

갯기름나물의 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해활성

최희철, 노태철, 김보연, 고희룡, 오원근, 성창근¹, 민태익, 안종석, 이현선*
생명공학연구원 세포반응조절 R.U., ¹충남대학교 식품공학과

Inhibition of Nitric Oxide Production by Coumarins from *Peucedanum japonicum* in LPS-Activated RAW 264.7 cells

Hee Cheol Choi, Tae Cheol Rho, Bo Yeon Kim, Hack Ryong Ko, Won Keun Oh,
¹Chang Keun Seong, Tae Ick Mheen, Jong Seog Ahn and Hyun Sun Lee*

*Cellular Response Modifier R.U., Korea Research Institute of
Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea and
¹Department of Food Science and Technology, Chungnam National University,
Taejeon 305-764, Korea*

Abstract - During the screening for inhibitors of nitric oxide production in LPS-activated macrophage, RAW 264.7 cells. Five coumarins were isolated from chloroform extract of the root of *Peucedanum japonicum*. They were identified as praeruptorin A (1), xanthotoxin (2), psoralen (3), isopimpinellin (4), bergapten (5) on the basis of spectroscopic methods. The IC₅₀ values for nitrite production by activated macrophages were about 1.5 µg/ml (1), 0.3 µg/ml (2), 1.0 µg/ml (3), 25 µg/ml (4), 25 µg/ml (5), respectively. However, the inducible nitric oxide synthase (iNOS) was not inhibited by treatment with these compounds. Their inhibitory effect on nitric oxide production was resulted from the suppression of iNOS expression

Key words - *Peucedanum japonicum*: coumarins: nitric oxide: RAW 264.7 cells: lipopolysaccharide (LPS), iNOS.

Nitric oxide(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포로부터 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 합성된다.^{1,2} NOS는 크게 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있으며 이중 cNOS는 Ca²⁺/calmodulin 의존성이며 단시간 동안 소량의 NO를 생성하여 정상적인 생리기능을 담당한다.³ 여기에 신경세포에 존재하는 neuronal NOS(ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothe-

*교신저자 : Fax 042-860-4595

lial constitutive NOS(ecNOS)가 속한다. iNOS는 세포내 Ca²⁺의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 lipopolysaccharide(LPS), interferon-γ(IFN-γ), interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 특히 대식세포는 생체내에서 감염, 염증 등의 자극에 의해서 L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 NO를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염

을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 hypotension(혈관확장), 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.^{4,7)}

따라서 이런 증상에 대한 치료제를 개발할 목적으로, 최근에는 천연물로부터 NO생성 저해제를 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 그 대표적인 것으로는 *Evodia rutaecarpa*로부터 evodiamine과 dehydroevodiamine⁸⁾이, *Artemisia princeps*로부터 yomogin⁹⁾이, *Ginkgo biloba*로부터 EGb 761¹⁰⁾이, *Curcuma longa*로부터 curcumin¹¹⁾ 등이 분리, 보고되어 있다. 본 연구실에서는 *Peucedanum japonicum*의 뿌리로부터 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서의 NO생성 저해활성을 나타내는 5종의 쿠마린계 물질을 분리하였으며 이들의 구조와 NO생성 저해활성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료, 기기 및 시약-본 실험에 사용한 갯기름나무 (*Peucedanum japonicum*)의 뿌리는 1997년에 대전시 소재 일신약품에서 구입하였다. 박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silica gel 60F₂₅₄(Merck, Art. 5554)와 RP-18F_{254s}(Merck)를 이용하여 실시하였고 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel 60(70-230 mesh, Merck), YMC-gel(ODS-A, 60-230 mesh), Sephadex LH-20(Pharmacia)을 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Unity 300 spectrometer, FAB-MS는 Kratos Concept-1S, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

세포배양-Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM L-arginine과 100 µg/ml의 penicilline, streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. RAW 264.7 세포를 1 × 10⁶ cells/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 200 µl씩 분주하고 2시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 새로운 배지로 교환하였다.

각 well에 1 µg/ml의 lipopolysaccharide(*E. coli* serotype 055:B5, Sigma)와 검정시료용액 5 µl를 첨가하여 20시간 배양하였다.

