

鬼箭羽 추출물의 염증성세포활성물질 억제효과

김대현 · 김병진 · 박경배 · 이주성¹ · 성강경¹ · 박성주^{2*}

원광대학교 약학대학 한약학과, 1: 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory Effect of Extract of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. on the Production of Inflammatory Cytokines

Dae Hyeon Kim, Byung Jin Kim, Kyung Bae Park, Ju Sung Lee¹, Kang Keyng Sung¹, Sung Joo Park^{2*}

Department of Pharmacy, College of Oriental Pharmacy, 1: Department of Circulatory Internal Medicine, 2: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of water extract from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. (EAS) on the RAW 264.7 cells. To evaluate of anti-inflammatory of EAS, we examined the cytokine productions on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells and also inhibitory mechanisms using Western blot. EAS reduced LPS-induced production of nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1b, IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor-a (TNF-a) in RAW 264.7 cells. EAS inhibited the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) but not of inhibitory kappa B a (Iκ-Ba) degradation in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In conclusion, EAS down-regulated LPS-induced NO and cytokines production, which could provide a clinical basis.

Key words : *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb.(EAS), lipopolysaccharide (LPS), inflammation, cytokine

서론

귀전우는 낙엽 관목으로서 높이가 약 3 m에 달한다. *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. (화살나무)의 날개 모양의 가지 혹은 날개 모양의 부속물을 기원으로 한다. 중국의 대부분 지역에 분포하는 귀전우는 破血, 通經, 殺蟲하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 귀전우 전탕추출물은 항고혈당, 고혈당과 면역자극 활성화에 쓰이고 있다^{1,2)}. 또한, 면역조절, 아테롬성 동맥 경화증과 항염증 효과와 같은 다양한 활성이 있는 것으로 알려져있다³⁻¹⁰⁾.

귀전우의 잎은 epifriedelinol, friedelin, quercetin, dulcitol을 함유하고 있다. 종자유에는 포화지방산 (20%), oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, caproic acid, acetic acid와 benoic acid 등을 함유하고 있으며, oxaloacetic acid도 들어 있다.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면, 면역세포가 활성화되고, 활성화된

면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다¹¹⁾.

nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase(NOS)에 의해 L-argine으로부터 생성된다¹²⁾. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다¹⁴⁻¹⁸⁾. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다.

또한 활성화된 대식 세포에서는 interleukin (IL)-1b, IL-6 and IL-10, tumor necrosis factor-a (TNF-a)와 같은 pro-inflammatory cytokine과 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등을 생산하게 된다^{18,19)}. 염증 매개 물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하게 되고 이로써 각종 인체 질환을 악화시키는 원인이 된다. 따라서 NO, PGE₂, TNF-a, IL-1β 및 IL-6, IL-10과 같은 염증 매개물질을 억제하면, 각종 면역질환 및 인체질환의 치료에 도움이 될 것이다^{20,21)}.

이에 귀전우가 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 NO, 전염증성 사이토카인(IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a)의 발현을 실험하였고, mitogen-activated protein kinases

* 교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : parksj08@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6844

· 접수 : 2009/03/13 · 수정 : 2009/03/23 · 채택 : 2009/04/10

(MAPKs) family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) 및 p38에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 inhibitory kappa B α (Iκ-Bα)를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 약재

실험에 사용한 귀전우는 읍니허브에서 구입하여 물 1 L에 100 g을 넣고 2시간 30분동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다.

2. 시약

Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 chloroform, Tri-zol, sodium dodesyl sulfate(SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-Iκ-Bα, anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. anti-mouse IL-6, TNF-α, IL-10, IL-1b antibodies, 재조합 IL-6, TNF-α, IL-10, IL-1b는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

3. 실험동물

C57BL/6 6주령 암컷을 오리엔트에 구입하여 사용하였다.

4. MTT 분석

RAW 264.7 cell의 생존율은 말집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 귀전우를 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해 했다. formazan의 양은 해액을 96-well plate에 loading 한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다.

5. NO (Nitrite) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent:0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 100 μl의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1내지 6의 각각에 100 μl씩을 첨가하고,

그 혼합물을 37℃에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토미터 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6. Cytokine (TNF-α, IL-6, IL-10, IL-1b) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell를 자극하기 전 귀전우 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다.

7. Total RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 귀전우를 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μl의 chloroform 용액을 가하고 두 세번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다.

8. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Tri-zol로 추출한 RNA는 MML-V reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg of oligo-(dT)을 넣고 70℃에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200 Unit MMLV reverse transcriptase을 첨가하고 42℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92℃에서 30초, 58℃에서 45초, 그 후에 72℃에서 30초를 30cycle 반복하였다.

사용한 primer는 다음과 같다.

TNF-α	Forward	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC
TNF-α	Reverse	TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT
IL-6	Forward	CAT CCA GIT GCC TTC TTG GGA
IL-6	Reverse	CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG
IL-1b	Forward	5'-AGT ATC ACT CAT TGT GGC TG-3'
IL-1b	Reverse	5'-TCA CAG AGG ATG GGC TCT TC-3'
IL-10	Forward	5'-ACC AGC TGG ACA ACA TAC TG-3'
IL-10	Reverse	5'-TAC CAG GTA AAA CTG GAT CAT T-3'
β-actin	Forward	TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G
β-actin	Reverse	TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C

PCR반응이 끝난 후 1X 샘플링 buffer를 섞은 뒤 1.5% agarose gel에 10 μl씩을 넣고 전기영동 한 후 자외선을 이용하여 반응을 확인하였다.

9. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI 1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 귀전우 (500 mg/ml)으로 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로(0, 15, 30, 60 min) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심 분리 (5,000 rpm, 5 min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor $10 \mu\text{l}$ + protease inhibitor $10 \mu\text{l}$)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 동일량의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 멤브레인에 옮기고 나서 5% skim milk로 2 h blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 Ik-Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

10. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 귀전우의 RAW 264.7 cell에 대한 독성

귀전우의 세포독성에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7cell 에 귀전우를 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 귀전우는 RAW 264.7 cell에 독성을 나타내지 않았다.

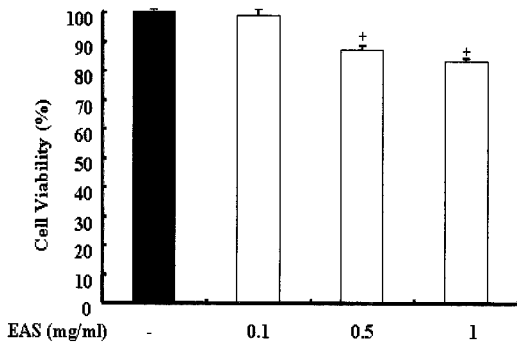


Fig. 1. Effect of EAS on cytotoxicity on RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with EAS at indicated dose. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. *P < 0.05 : significant as compared to control,

2. 귀전우 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

귀전우는 면역조절, 아테롬성 동맥 경화증과 항염증 효과와 같은 다양한 활성이 있는 것으로 알려져있다^{2,9)}. 물 추출물에서의 항염효과에 대해서 조사하기 위하여 먼저 귀전우가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 귀전우를 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정한 결과 LPS로 자극한

대조군에 비해 귀전우 추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

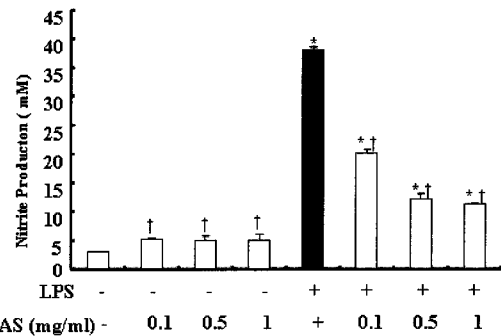


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced NO production by EAS. The cells were treated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. NO release was measured by the method of Griess.*P < 0.05 : significant as compared to control, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone.

3. 귀전우 추출물이 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a 발현에 대한 영향

귀전우가 RAW 264.7 cell에서 전염증성 인자들에 대한 영향을 조사하기 위하여, 염증성 세포활성물질의 생성을 조사하였다. 귀전우를 전처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a를 측정한 결과 귀전우 추출물이 염증성 세포활성물질들을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

