

약용식물자원 추출물의 항염증활성

이승은^{*†} · 이정훈^{*} · 김진경^{**} · 김금숙^{*} · 김영옥^{*} · 서진숙^{***} · 최재훈^{*} · 이은숙^{*} · 노형준^{*} · 김승유^{*}

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **대구가톨릭대학교 의생명과학과, ***(주)한일양행 중앙연구소

Anti-inflammatory Activity of Medicinal Plant Extracts

Seung Eun Lee^{*†}, Jeong Hoon Lee^{*}, Jin Kyung Kim^{**}, Geum Sook Kim^{*}, Young Ok Kim^{*}, Jin Sook Soe^{***}, Je Hun Choi^{*}, Eun Suk Lee^{*}, Hyung Jun Noh^{*} and Seung Yu Kim^{*}

^{*}Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumsung 369-873, Korea.

^{**}Department of Biomedical Science Catholic University, Gyeongsan 712-702, Korea.

^{***}Research Center of Hanilyanghang Co. Ltd, Anseong 456-825, Korea.

ABSTRACT : The study was conducted to investigate candidate materials as anti-inflammation agent from plant resources. Activities of 33 plant parts extracts with the final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were evaluated on the several inflammation-related markers such as the release of proinflammatoty cytokine [tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) & interleukin-6 (IL-6)], nitric oxide (NO), the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and inhibitor of nuclear factor kappa-B alpha (Ik-B α) in lipopolysaccharide (LPS)-treated RAW 264.7 cells. The extracts in the final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were also screened on peroxynitrite (ONOO $^-$) scavenging activity. Eleven extracts selected from the screening assay were verified on the inhibition activity on peroxynitrite and total reactive species oxygen (ROS) in the several concentrations. As results, *Alpinia officinarum* Hance (rhizome), *Inula britannica* var. *chinensis* Regel (flower), *Ulmus arvifolia* Jacq (trunk peel) and *Aster scaber* Thunb. (aerial part) showed comparatively potent anti-inflammatory activities *in vitro* cells or chemical level systems, and then these four plant parts should be studied on the antiinflammatory mechanism by further studies.

Key Words : Plant Extracts, Inflammation, Cytokine

서 언

근래에 이르러 건강과 장수에 대한 관심증가로 인해 소비자들의 건강기능성 소재나 제품에 대한 수요 많아지고 있으며, 이는 건강기능성제품 시장의 규모 확대 등으로 이어지고 있어 연구자 및 산업계에서는 천연자원으로부터 새로운 기능성 소재를 발굴하려는 연구가 활발하다. 연구가 이루어지고 있는 기능성분야도 매우 다양화되고 있는 추세인데, 그 중 염증으로 인하여 생길 수 있는 질병을 파악하고 이를 예방하거나 치료하는 데 목적을 둔 항염증효능 소재 발굴 연구도 한 부분을 차지하고 있다.

염증은 생체 혹은 조직에 물리적 자극이나 화학적 물질, 세균감염 등의 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복재생하려는 복구기전으로서 자극이 가해지면 국소적으로 염증성 성분이 증가되면서 염증이 유발 (Jeoung *et al.*, 2009)되며, 염증반응이 만성화되면 류마티스 관절염, 동맥

경화증, 위염, 천식 등의 염증성질환을 유발할 수 있다 (Kaplanski *et al.*, 2003).

이러한 염증반응에는 cytokines, prostagrandin E2 (PGE2), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있는 테 특히, 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 nitric oxide (NO)와 PGE2를 생성하여 염증을 일으킨다 (Lee *et al.*, 2007; Nishida *et al.*, 2007).

본 연구에서는 약용작물로 빈번하게 활용되거나 약용으로 이용될 수 있는 식물자원들 중에서 문헌 및 특허검색을 통해 연구 및 실용화가 미흡한 것들을 선발하여 항염증활성에 대한 활성을 평가하므로서 향후 염증과 관련된 질환의 예방 및 치료제로의 활용 가능성을 알아보고자 하였는 바, 이를 위해 약

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5586 (E-mail) lse1003@korea.kr

Received 2011 September 3 / 1st Revised 2011 May 31 / 2nd Revised 2011 June 22 / Accepted 2011 June 26

Table 1. The conditions of extraction from the plant parts.

Sample No.	Scientific name	Used part	Extract condition [†]	Sample No.	Scientific name	Used part	Extract condition
1	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2001)	whole plant	3	18	<i>Gossy whole nanking Meyen</i>	seed	2
2	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2004)	whole plant	2	19	<i>Rumex acetosa</i> L.	aerial part	2
3	<i>Rosa laevigata</i> Michx	fruit	3	20	<i>Rumex acetosa</i> L.	root	2
4	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	rhizome	3	21	<i>Rumex acetocella</i> L.	whole plant	2
5	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	fruit peel	3	22	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (LED.) R. Knuth.	aerial part	2
6	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i> Regel flower		1	23	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	aerial part	2
7	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	fruit	1	24	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	root	2
8	<i>Viola mandshurica</i> W. Becker	aerial part	1	25	<i>Aster scaber</i> Thunb.	aerial part	2
9	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	stem	1	26	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	root	1
10	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	leaf	1	27	<i>Valeriana officinalis</i> var. <i>latifolia</i> Miq.	root	2
11	<i>Cedrela sinensis</i> A. Juss	leaf	1	28	<i>Quercus acutissima</i> Carruth.	trunk peel	2
12	<i>Torilis japonica</i> D. C.	fruit	1	29	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	aerial part	2
13	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	trunk peel	4	30	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	root	2
14	<i>Gastrodia elata</i> Blume	root	1	31	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyl.	whole plant	2
15	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	root	1	32	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> (Benth.) Briq.	whole plant	2
16	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	root peel	4	33	<i>Chamaecrista nomame</i> (Siebold) H.Ohashi	whole plant	2
17	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai	whole plant	2				

