

한국 자생식물로부터 아라키돈산 대사계 효소 저해제 검색 (2)

정혜진 · 문태철 · 이은경 · 손건호* · 김현표** · 강삼식*** · 배기환[§] · 안인파[§] · 권동렬* · 장현욱[#]
영남대학교 약학대학, *안동대학 식품영양학과, **강원대학 약학대학, ***서울대학교 천연물과학연구소,
[§]충남대학교 약학대학, [#]원광대학교 약학대학 한약학과
(Received February 5, 2003; Revised March 25, 2003)

Screening of Arachidonic Acid Cascade Related Enzymes Inhibitors from Korean Indigenous Plants (2)

Hyejin Jung, Tae Chul Moon, Eunkyung Lee, Kun Ho Son*, Hyun Pyo Kim**, Sam Sik Kang***, Ki Hwan Bae[§], Ren Bo An[§], Dong Yeul Kwon* and Hyeun Wook Chang[#]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Korea

*Department Food & Nutrition, Andong National University, Korea

**College of Pharmacy, Kangwon National University, Korea

[§]College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

***Natural Products Res. Institute, Seoul National University, Korea

[#]Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Korea Institute of Oriental Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

Abstract — Arachidonic acid (AA), which is stored in membrane glycerophospholipids, is liberated by phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes and is sequentially converted to cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs) then to various bioactive PGs, and LTs. In order to find the specific inhibitors of AA metabolism especially PLA₂, COX-2, 5-LO and lyso PAF acetyltransferase, 120 Korean residential plants extracts were evaluated for their inhibitory activity on PGD₂, LTC₄ production from cytokine-induced mouse bone marrow-derived mast cells (BMMC) and arachidonic acid released from phospholipid and PAF production from lyso PAF. From this screening procedure, methanol extract of ten indigenous plant such as *Salix gracilistyla*, *Sedum kamtschaticum*, *Cirsium chanroenicum*, *Hypericum ascyron*, *Astilbe chinensis*, *Agrimonia pilosa*, *Aristolochia manshuriensis*, *Vodia daniellii*, *Pyrola japonica*, *Styrax obassia* were found to inhibit production of inflammatory mediators *in vitro* assay system.

Keywords □ Secretory Phospholipase A₂, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase, lyso PAF acetyltransferase, inhibitors, Korean indigenous plants, anti-inflammatory agents

세포막 인지질의 2번 위치에 지방산을 가수분해하는 효소로 arachidonic acid(AA) cascade의 율속 효소로 알려진 바 있다. phospholipase A₂(PLA₂)에 의해 생성된 AA는 cyclooxygenases (COXs)와 lipoxygenases(LOs)에 의해 염증의 강력한 매개체인 prostaglandins(PGs), thromboxanes(TXs) 및 leukotrienes(LTs)로 각각 합성되며 이때 생성된 lysophospholipid는 극히 미량으로 혈소판을 활성화하며 다양한 염증성질환에 관여하는 platelet activating factor(PAF, 혈소판활성화인자)로 합성되므로 PLA₂는 다양한 염증성 매개체 생성의 율속 효소로 생각되어지고 있다. 최

근 PLA₂도 많은 연구가 진행되어 현재는 10종의 isozyme이 존재함이 알려졌다.¹⁻⁵⁾ 이들 중 특히 사람 및 여러 동물 모델에서 염증 반응이나 알러지 반응, 조직 손상에 type IIA sPLA₂가 직접적으로 관여하고 있음이 밝혀졌으며,⁶⁻¹⁰⁾ 급, 만성 염증질환의 치료제 개발에 PLA₂ 저해제가 유력한 후보 물질이라는 기대감으로 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 종래의 막구성형 COX-1에 대하여 cytokine 등의 자극에 의해 유도되는 새로운 효소인 COX-2가 발견되어, COX는 적어도 2종류의 isozyme이 존재함이 밝혀졌다. COX-1이 위, 신장을 비롯한 여러 조직에 발현되어 있는 반면 COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되는 발현 현상을 나타내어 2효소가 다른 효소임이 알려졌다.¹¹⁻¹⁴⁾ 세포에서의 COX-1의 역할은 그들의 "house keeping activity"를 조절하는데 필요한 prostanoid를 생산하는 것으로 예를 들면, 혈

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2811 (팩스) 053-811-3871
(E-mail) hwchang@yu.ac.kr

소판에 의한 TXA₂의 생산이나, 혈관내피세포에 의한 항혈전 prostacycline의 생산, 소화기점막에서의 cytoprotective prostanoid 생산, 신장에서의 신혈류조절작용을 갖는 prostanoid의 생산등이며, COX-1 유전자 역시 다른 일반적인 "house keeping genes"의 특징인 TATA-less promoter를 가지는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ COX-2는 각종의 사이토카인, 성장인자, 그람음성균세포의 세포벽구성성분인 LPS (lipopolysaccharide), phorbol ester, cAMP-elevating agent, 그리고 몇몇 G-protein 관련시약 등에 대하여 반응하여 즉각적으로 유도되어짐이 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 따라서 COX-1에 영향이 없으면서 COX-2에 특이적으로 저해하는 약의 개발은 "부작용이 없는 새로운 NSAID"로 될 수 있다는 기대감으로 최근 활발히 연구되어 Celebrex, Vioox 등이 개발되어 현재 임상에 사용되고 있다. 또한 5-LO에 의해 생성되는 LTB₄는 호중구의 주화성 인자로, LTC₄, LTD₄는 강력한 기관지 평활근 수축작용이 있어 천식과 같은 알레르기 염증질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 개발중이거나 개발된 방향 염증제는 주로 COX-2 선택적 저해제, PLA₂ 저해제, COX-2와 LO 동시 저해제, LTs 생합성 저해제, LTC₄, LTD₄ 길항제, PAF 길항제 및 PAF 생합성 저해제, 세포 접착분자 길항제 및 발현 조절제, 염증성 cytokine 저해제 및 이들에 대한 항체 등을 들 수 있다.