Nitrite assay-macrophage로부터 생성된 Nitric oxide (NO)의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 (0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine · 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O) 100 µl를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 microplate reader (Dynatech, MR 700)로 흡광도를 측정하였다.¹²⁾

Western blot analysis-RAW 264.7 세포를 LPS(1 µg/ml)와 검정시료용액을 첨가하여 20시간 동안 배양하였다. 세포들을 ice-cold PBS(Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline)로 세척 후 원심분리하여 상등액을 제거 후, 400 µl의 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Noindet P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptin and aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 용해시켰다. 이 세포 용해액을 원심분리(10,000-15,000 rpm, 4°C)하여 상등액을 얻어 Bradford 방법을 사용하여 단백질을 정량한 후 8% SDS-PAGE(50 µg/lane of protein)를 시행하고, 전가된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 Tris buffered saline(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 2시간 동안 세척 후 anti-inducible NOS antibody(rabbit, 1:2,000, Calbiochem)로 blotting하였다. Tris buffered saline으로 10분씩 3회, 20분씩 2회 세척 후 secondary antibody (G α-Rb Ig G-HRP, 1:2,000, Pierce)로 30분 동안 반응시켰다. Immunoreactive band는 ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK)western blotting system으로 확인하였다.

추출 및 분리-건조된 *Peucedanum japonicum*의 뿌리 1.2 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 MeOH 10 L로 7일간 2회 추출, 감압농축 하여 얻은 MeOH추출물(111 g)을 CHCl₃층과 물층으로 분획하였다. CHCl₃추출물 50 g을 실리카겔 컬럼크로마

토그래피(hexane-EtOAc, 10:1 → 3:1)를 실시하여 활성 Fr. A (9.8 g)을 얻고 계속해서 Sephadex LH-20 column chromatography(CHCl₃-MeOH, 1:1)를 실시하여 두 부분의 활성 Fr. B-1과 B-2를 얻었다. 활성 Fr. B-1과 B-2를 RP column chromatography(40% MeOH → 70% MeOH)와 Prep. HPLC(column: J'sphere ODS-H80, 4 μm, 80 Å, 150×20 mm I.D, flow rate: 7 ml/min, UV detector: 254 nm)를 실시하여 Fr. B-1에서 화합물 1 (34 mg)을, Fr. B-2에서 화합물 2 (18 mg)와 화합물 3 (7 mg)을 얻고 계속해서 recyclic Prep. HPLC(Japan Analytical Industry, 용매: 80% MeOH)를 실시하여 화합물 4 (2 mg)와 화합물 5 (4.2 mg)를 각각 분리하였다.

화합물 1-C₂₁H₂₂O₇; FAB-MS, *m/z* 387(M⁺ + H), 379, 349, 287, 245, 229, 133, 115; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 6.22(1H, d, J=9.3 Hz, H-3), 7.59(1H, d, J=9.3 Hz, H-4), 7.36(1H, d, J=8.4 Hz, H-5), 6.81(1H, d, J=8.4 Hz, H-6), 5.35(1H, d, J=4.8 Hz, H-3'), 6.63(1H, d, J=4.8 Hz, H-4'), 1.43(3H, s, CH₃-2'), 1.46(3H, s, CH₃-2'); acetyl-2.09(3H, s, CH₃); angeloyl-6.03(1H, qq, J=6.9, 1.8 Hz, β-H), 1.95(3H, s, CH₃), 2.01(3H, s, CH₃); ¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 112.5(C, C-10), 156.6(C, C-7), 107.3(C, C-8), 154.0(C, C-9), 77.3(C, C-2'), 159.7(C=O, C-2), 113.3(CH, C-3), 143.2(CH, C-4), 129.3(CH, C-5), 114.4(CH, C-6), 70.5(CH, C-3'), 60.1(CH, C-4'), 25.3(CH₃), 22.2(CH₃); angeloyl-127.5(C, C-α), 137.8(C, C-β), 169.8(C=O), 20.4(CH₃), 15.6(CH₃); acetyl-166.9(C=O), 20.8(CH₃)