[†]Extract condition 1 means that sample was extracted in refluxing apparatus with methanol at 74°C; condition 2 means that sample was extracted in accelerated solvent extractor (ASE300, DIONEX, USA) with methanol at 50°C; condition 3 means that sample was extracted in refluxing apparatus with 70% methanol at 74°C; condition 4 means that sample was extracted in refluxing apparatus with 80% ethanol at 85°C. The solvents in the samples was evaporated in vacuum condition. All of the extracts were stored in -27°C before using.

용식물 추출물들이 lipopolysaccharide (LPS)로 처리한 RAW 264.7 cell에서 proinflammatory cytokine^[1] TNF- α , interleukin-6 (IL-6)의 생성 그리고 iNOS, COX-2, inhibitor of nuclear factor kappa-B alpha (Ik-B α)의 발현에 미치는 영향과 peroxynitrite 생성에 대한 저해활성 등을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 추출물 조제

실험에 사용된 *Agastache rugosa* O. Kuntz (aerial part) 등 33점의 식물추출물은 농촌진흥청 식물자원추출물은행 (PJ007083201003 & PJ007437201003)에서 분양받아 사용하였다 (Table 1).

2. 시약 및 기기

3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide

(MTT), lipopolysaccharide (LPS), 2',7-dichlorofluorescence diacetate (DCFDA), 3-morpholinosyndnonimine hydrochloride (SIN-1) 및 tannic acid는 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 10% fetal bovine serum (10% FBS)는 Invitrogen (USA)의 제품을 사용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 eBioscience (San Diego, LA USA)의 것을, Ik-B α , iNOS, COX-2에 대한 특이 항체는 horseradish peroxidase (HRP) attached secondary antibody는 Cell Signaling Technology (USA)의 것을 사용하였다. 또한, Griess reagent system과 Cell Titer 96[®] AQ_{ueous} One Solution Assay는 Promega (USA)의 것을 사용하였고 그 외의 분석시약은 특급을 사용하였다. 실험에 사용된 기기로서 peroxynitrite 소거능과 total reactive oxygen species (ROS) 분석은 fluorescence microplate reader (Synergy HT, BIO-TEK, USA)를 이용하였고, NO 생성저해능, 세포증식능 및 cytokine

분비량측정은 분광광도계 겸용 효소면역분석기 (SpectraMaxM2, Molecular Device, USA)로 분석하였으며, western blot의 결과는 실시간화학 발광 및 형광영상장치 (Chemi-smart 2100, Vilber Lourmat, Italy)를 사용하여 측정하였다.

3. 실험물질의 제조

항염증인자에 대한 식물추출물의 활성을 분석하기 위한 1차 검색 실험에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 각 식물자원 추출물을 5 mg/ml의 농도로 용해하여 stock solution을 만든 후 반응계 중 시료의 최종농도가 5 µg/ml이 되도록 가하였으며 선발된 11개의 식물추출물은 여러 농도로 조제한 후 peroxynitrite 및 ROS 소거능 분석을 위한 추가실험에 사용하였다.

4. 세포주 및 세포배양

항염증효과 분석에는 대식세포주인 murine mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양은 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 그리고 100 mg/ml streptomycin을 첨가한 것을 사용하였으며, 배양기를 이용하여 37°C와 5% CO₂를 유지하였고 시험과정의 모든 세포는 70~80%의 confluence에서 실험하였고, 10 passages 이하의 세포만을 사용하였다.

5. Cell proliferation 분석

식물자원 추출물의 cell proliferation에 대한 영향 분석을 위해 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 3 × 10⁴/well이 되도록 분주하고 16시간 배양하였다. 각 시험물질을 최종농도 5 µg/ml가 되게 처리하여 24시간 동안 배양한 후 Cell Titer 96®AQ_{ueous} One Solution Assay를 이용하여 세포독성을 측정하였다.

6. NO 생성 저해효과

식물자원 추출물의 NO 생성 저해정도의 분석은 Lee *et al.* (2007)의 방법에 따라 RAW264.7 세포를 48-well plate에 5 × 10⁵/well이 되도록 분주하고 16시간 배양하였다. 각 시험물질의 최종농도가 5 µg/ml이 되게 가하고 100 ng/ml 농도의 LPS로 동시에 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 18시간 배양하였다. 배양 후, 세포상층액을 얻어, 세포상층액 중으로 분비한 nitrite양을 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다.

