

白屈菜的 물추출물이 lipopolysaccharide로 유도된 Nitric Oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

조용걸^{2,4)}, 김영우^{1,2)}, 변성희^{1,3)}, 김상찬^{1,2,3)}

대구한의대학교 한의과대학 한의학과 방제학교실¹⁾, 한방생명자원연구센터²⁾,
제한동의학술원³⁾, 연변대학교 의과대학 약리학교실⁴⁾

Abstract

Inhibitory effect of *Chelidonii Herba* water extract on production of Nitric Oxide, Expression of iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells.

Rong-Jie Zhao^{2,4)}, Young-Woo Kim^{1,2)}, Sung-Hui Byun^{1,3)}, Sang-Chan Kim^{1,2,3)}

Dept. of prescription, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Korea.¹⁾
Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Korea.²⁾
Jaehan Oriental Medical Academy, Daegu Haany University, Korea.³⁾
Dept. of pharmacology, College of Medicine, Yanbian University, China.⁴⁾

Chelidonii Herba (CHE, *Baek-gul-cha*e in Korean), which has its original description in Gu-Hwang-Bon-Cho, a classic book of oriental Herbal book, is widely used in the treatment of stomach cancer, jaundice, gastric ulcer, edema and stomach pain, in Korea, Japan and China.

The present study was conducted to evaluate the effect of CHE on the nitric oxide

교신저자 : 김 상 찬

주소 : 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

전화 : 053-770-2247, Fax : 053-768-6340, e-mail : sckim@dhu.ac.kr

접수 : 2004/ 12/ 20 수정 : 2004/ 12/ 23 채택 : 2004/ 12/ 31

(NO) production, iNOS and COX-2 expression in lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells.

After the treatment of CHE, NO production was monitored by measuring the nitrite content in culture medium, cell viability was measured by MTT assay. COX-2 and iNOS were determined by Immunoblot analysis.

The production of nitric oxide was significantly inhibited by pretreatment (1h) with CHE (0.1~0.3 mg/ml) on LPS-activated Raw264.7 cells. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) protein were up-regulated by LPS, but the increased levels of iNOS and COX-2 were inhibited by pretreatment of CHE (0.1-0.3 mg/ml), respectively.

Thus, the present data suggest that CHE may play an important role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections.

Key Word : *Chelidonii Herba*, Nitric oxide, iNOS, COX-2

I. 서 론

白屈菜는 救荒本草에서 부터 기재된 약재로¹⁾, 다년생초본인 애기똥풀의 帶花 한초이다. 淸熱解毒藥으로 微溫有毒 苦辛하고, 入肝脾胃한다²⁾. 鎮痛, 止咳, 利尿, 解毒, 抗癌作用이 있어³⁾ 胃腸疼痛, 黃疸, 水腫, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷, 胃癌, 胃潰瘍을 치료한다²⁾.

백굴채의 연구경향을 살펴보면, 백굴채의 성분중 chelidonine은 細胞有絲分裂毒으로서 체외실험에 있어서 섬유모세포의 유사분열을 억제하였고, 악성종양의 성장을 억제하였으며⁴⁾, indomethacin으로 유발된 위궤양을 회복시킨 보고가 있다⁵⁾.

그러나, 아직 cyclooxygenase - 2 (COX-2)를 매개로 하는 염증반응에 대한 白屈菜에 대한 연구는 아직 밝혀져 있지 않으므로, 본 연구에서는 LPS로 활성화된

Raw cell에 白屈菜를 처치하여 nitric oxide (NO) 및 이와 관련된 단백질에 대하여 연구하였다.

LPS는 endotoxin으로서, septic shock syndrome을 유발시키기도 하고, 또한 NO, TNF- α , interleukins, prostanoids, leukotrien과 같은 염증 매개물들을 생산을 유도하므로^{6,7)}, 일반적인 염증의 in vitro 연구에 활용된다.

일반적으로, 대식세포는 자연면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species(ROS) 와 TNF- α 및 IL-6와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 TNF- α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾. 따라서 NO 생성 저해제는

septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증 반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 Polygonum tinctorium¹⁴⁾, Melia azedarach¹⁵⁾, Cyperus rotundus¹⁶⁾¹⁷⁾, Cudrania tricuspidata¹⁸⁾, 當歸¹⁹⁾, Farfarae Flos²⁰⁾ 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서, 본 연구는 열수추출된 白屈菜(CHE)가 NO production, inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물의 제조

白屈菜 물추출물(CHE)은 *Chelidonium Herba* (영남약업사, 대구) 600 g을 물 3,000 ml로 3시간 전탕한 후, 추출물을 거여즈로 1차 여과하고 3000×g에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여, 0.2 μm filter (Millipore Corporation, Bedford, MA)로 여과하고, 동결건조한 후 사용 때까지 -20℃에 보관하였다. 세포에 처치시 CHE는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 녹여 사용하였다. CHE의 양은 *Chelidonium Herba* 물추출물의 동결건조된 무게로 측정하였다. *Chelidonium Herba*로부터 동결건조된 CHE의 수율은 14.6 % (8.76/600)였다.

2. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에

서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator (Naire, USA)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

3. 시약

LPS (*Escherichia coli* 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10⁴ cells/well로 분주한 다음 白屈菜를 농도별로 처치하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1 - 0.3 mg/ml의 농도로 白屈菜를 처치하고 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양후 생존세포에 MTT (0.5 mg/ml)를 4시간 처치한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은

control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

$$[\text{i.e. viability (\% control)} = \frac{100 \times (\text{absorbance of treated sample})}{(\text{absorbance of control})}].$$

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H_2O) 100 μl 를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO_2^- 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM β -glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat

antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

7. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm S.D로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

IV. 결 과

1. CHE가 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 CHE의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 CHE를 0.1-3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS농도 의존적으로 증가하였으며, CHE를 0.1과 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 12h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, CHE 1.0 및 3.0 mg/ml을 처리한 실험군에서는 LPS보다 NO의 생성량이 더욱 증가되는 경향 (data not shown)을 나타내었다 (Fig. 1).

2. CHE가 Raw cell의 생존율에 미치는 영향

CHE가 0.1 및 0.3 mg/ml (12 ~ 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, CHE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지

를 관찰하기 위하여, CHE의 농도별 시간별 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 LPS는 9 ~ 24 h에서 control보다 유의성있는 세포사를 유도하였으나, CHE는 12 ~ 24 h에서 LPS로 인한 세포사를 보호하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, CHE가 NO의 생성을 억제한다는 앞의 결과가 Raw cell의 절대적 수의 감소에 기인하는 것이 아니라는 것을 의미한다 (Fig. 2).

3. CHE가 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

는 영향

L-arginine으로 생성되는 NO는 enzyme nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 생성되며⁷⁾, prooxidant나 proinflammatory stimuli에 의해 MEKK-1, NFκB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증 반응에 있어서 중추적 역할을 하는 단백질이다²¹⁾²²⁾. LPS처치시에는 iNOS 및 COX-2 단백질이 유도되었으나, LPS에 CHE 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS 및 COX-2의 양이 줄어들었다 (Fig. 3).

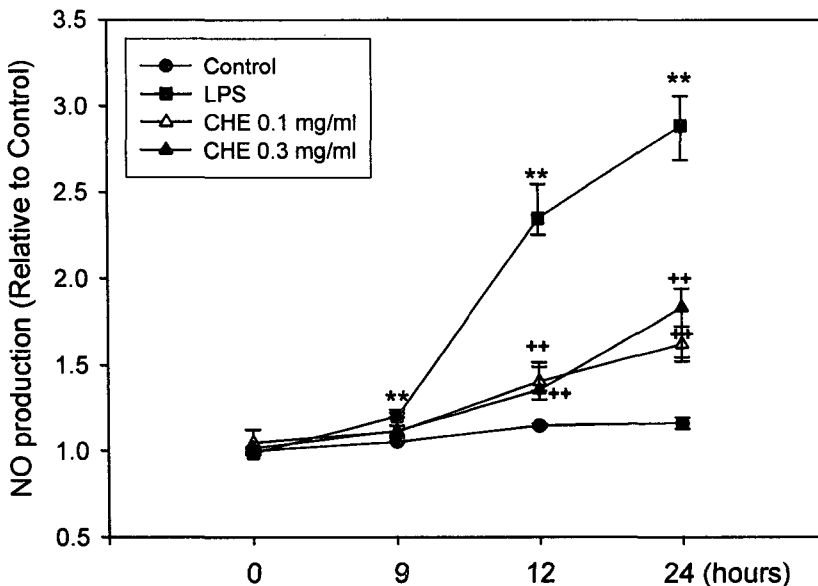


Fig. 1. Effects of CHE on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with 0.1, 0.3 mg/ml of CHE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 9~24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (*: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, +*P < 0.01).

