

Lipopolysaccharide로 유도된 Raw264.7 cell에서 *Phellodendron amurense*의 Jatrorrhizine에 의한 염증 억제효과

조 영 제*

경북대학교 식품공학부, 경북대학교 식품생물산업연구소

Anti-inflammatory Effect of Jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in Lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 Cells

Young-Je Cho*

School of Food Science & Biotechnology, Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

Received March 28, 2011; Accepted April 19, 2011

n-Butanol extracts from *Phellodendron amurense* have about 50% inhibitory activity against hyaluronidase. The anti-inflammatory compound was isolated from *P. amurense* by Sephadex LH-20 and MCI-gel CHP-20 column chromatography with gradient elution. As a the result, its structure was identified as Jatrorrhizine by the interpretation of spectroscopic analyses including ¹H- and ¹³C-NMR. In anti-inflammatory activity, the expression of nitric oxide (NO) was inhibited as above 60% at 100 µg/mL concentration of extracts and then purified Jatrorrhizine from *P. amurense*. The inhibitory activities against the expression of inducible NO syntase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were 45% and 29%. It seems that the extracts and purified Jatrorrhizine from *P. amurense* were expected anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw264.7 cells.

Key words: anti-inflammatory, Jatrorrhizine, lipopolysaccharide, *Phellodendron amurense*

서 론

황백(*Phellodendron amurense*)은 황백나무의 껍질을 말린 약용식물로서, 우리나라 전역에서 자생되고 있으며, 줄기에는 isoquiniline alkaloid, furoquiniline alkaloid, indol pyridoquinazolin alkaloid, limonoid류, flavonoid 등의 phenolic compound 등이 함유되어 있는 것으로 Biomedical compilation committee에서 2006년에 보고된바 있으며, 정장, 위장염, 복통, 설사 등의 증상에 효과가 있는 생리작용을 가지는 것으로 Medicinal phytology subcommittee에서 보고하였다.

최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 물질들이 자생식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며[Bunney, 1992; Cho 등, 2005; Cho와 An, 2008], 삶을 건강하게 살려는 문화적 필요성에 따라 지구상의 다양한 자원으로부터 다양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중

에서도 특히 식물자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다[Clark과 TI-Feraly, 1981; Ham 등, 1997; Hubue 등, 1999; Moon 등, 1999; Choi와 Choi, 2003].

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 외막 구성성분이며 옛날부터 발열물질로서 알려져 있다. 단구 세포 또는 macrophage는 미량의 LPS에 의해 활성화되고 다양한 사이토카인, 아라키돈산 대사산물, 활성산소, nitric oxide (NO) 등을 생산, 방출한다[Oshima와 Bartsch, 1994; Gross와 Wolin, 1995; Kroncke 등, 1998; Stuehr, 1999; So 등, 2004]. 생체의 면역기구로서 제1선을 담당하는 macrophage는 골수에서 생산되는 탐식세포로서 체내에 들어온 이물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, hydrogen peroxide (H₂O₂)나 NO와 같은 각종 세포독성물질을 분비하여 이중세포나 암세포를 파괴하는 면역세포이다[Nirupama 등, 2005]. 또한 세균이나 이물질을 탐식 제거하는 과정에서 interleukin-1 (IL-1), IL-6 그리고 tumor necrosis factor (TNF-α)와 같은 여러 가지 사이토카인과 phosphatase와 같은 효소를 분비하여 체내면역현상을 조절하여 염증반응, 조혈기구 등에도 관여하는 면역계의 주요 방어기구이다[Anfernee 등, 2005; Naoko 등, 2005; Syu-ichi 등, 2005; Iwona 등, 2006].

*Corresponding author
Phone: +82-53-950-7755; Fax: +82-53-950-7762
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

따라서 본 연구에서는 생리활성 탐색연구의 일환으로 민간에 서 한약재로 널리 사용되어지고 있는 황백(*P. amurense*)에서 염 증억제효과를 가지는 물질이 있음을 확인하고, 유용성분들을 분 리, 동정하였으며, macrophage cell 라인인 Raw cell을 이용하여 항염증 효과를 검정하기 위하여 세포내의 단백질의 변화를 Western blotting을 통하여 염증억제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용한 황백은 영천 소재의 약업사에서 구 입하여 분쇄 후 저온저장 하면서 이용하였다.