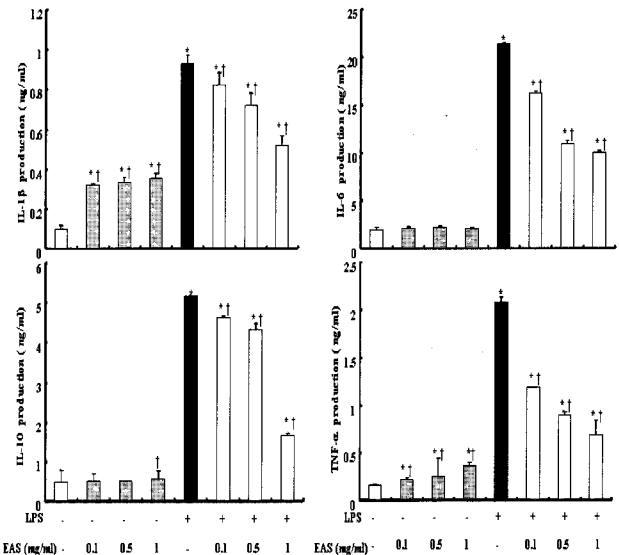


Fig. 3. Effect of EAS on the productions of IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated EAS at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods.*P < 0.05 : significant as compared to control, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone.

4. 귀전우 추출물이 mRNA 수준의 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a 발현에 대한 영향

귀전우가 RAW 264.7 cell에서 전염증성세포활성물질을 단백질 수준에서 억제하여서(Fig. 3), mRNA수준에서도 전염증성 인자들을 억제함을 알아 보기 위해 귀전우를 전처리한 후 LPS로

자극하여 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a의 mRNA를 측정된 결과 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a를 대조군에 비해 실험군이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

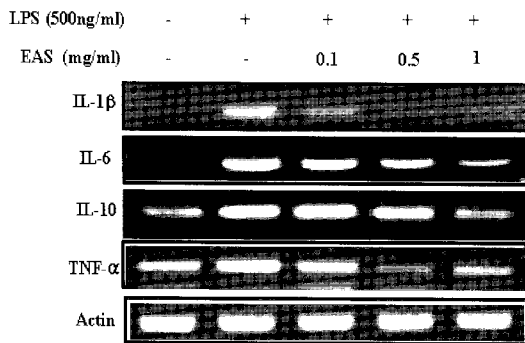


Fig. 4. Effect of EAS on the mRNA levels of IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a. The cells were pre-treated EAS extract at indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods.

5. 귀전우 추출물에 의한 MAPKs의 발현억제 효과

MAPKs는 세포활성물질의 생성 조절 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서는 p38, ERK, JNK의 활성이 증가 하지만, 귀전우를 전처리했을 경우 ERK, JNK의 활성이 억제되었다(Fig. 5). LPS는 NF-kB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분비한다. 또한 NF-kB의 활성은 Iκ-Ba의 분해에 의존하게 된다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 귀전우가 LPS에 의한 Iκ-Ba의 분해를 억제하고 있다. 즉 귀전우가 NF-kB의 활성을 억제하고 있다.

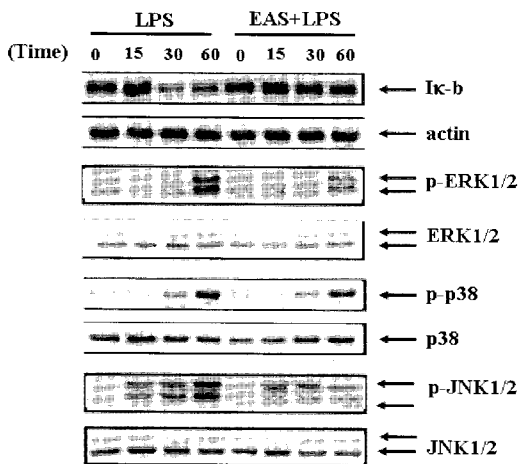


Fig. 5. Effects of EAS on the expression of Iκ-Ba degradation and MAP kinase activity in LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with EAS extract at indicated concentrations for 1h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for indicated time. Detail methods were described Materials and Methods.

고찰

귀전우(鬼箭羽)는 노박영굴과 (Celastraceae)의 화살나무 (Euonymus alatus Sieb.) 또는 동속식물의 줄기에 생긴 날개 모양