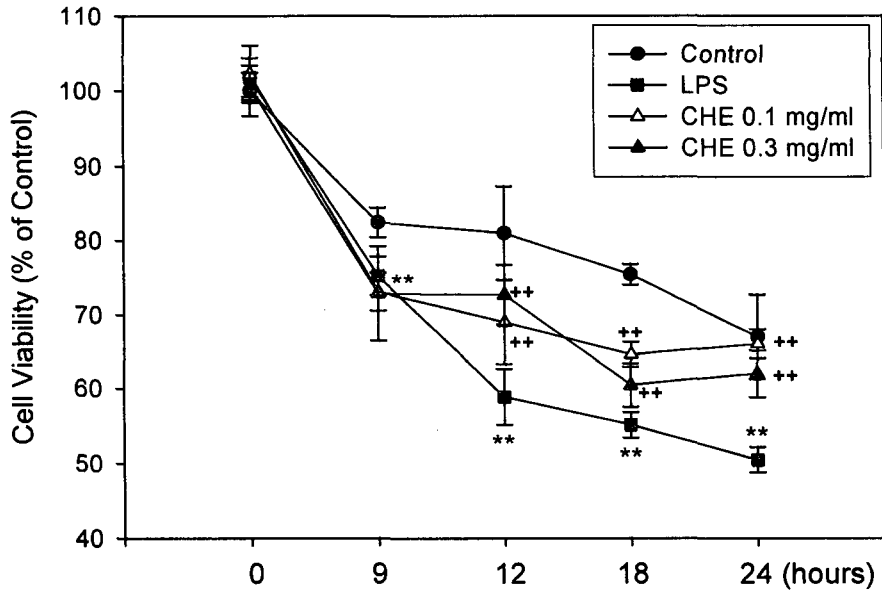


Fig. 2. Effects of CHE on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with various concentrations of CHE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μ g/ml), and the cells were further incubated for 9-24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The cell viability was monitored as described in the Experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with eight separate experiments. (*: significant as compared to control, **P < 0.01, +: significant as compared to LPS alone, at concomitant time, **P < 0.01).

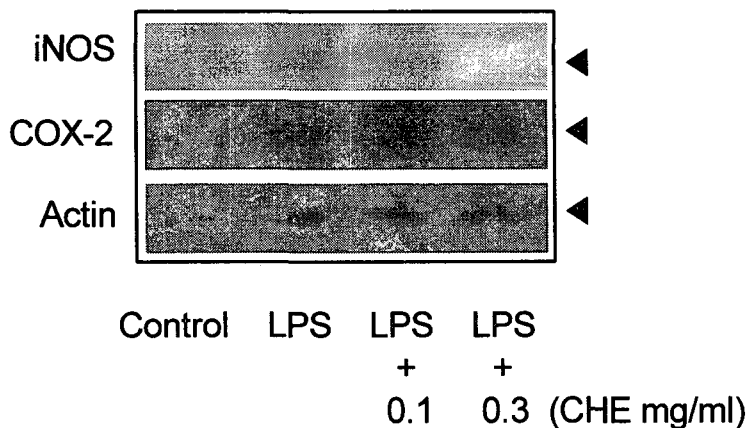


Fig. 3. Effect of CHE on the induction of iNOS and COX-2 by LPS. Inhibition of LPS-stimulated iNOS and COX-2 protein expression by CHE. The level of protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1 μ g/ml) with or without CHE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

IV. 고찰

白屈菜는 救荒本草에서 부터 기재된 약재로¹⁾, 양귀비과(*Papaveraceae*)에 속한 다년생초본인 애기똥풀의 帶花 한 전초이다. 우리나라 전국 각지의 原野에 분포하고 있으며, 신선한 즙액에는 alkaloid를 함유하고 있으며, 그 주요성분은 chelidoneine $C_{20}H_{19}NO_5$ 0.3%, sanguinarine $C_{20}H_{15}NO_5$, chelerythrine $C_{21}H_{19}NO_5$, homochelidone $C_{21}H_{23}O_5N$, oxychelidoneine $C_{20}H_{17}NO_6$, methoxychelidoneine $C_{21}H_{21}NO_6$, portopine $C_{20}H_{19}NO_5$, sparteine $C_{15}H_{26}N_2$ 등이다. 淸熱解毒藥으로 微溫有毒 苦辛하고, 入肝脾胃한다²⁾. 鎮痛, 止咳, 利尿, 解毒, 抗癌作用이 있어³⁾ 胃腸疼痛, 黃疸, 水腫, 疥癬瘡腫, 蛇蟲咬傷, 胃癌, 胃潰瘍을 치료한다²⁾. 백굴채의 연구경향을 살펴보면, 백굴채의 성분 중 chelidoneine은 1종의 세포유사분열독으로서 체외실험에 있어서 섬유모세포의 유사분열을 억제하였고, 악성종양의 성장을 억제하였으며⁴⁾, indomethacin으로 유발된 위궤양에 대한 효과등이 있다⁵⁾.