세포막 인지질로부터 생성되는 극히 미량으로 다양한 생리활성을 나타내는 PAF는 염증, 알러지반응, 기관지 천식, 혈압강하, 패혈증의 유발등에 직·간접적으로 관여함이 밝혀진 이래 세계적으로 수많은 연구소, 제약회사에서 PAF 길항제 발견이 새로운 치료약으로 개발될 수 있다는 기대감으로 많은 연구가 활발히 수행되어왔다.¹⁹⁻²¹⁾ 최근에는 길항제개발이외 PAF의 생합성의 유효속효소인 lyso PAF-acetyltransferase 저해제를 찾아서 새로운 약품을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구자는 이 효소의 저해제를 검색하던 중 luteolin등과 같은 flavonoid에서 저해활성을 발견하여 보고하였다.²²⁾

쥐 골수세포에 IL-3 존재 하에서 배양하면 특이적으로 비만세포가 분화됨이 알려져 있으며, 쥐 골수유래비만세포(bone marrow-derived mast cells, BMMC)는 IL-10, IL-1β의 혼합조건에서 *c-kit* ligand(KL) 또는 FcεRI 교차에 의하여 활성화되면 COX-2의 발현과 함께 PGD₂ 및 5-LO에 의한 LTC₄의 생성 및 내재성 사이토카인의 발현 등이 유도된다고 보고되었다.^{23,24)} 특히, arachidonic acid cascade 대사산물이나 사이토카인의 장시간의 점진적인 생산, 우리는 기관지 천식이나, 아토피성 피부염과 같은 만성적인 알러지환자의 상태를 반영하는 것이기 때문에, 최근에는 비만세포 활성화시의 변화와 분자기전에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구자 등은 이미 BMMC 배양계를 이용하여 COX-2의 선택적인 저해제인 rutaecarpine을 발견하였으며,²⁵⁾ 또한 *in vitro*

검색계를 이용하여 type IIA sPLA₂의 선택적인 저해제인 ochnaflavone 발견하여 보고한바 있다.²⁶⁾

이상에서 기술한 것과 같이 본 연구진은 지금까지 천연물에서 성분의 분리 및 구조결정에 관한 다년간의 경험을 바탕으로 *in vitro* 검색계를 사용하여 최근 195종의 자생식물로부터 새로운 항염증 작용을 나타내는 자생식물의 발굴을 통하여 새로운 치료제 개발에 필요한 기초적인 자료를 제공한바 있다.²⁷⁾ 따라서 이미 보고한 자생식물 이외 본 연구에서는 120종의 자생식물과 활성을 나타내는 식물을 유기 용매법으로 더욱 분획하여 얻은 활성 성분에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 및 시약

실험재료 - 본 연구에 사용한 생약은 한약 도매시장에서 구입하여 본 논문의 공동저자인 배기환 교수가 감정하여 실험재료로 사용하였다.

시약 - Tris(hydroxymethyl) aminomethane, CaCl₂ aspirin은 Sigma Chemical사(St. Louis, MO), recombinant mouse *c-kit* ligand(KL), IL-1β, IL-10, IL-3, WEHI-3 cell는 일본 Showa 대학 Kudo Ichiro 교수로부터, Lipopoly- saccaride(LPS)는 Difco Laboratories사(Detroit, MI), RPMI-1640 Medium은 GIBCO BRL사, Fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone사, LTC₄ 및 PGD₂ EIA kit(Cayman 사), BCA Protein Assay Reagent는 PIERCE사, dimethylsulfoxide(DMSO)는 MERCK사에서 구입하여 사용하였으며, [³H]acetyl CoA(Amersham 사), 1,4-bis[2-(phenyloxazolyl)]-benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole(DPO)는 Dojin사로부터 구입하여 사용하였으며, 이 외의 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

시료의 조제

건조한 시료 100 g을 methanol로 3시간 3회 열추출하고, 이 추출액을 합한후 농축 건조하여 이를 methanol 추출물로 사용하였다. 각 methanol 추출물을 물로 현탁시킨후 *n*-hexane, CHCl₃, ethylacetate 및 *n*-butanol로 단계적으로 분획하고 마지막 분획을 물분획으로 하여 저해활성 검색에 사용하였다.

Human Secretory Phospholipase A₂-IIA(sPLA₂-IIA) 조제

sPLA₂-IIA의 유전자(450 b.p)를 함유한 PUC 119 plasmid (PCU 119-hIIPLA₂)로부터 insect cell expression vector인 PVL 1392 vector에 subcloning한 후 insect cell인 SF 9 cell에 감염시켜(Low Temp. Incubator, 27°C) Grace's insect medium (Invitroge사)/10% FCS로 배양한 후, 배양액중에 분비되는 정제

하여 효소원으로 사용하였다.

Phospholipase A₂ 활성의 측정

PLA₂ 활성 측정은 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 기질 2.5 μM 1-acyl-2-[1-¹⁴C] arachidonoyl-*sn*-glycerolphosphoethanolamine(48 mCi/m mole, NEN) 및 효소(10 ng) 및 천연물 추출액 2.5 μg/ml를 함유한 반응액을 37°C로, 지정된 시간 동안 반응한 후, 생성된 [¹⁴C]유리지방산을 Dole 등의 방법에 따라 추출하여 액체 scintillation counter Minaxi Tri-Carb, Packard, USA)로 측정하여 PLA₂ 활성으로 환산하였다. 검체는 전부 DMSO에 녹여서 사용하였으며, 15분간 전 처리하였다.