의 코르크를 말한다²²⁾. 귀전우는 생김 모양이 화살의 날개처럼 생겼고 특이한 모양을 하고 있어서 귀신을 쫓는다고 하여 붙여진 이름이다. 민간에선 오래전부터 사용하던 약초로서 참빗나무, 훗잎나무라고도 하며 화살나무와 유사한 참빗살나무, 회잎나무, 회목나무 등을 함께 부르던 말이다. 특히 암에 사용하기도 하며 도가에서는 신병, 놀라서 생긴 병, 상기증 등에 사용해 왔다²³⁾. 귀전우는 파혈작용이 있어 타박상, 어혈동통, 생리불순, 산후어혈복통, 무월경 등에 사용하고 풍습으로 인한 사지마비동통, 류마티스성 관절염 등에 사용한다²⁴⁾. 약리작용으로 심박동이상, 진정작용, 혈압강화작용, 혈당강화작용, 관상동맥혈류량 증가, 장관수축작용 등이 보고되었다^{25,26)}. 귀전우는 항암작용, 항염증 작용이 알려져 있기는 하나, 항염증 작용에 대한 자세한 연구나, 기전 연구는 이루어 지지 않고 있다. 본 연구에서는 귀전우의 물 추출물이 항염증 작용과 그 기전을 조사하였다.

NO는 염증성 매개체로서 대식세포의 종양, 박테리아 파괴 능력과 같은 면역반응에 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 또한 장기 기능에 미치는 LPS의 유독한 작용의 원인은 NO이다²⁸⁾. NO의 지나친 생산은 폐혈증과 류머티즘과 같은 면역질환을 야기 할 수 있다²⁹⁾. NO를 억제한다면 면역질환을 억제할 수 있다. 귀전우 추출물은 NO를 유의적으로 억제하여 염증에 관여함을 보여준다(Fig. 2).

그람음성 세균 세포외막 성분인 LPS는 macrophage에서 면역기능을 조절하는 여러 분자 즉 TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-10 및 arachidonic acid 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 pro-inflammatory 분자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다^{30,31)}. 본 연구에서는 LPS로 유도한 전염증성 물질들을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 측정해보았다. 귀전우 추출물은 전염증성 물질들의 발현을 억제하여 면역작용을 억제하였다(Fig. 3, 4). 특히 IL-6, TNF-a의 뛰어난 억제 능력을 통해 endotoxin shock 억제에 뛰어난 효과를 보일 것으로 예측이 된다. 여기서 마우스의 쇼크 억제 실험을 하지는 못했지만, 추후에 쇼크 억제 실험과 그에 따른 사이토카인의 변화를 측정하는 것이 더 이루어져야 할 것 같다.

LPS는 MAP kinase (ERK 1/2, p38, JNK)와 NF-kB를 활성화 시켜서 NO 및 superoxide anion 등의 free radicals이 생성된다³²⁻³⁵⁾. ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 활성은 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 인산화에 의해서 나타나며, NF-kB 활성은 Iκ-Ba의 감소를 통해 알아낼 수 있다. 귀전우가 p38의 분해를 억제하지 못했으나, ERK 1/2, JNK 1/2 인산화와 Iκ-Ba의 분해를 억제 하였다. 이는 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 활성과 Iκ-Ba의 분해를 억제하여 항염증 작용을 하였음을 알 수 있다.

이러한 실험 결과들은 귀전우가 대식세포에서 ERK 1/2, p38, JNK 1/2의 인산화를 저해하고 Iκ-Ba의 분해를 억제하여서 전염증성 cytokine 들의 발현을 억제 하여 NO의 생산을 억제하였다고 생각된다. 귀전우의 이와 같은 작용은 천식, 류마티스 관절염 같은 자가 면역 질환과 소화 질환 염증, 예를 들어 위장염, 지방간, 대장염 등과 염증에 효과적일 것이라고 생각되어진다. 일반적으로는 항암치료를 하는 약으로 더 많이 알려져 있기에, 항암주 세포에서 실험을 하여 항암작용이 실제로 있는지에 대해

밝혀보고 그 기전을 알아보는 것에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것 같다.

결 론

RAW264.7cell을 LPS로 자극하였을때 귀전우의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

귀전우를 농도별로 처리했을 때 세포독성이 거의 나타나지 않았다. 귀전우의 농도 의존적으로 NO 생산이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 귀전우가 농도 의존적으로 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a 생산을 현저하게 억제하였다. 귀전우가 mRNA수준에서 IL-1b, IL-6, IL-10, TNF-a 생산을 억제하였다. 귀전우가 ERK 1/2, JNK 1/2의 인산화가 억제되고 Ik-Ba의 분해를 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 귀전우 추출물은 MAPKs의 인산화를 억제함으로써 NO와 항염증성 cytokine들의 생산을 억제하여서, 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