추출물의 조제. 황백시료 1 g을 60% 에탄올로 상온에서 24 시간 동안 교반 추출하였다. 각각의 추출물은 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (N-11, Eycla NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하 였다.

Phenol 화합물 정량. 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증 류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na₂CO₃ 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용 한 표준곡선으로 양을 환산하였다[Folin과 Denis, 1912].

Hyaluronidase 억제효과 측정. Hyaluronidase 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 *N*-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도체로 변형시킨 후 *p*-dimethylamino benzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다[Reissig 등, 1995]. 즉, 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (7,900 U/mL) 0.05 mL와 시료용액 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 20분간 배양 한 다음 12.5 mM CaCl₂ 0.1 mL를 가하고 혼합 후 다시 20분 간 배양 하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹 인 HA (12 mg/mL)를 첨가하여 다시 40분간 배양하여 0.4 N potassiumtetraborate 0.1 mL 및 0.4 N NaOH 용액을 0.1 mL 반응 혼합물에 첨가하여 3분 동안 수욕상에서 가열한 후 완전히 냉각시켰다. 냉각 시킨 반응물에 발색제로 DMAB 시약 3 mL를 가하여 37°C에서 20분간 배양한 다음 585 nm에서 흡광 도를 측정하여 저해활성을 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

항염증 효과 측정을 위한 세포배양. Murine macrophage cell line인 Raw264.7 cells은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Research Foundation)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 Gibco사의 fetal bovine serum (FBS)를 10%, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin 을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 dish에 cell의 밀도가 2~3×10⁶/mL 정도 가 되게 계대 배양하여 5% CO₂ 조건으로 cell 상태를 유지하 였다. 실험을 할 때는, 80%의 confluency와 20회 이하 passages 조건을 준수하여 실험 하였고, 실험 전 12시간은 FBS 를 제거한 배지로 cell을 배양시켰다[Cho 등, 2008].

NO 저해활성 측정. NO 측정은 cell의 supernatant에서의 NO 의 양을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 사용하였으며, 6 well plate에 2×10⁶개의 cell을 confluence가 80%일 때, phosphate buffer saline (PBS)로 2번 세척한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시 간 이상 배양시킨 후에 lipopolysacchride (LPS) 10 µg/mL을 control군을 뺀 모든 well에 다 넣어서 자극시켰다. 1시간 후에 시료를 농도별로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540nm에서 흡광도로 측정하였다[Cho 등, 2008].

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 이용한 inducible NO syntase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 활성 측정. iNOS protein 활성 측 정을 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw264.7 세포를 suspension을 100 π tissue culture dish에 각 well당 2×10⁴ cells/mL cell로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별(10, 100 µg/mL)처리한 배지로 24시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 phosphate buffer saline (PBS)로 2번 세척해 준 후, Lysis buffer (Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tablet을 가함) 100 mL로 용해해서 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하였다. 상층액만을 모아 새 튜브로 옮긴다. 단백질 정량을 하거나 또는 차후 사용하기 위해 -20°C에 보관 한다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20 µL의 단백질을 10%의 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semidry transfer cell 기기(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST))에서 배양시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 iNOS (BD Bioscience, 1:1000, Sanjose, CA), COX-2 (Cayman, 1:1000, Ann arbor, MI), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1:1000, Santa Cruz, CA) 1차 항체 를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP), bovine anti-goat IgG HRP (Santacruz, 1:1000)의 각각의 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 뒤 암실에서 ECL (Millipore, Bedford, MA) 용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 Molecular Imager (Bio-Rad)를 이용하여 band를 정량화 하였다[Cho 등, 2008].