Mouse Bone Marrow Derived Mast Cell(BMMC)의 배양 및 활성화

Mice BALB/cj mice로부터 채취한 골수세포는 50% enriched medium(RPMI 1640 containing 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10 mg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids and 10% fetal bovine serum)과 IL-3의 공급원으로 50% WEHI-3 cell-conditioned medium을 사용하여 배양하면 약 4주 후 98% 이상의 BMMC를 얻을 수 있었으며, 4주 후의 세포를 사용하였다.

COX-2 활성의 측정

BMMC내의 COX-1를 불활성화시키기 위하여 BMMC를 미리 1×10^7 cells/ml 농도로 하여 10 μg/ml aspirin으로 2시간 동안 배양한 후 COX-2 발현을 위하여 BMMC를 enriched medium으로 3회 세척한다. 이후 1×10^6 cells/ml 농도로 하여 100 ng/ml KL_κ-kit ligand), 100 U/ml IL-10, 5 ng/ml IL-1β, 100 ng/ml LPS 및 메타놀 추출물(12.5 μg/ml)의 혼합조건에서 37°C CO₂ incubator내에서 8시간 동안 배양하였다. 반응은 120×g, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 중결시키며, 원심분리 후 상층액을 PGD₂ 유리량의 측정에 이용하였다. 배양 상층액내의 PGD₂는 EIA kit (Cayman 사)를 사용하여 ELISA법으로 측정하여 COX-2의 저해 활성을 검토하였다.

5-LO 활성의 측정

상기 방법으로 BMMC에 KL 혼합자극제를 처리하여 30 분 후 배양 상층액 중의 LTC₄를 EIA kit(Cayman 사)를 사용하여 ELISA법으로 측정하여 5-LO 활성으로 환산하였다. 이때 검체는 (25 μg/ml) 30분간 전 처리하였다.

Lyso PAF-acetyltransferase 효소원 조제

효소원으로는 rat 비만세포 유래의 cell line인 RBL-2H3를 대량 배양하여 homogenize한 후 100,000×g로 원심분리 하여

pellet를 이용하였다.

Lyso PAF-acetyltransferase의 활성 측정

RBL cell lysate, [³H] acetyl CoA, lyso PAF 및 100 mM Tris-HCl(pH 6.9)를 가하여 37°C 10분 반응시킨 후 생성되는 [³H] acetyl PAF를 유기용매법으로 추출한 후 액체scintillation counter로 측정한다. 이때 검체는(50 μg/ml) 5분간 전 처리한 후 [³H]PAF 생성량을 측정하였다.

결과 및 고찰

저자 등은 과거부터 arachidonic acid 대사계에 관련된 효소의 조절 기구를 연구하는 과정에서 이들 대사계에 관련된 효소들의 조절물질 혹은 저해제를 개발하려는 연구의 결과 금은화로부터 sPLA₂-IIA 선택적인 저해제로 biflavonoid인 ochnaflavone을 발견하였다.²⁶⁾ 이들 biflavonoid는 염증성 매개체인 TNF-α, NO 생성의 억제,²⁸⁾ 비만세포에서의 히스타민 유리억제작용²⁹⁾ 및 *in vivo* 동물모델에서도 항 염증 활성 보고한바 있다.³⁰⁻³²⁾ 또한 저자 등은 최근 천연물로부터 PLA₂ 저해제 검색³³⁾ 및 COX-2 저해제 검색결과도 이미 보고한 바 있다.³⁴⁾ 저자 등은 최근 염증의 주된 세포인 비만세포를 쥐와 사람에서 배양하는 기술을 이용하여 염증치료제를 개발을 시도하고 있다. 특히 쥐의 골수로부터 분화시킨 비만세포는 비록 미성숙한 세포이지만 이들 세포는 대량으로 거의 순수한 세포들을 얻을 수 있는 이점과 동시에, 항원-항체반응 및 각종 cytokine 등에 의해 활성화가 된다. 그러므로 이러한 비만세포를 이용하면 5-LO 저해제, COX-1, COX-2 선택적 저해제, 히스타민 유리 억제제의 검색이 한 종류의 세포에서 동시에 실시되는 장점이 있다. 또한 저자 등은 상기의 방법 이외에도 COX-1, COX-2의 유전자를 도입한 transfectant를 이용하여 COX-2의 선택적인 저해제인 rutaecarpine을 발견하였다.²⁵⁾ 한편 저자 등의 방법을 이용하게되면, 최소한 5종류의 효능을 동시에 확인 할 수 있기 때문에 대상 식물에 따라서는 몇 가지 효능을 동시에 가지는 물질의 개발도 가능하리라 생각되어 한국 자생식물 195종으로부터 아라키돈산 대사계에 관련된 효소의 저해제를 검색한 결과 삼백초(*Saururus chinensis*), 개미취(*Aster tataricus*), 제충국(*Chrysanthemum cinerariaefolium*), 호장(*Reynoutria japonica*), 부채마(*Dioscorea nipponica*), 삼지구엽초(*Epimedium koreanum*), 물봉선(*Impatiens textori*), 산꼬리풀(*Veronica rotunda* var. *subintegra*) 등 8종류에서 강한 저해활성이 있음을 보고 한 바 있다.²⁷⁾ 본 연구에서는 이미 보고한 195종의 자생식물 이외에도 추가로 120종의 자생식물 및 이들의 유기용매 분획 및 단일 성분에 대한 활성을 검색한 결과를 Table I-IV에 요약하였다.

Table I은 사람 재조합 group IIA PLA₂ 및 랫트 유래의 비만

세포주인 RBL-2H3 cell lysate를 효소원으로, 그리고 쥐 골수에 서 분화시킨 비만세포계를 이용하여 검색한 결과 강한 저해활성을 나타내는 식물은 다음과 같다.