7. TNF-α 및 IL-6 의 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plate에 5 × 10⁵/well이 되도록 분주하고 16시간 배양하고 각 시험물질 (5 µg/ml)과 100 ng/ml 농도의 LPS로 동시에 처리 또는 LPS를 단독 처리하여 4시간

(TNF-α) 혹은 24시간 (IL-6) 배양하였다. 배양 후 상층액을 얻어, 세포 상층액 중으로 분비한 TNF-α와 IL-6를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 처리한 후 분광광도계 겸용 효소면역분석기로 분석하였으며 그 결과는 LPS 처리군 (염증 유발군)의 결과에 대한 시료처리에 의해 나타나는 수치를 저해율 (%)로 환산하여 LPS 처리군에 비교한 각 시험물질의 효과를 나타내었다.

8. Iκ-Bα, iNOS 및 COX-2 단백질 발현양 측정

RAW 264.7 세포를 6-well plate에 2 × 10⁶/well이 되도록 분주하여 16시간 배양하고 Iκ-Bα의 분해정도를 관찰하기 위해서는 각 시험물질 5 µg/ml을 첨가하여 2시간 전배양한 후, LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하여 20분간 배양하였다. iNOS 및 COX-2의 발현정도를 관찰하기 위해서는 LPS (100 ng/ml)와 각 시험물질을 (5 µg/ml)을 동시에 처리한 후 18시간 배양하였다. 배양 후 세포는 냉각 PBS로 씻은 후, 세포를 100 ml의 세포 용해액 (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 25 mM b-glycerophosphate, 50 mM NaF, 100 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/ml aprotinin)에 넣어, 4°C에서 20분간 방치한 후 원심분리하여 단백질을 얻었다. 얻어진 단백질은 7% (iNOS)와 10% (Iκ-Bα, COX-2) SDS-아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동한 후, nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 membrane을 5% 탈지 분유액이 포함된 TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 1시간 실온에서 배양하였다. 그 후, Iκ-Bα, iNOS와 COX-2의 specific antibody를 이용하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. iNOS와 COX-2 발현 양은 horseradish peroxidase (HRP)가 붙어 있는 secondary antibody로 실온에서 2시간 반응하고 chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 처리한 후 실시간화학 발광 및 형광영상장치 (Chemi-smart 2100, Vilber Lourmat, Italy)를 사용하여 이미지를 분석하였다.

9. Peroxynitrite 소거능 분석

96-well microplate에 추출물이 최종농도가 10 µg/ml이 되게 가하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 mM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 mM dihydrorhodamine 123을 함유하는 sodium phosphate 원층액 (pH 7.4)를 가하였다. 그리고 50 mM의 3-morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1)를 처리한 후 fluorescence microplate reader (Synergy HT, BIO-TEK, USA)로 excitation 500 nm 및 emission 536 nm에서 측정하여 peroxynitrite의 제거능을 측정하였으며 결과는 SIN-1을 처리한 대조군의 결과에 대한 시료처리에 의해 나타난다.

나는 수치를 저해율 (%)로 환산하여 나타내었다. 또한, 1차 선발한 11개의 추출물에 대해서 1.25, 2.5, 5.0 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 peroxynitrite 소거능을 추가로 분석하였다 (Kooy *et al.*, 1994).

10. Total reactive oxygen species (ROS) 소거능 분석

선발된 11개의 시료에 대해 LeBel 등 (1992)의 방법에 따라 다음과 같이 total ROS 소거능을 측정하였다. 먼저 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20°C 에 stock solution으로 보관하면

서 실험 시 DCFDA와 esterase를 혼합하여 조제된 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액 (최종농도 0.125 mM DCFDA, 6 U/ml esterase) 2 μl 를 취해 SIN-1 용액 (최종농도 50 mM) 190 μl 및 시료 10 μl (최종농도 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함께 가하여 5분간 상온의 암소에서 교반한 후 interval time 5분, running time 30분으로 수차례 fluorescence (excitation wavelength 485 nm/emission wavelength 530 nm)를 측정하여 분당 ROS 발생량을 계산하여 IC₅₀으로 나타내었다.

Table 2. Cytotoxicity and inhibition of LPS-induced nitrite release in RAW264.7 cells by the 33 medical plant parts and scavenging activity on peroxynitrite.