본 연구에서는 열수추출된 白屈菜(CHE)가 LPS로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하였다. LPS는 endotoxin으로서, septic shock syndrome을 유발시키기도 하고, 또한 NO, TNF- α , interleukins, prostanoids, leukotrien과 같은 염증 매개물들의 생산을 유도하므로^{6,7)}, 일반적인 염증의 in vitro 연구에 활용된다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide

synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 하며, 염증의 과정에 있어서 중요한자 중의 하나로 작용한다^{7,23)}. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, 구조를 이루는 (constitutively expressed) NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다²⁴⁾. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,25)}. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- α (TNF α)등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다^{14,15,26)}. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절체로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 CHE의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 CHE를 0.1-3.0 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는

control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS 농도 의존적으로 증가하였으며, CHE를 0.1과 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 12h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, CHE 1.0 및 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 LPS보다 NO의 생성량이 더욱 증가되는 경향 (data not shown)을 나타내었다. CHE가 0.1 및 0.3mg/ml (12 ~ 24 h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, CHE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, CHE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 LPS는 9 ~ 24 h에서 control보다 유의성있는 세포사를 유도하였으나, CHE는 12 ~ 24 h에서 LPS로 인한 세포사를 보호하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, CHE가 NO의 생성을 억제한다는 앞의 결과가 Raw cell의 수적 감소에 기인하는 것이 아니라 CHE자체에 어떠한 NO의 생성 억제기작이 있음을 의미한다.

이러한 CHE의 NO 생성 억제 기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 CHE 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 양이 현저히 감소하였다.

한편, COX-2는 prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNF α , ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증

반응에 있어서 증추적 역할을 한다²¹⁾²²⁾. 또 Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다²⁷⁾. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다²⁸⁾. 본 실험에서 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 CHE 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 발현량이 현저히 줄어들었다.

V. 결 론

白屈菜의 물추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 nitric oxide의 production, iNOS 및 COX-2의 expression에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CHE를 0.1과 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 12 ~ 24 h에서, LPS에 의하여 증가된 NO의 생성을 유의성있게 억제하였다.
2. 세포생존율을 측정한 결과 LPS는 9 ~ 24 h에서 control보다 유의성있는 세포사를 유도하였으나, CHE는 12 ~ 24 h에서 LPS로 인한 세포사를 억제하였다.
3. LPS처치시에는 iNOS 및 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 CHE를 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는

발현량이 현저히 감소하였다.

이러한 결과는 白屈菜가 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 nitric oxide 및 과량의 proinflammatory cytokine생성과 관련된 면역증상의 치료에 활용될 수 있는 가능성을 시사한다.

Acknowledgment

This work was supported by grant number (R12-2003-002-03002-0) from the basic research program of the Korea Science and Engineering Foundation.

參 考 文 獻

1. 윤인한, 박창국. 백굴채에 대한 문헌적 고찰. 동서의학. 19(2). 43-51. 1994.
2. 이상인. 본초학. 수서원. 서울. 1981. p. 532.
3. 소진백, 김호철, 안덕균. 백굴채의 항암 효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 13(2). 63~72. 1997.
4. 常敏毅 編著, 金洙哲. 抗癌本草. 일증사. 서울. 1992. pp. 204-205.
5. 김득용, 권기록, 이준무. 백굴채수침, 전탕액 투여 및 침자가 Indomethacin으로 유발된 백서의 위궤양에 미치는 영향. 대한침구학회지. 12(2). 177-192. 1995.
6. Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. Pharmacol Rev. 45(4). 382-411. 1993.
7. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med. 109(2). 150-158. 2000.
8. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to Candida albicans. J Microbiol Biotechnol. 10, 8-15, 2000.
9. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic

- mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 144, 1425-1431, 1990.
10. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 24-32, 1996.
 11. Corbett JA, and Mac Daniel ML : Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 181, 559-568, 1995.
 12. Cetkovic-Cvrlje M and 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.
 13. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. *대한화학회지* 39, 52-63, 1999.
 14. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28, 217-226, 2000.
 15. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406, 301-309, 2000.
 16. Seo WG, Pae HO, Oh GS, KY Chai, Kwon TO, YG Yun, NY Kim, HT Chung. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 76, 59-64, 2001.
 17. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*, 17/3, 771-776, 2003.
 18. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol* 35, 21-28, 2000.
 19. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 김윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지*. 10/2, 189-197, 2002.
 20. T.G. Yoon, B.H. Byun, T.K. Kwon, S.I. Suh, S.H. Byun, Y.K. Kwon, S.C. Kim. Inhibitory effect of farfarae flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*.

- 18(3). 908-913. 2004.
21. Surh YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidant and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* 40(8), 1091-7, 2002.
22. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 480-481, 243-68, 2001
23. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664 - 666, 1988.
24. Kubes p. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*, 47, 6-9, 2000.
25. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 69, 625-635, 2001.
26. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 76, 119-123. 2001.
27. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase -2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol.* 4(2), 116-23, 2004.
28. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology.* 139, 11-20, 2003.