생리활성물질의 정제 및 동정. 흡착성 성질을 가지는 Sephadex LH-20 column (5.0×95 cm)과 다공성 polystyren gel 로서 흡착성을 가지는 MCI-gel CHP 20P column (3×50 cm)을 충진한 후 용출용매로서 normal phase type으로 EtOH→H₂O (100→0%), reverse phase type으로 H₂O→EtOH (0→100%)의

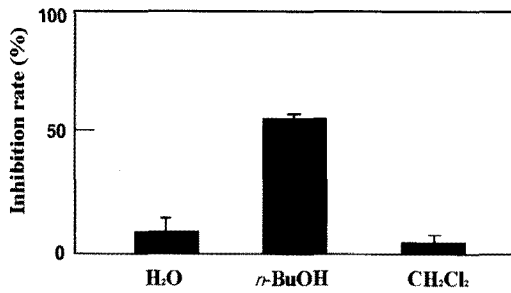


Fig. 1. Inhibitory activity against hyaluronidase by various solvents extracts from *P. amurense*.

순으로 용출시켜 thin layer chromatography (TLC) 상에서 물질의 분리유무를 확인하고 농축, 동결건조 하였다.

정제된 화합물의 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrum 분석. 핵자기 공명 분광기(NMR) spectrum의 측정은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수정제물 10 mg을 측정 용매 CDCl₃+DMSO-D₆+D₂O에 5~20% (w/v) 비율로 용해시키고 TMS [Tetramethylsilane; (CH₃)₄Si]를 기준물질로 하여 proton magnetic resonance (PMR) 300 MHz로 측정하였다.

결과 및 고찰

각종용매추출에 따른 황백 추출물의 항염증 활성. 황백으로부터 용매추출을 수행한 결과 Fig. 1에서와 같이 *n*-BuOH 층에서 약 50% 이상 저해되는 것으로 나타나 hyaluronidase의 저해 효과가 있음이 확인되었다. 따라서 항염증 물질의 정제는 *n*-BuOH 분획으로 수행하였다. Choi 등[2003]은 오가피, 황기, 목과, 목단피, 오미자, 황금 추출물에 대한 hyaluronidase 저해활성을 조사한 결과 ethyl acetate 분획물에서 44~65%의 저해활성을 확인한 결과와 비교하였을 때 황백의 hyaluronidase 저해능과 유사하게 나타났다.

황백 분획물로 부터 항염증 물질의 정제. *n*-BuOH 분획 농축물을 Sephadex LH-20 column (5×95 cm)을 이용하여 H₂O →EtOH로 gradient 용출한 결과 Fig. 2와 같이 4가지 분획물을 얻을 수 있었으며, 4가지 분획물 중 fraction (Fr) 2에서 hyaluronidase 저해활성이 확인되었다. Fr 2 농축액을 MCI gel CHP-20 column (3×50 cm)을 이용하여 EtOH→H₂O로 gradient 용출하여 2차 분리를 수행한 결과 Fr 2-1에서 Fr 2-5까지 5개의 분획물을 얻을 수 있었으며, Fr 2-2분획에서 hyaluronidase 저해활성이 검출되었다. 분리된 Fr 2-2는 단일물질임이 확인되어 정제 compound A로 정하였다(Fig. 3).

황백 분획물로 부터 항염증 물질의 구조 동정. Compound A를 구조 동정한 결과, 적황색 침상결정이었으며, ¹H-NMR spectrum은 9.66과 8.72 ppm에서 각각 H-8, 13위치에 해당하는 singlet의 spectrum이 관찰되었으며, 7.93과 8.05 ppm에서 *J*=9.0 Hz로서 H-11, 12에 해당하는 doublet spectrum이 관찰되어, protoberberine의 구조를 가지고 있음이 추정되었다. 또한 7.55과 6.82 ppm에서 H-1과 4의 위치에 해당되는 2개의 singlet이 관찰되었으며, 4.15~3.95 ppm영역에서 3개의 methoxy기에 의한

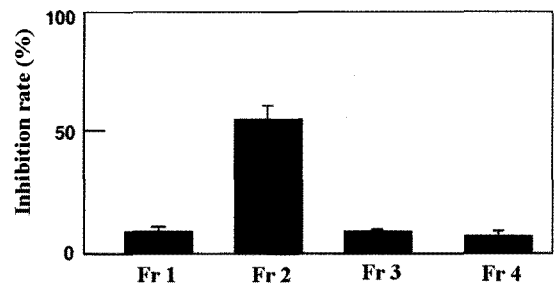


Fig. 2. Inhibitory activity against hyaluronidase of fractions by Sephadex LH-20 column chromatography from *P. amurense* extracts.