Sample No.	Scientific name	Used part	Proliferation (%)	Inhibition rate	
				NO production (%)	Peroxynitrite (%)
1	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2001)	whole plant	107.1 \pm 6.1	24.2 \pm 3.8***	59.0 \pm 7.7***†
2	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2004)	whole plant	108.6 \pm 0.7	22.2 \pm 3.3***	71.9 \pm 0.4***
3	<i>Rosa laevigata</i> Michx	fruit	98.5 \pm 5.8	25.8 \pm 2.5***	62.4 \pm 0.9***
4	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	rhizome	100.6 \pm 2.1	34.5 \pm 4.5***	83.7 \pm 0.8***
5	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	fruit peel	100.5 \pm 2.9	24.4 \pm 4.2***	31.1 \pm 1.0***
6	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i> Regel	flower	100.1 \pm 4.0	45.3 \pm 4.1***	70.0 \pm 0.7***
7	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	fruit	106.7 \pm 3.4	20.9 \pm 5.5***	45.8 \pm 0.9***
8	<i>Viola mandshurica</i> W. Becker	aerial part	99.8 \pm 2.4	19.2 \pm 3.2**	44.0 \pm 1.0***
9	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	stem	98.7 \pm 3.1	23.0 \pm 4.4***	93.2 \pm 0.3***
10	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	leaf	101.3 \pm 3.0	38.8 \pm 1.6***	93.4 \pm 0.2***
11	<i>Cedrela sinensis</i> A. Juss	leaf	98.5 \pm 4.0	22.0 \pm 2.6***	93.5 \pm 0.8***
12	<i>Torilis japonica</i> D. C.	fruit	99.6 \pm 4.4	20.9 \pm 2.0***	41.9 \pm 2.2***
13	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	trunk peel	102.5 \pm 5.5	18.3 \pm 1.9***	92.1 \pm 0.6***
14	<i>Gastrodia elata</i> Blume	root	103.1 \pm 5.2	19.5 \pm 3.7***	4.9 \pm 2.9
15	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	root	96.9 \pm 4.4	9.1 \pm 3.0	50.43 \pm 1.8***
16	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	root peel	97.0 \pm 5.6	18.9 \pm 3.7	95.5 \pm 0.5***
17	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai	whole plant	94.3 \pm 1.9	11.3 \pm 1.4	55.2 \pm 1.8***
18	<i>Gossypium nanking</i> Meyen	seed	93.4 \pm 6.3	25.0 \pm 3.5***	79.1 \pm 1.5***
19	<i>Rumex acetosa</i> L.	aerial part	95.3 \pm 5.0	18.0 \pm 4.6	2.6 \pm 2.6
20	<i>Rumex acetosa</i> L.	root	98.3 \pm 4.4	18.8 \pm 1.8	97.0 \pm 0.7***
21	<i>Rumex acetocella</i> L.	whole plant	100.3 \pm 4.9	18.8 \pm 1.5	92.4 \pm 2.1***
22	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (LED.) R. Knuth.	aerial part	101.3 \pm 5.2	24.6 \pm 5.5***	88.5 \pm 0.4***
23	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	aerial part	95.5 \pm 5.2	12.4 \pm 4.0	23.8 \pm 3.2***
24	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	root	99.1 \pm 2.0	28.5 \pm 0.9***	67.5 \pm 2.2***
25	<i>Aster scaber</i> Thunb.	aerial part	101.8 \pm 22.8	26.5 \pm 2.8**	91.8 \pm 0.4***
26	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	root	100.4 \pm 2.1	2.2 \pm 5.9	83.0 \pm 2.1***
27	<i>Valeriana officinalis</i> var. <i>latifolia</i> Miq.	root	100.9 \pm 5.6	4.4 \pm 2.7	83.1 \pm 3.8***
28	<i>Quercus acutissima</i> Carruth.	trunk peel	99.1 \pm 2.7	6.0 \pm 1.1	99.2 \pm 0.4***
29	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	aerial part	97.3 \pm 4.3	-0.3 \pm 2.1	83.4 \pm 0.4***
30	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	root	95.7 \pm 4.0	1.3 \pm 2.0	64.5 \pm 0.5***
31	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyl.	whole plant	99.2 \pm 2.0	2.9 \pm 1.1	78.3 \pm 0.5***
32	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> (Benth.) Briq.	whole plant	101.7 \pm 4.2	0.4 \pm 2.9	87.0 \pm 0.6***
33	<i>Chamaecrista nomame</i> (Siebold) H.Ohashi	whole plant	98.5 \pm 4.2	0.8 \pm 4.6	79.8 \pm 0.5***
trolox					

[†]Symbol indicate significance in OD value. Significantly different from LPS treated cells; * p $<$ 0.05, ** p $<$ 0.01 and *** p $<$ 0.001.

11. 통계분석

Cell proliferation, NO 생성에 대한 저해능, TNF- α 및 IL-6 분비량 측정결과는 LPS 처리군 (염증유발군)의 결과에 대한 각 시험물질의 효과를 백분율로 나타내었으며, 각 결과는 means \pm SD로 나타 내었고 자료의 유의성은 GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA,

USA)를 이용하여 ANOVA-test를 통해 검정하였다. 또한, I κ -B α , iNOS 및 COX-2 단백질 발현양의 분석결과는 LPS 처리군 (염증유발군)의 결과를 1 fold로 환산하여 LPS 처리군에 비교한 각 시험물질의 효과를 fold로 나타낸 후 백분율로서 나타내었다.

Table 3. Inhibition of TNF- α , IL-6 release and degradation of I κ -B α , expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells by the plant part extracts.