화합물 2-C₁₂H₈O₄; EI-MS, *m/z* 216(M⁺), 201, 173, 145, 108, 89, 63; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.76(1H, d, J=9.6, H-3), 6.38(1H, d, J=9.6, H-4), 7.35(1H, s, H-5), 7.69(1H, d, J=2.1, H-2'), 6.82(1H, d, J=2.1, H-3'), 4.25(3H, s, OCH₃-8); ¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 160.4(C, C-2), 116.4(C, C-4a), 126.1(C, C-6), 147.7(C, C-7), 132.8(C, C-8), 143.0(C, C-8a), 114.7(CH, C-3), 144.3(CH, C-4), 112.9(CH, C-5), 146.6(CH, C-2'), 106.7(C, C-3'), 61.3(OCH₃)

화합물 3-C₁₁H₆O₃; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.80(1H, d, J=9.3, H-3), 6.38(1H, d, J=9.9, H-4), 7.48(1H, s, H-5), 7.70(1H, s, H-8), 7.69(1H, d, J=1.8, H-2'), 6.83(1H, J=2.1, H-3')

화합물 4-C₁₃H₁₀O₅; EI-MS, *m/z* 246(M⁺), 231, 203, 175, 147, 104, 66; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.13(1H, d, J=9.9, H-3), 6.3(1H, d, J=9.9, H-4), 7.63(1H, d, J=2.4, H-2'), 7.0(1H, d, J=2.1, H-3'), 3.96(3H, s, OCH₃-5), 4.17(3H, s, OCH₃-8)

화합물 5-C₁₂H₈O₄; ¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.15(1H, d, J=9.6, H-3), 6.27(1H, d, J=9.6, H-4), 7.6(1H, d, J=2.7, H-2'), 7.0(1H, d, J=2.7, H-3'), 7.26(1H, s, H-8), 4.27(3H, s, OCH₃-5); ¹³C-NMR(75 MHz, CDCl₃) δ: 161.2(C, C-2), 106.4(C, C-4a), 149.5(C, C-5), 112.6(C, C-6), 158.3(C, C-7), 152.7(C, C-8a), 112.5(CH, C-3), 139.2(CH, C-4), 93.8(CH, C-8), 144.7(CH, C-2'), 105.0(CH, C-3'), 60.0(OCH₃)

결과 및 고찰

LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 NO₂⁻의 양을 Griess 시약을 사용하여 NO생성 저해활성을 측정하였다. 150여 종의 생약을 대상으로 NO생성 저해활성을 탐색한 결과, 1차로 20여 종을 선별하였다. 그 중 *Peucedanum japonicum* 뿌리의 MeOH추출물이 125 μg/ml에서 84%의 저해활성을 보였고, 다시 CHCl₃층과 BuOH층으로 분획한 결과 동일한 농도에서 각각 93%와 47%의 활성을 보였다. 활성이 높은 CHCl₃ 분획으로부터 NO생성 저해물질을 분리, 정제하여 5종의 coumarin계열의 물질을 얻었다. 이들의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum 등의 기기분석 data와 문헌상의 결과를 비교함으로써 praeruptorin A (1), xanthotoxin (2), psoralen (3), isopimpinellin (4), bergapten (5)으로 동정되었으며 분리한 화합물들의 화학구조는 Fig. 1에서 나타내었다.¹³⁻¹⁴⁾

Fig. 2는 분리한 5종의 coumarin 중에서 활성이 높은 praeruptorin A (1), xanthotoxin (2), psoralen (3)의 농도에 따른 NO생성 저해효과를 나타

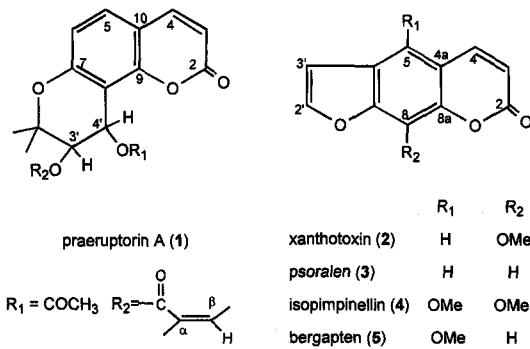


Fig. 1. Chemical structures of coumarins isolated from *Peucedanum japonicum*.