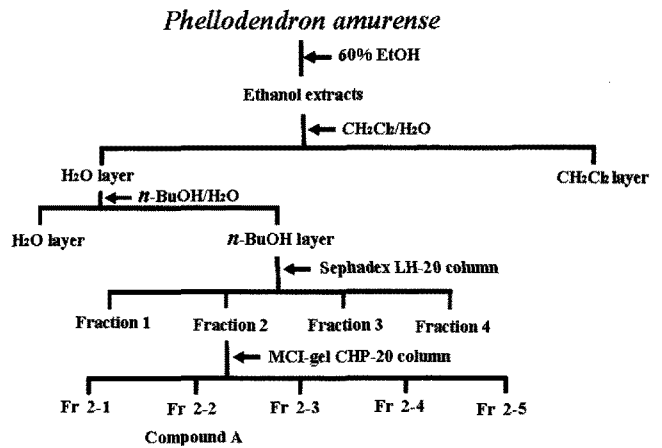


Fig. 3. Purification procedure of 60% ethanol extracts from *P. amurense*.

singlet이 나타났고, ¹³C-NMR spectrum도 56.4, 57.2, 57.8 ppm에서 3개의 methoxy carbon spectrum이 확인되었으며, 115.7 ppm (C-4)의 carbon spectrum은 palmitine의 112.1 ppm (C-4)보다 down shift되어 나타나므로 C-3 위치에 hydroxy기가 치환되어 있는 것으로 추정하였다. 이상의 결과로 보아 Virinder 등[1997]과 Ying 등[2005]이 보고한 문헌의 spectrum [¹H-NMR: 4.12 ppm (C-2 OCH₃), 4.18 ppm (C-10 OCH₃), 4.27 ppm (C-9 OCH₃), 6.95 ppm (H-4), 7.73 ppm (H-1), 8.07 ppm (H-11), 8.15 ppm (H-12), 8.84 ppm (H-13), 9.85 ppm (H-8)]과 거의 일치하여 compound A는 Jatrorrhizine으로 동정하였다.

Nitric oxide (NO) 저해활성 측정결과. 체내 염증과정에서 과량의 NO 및 Prostaglandin E2 등의 염증인자가 iNOS 및 COX-2에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능 등 다양한 생리기능을 가지고 있으며, NO의 형성은 박테리아나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[Stuehr 등, 1991; McCartney-Francis 등, 1993; Weisz 등, 1996]. 따라서 본 연구에서는 Raw264.7 cell의 NO 생성억제 정도를 측정하기 위하여 황백추출물과 Jatrorrhizine을 농도별로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정된 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비하여 2배에 가까운 200% 정도의 NO 발현을 나타내었으며, 각각의 시료는 모두 농도 의존적으로 NO 발현을 억제

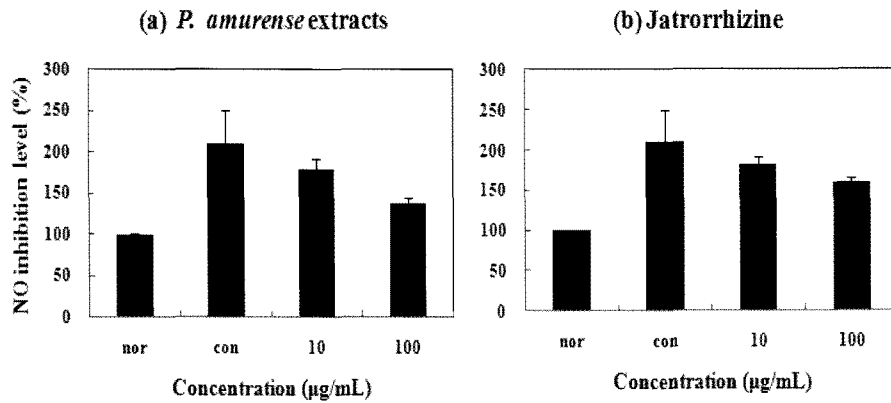


Fig. 4. Effects of *P. amurensis* extracts (a) and Jatrorrhizine (b) on the production of NO in Raw264.7 cell. Raw264.7 were treated for 24 hs.