Sample No.	Scientific name	Used part	Inhibition rate (%)		Fold intensity to control (%)		
			TNF- α release	IL-6 release	I κ -B α expression	iNOS expression	COX-2 expression
1	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2001)	whole plant	-0.8 \pm 0.8	35.1 \pm 8.5***†	18.51‡	107.9§	112.0§
2	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntz (2004)	whole plant	4.5 \pm 4.1	23.3 \pm 8.6	24.42	106.6	108.4
3	<i>Rosa laevigata</i> Michx	fruit	-1.1 \pm 1.7	23.6 \pm 2.8	16.20	97.4	89.2
4	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	rhizome	-5.6 \pm 4.1	36.8 \pm 6.7***	34.19	113.2	141.0
5	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	fruit peel	5.0 \pm 8.5	21.9 \pm 7.5	53.73	110.5	125.3
6	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i> Regel	flower	-1.2 \pm 5.2	37.8 \pm 5.0***	25.71	101.3	141.0
7	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	fruit	5.5 \pm 3.1	19.0 \pm 8.6	19.54	165.8	163.9
8	<i>Viola mandshurica</i> W. Becker	aerial part	8.2 \pm 4.4	33.8 \pm 12.7***	-4.49	81.1	118.1
9	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	stem	15.9 \pm 4.6	28.0 \pm 6.9	-1.25	87.8	128.9
10	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	leaf	21.7 \pm 1.7**	22.2 \pm 7.5	-4.99	85.1	133.7
11	<i>Cedrela sinensis</i> A. Juss	leaf	7.5 \pm 3.0	10.2 \pm 3.3	-2.74	56.8	110.8
12	<i>Torilis japonica</i> D. C.	fruit	16.2 \pm 1.8	28.6 \pm 15.4*	-10.47	62.2	150.6
13	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	trunk peel	12.8 \pm 6.9	6.2 \pm 17.8	2.79	47.3	144.6
14	<i>Gastrodia elata</i> Blume	root	-2.5 \pm 8.3	28.0 \pm 13.0*	-2.00	29.7	157.8
15	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	root	16.3 \pm 3.5	30.5 \pm 5.5	0.18	77.9	104.4
16	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq.	root peel	9.7 \pm 8.1	6.3 \pm 2.9	1.75	92.2	117.8
17	<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai	whole plant	7.2 \pm 0.6	-8.2 \pm 8.7	2.63	92.2	118.9
18	<i>Gossypium nanking</i> Meyen	seed	27.9 \pm 3.4***	33.9 \pm 6.1	1.75	96.1	110.0
19	<i>Rumex acetosa</i> L.	aerial part	17.3 \pm 2.4	26.4 \pm 13.9	2.46	77.9	118.9
20	<i>Rumex acetosa</i> L.	root	10.7 \pm 1.2	9.8 \pm 14.8	4.21	88.3	131.1
21	<i>Rumex acetocella</i> L.	whole plant	12.9 \pm 10.7	21.9 \pm 6.8	3.68	81.8	125.6
22	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (LED.) R. Knuth.	aerial part	42.5 \pm 50.3	22.0 \pm 7.6	5.25	125.0	141.8
23	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	aerial part	-1.2 \pm 4.6	21.1 \pm 5.7	2.79	155.6	129.7
24	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	root	12.6 \pm 3.2	26.1 \pm 6.5	1.48	127.8	89.0
25	<i>Aster scaber</i> Thunb.	aerial part	11.6 \pm 0.9	33.0 \pm 5.7	2.30	131.9	91.2
26	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	root	-0.1 \pm 4.8	-2.9 \pm 11.2	2.22	305.6	289.0
27	<i>Valeriana officinalis</i> var. <i>latifolia</i> Miq.	root	-6.2 \pm 6.5	7.8 \pm 17.0	-4.07	248.6	239.6
28	<i>Quercus acutissima</i> Carruth.	trunk peel	-2.0 \pm 3.9	4.6 \pm 18.3	-1.11	313.9	318.7
29	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	aerial part	-5.4 \pm 4.4	-10.8 \pm 13.0	0.37	381.9	354.9
30	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	root	-13.5 \pm 2.4	-37.0 \pm 10.3	0.00	595.8	323.1
31	<i>Elsholtzia ciliata</i> (Thunb.) Hyl.	whole plant	-10.7 \pm 2.2	-3.3 \pm 4.7	2.96	412.5	437.4
32	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> (Benth.) Briq.	whole plant	1.4 \pm 0.1	-3.4 \pm 4.6	0.37	518.1	419.8
33	<i>Chamaecrista nomame</i> (Siebold) H.Ohashi	whole plant	3.4 \pm 0.7	22.7 \pm 16.5	0.61	77.6	96.8

[†]Symbol indicate significance in OD value. Significantly different from LPS treated cells; * p $<$ 0.05, ** p $<$ 0.01, and *** p $<$ 0.001.

[‡]Data indicate the amount of the protein compared with the quantity of DMSO treatment alone

[§]Data indicate the amount of the protein compared with the quantity of LPS treatment alone

결과 및 고찰

1. Cell proliferation

식물자원 추출물의 생쥐 대식세포 RAW264.7에 대한 cell viability는 모든 시료에서 90% 이상의 높은 수치를 나타내었는데 특히, 2004년 채취된 *Agastache rugosa* O. Kuntz의 전초와 *Crataegus pinnatifida* Bunge의 열매는 각각 $108.6 \pm 0.7\%$ 및 $106.7 \pm 3.4\%$ 의 비교적 높은 수치를 나타내었다 (Table 2).

2. NO 생성 저해효과

실험된 33점의 식물 중에서 14개의 시료가 20% 이상의 NO 생성저해능을 나타내었고 그 외의 시료는 $19.5 \pm 3.7\%$ 이하의 저해능을 나타내었다. 특히, *Inula britannica* var. *chinensis* Regel의 꽃, *Agrimonia pilosa* L. var. *japonica* Nakai의 잎, *Alpinia officinarum* Hance의 근경은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의

비교적 낮은 농도에서도 각각 $45.3 \pm 4.1\%$, $38.8 \pm 1.6\%$, $34.5 \pm 4.5\%$ 를 나타내 이들 시료는 NO의 생성을 비교적 효과적으로 저해하는 것을 알 수 있었다 (Table 2). Nitric oxide는 감염부위에서 면역활성화된 대식세포에 의해 생성되는 것으로서 다양한 조직에서 신경전달, 혈관확장 및 면역조절에서 중요한 역할을 담당 (Soe et al., 2009) 하고 있어 이와 같이 높은 NO 생성저해활성을 나타내는 추출물들은 감염반응과 질환의 치료 및 예방을 위한 소재로의 활용가능성을 제시하는 결과라고 사료된다.