감사의 글

이 연구는 Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2006-331-20084) 에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Park, W.H., Kim, S.H., Kim, C.H. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination. *Toxicology*. 207: 383-390, 2005.
2. Chung, H.S., Jeong, H.J., Kim, J.S., Jeong, S.I., Kim, K.S., Kim, K.S. et al. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Euonymus alatus* in mouse peritoneal macrophages. *Clin Chim Acta*. 318: 113-120, 2002.
3. Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G. et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci*. 77: 276-279, 2005.
4. Kim, C.H., Kim, D.I., Kwon, C.N., Kang, S.K., Jin, U.H., Suh, S.J. et al. *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant in human uterine leiomyomal smooth muscle cells. *Int J Gynecol Cancer*. 16: 843-848, 2006.
5. Lee, T.K., Lee, J.Y., Kim, D.I., Lee, Y.C., Kim, C.H. Differential regulation of protein kinase C activity by modulating factors and *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb in human myometrial and uterine leiomyomal smooth muscle cells. *Int J Gynecol Cancer*. 15: 349-358, 2005.
6. Park, S.H., Ko, S.K., Chung, S.H. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J Ethnopharmacol*. 102: 326-335, 2005.
7. Seo, U.K., Lee, Y.J., Kim, J.K., Cha, B.Y., Kim, D.W., Nam, K.S. et al. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol*. 97: 101-106, 2005.
8. Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G. et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J*. 18: 670-681, 2004.
9. Lee, T.K., Kim, D.I., Han, J.Y., Kim, C.H. Inhibitory effects of *Scutellaria barbata* D. Don. and *Euonymus alatus* Sieb. on aromatase activity of human leiomyomal cells. *Immunopharm Immunotoxicol*. 26: 315-327, 2004.
10. Cha, B.Y., Park, C.J., Lee, D.G., Lee, Y.C., Kim, D.W., Kim, J.D. et al. Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol*. 85: 163-167, 2002.
11. Abul, K. Abbas. *Cellular and Molecular Immunology* 6th edition, Saunders Elsevier. pp 75-97, 2006.
12. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell*. 78: 915-918, 1994.
13. Kwqamata, 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.
14. Lee, B.G., Kim, S.H. Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. 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.
15. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. 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-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol*. 35: 21-28, 2000.
16. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci*. 69: 625-635, 2001.
17. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7

- macrophage. *J Ethnopharmacol.* 76: 119-123, 2001.
18. Horwood, N.J., Page, T.H., McDaid, J.P., Palmer, C.D., Campbell, J., Mahon, T., Brennan, F.M., Webster, D., Foxwell, B.M. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *J Immunol.* 176(6): 635-641, 2006.
 19. Hirohashi, N., Morrison, D.C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophage modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun.* 64(3):1011, 1996.
 20. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I. and Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* 11: 1995-2000, 2003.
 21. Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2):93-103, 2004.
 22. Swearingen, J.K., Reshetiloff, B., Slattery and S. Zwicker. "Winged Burning Bush". *Plant Invaders of Mid-Atlantic Natural Areas.* National Park Service and U.S. Fish & Wildlife Service. 2002.
 23. Huang, K.C. *The pharmacology of Chinese Herbs.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp 343-346, 1993.
 24. 전국한의학대학 본초학 공동교재편찬위원회. *본초학.* 서울, 영림사, p 720, 2007.
 25. Middleton, Jr. E., Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol.* 43: 1167-1179, 1992.
 26. Robak, J., Gryglewski, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 37: 837-841, 1988.
 27. la Sala, A., Gadina, M., Kelsall, B.L. G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J. Immunol.* 175: 2994-2999, 2005.
 28. Wu, G.H., Zhang, Y.W., Wu, Z.H. Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 7: 357-362, 2001.
 29. Bryan, N.S. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems based review. *Free Radic Biol Med.* 41: 691-701, 2006.
 30. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Datta, S., Chattopadhyay, S., Basu, J., Kundu, M. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB regulate H. pylori-mediated IL-8 release from macrophages. *Biochem J.* 366: 376-382, 2002.
 31. Binetruy, B., Smeal, T., Kariu, M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature.* 351: 122-127, 1991.
 32. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 211-218, 1999.
 33. Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H., Kim, K.H. Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *lab Invest.* 84: 49-62, 2004.
 34. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase. TNF- α and COX-2 expression by suchinone effects on I- κ B α phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J.Pharmacol.* 139: 11-20, 2003.
 35. Meng, F., Lowell, CA. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med.* 185(9):1661, 1997.