1. Group IIA PLA₂에 85% 이상 강한 저해활성을 나타내는 식물로는 정영영경귀(*Cirsium chanroenicum*), 노루오줌 뿌리(*Astilbe chinensis*), 도깨비부채 뿌리(*Rodgersia podophylla*), 뱀무(*Geum japonicum*), 즙 짚레(*Rosa multiflora*), 서양칠엽수(*Aesculus turbinata*), 미역줄나무(*Tripterygium regelii*), 쉬나무 잎(*Evodia daniellii*), 부처꽃(*Lythrum anceps*) 등 9종류이었다. 이

들 중 쉬나무의 뿌리 및 열매 성분에서 bergapten의 COX-2 저해활성에 대하여서는 보고한바 있다.³⁵⁾

2. PAF 생합성에 40% 이상 저해활성을 나타내는 식물로는 고추나물(*Hypericum erectum*), 산수국(*Hydrangea serrata*), 짚신나물(*Agrimonia pilosa*), 쉬나무 잎(*vodia daniellii*) 등 4종류이었다.

3. COX-2에 60% 이상 저해활성을 나타내는 식물로는 도깨비부채(*Rodgersia podophylla*), 등칫(*Aristolochia manshuriensis*), 나도바람꽃(*Isopyrum raddeanum*), 영경귀 꽃(*Cirsium japonicum*), 도꼬마리(*Xanthium strumarium*), 무릇(*Scilla scilloides*),

Table I – Inhibitory activity of methanol extract of medicinal plants against secretory group II phospholipase A₂ (sPLA₂-IIA), cyclooxygenase-2 (COX-2), 5-lipoxygenase (5-LO) and lyso PAF-acetyltransferase (Lyso PAF-AT)

Korean name	Scientific name	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (μg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
		Inhibition (%)			
승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	29.4	0.0	35.0	45.0
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i>	60.2	0.9	48.2	85.0
갯버들	<i>Salix gracilistyla</i>	45.5	15.5	57.3	33.6
패랭이꽃	<i>Dianthus chinensis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
기린초	<i>Sedum kamtschaticum</i>	68.9	13.8	70.3	15.3
장구채(전초)	<i>Melandryum firmum</i>	72.6	38.1	0.0	63.1
세모고랭이(전초)	<i>Scirpus triqueter</i>	5.4	5.5	19.8	61.3
곰취	<i>Ligularia fischeri</i>	62.3	22.1	100	48.5
수송나물(전초)	<i>Salsola komarovii</i>	34.6	6.8	16.5	0.0
정영영경귀	<i>Cirsium chanroenicum</i>	91.2	8.3	27.3	56.7
쇠무릎(전초)	<i>Achyranthes japonica</i>	13.7	3.6	0.0	0.0
백목련(열매)	<i>Magnolia denudata</i>	0.0	0.0	13.2	10.5
생강나무(잎, 줄기)	<i>Lindera obtusiloba</i>	0.0	0.0	5.5	0.0
쑥대승마(뿌리)	<i>Cimicifuga simplex</i>	49.3	0.0	23.1	39.2
사위질팽(전초)	<i>Clematis apiifolia</i>	0.0	12.9	26.4	65.4
할미꽃	<i>Pulsatilla koreana</i>	65.8	27.5	29.7	0.0
매발톱나무	<i>Berberis amurensis</i>	1.5	0.0	45.1	0.0
댕댕이덩굴(줄기)	<i>Cocculus trilobus</i>	6.8	0.0	59.3	10.5
새모래등굴	<i>Menispermum dahuricum</i>	0.0	0.0	41.8	96.4
물레나무	<i>Hypericum ascyron</i>	77.8	37.7	41.8	83.9
고추나물	<i>Hypericum erectum</i>	34.4	45.4	46.2	0.0
애기똥풀(자성부)	<i>Chelidonium majus</i>	16.6	7.6	23.1	15.3
솔장다리	<i>Salsola collina</i>	0.0	0.0	51.1	61.0
노루오줌(뿌리)	<i>Astilbe chinensis</i>	96.3	36.1	59.3	79.9
노루오줌(지상부)	<i>Astilbe chinensis</i>	24.4	20.2	48.4	0.0
산수국(지상부)	<i>Hydrangea serrata</i>	45.5	43.6	23.1	72.0
물매화(전초)	<i>Parnassia palustris</i>	50.3	0.0	3.3	0.0
도깨비부채(뿌리)	<i>Rodgersia podophylla</i>	90.9	18.6	60.4	0.0
바위취(전초)	<i>Saxifraga stolonifera</i>	29.7	20.9	15.4	91.7
짚신나물(전초)	<i>Agrimonia pilosa</i>	27.6	41.3	28.6	56.4
뱀무(전초)	<i>Geum japonicum</i>	85.4	8.7	0.0	73.5
죽단화(지상부)	<i>Kerria japonica</i>	1.9	0.0	5.5	61.0
딱지꽃(전초)	<i>Potentilla chinensis</i>	34.0	3.0	1.1	10.5
양지꽃(전초)	<i>Potentilla fragarioides</i>	34.0	4.6	19.8	65.1
쉬땅나물(지상부)	<i>Sorbaria sorbifolia</i>	33.0	13.1	4.4	66.9
마가목(줄기, 껍질)	<i>Sorbus commixta</i>	36.2	13.8	29.7	35.8
둥근잎조팝나무(전초)	<i>Spiraea betulifolia</i>	33.7	2.2	57.1	94.1
국수나무(지상부)	<i>Stephanandra incisa</i>	26.9	2.5	28.6	61.0
자귀나물(지상부)	<i>Albizia julibrissin</i>	0.0	5.1	3.3	0.0