3. Peroxynitrite 소거능

식물자원 추출물의 peroxy nitrite에 대한 소거능을 분석한 결과, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비교적 낮은 농도에서 *Quercus acutissima* Carruth.의 수피 ($99.2 \pm 0.4\%$), *Rumex acetosa* L.의 뿌리 ($97.0 \pm 0.7\%$)와 *Ulmus arvifolia* Jacq의 근피 ($95.5 \pm 0.5\%$)와 수피 ($92.1 \pm 0.6\%$), *Cedrela sinensis* A. Juss의 잎 ($93.5 \pm$

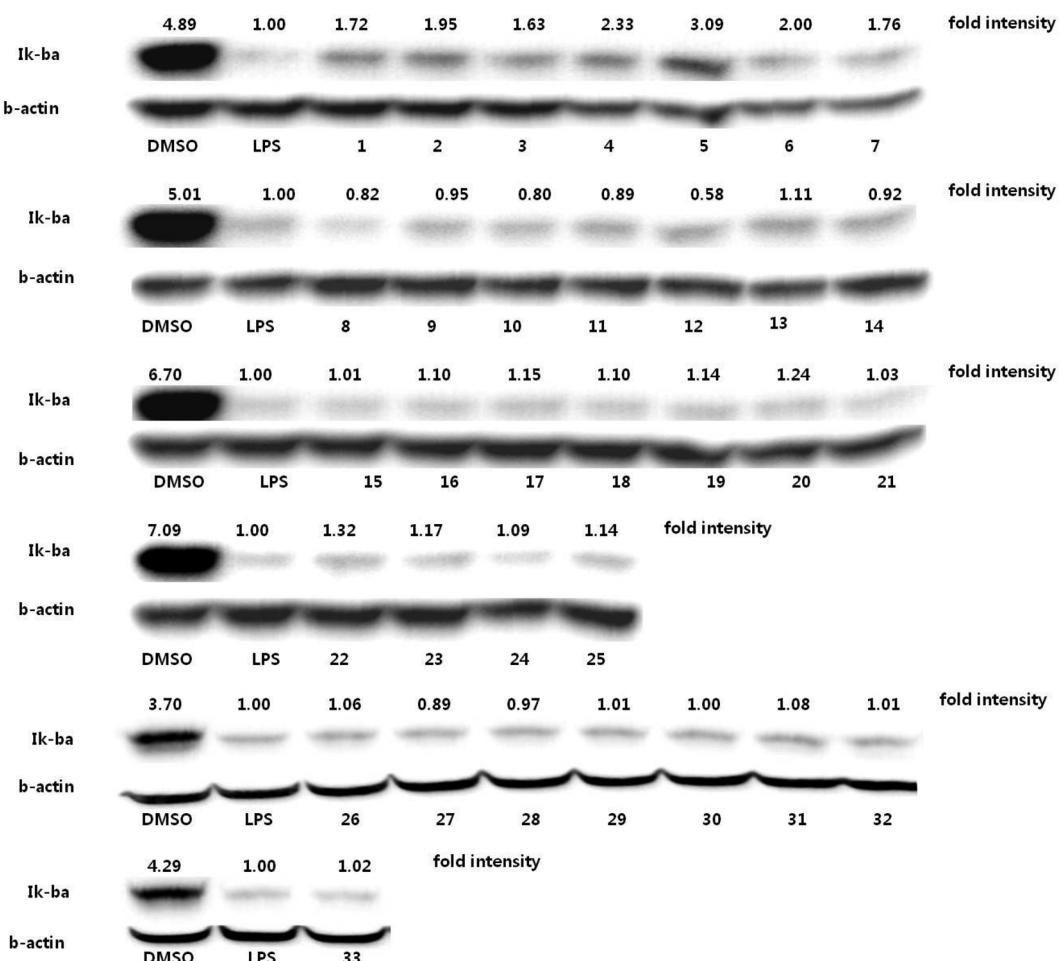


Fig. 1. Inhibitory effects of 33 medicinal plant extracts on expression of Ik-B α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medicinal plant extracts in the presence or absence of 100 ng/ml LPS for 20 min. The 30 mg of protein obtained from each cell lysates was resolved on 10% SDS-PAGE. The expression of Ik-B α was measured by densitometry.

