyer, C. M., Champion, B., Connolly, K. M., Conway, J. G., Furdon, P., Karp, S., Kidao, S., McElroy, A. B., Nichols, J., Pryzwansky, K. M., Shoenen, F., Sekut, I., Truesdale, A., Verghese, M., Warner, J. and Ways, J. P. : Regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* **370**, 558 (1994).
  - 13) Crowe, P. D., Walter, B. N., Mohler, K. M., Otten-Evans, C., Black, R. A. and Ware, C. F. : A metalloproteinase inhibitor blocks shedding of the 80-kd TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 1205 (1995).
  - 14) Parmely, M. J., Zhou, W. W., Edwards, C. K., Borchering, D. R., Silverstein, R. and Morrison, D. C. : Adenosine and a related carbocyclic nucleoside selectively inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  production and protect mice against endotoxin challenge. *J. Immunol.* **151**, 389 (1993).
  - 15) Bradshaw, M., Rutherford, M. S., Hoepfer, B. J., McWhinney, C. D., Borchering, D. R., Shook, L. B. and Edwards, C. K. : Specific transcriptional inhibition of bone marrow-derived macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression and protein production using novel enantiomeric carboxylic nucleoside analogues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 1506 (1995).
  - 16) Firestein, G. S., Boyle, S. D., Bullogh, D. A., Gruber, H. E., Sajjadi, F. G., Montag, A., Sambol, B. and Mullane, K. M. : Protective effect of an adenosine kinase I inhibitor in septic shock. *J. Immunol.* **152**, 5853 (1994).
  - 17) Sajjadi, F. G., Takabayashi, K., Foster, A. C., Domingo, R. C. and Firestein, G. S. : Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine: Role of A3 adenosine receptors. *J. Immunol.* **156**, 3435 (1996).
  - 18) Hwang, D., Fischer, N. H., Jang, B. C., Tak, H., Kim, J. K. and Lee, W. : Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 810 (1996).
  - 19) Cho, J. Y., Park, J., Yoo, E. S., Yoshikawa, K., Baik, K. U., Lee, J. and Park, M. H. : Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta* on TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 12 (1998).
  - 20) Chae, S. H., Kim, P. S., Cho, J. Y., Park, J., Lee, J. H., Yoo, E. S., Baik, K. U., Lee, J. and Park, M. H. : Isolation and identification of inhibitory compounds on TNF- $\alpha$  production from

- Flos Magnoliae. *The Spring Convention of Pharmaceutical Society of Korea, Abstr.* p. 186 (1997).
- 21) Seow, W. K., Nakamura, K., Sugimura, Y., Sugimoto, Y., Yamada, Y., Fairlie, D. P. and Thong, Y. H. : Inhibitory effects of bisbenzylisoguinolines on synthesis of the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Med. Inflamm.* **2**, 199 (1993).
  - 22) Seow, W. K., Ferrante, A., Summors, A. and Thong, Y. H. : Comparative effects of tetrandrine and berbamine on production of the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Life Sci.* **50**, PL53 (1992).
  - 23) Onai, N., Tsunokawa, Y., Suda, M., Watanabe, N., Nakamura, K., Sugimoto, Y. and Kobayashi, Y. : Inhibitory effects of bisbenzylisoguinoline alkaloids on induction of proinflammatory cytokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Planta Med.* **61**, 491 (1995).
  - 24) Ito, C., Mizuno, T., Tanahashi, S., Furukawa, H., Ju-Ichi, M., Inoue, M., Muraguchi, M., Omura, M., McPhail, D. R. and McPhail, A. T. : Structure of bisosthenon, a novel dimeric coumarin from *Citrus* plants *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2101 (1990).
  - 25) Woo, W. S., Lee, C. K. and Shim, K. H. : Isolation of drug metabolism modifiers from roots of *Angelica koreana*. *Planta Med.* **45**, 234 (1982).
  - 26) Kim, T. J., Lee, S. I., Yoon, Y. S. and Ko, J. S. : A study on structure and quantitation of furanocoumarins from *Angelica koreana* Max.. *Anal. Sci. Technol.* **2**, 337 (1989).
  - 27) Lee, G. I., Ha, J. Y., Min, K. R., Nakagawa, H., Tsurufji, S., Chang, I. M. and Kim, Y. : Inhibitory effects of oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. *Planta Med.* **61**, 26 (1995).
  - 28) Cai, Y., Baer-Dubowska, W., Aswood-Smith, M. and DiGiovanni, J. : Inhibitory effects of naturally occurring coumarins on the metabolic activation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene in cultured mouse keratinocytes. *Carcinogenesis* **18**, 215 (1997).
  - 29) Wall, M. E., Wani, M. C., Manikumar, G., Hyghes, T. J., Taylor, H., McGivney, R. and Warner, J. : Plant antimutagenic agents, 3. Coumarins. *J. Nat. Prod.* **51**, 1148 (1988).
  - 30) Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J. and Iwashima, A. : Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances. II. Inhibition of tumor-promoter-enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials. *Chem Pharm. Bull.* **38**, 1084 (1990).
  - 31) Marston, A., Hostettman, K., Msonthi, J. D. : Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchmanii* by centrifugal partition chromatography. *J. Nat. Prod.* **58**, 128 (1995).
  - 32) Chen, I. S., Chang, C. T., Sheen, W. S., Teng, C. M., Tsai, I. L., Duh, C. Y. and Ko, F. N. : Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **41**, 525 (1996).
  - 33) Chen, Z. C., Duan, X. B. and Liu, K. R. : The anti-allergic activity of osthol extracted from the fruits of *Onidium monnieri* (L.) Cussion. *Yao Hsueh Pao* **23**, 96 (1988).
  - 34) Cai, Y., Bennett, D., Nair, R. V., Ceska, O., Ashwood-Smith, M. J. and DiGiovanni, J. : Inhibition and inactivation of murine hepatic ethoxy- and pentoxyresorufin O-dealkylase by naturally occurring coumarins. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 872 (1993).
  - 35) Bae, K. W., Ji, J. M., Kang, J. S. and Ahn, B. Z. : A cytotoxic component from *Angelicae koreanae* Radix against L1210 and HL 60 cells. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 45 (1994).