Table I - Continued

Korean name	Scientific name	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (µg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
Inhibition (%)					
죽계비싸리(지상부)	<i>Amorpha fruticosa</i>	5.3	9.1	3.3	0.0
결명자(뿌리)	<i>Cassiae tora</i>	0.0	8.9	33.0	97.5
결명자(지상부)	<i>Cassiae tora</i>	43.8	15.9	23.0	32.1
박태기나무(지상부)	<i>Cercis chinensis</i>	38.6	0.0	5.5	83.0
매듭풀(잎, 줄기)	<i>Kummerowia striata</i>	0.0	0.0	39.6	51.3
동충	<i>Aristolochia manshuriensis</i>	30.5	23.8	62.6	72.0
비수리(전초)	<i>Lespedeza cuneata</i>	80.2	0.0	17.6	0.0
나비나물(전초)	<i>Vicia unijuga</i>	8.5	0.0	9.9	65.4
등나무	<i>Wistaria floribunda</i>	17.8	21.2	22.0	59.1
굴거리나무(열매)	<i>Daphniphyllum macropodum</i>	0.0	21.8	3.3	28.5
좀철레	<i>Rosa multiflora</i>	92.9	22.4	37.0	54.3
개감수	<i>Euphorbia sieboldiana</i>	10.1	5.6	0.0	96.1
사할주나무(잎, 줄기)	<i>Sapium japonicum</i>	77.8	3.5	0.0	96.9
서양철쭉수(잎)	<i>Aesculus turbinata</i>	94.9	23.3	0.0	92.4
미역줄나무(줄기)	<i>Tripterygium regelii</i>	89.7	27.7	0.0	93.5
회양목(잎, 줄기)	<i>Buxus microphylla</i>	0.0	11.4	18.7	95.1
쉬나무(잎)	<i>Evodia daniellii</i>	88.1	40.2	37.8	17.5
쉬나무(열매)	<i>Evodia daniellii</i>	56.2	0.0	31.4	0.0
갈매나무	<i>Rhamnus davurica</i>	58.7	18.0	38.5	89.9
왕너루	<i>Vitis amurensis</i>	5.0	0.0	15.4	88.7
부처꽃(전초)	<i>Lythrum anceps</i>	89.5	22.7	1.1	91.0
마름(전초)	<i>Trapa japonica</i>	43.7	15.3	25.3	63.4
달맞이꽃(지상부)	<i>Oenothera odorata</i>	49.8	13.5	0.0	15.4
팔손이나무(가지)	<i>Fatsia japonica</i>	17.5	0.7	56.0	0.0
기름나물(지상부)	<i>Peucedanum terebinthaceum</i>	10.8	22.1	11.0	45.9
노루발(전초)	<i>Pyrola japonica</i>	65.8	18.3	50.5	96.1
큰까치수염(줄기)	<i>Lysimachia chlethroides</i>	48.8	16.7	31.9	0.0
긴꽃병	<i>Styrax obassia</i>	67.3	32.5	45.0	48.2
두충(전초)	<i>Eucommia ulmoides</i>	44.5	0.0	19.8	0.0
은조롱(지상부)	<i>Cynanchum wilfordii</i>	0.0	15.1	50.5	15.4
방울빛자루	<i>Asparagus oligoclonos</i>	36.8	17.3	15.7	12.4
박주가리(전초)	<i>Metaplexis japonica</i>	0.0	15.2	18.7	24.3
꼭두서니(뿌리)	<i>Rubia akane</i>	8.3	3.5	59.3	75.3
꼭두서니(지상부)	<i>Rubia akane</i>	37.7	3.5	31.9	32.4
작살나무(줄기)	<i>Callicarpa japonica</i>	14.6	0.0	14.3	83.3
꽃향유(전초)	<i>Elsholtzia splendens</i>	11.1	26.2	27.5	90.4
들깨풀(전초)	<i>Mosla punctulata</i>	10.9	34.8	33.0	67.3
오리방풀(잎)	<i>Plectranthus excisus</i>	4.4	2.5	45.1	12.3
송이풀(전초)	<i>Pedicularis resupinata</i>	19.5	5.3	35.2	10.6
개오동나무(줄기)	<i>Catalpa ovata</i>	20.9	0.0	44.0	24.4
해국(지상부)	<i>Aster spathulifolius</i>	31.0	4.3	0.0	69.1
파리풀(뿌리)	<i>Phryma leptostachya</i>	0.0	11.9	16.5	0.0
카타리(뿌리)	<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	1.9	0.0	77.0	42.8
멸가치(전초)	<i>Adenocaulon himalaicum</i>	14.6	0.0	29.7	48.9
단풍취(전초)	<i>Ainsliaea acerifolia</i>	9.3	2.0	26.4	85.0
단풍취(잎, 줄기)	<i>Ainsliaea acerifolia</i>	0.0	17.3	26.4	85.0
단풍취(뿌리)	<i>Ainsliaea acerifolia</i>	0.0	5.4	3.3	39.5
사철쭉(전초)	<i>Artemisa capillaris</i>	22.4	30.3	0.0	73.8
맑은대쭉(전초)	<i>Artemisia keiskeana</i>	10.6	17.6	0.0	10.6
나도바람꽃	<i>Isopyrum raddeanum</i>	55.4	0.0	75.3	53.5
참취(뿌리)	<i>Aster scaber</i>	13.7	17.5	34.1	85.9
참취(지상부)	<i>Aster scaber</i>	28.5	9.4	0.0	85.0
도깨비나물(전초)	<i>Bidens bipinnata</i>	8.5	0.0	16.5	75.3
조뱅이(전초)	<i>Breea segeta</i>	8.0	0.0	33.0	63.4
긴담배풀(전초)	<i>Carpesium divaricatum</i>	11.7	15.1	45.1	96.1