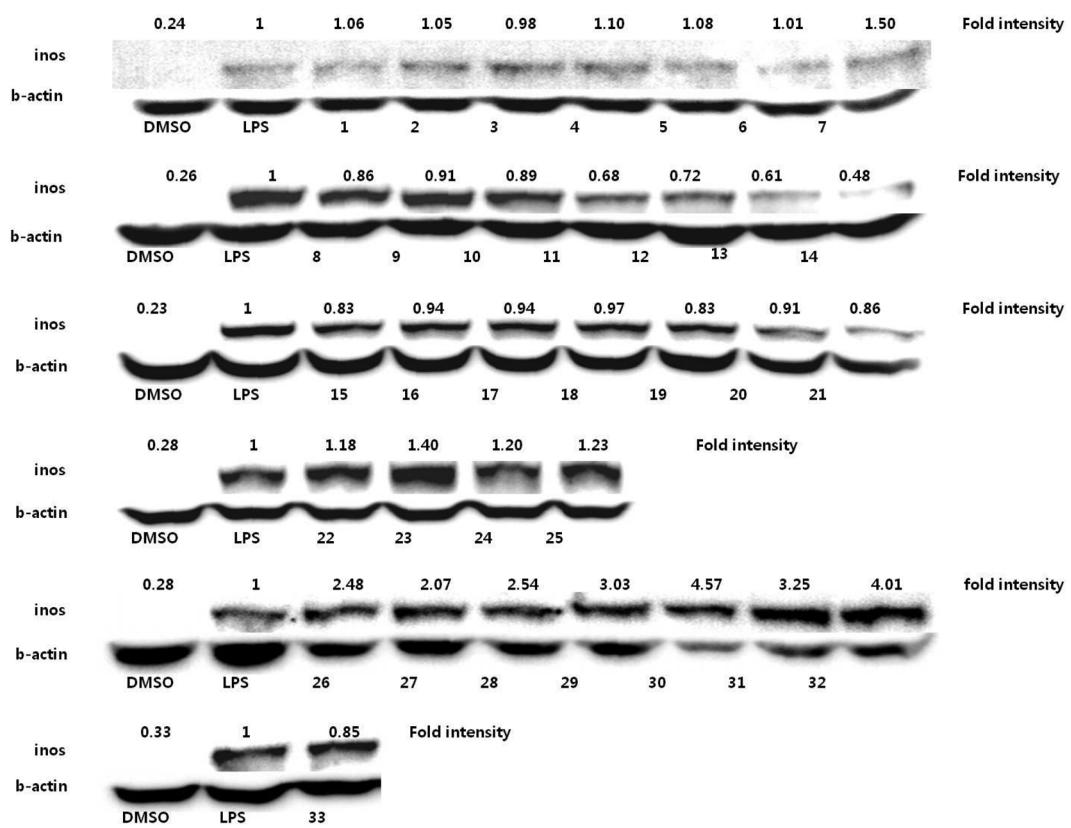


Fig. 2. Inhibitory effects of 33 medicinal plant extracts on expression of iNOS in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medicinal plant extracts in the presence or absence of 100 ng/ml LPS for 18 hr. The 30 μg of protein obtained from each cell lysates was resolved on 8% SDS-PAGE. The expression of iNOS was measured by densitometry.

0.8%), *Agrimonia pilosa* L. var. *japonica* Nakai의 잎 ($93.4 \pm 0.2\%$)과 줄기 ($93.2 \pm 0.3\%$), *Rumex acetocella* L.의 전초 ($92.4 \pm 2.1\%$) 및 *Aster scaber* Thunb.의 지상부 ($91.8 \pm 0.4\%$) 등 9개의 시료가 90% 이상의 우수한 활성을 나타내었다 (Table 2). 특히, 11개의 우수한 활성을 보인 시료에 대해 1.25~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서의 peroxynitrite 소거능을 살펴본 결과, *Aster scaber* Thunb.의 지상부가 가장 효과적인 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

4. TNF- α 및 IL-6 분비 저해능

약용식물 추출물의 처리가 마우스 대식세포에서 LPS 처리에 의한 염증반응으로 유도된 TNF- α 의 분비에 미치는 영향을 살펴본 결과, *Gossypium nanking* Meyen의 종자, *Agrimonia pilosa* L. var. *japonica* Nakai의 잎이 각각 $27.9 \pm 3.4\%$ 및 $21.7 \pm 1.7\%$ 로 효과적으로 염증반응으로 유도되는 TNF- α 의 분비를 억제함을 관찰할 수 있었다 (Table 3). 또한, IL-6의 분비에 미치는 영향은 *Inula britannica* var. *chinensis* Regel의 꽃 ($37.8 \pm 5.0\%$), *Alpinia officinarum* Hance의 근경 ($36.8 \pm 6.7\%$), *Gossypium nanking* Meyen의 종자 ($33.9 \pm 6.1\%$), *Viola*

mandshurica W. Beker의 지상부 ($33.8 \pm 12.7\%$), *Aster scaber* Thunb.의 지상부 ($33.0 \pm 5.7\%$), *Ligusticum chuanxiong* Hort.의 뿌리 ($30.5 \pm 5.5\%$) 등 6개의 시료가 30% 이상의 저해활성을 나타내 염증반응으로 유도되는 IL-6의 분비를 억제함을 관찰할 수 있었다 (Table 3).