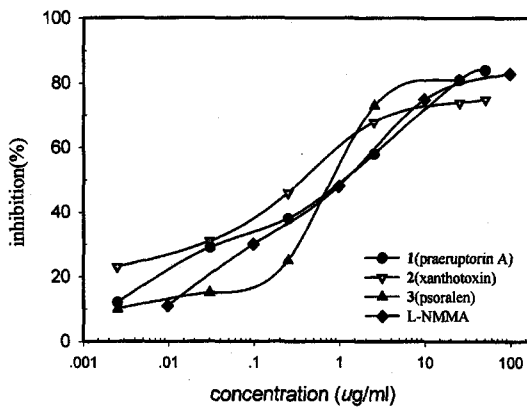


Fig. 2. Dose dependent effects by compounds 1, 2 and 3 on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells. Conditioned media were collected after 20 hr activation and the NO₂ levels were measured using Griess reagent. Each value is the mean ± SD of three experiments.

낸 표이다. 양성 대조구로 L-NMMA(N^G-Methyl-L-arginine, Monoacetate)를 사용하였으며, 이는 L-arginine과의 기질경쟁으로 인하여 활성을 나타내는 iNOS저해제로 알려져 있다.¹⁵⁾ 이들은 농도의존적으로 NO생성을 저해했으며 IC₅₀는 각각 1.5 µg/ml (1), 0.3 µg/ml (2), 1.0 µg/ml (3)로 나타났다. 이들 중 xanthotoxin (2)이 가장 강한 저해활성을 보였으며 양성대조구로 사용된 L-NMMA(IC₅₀=1.0 µg/ml)보다 활성이 높았으며, 화합물 1과 화합물 3의 경우는 양성 대조구와 유사한 저해활성을 보였다. 또한 Fig. 2에서 나타내지 않았지만, isopimpinellin (4)과 bergapten (5)은 각각 25 µg/ml에서 50%의 저해활성을 나타내었다.

Fig. 3는 화합물 1, 2, 3들의 시간에 따른 NO생성

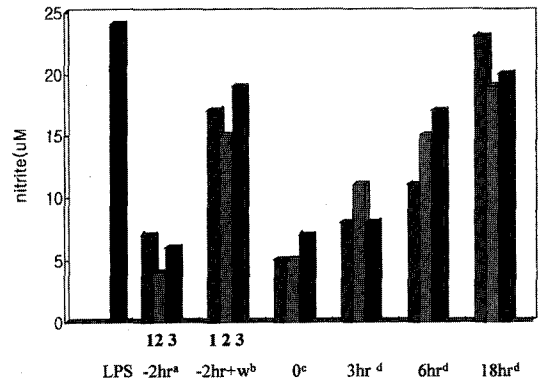


Fig. 3. Time dependent effects by compounds 1, 2 and 3 (25 µg/ml) on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells. Test samples were added to RAW 264.7 cells at -2, 3, 6 and 18 hr relative to the addition of LPS (0 hr). Each value is the mean ± SD of three experiments. ^aSamples were treated at 2 hr before LPS-activation. ^bSamples were treated at 2 hr before LPS-activation and media was exchanged by fresh media. ^cSamples were co-treated with LPS. ^dSamples were treated at 3, 6 and 18 hr after LPS-activation. After 20 hr LPS-activation, NO₂ levels were measured using Griess reagent.

저해효과를 나타낸 표이다. LPS를 처리하는 시간을 0시간으로 정하고 전처리(-)로 나타냈으며, 후처리는 LPS를 처리한 후 3시간, 6시간 그리고 18시간에 각각 시료를 처리하여 실시하였다. 또한 Fig. 2처럼 병용처리(0시간)를 기준으로 LPS를 처리한 후 20시간이 되었을 때 활성을 측정하였다. 분리한 3가지 화합물의 경우, xanthotoxin을 제외하고는 모두 병용처리(0시간)시 가장 강한 활성을 보였고, 또한 전처리(-2시간)의 경우에도 역시 강한 활성을 나타내었다. 그러나, LPS로 세포를 활성화시킨 후에는 화합물들을 처리하는 시간이 짧아질수록 활성이 약화되는 것을 볼 수 있었다. 또한, 화합물들을 2시간 처리한 후 새 배지로 교환한 경우(-2 hr+w)에는 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 일반적으로 LPS를 처리한 후 2시간이 경과되었을 때 iNOS mRNA는 안정한 상태에 이르게 되고 그 후로 NO생성이 일정한 수준으로 계속해서 16-20시간 지속되게 된다.⁸⁾ 따라서 LPS를 처리한 후 LPS에 의한 유도단계에 영향을 미치는 저해제들을 2시간 이내에 처리한다면 후처리보다 전처리나 병용처리가 더 강한 저해활성을 나타낸다. 따라서 이들 화합물들은