Table I – Continued

Korean name	Scientific name	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (µg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
		Inhibition (%)			
여우오줌(잎)	<i>Carpesium macrocephalum</i>	10.5	24.6	26.4	72.3
산국(꽃)	<i>Chrysanthemum boreale</i>	17.5	5.4	6.6	32.7
구절초(전초)	<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	8.9	1.2	51.6	82.3
영경귀(꽃)	<i>Cirsium japonicum</i>	15.8	0.0	63.5	61.3
영경귀(지상부2)	<i>Cirsium japonicum</i>	10.6	30.8	0.0	88.0
붉은서나무(전초)	<i>Erechtites hieracifolia</i>	6.2	5.3	35.2	65.4
등골나물(전초)	<i>Eupatorium chinensis</i>	16.0	8.6	39.6	73.8
떡숙(전초)	<i>Gnaphalium affine</i>	16.1	11.9	24.2	80.2
지쟁개(전초)	<i>Hemistepta lyrata</i>	14.9	0.0	40.2	63.4
왕고들배기(전초)	<i>Lactuca indica</i>	9.7	0.0	29.7	0.0
두메고들배기(전초)	<i>Lactuca triangulata</i>	21.0	32.6	46.2	65.4
숨나물(전초)	<i>Leibnitzia anandria</i>	22.9	1.4	40.1	59.1
진득찰(잎, 줄기)	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>	23.4	21.6	35.2	79.1
미역취(전초)	<i>Solidago virga-aurea</i>	15.0	7.4	36.3	79.1
우산나물(전초)	<i>Syneilesis palmata</i>	23.4	10.9	56.5	93.2
도꼬마리(전초)	<i>Xanthium strumarium</i>	23.6	0.0	73.0	84.2
이고들빼기(전초)	<i>Youngia denticulata</i>	22.1	0.0	30.8	63.4
자리풀(전초)	<i>Hydrocharis dubia</i>	56.1	0.0	51.9	85.0
은방울꽃(전초)	<i>Convallaria keiskei</i>	56.0	0.0	49.5	93.5
비비추(뿌리)	<i>Hosta longipes</i>	45.6	0.0	39.6	87.4
무릇(전초)	<i>Scilla scilloides</i>	57.0	0.0	68.6	87.4
여로(지하부)	<i>Veratrum maackii</i>	46.6	0.0	57.1	89.9
박새(뿌리)	<i>Veratrum patulum</i>	39.7	0.0	53.8	88.0
문주란(지하부)	<i>Crinum asiaticum</i>	47.6	2.9	0.0	97.5
골풀(전초)	<i>Juncus effusus</i>	52.0	14.9	0.0	45.9
참취(전초)	<i>Aster scaber</i>	21.4	33.0	20.9	44.2

a. All samples were tested duplicate.

Lyso-PAF AT : Lyso PAF-acetyltransferase.

COX-2 : cylooxygenase-2, 5-LO : 5-lipoxygenase.

Table II – Inhibitory activity of organic solvent soluble fractions of *Astilbe chinensis* on arachidonic cascade related enzymes

Korean name	Fraction	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (µg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
		Inhibition (%) ^a			
노루오줌 뿌리	Methanol	96.3	36.1	59.3	79.9
	Hexane	88.0	26.5	72.5	98.4
	Etylacetate	76.7	69.7	0.0	0.0
	Butanol	95.4	81.7	0.0	0.0
	H ₂ O	53.4	20.6	0.0	0.0
지상부	Methanol	24.7	20.2	48.4	0.0
	Hexane	92.7	35.6	0.0	99.6
	Etylacetate	88.9	34.4	16.2	97.5
	Butanol	86.1	29.6	36.6	0.0
	H ₂ O	0.0	0.0	0.0	0.0

a. All samples were tested duplicate.

Lyso-PAF AT : Lyso PAF-acetyltransferase.

COX-2 : cylooxygenase-2, 5-LO : 5-lipoxygenase.

pe platyphylla) 등 6종류이었다.

4. 5-LO에 대하여 90% 이상 강한 저해활성을 나타내는 식물로는 새모래등골(*Menispermum dahuricum*), 바위취(*Saxifraga stolonifera*), 둥근잎조팝나무(*Spiraea betulifolia*), 결명자 뿌리(*Cassiae tora*), 개감수(*Euphorbia sieboldiana*), 사람주나무(*Sapium japonicum*), 서영철엽수(*Aesculus turbinata*), 미역줄나무(*Tripterygium regelii*), 회양목(*Buxus microphylla*), 노루발(*Pyrola japonica*), 꽃향유(*Elsholtzia splendens*), 긴담배풀(*Carpesium divaricatum*), 우산나물(*Syneilesis palmata*), 은방울꽃(*Convallaria keiskei*), 여로(*Veratrum maackii*), 문주란(*Crinum asiaticum*) 등 16종류이었다.