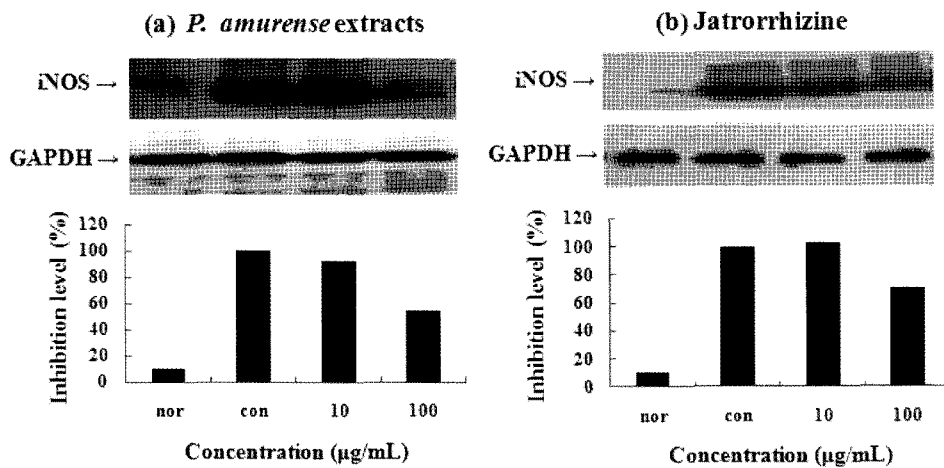


Fig. 5. Effects of *P. amurensis* extracts and Jatrorrhizine on the production of iNOS in Raw264.7 cell. Raw264.7 were treated for 24 hs.

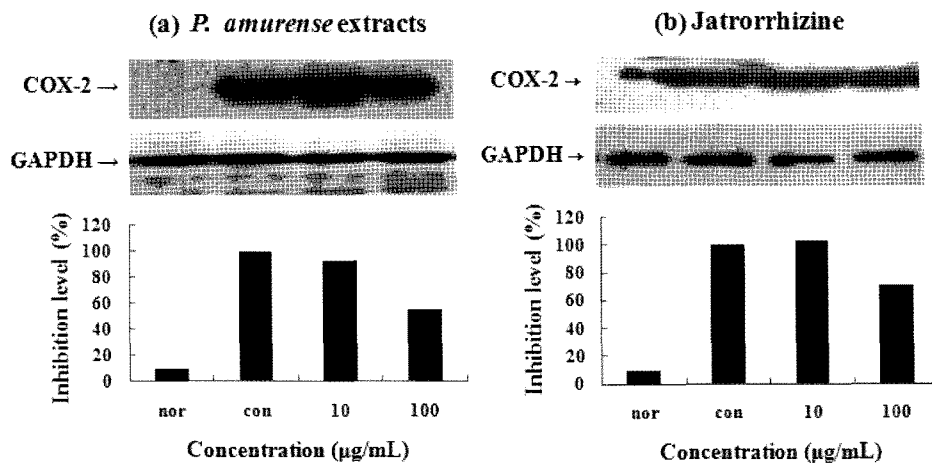


Fig. 6. Effects of *P. amurensis* extracts and Jatrorrhizine on the production of COX-2 in Raw264.7 cell. Raw264.7 were treated for 24 hs.