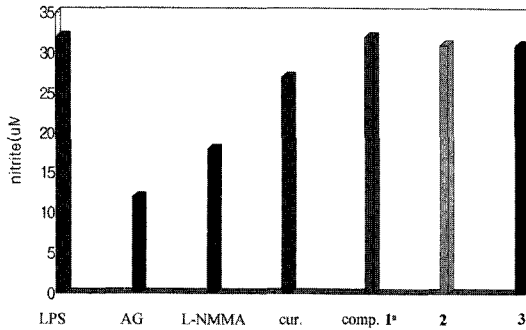


Fig. 4. Effects of compounds 1, 2 and 3 (25 µg/ml), aminoguanidine (AG, 307.5 µg/ml), N^G-Methyl-L-arginine, Monoacetate (L-NMMA, 10 µg/ml) and curcumin (22 µg/ml) on NO production when RAW 264.7 cells were incubated with effectors for 18 hr after 20 hr LPS-activation. Each value is the mean±SD of three experiments. *Comp. 1 (praeruptorin A), 2 (xanthotoxin), 3 (psoralen)

iNOS mRNA 유도단계에 작용한다는 것을 추정할 수 있었다.

이에 따라 3가지 화합물들의 NO생성 저해기작을 더 자세히 알아보기 위해서 Fig. 4와 같은 방법으로 실험을 실시하였다. 즉 LPS로 20시간 동안 세포를 완전히 활성화하여 iNOS와 유도를 완료시킨 후 iNOS에 의한 NO생성 저해효과를 측정하였다. 여기서는 양성대조구로 L-NMMA(IC₅₀=1.0 µg/ml),¹⁵⁾ aminoguanidine(AG, IC₅₀=30.7 µg/ml),¹⁷⁾ curcumin(IC₅₀=2.2 µg/ml)¹¹⁾을 사용하였다. 이들은 모두 iNOS 저해제로 알려져 있으며, L-NMMA는 앞서도 언급하였듯이 L-arginine과의 기질경쟁으로 인해 활성을 나타내며, AG는 iNOS에 대하여 특이적인 저해활성을 나타낸다. 또한 curcumin은 항염증제로 iNOS저해 뿐만 아니라 iNOS유도단계에서도 저해 활성을 보인다고 알려져 있다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 화합물 1, 2, 3, 3종의 coumarin은 iNOS의 유도가 완료된 후에는 NO생성 저해효과를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 동일하게 처리한 양성 대조구들, L-NMMA, AG, curcumin 등은 iNOS의 유도가 완료된 후에도 저해활성을 나타내었는데, AG는 307.5 µg/ml에서 62%, L-NMMA는 10 µg/ml에서 36%, curcumin은 22 µg/ml에서 20%의 활성을 나타내었다. 그리고 이 실험에서는 뚜렷한 저해활성을 보기 위해

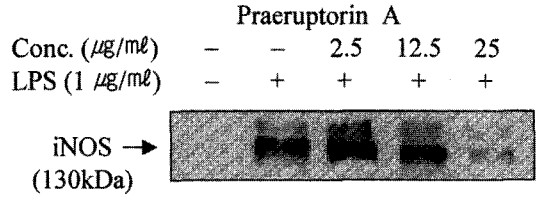


Fig. 5. Effect of praeruptorin A (1) on the expression of iNOS protein in LPS-activated RAW 264.7 cells. The cells were incubated with LPS (1 µg/ml) in the presence of praeruptorin A. 50 µg/lane of protein was loaded.

서 IC₅₀의 농도보다 높게 대조구들을 처리하였는데, 실제로 AG의 경우를 제외하고는 모두 50%이하의 저해활성을 보였다. 또한 여기서 in vitro iNOS enzyme assay에 대한 결과는 나타내지는 않았지만, 실험결과 iNOS에 대한 저해활성은 bergapten이 100 µg/ml이상의 농도에서 40%의 활성을 보였을 뿐, 나머지 화합물들은 이 효소에 대한 저해활성을 보이지 않았다.