5. 비록 각각의 효소에 대하여 강한 저해활성은 나타내지 않았지만 아라키돈산 대사계효소 전반에 걸쳐 저해활성을 나타내는 식물로는 갯버들(*Salix gracilistyla*), 기린초(*Sedum kamtschaticum*), 정영영경귀(*Cirsium chanroenicum*), 물레나무(*Hypericum ascyron*), 노루오줌 뿌리(*Astilbe chinensis*), 짚신나물(*Agrimonia pilosa*), 등취(*Aristolochia manshuriensis*), 쉬나무 잎(*Vodia*

Table III – Inhibitory activity of various compounds isolated from ethylacetate fractions of *Salix gracilistyla* on arachidonic cascade related enzymes

Korean name	Compound	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (µg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
Inhibition (%) ^a					
갯버들	SF-1	21.8	35.7	37.6	0.0
	-2	36.0	0.0	38.8	0.0
	-3	68.9	31.1	43.3	8.8
	-4	50.9	14.8	69.4 (IC ₅₀ =11.4 µg/ml)	85.3 (IC ₅₀ =1.8 µg/ml)
	-5	34.5	33.9	44.9	69.0 (IC ₅₀ =9.5 µg/ml)
	-6	26.5	17.0	80.8	0.0
	-7	20.9	0.0	38.8	0.0
	-8	28.6	7.7	49.1	0.0
	-9	40.1	38.9	37.0	0.0
	-10	45.7	26.6	43.8	0.0

a. All samples were tested duplicate.
 Lyso-PAF AT : Lyso PAF-acetyltransferase.
 COX-2 : cyclooxygenase-2, 5-LO : 5-lipoxygenase.

Table IV – Inhibitory activity of various compounds isolated n-butanol fractions of *Sedum kamtschaticum* on arachidonic cascade related enzymes

Korean name	Compounds	sPLA ₂ IIA	Lyso-PAF AT	COX-2	5-LO
		Final concentration (µg/ml)			
		2.5	50	12.5	25
Inhibition (%)					
기린초	SKB-1	14.4	12.3	76.6 (IC ₅₀ =9.5 µg/ml)	98.2 (IC ₅₀ =2.8 µg/ml)
	-2	21.0	37.3	20.4	90.3 (IC ₅₀ =5.1 µg/ml)
	-3	0.6	17.3	6.8	10.3
	-4	-12.0	27.7	23.8	40.0
	-5	-9.4	33.4	14.2	23.2
	-6	-22.0	57.5 (IC ₅₀ =41.1 µg/ml)	3.5	27.8
	-7	5.6	27.4	0	0
	-8	0.0	19.7	6.3	0
	-9	19.6	21.6	7.8	32.4
	-10	2.2	9.1	0	3.7

a. All samples were tested duplicate.
 Lyso-PAF AT : Lyso PAF-acetyltransferase.
 COX-2 : cyclooxygenase-2, 5-LO : 5-lipoxygenase.

daniellii), 노루발 전초(*Pyrola japonica*), 긴 꽃병(*Syrax obassia*) 등 1(종류)이었다.

6. 이들 중 비교적 아라키돈산 대사계 효소들에 대해 강한 저해활성을 나타낸 노루오줌 뿌리를 유기용매로 분획하여 저해 활성을 검색한 결과 Table II에서처럼 뿌리에서는 PLA₂ 저해활성을 보인 물 분획을 제외한 모든 분획에서, 지상부에서는 메탄올 분획 및 물 분획을 제외한 분획에서 강한 저해활성을 나타내었다. 한편 PAF 생합성 저해활성은 특히 뿌리의 에칠아세테이트 분획 및 부탄올 분획에서 강한 활성을 나타내었으며 동일한 조건에서 양성대조군으로 사용한 luteolin²²⁾은 80%의 저해활성을 나타내어 뿌리 분획을 더욱 분리하면 강한 PAF 생합성 저해물질의 발견이 예상된다. 또한 뿌리의 메탄올 분획 및 헥산분획에

서 COX-2와 5-LO를 동시에 저해하는 활성이 나타났으며, 지상부에서는 헥산 및 에칠아세테이트 분획에서 5-LO에 대한 강한 활성을 나타내었다. 저자등은 노루오줌에서는 뿌리에서 5-LO에 대하여 강한 선택성을 나타내는 화합물을 발견하여 현재 작용기전을 검토하고 있다.

7. Table III은 갯버들의 에칠아세테이트를 분획하여 얻은 단일 물질을 사용하여 저해활성을 검토한 결과 특히 SF-4 화합물은 COX-2와 5-LO를 동시에 저해하는 활성을 나타내어 현재 구조를 분석하고 있다.

8. 기린초의 부탄올 분획에서 분리한 단일 성분을 사용하여 저해활성을 검토한 결과 SKB-1 역시 COX-2와 5-LO를 동시에 저해하는 활성을 나타내었으며, SKB-2에서는 5-LO에 강한 선택성

을 나타내었다.

따라서 깃버들 중의 SF-4 및 기린초 중의 SKB-1은 각종 염증 질환의 치료제로서의 개발가능성이 제시되어 금후 대량생산을 통하여 *in vivo* 동물실험으로 항염증제 개발의 가능성을 검토할 계획이다.

금후 계속적으로 저해활성이 강한 자생식물을 대상으로 유기용매 분획법으로 분리한 검체를 사용하여 저해제를 검색하면 지금까지 보고된 저해제와는 다른 구조를 가진 항염증 및 항알러지제의 개발에 필요한 기초적인 자료가 제공될 수 있으리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비(PF 002104-01)에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