하였으며 100 µg/mL의 농도에서 각각 황백추출물은 70% 이상의 억제 효과를 나타내었으며, Jatrorrhizine의 경우 60%의 NO 발현을 억제함을 확인 할 수 있었다.

iNOS, COX-2 단백질 생성 저해 효과 측정 결과. NO의 생성에는 NO syntase (NOS)가 작용하게 되는데, constitutive NO syntase (cNOS)와 iNOS 중 자극에 유도된 iNOS의 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하고, 생성된 NO는 guanyl

cyclase의 활성화와 동시에 세포독성을 나타내게 된다. 따라서 LPS로 유도되어진 RAW264.7 cell에서 iNOS의 protein level의 감소를 확인함으로써 항염증 효과를 기대할 수 있으며, 또한 세포와 같은 macrophage 또한 monocyte에서 TNF-α, IL-6와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키는 요인 중 하나인 COX-2의 protein level의 감소를 이끌어 냄으로써 항염증 효과를 기대할 수 있다[Suh, 2002; Kim 등, 2004]. 또 monocyte에

서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1 β , TNF- α 와 phosphatidic acid, fibroblast growth factor 등에 의해서 증식하고 glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현 억제가 유도된다. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증 치료 target molecule이 되고 있다. 황백추출물과 Jatrorrhizine에 의한 NO 생성저해 기전을 확인하기 위해 Western blot으로 iNOS의 단백질 생성을 측정된 결과 Fig. 5, 6과 같이 황백 추출물의 경우 대조군에 비해 100 μ g/mL의 농도에서 45%의 높은 억제효과를 나타내었고, 농도 의존적으로 감소하는 효과를 관찰할 수 있었으며, 특히, 100 μ g/mL의 농도에서 53%의 억제능을 확인할 수 있었다. 또한 Jatrorrhizine의 경우 각각 100 μ g/mL의 농도에서 13, 29%의 저해효과를 나타내었다. 이는 salidroside의 iNOS 저해 활성에서 30%의 저해효과를 나타낸 결과보다 황백 추출물이 저해 효과가 높음을 확인할 수 있었다. 또 다른 염증 인자인 COX-2의 단백질 발현을 측정된 결과 황백 추출물의 경우 100 μ g/mL에서 30%, Jatrorrhizine의 경우 100 μ g/mL 농도에서 20% 미만의 저해 효과를 나타내었다. So 등[2004]과 Byun 등[2005]은 약용작물인 산더덕과 현삼 추출물에 의해 대식세포에서 iNOS와 COX-2 발현이 저해되었다고 보고하였으며, 본 연구에서도 약용작물의 일종인 황백추출물에서 iNOS와 COX-2에 대해 높은 억제 효과를 나타내는 것으로 보아 NO와 상호 작용을 가진 iNOS 및 COX-2 발현억제에 의해 LPS로 유도되어진 대식세포주인 Raw264.7 세포에서의 면역 기능과 염증반응의 효과를 기대할 수 있었다.

초 록

황백으로부터 *n*-BuOH 추출물에서 약 50%의 hyaluronidase 저해효과가 있음이 확인되었다. *n*-BuOH 분획 농축물을 Sephadex LH-20 및 MCI gel CHP-20 column chromatography로 정제한 결과 저해활성을 가지는 Jatrorrhizine을 분리, 동정하였다. 황백추출물과 Jatrorrhizine은 모두 농도 의존적으로 NO 발현을 억제하였고, 100 μ g/mL의 농도에서 60% 이상의 억제효과를 나타내었다. 황백추출물과 Jatrorrhizine의 iNOS와 COX-2의 억제력을 살펴본 결과, 100 μ g/mL의 농도에서 45% 및 29%의 저해효과를 나타내었다. 따라서 황백추출물 및 Jatrorrhizine은 LPS로 유도되어진 대식세포주인 Raw264.7 세포에서의 염증반응의 억제효과를 기대할 수 있었다.

Key words: anti-inflammatory, Jatrorrhizine, lipopolysaccharide, *Phellodendron amurense*