Fig. 5는 iNOS western blotting의 결과를 나타낸 것으로 화합물 1을 LPS(1 µg/ml)와 함께 처리하여 20시간 배양한 후 이때 생성된 iNOS에 대한 화합물 1의 저해효과를 살펴보았다. 화합물 1은 25 µg/ml에서 iNOS protein발현을 저해하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 위의 모든 결과를 종합해 볼 때 화합물 1은 iNOS의 발현을 저해하지만 iNOS enzyme assay에서는 저해활성을 나타내지 않은 것으로 볼 때 이 효소에 대한 직접적인 저해보다는 그 전 단계인 LPS에 의한 세포의 활성화 단계에서 iNOS의 유도를 억제하는 것으로 추정되며, 화합물 2와 3도 같은 결과를 보일 것으로 생각된다.

결론

150여 종의 생약을 대상으로 RAW 264.7 세포에서의 NO생성 저해활성을 탐색한 결과, 20여 종을 1차로 선별하였다. 그 중 *Peucedanum japonicum*의 뿌리의 CHCl₃추출물로부터 5종의 화합물들을 분리하여 그 구조를 규명하였다. 그 결과 이들은 coumarin계열의 화합물들로서 각각 praeruptorin A (1), xanthotoxin (2), psoralen (3), isopimpinellin (4), bergapten (5)으로 동정되었다. 분리된 화합물들의 RAW 264.7 세포에서의

NO생성 저해활성에 대한 IC₅₀은 각각 1.5 µg/ml (1), 0.3 µg/ml (2), 1.0 µg/ml (3), 25 µg/ml (4), 25 µg/ml (5)이었다. 이들은 모두 농도 의존적으로 저해활성을 보였으며, xanthotoxin (2)의 경우는 양성대조구로 사용된 L-NMMA(IC₅₀=1.0 µg/ml)보다 높은 저해활성을 나타내었다. 앞에서 살펴본 결과들을 종합해 볼 때 활성이 강한 3종의 화합물, praeruptorin A (1), xanthotoxin (2), psoralen (3)은 iNOS를 직접 저해하지 않고, LPS에 의한 세포의 활성화 단계에서 iNOS의 유도를 억제하는 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 국책 생명공학기술개발사업비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드리며, NMR과 MS를 측정해주신 생명공학연구소 생물분석실의 정동호, 박규환씨께도 감사의 말씀을 드립니다.

인용문헌

1. Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
2. Galla, H. J. (1993) Nitric oxide, NO, an intracellular messenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 378-380.
3. Mehta, J. L., Chen, L. Y., Kone, B. C., Mehta, P. and Turner, P. (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 370-377.
4. Knowles, R. G. and Moncada, S. (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399-402.
5. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
6. Stuehr, D., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA* 88: 7773-7777.
7. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749.
8. Chiou, W. F., Sung, Y. J., Liao, J. F. and Chen, C. F. (1997) Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. *J. Nat. Prod.* 60: 708-711.
9. Ryu, J. H., Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Han, Y. N. (1998) Yomogin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 21(4): 481-484.
10. Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M. T., Christen, Y. and Packer, L. (1997) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem. Pharm.* 53: 897-903.
11. Brouet, I. and Ohshima, H. (1995) Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 206: 533-540.
12. Feelisch, M. and Stamler, J. (1996) Methods in nitric oxide research. *John Wiley & Sons.* 492-497.
13. Okuyama, T. and Shibata, S. (1981) Studies on coumarins of Chinese drug "Qian-Hu". *Planta Med.* 42: 89-96.
14. Elgamal, M. H. A., Elewa, N. H., Elkhrisy, E. A. M. and Duddeck, H. (1979) ¹³C NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones. *Phytochemistry* 18: 139-143.
15. Reif, D. W. and McCreedy, S. A. (1995) N-Nitro-L-arginine and N-Monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 320: 170.
16. Wolfe, D. J. and Lubeskie, A. (1995) Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem. Biophys.* 316: 290.

(1999년 2월 5일 접수)