문헌

- Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H. and Hanasaki, K. : Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A(2)s. *J. Biol. Chem.* **274**, 24973 (1999).
- Valentin, E., Koduri, R. S., Scimeca, J. C., Carle, G., Gelb, M. H., Lazdunski, M. and Lambeau, G. : Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **274**, 19152 (1999).
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M. and Lambeau, G. : On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J. Biol. Chem.* **274**, 31195 (1999).
- Suzuki, N., Ishizaki, J., Yokota, Y., Higashino, K., Ono, T., Ikeda, M., Fujii, N., Kawamoto, K. and Hanasaki, K. : Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s. *J. Biol. Chem.* **275**, 5785 (2000).
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M. and Lambeau, G. : Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 7492 (2000).
- Vadas, P. and Pruzanski, P. : Biology of diseases. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of diseases. *Lab. Invest.* **55**, 391 (1986).
- Chang, H. W., Kudo, I., Hara, S. and Inoue, K. : Extracellular phospholipase A₂ activity in peritoneal cavity of casein-treated rats. *J. Biochem.* **100**, 1099 (1986).
- Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W. and Inoue, K. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.* **105**, 395 (1989).
- Baek, S. H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K. and Chang, H. W. : Detection and characterization of extracellular phospholipase A₂ in pleural effusion of patients with tuberculosis. *Life Sci.* **49**, 1095 (1991).
- Forster, S., Ilderton, E., Norris, J. F. B. and Yardley, H. J. : Characterization and activity of phospholipase A₂ in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *Br. J. Dermatol.* **112**, 135 (1985).
- Jones, D. A., Cartton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. and Prescott, S. M. : Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type-II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* **268**, 9049 (1993).
- Otto, J. C. and Smith, W. L. : The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and synthase-2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **269**, 19868 (1994).
- Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L. and Smith, W. L. : Different intracellular location for prostaglandin H synthase-1 and synthase-2. *J. Biol. Chem.* **270**, 10902 (1995).
- DeWitt, D. L. and Smith, W. L. : Primary structure of prostaglandin-G/H synthase from sheep vascular gland determined from the complementary-DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1412 (1988).
- Kramer, S. A., Meadde, E. A. and DeWitt, D. L. : Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure-identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 391 (1992).
- Pilbram, C. C., Kawaguchi, H., Hakeda, Y., Voznesensky, O., Alander, C. B. and Raisz, L.G. : Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic Mc 3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25643 (1993).
- Pritchard, Jr. K. A., O'Banion, M. K., Miano, J. M., Vlastic, N., Bhatia, U. G., Young, D. A. and Stemerman, M. B. : Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth-muscle cells in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **269**, 8504 (1994).
- Reddy, S. T. and Herschman, H. R. : Ligand induced prostaglandin synthesis requires expression of the Tis10/Pgs-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblast and macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**, 15473 (1994).
- Morley, J., Page, C. P., Mazzoni, L. and Sanjar, S. : Effect of ketotifen upon responses to platelet activating factor: A basic for asthma prophylaxis. *Annals of Allergy* **56**, 335 (1986).
- Mallet, A. I. and Cunningham, F. M. : Structural identification

- of platelet activating factor in psoriatic scale. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 192 (1985).
- 21) Doebber, T. W., Wu, M. S., Robbins, J. C., Choy, B. M., Chang, M. N. and Shen, T. Y. : Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptors antagonist Kadsurenone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 799 (1985).
- 22) Yanoshita, R., Chang, H. W., Son, K. H., Kudo, I. and Samejima, Y. : Inhibition of lyso-PAF acetyltransferase activity by flavonoids. *Inflammation Res.* **45**, 546 (1996).
- 23) Murakami, M., Bingham, C. O., Matsumoto, R., Austen, K. F. and Arm, J. P. : IgE-dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast cells induces a delayed phase of prostaglandin D₂ generation via prostaglandin endoperoxidase synthase-2. *J. Immunol.* **155**, 4445 (1995)
- 24) Murakami, M., Matsumoto, R., Urade, Y., Austen, K. F. and Arm, J. P. : c-Kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A₂, prostaglandin endoperoxidase synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D₂ synthesis and increased IgE-dependent prostaglandin D₂ generation in immature mouse mast cells. *J. Biological Chem.* **270**, 3239 (1995)
- 25) Moon, T. C., Murakami, M., Kudo, I., Son, K. H., Kim, H. P. and Chang, H. W. : A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. *Inflammation Res.* **48**, 621 (1999).
- 26) Chang, H. W., Baek, S. H., Chung, K. W., Son, K. H., Kim, H. P. and Kang, S. S. : Inactivation of phospholipase A₂ by naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 843 (1994).
- 27) Moon, T. C., Jung, H. J., E. K., Park, H. Y., Jeon, S. J., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S., Bae, K. H., Kwon, D. Y. and Chang, H. W. : Screening of arachidonic acid cascade related enzymes inhibitors from Korean indigenous plants (1). *Kor. J. Pharmacogn.* **34**(1) 2003. (in press)
- 28) Baek, S. K., Yun, S. S., Kwon, T. K., Kim, J. R., Chang, H. W., Kwak, J. Y., Kim, J. H. and Kwun, K. B. : The effect of two new antagonists of secretory PLA₂ on TNF, INOS, and COX-2 expression in activated macrophages. *SCHOCK* **12**, 473 (1999).
- 29) Moon, T. C., Lee, E. K., Son, K. H., Kim, H. P., Lee, S. H., Kang, S. S. and Chang, H. W. : Inhibitory activity of amentoflavone on arachidonic acid releasing enzyme, phospholipase A₂ and inhibition of histamine release from mast cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 49 (2002).
- 30) Kim, H. K., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. : Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 406 (1998).
- 31) Kim, H. K., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. : Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by gingetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Medica* **65**, 465 (1999)
- 32) Kwak, W. J., Han, C. K., Chang, H. W., Kang, S. S., Park, B. K. and Kim, H. P. : Effect of Gingetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and *in vivo* skin inflammation. *Planta Medica* **68**, 316 (2002)
- 33) Moon, T. C., Chung, K. W., Chung, K. C., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. : Screening of inflammatory phospholipase A₂ inhibitors from natural products. *YAKHAK HOEJI* **41**, 565 (1997).
- 34) Moon, T. C., Chung, K. C., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. : Screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from natural products. *YAKHAK HOEJI* **42**, 214 (1998)
- 35) Yoo, S. W., Kim, J. S., Kang, S. S., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K. H. and Lee, C. O. : Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 824 (2002).