참고문헌

- Anfernee KT, Chi-Keung W, Xiao-Ling S, Mengsu Y, and Wang-Fun F (2005) Honokiol inhibits TNF- α -stimulated NF- κ B activation and NF- κ B-regulated gene expression through suppression of IKK activation. *Biochem Pharm* **70**, 1443-1457.
- Bunney S (1992) In *The Illustrated Encyclopedia of Herbs*. Chancellor press, London, England.
- Byun SH, Yang CH, and Kim SC (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Kor J Herb* **20**, 7-16.
- Cho YJ and An BJ (2008) Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmoksang (Morus alba L.)* in lipopolysaccharide-stimulated Raw cells. *J Kor Soc Appl Biol Chem* **51**, 44-48.
- Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Yoon SJ, and Lee KH (2005) Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum F.*). *J Kor Soc Food Sci Nutr* **34**, 790-796.
- Cho YJ, Ju IS, Kwon OJ, Chun SS, An BJ, and Kim JH (2008) Biological and antimicrobial activity of *Portulaca oleracea*. *J Kor Soc Appl Biol Chem* **51**, 49-54.
- Choi HR and Choi EH (2003) Screening of antimicrobial and antioxidative herb. *J Nat Sci* **15**, 123-131.
- Choi SI, Lee YM, and Heo TR (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity *in vitro* of traditional herbal medicine extracts. *Kor J Biotechnol Bioeng* **18**, 282-288.
- Clark AM and TI-Ferally FS (1981) Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora L.* *J Pharm Sci* **70**, 951-952.
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239-249.
- Gross SS and Wolin MS (1995) Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* **57**, 737-769.
- Ham SS, Hong JK, and Lee JH (1997) Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J Food Sci Nutr* **2**, 155-161.
- Hubue G, Wray V, and Nahrstedt A (1999) Flavonol Oligosaccharides from the Seeds of *Aesculus Hippocastanum*. *Planta Med* **65**, 638-640.
- Iwona M, Barbara M, Violetta RS, Romuald M, Zbigniew S, Maciej K, and Stefania GK (2006) Proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, and TNF- α) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Immunol Lett* **102**, 79-82.
- Kim SC, Jung YS, Lee JR, Kim YW, Byun BH, Kwon TK, Suh SI, Byun SH, and Kwon YK (2004) Inhibition effect of *Phellinus igniarius* water extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Kor J Ori Phy Pathol* **18**, 880-886.
- Kroncke KD, Fehsel K, and Kolb-Bachofen V (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* **113**, 147-156.
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, and Wahl SM (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* **178**, 749-754.
- Moon TC, Park JO, Chung KW, Son KH, Kim HP, Kang SS, and Chang HW (1999) Anti-inflammatory activity of the flavonoid components of *Lonicera japonica*. *Yakhak Hoeji* **43**, 117-123.
- Naoko K, Satsuki K, and Shinichi W (2005) IL-17 suppresses TNF- α -induced CCL27 production through induction of COX-2 in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 1144-1150.
- Nirupama S, Anil KS, Battu A, Sangita M, Sudip G, and Nasreen ZE (2005) Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Comm* **334**, 1092-1101.
- Oshima H and Bartsch H (1994) Chronic infections and inflammatory

- processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* **305**, 253-264.
- Reissig JL, Storminger JL, and Leloir LF (1995) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J Biol Chem* **271**, 959-966.
- So MS, Lee JS, and Yi SY (2004) Inhibition of nitric oxide and cytokines in Macrophages by *Codonopsis lanceolata*. *Kor J Food Sci Technol* **36**, 986-990.
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Acta* **1411**, 217-230.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, and Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 7773-7777.
- Suh YJ (2002) Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A short review. *Food Chem Toxicol* **40**, 1091-1097.
- Syu-ichi K, Ai S, Ayako T, Takako H, Yu O, Mayuko U, Yutaro O, Norimichi N, and Masaaki I (2005) Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages. *Life Sciences* **25**, 1-9.
- Virinder SP, Marc EB, Bracke JP, Jesper W, Subhash CJ, Carl EO, Kirpal SB, Nawal KS, Andy C, Sunil KS, Krist'l V, Veerle VM, Sanjay KS, Ajay K, Sanjay M, Rajesh K, Vivek KR, Rajni J, and Marc MM (1997) Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics *in vitro*. *Bioorg Med Chem* **5**, 1609-1619.
- Weisz A, Cicatiello L, and Esumi H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* **316**, 209-215.
- Ying L, Wenying H, Jiaqin L, Fenling S, Zhide H, and Xingguo C (2005) Binding of the bioactive component Jatrorrhizine to human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**, 15-21.