5. I κ -B α , iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

약용식물 추출물의 처리가 마우스 대식세포에서 LPS처리에 의한 염증반응으로 유도된 I κ -B α 의 분해에 미치는 33가지 약용식물 추출물의 영향을 조사한 결과, *Alpinia officinarum* Hance의 근경과 *Citrus unshiu* Markovich의 과피가 각각 34.9% 및 53.7%로 I κ -B α 의 분해를 억제하는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 3, Fig. 1). 그리고, iNOS발현에 대해서는 *Cedrela sinensis* A. Juss의 잎, *Ulmus arvifolia* Jacq의 수피, *Gastrodia elata* Blume의 뿌리가 대조에 비해 각각 56.8%, 47.3% 및 29.7%의 발현을 나타내 염증반응으로 유도되는 iNOS의 발현을 효과적으로 억제하였다 (Table 3, Fig. 2). 또한, 마우스 대식세포에 LPS를 처리하여 유도되는 COX-2의 발현에 미치는 33가지 약용식물 추출물의 영향을 조사한 결

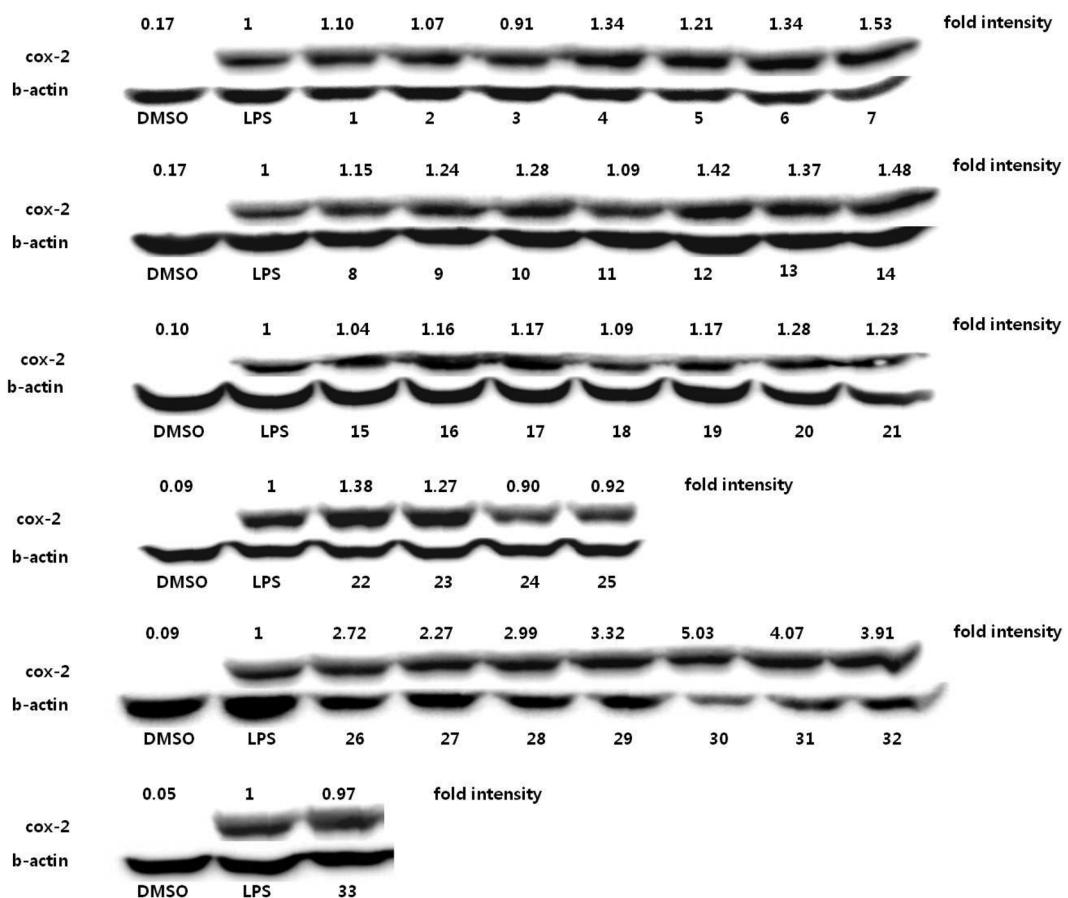


Fig. 3. Inhibitory effects of 33 medicinal plant extracts on expression of COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of medicinal plant extracts in the presence or absence of 100 ng/mL LPS for 18 hr. The 30 μg of protein obtained from each cell lysates was resolved on 8% SDS-PAGE. The expression of COX-2 was measured by densitometry.

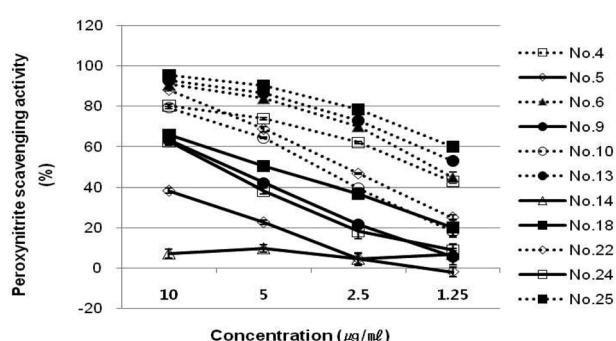


Fig. 4. Scavenging activity on peroxynitrite of the selected 11 plant part extracts. [No.4, *Alpinia officinarum* Hance (rhizome); No.5, *Citrus unshiu* Markovich (fruit peel); No.6, *Inula britannica* var. *chinensis* Regel (flower); No.9, *Agrimonia pilosa* L. var. *japonica* Nakai (stem); No.10, *Agrimonia pilosa* L. var. *japonica* Nakai (leaf); No.13, *Ulmus arvifolia* Jacq (trunk peel); No.14, *Castrodia elata* Blume (root); No.18, *Gossypium nanking* Meyen (seed); No.22, *Lysimachia vulgaris* var. *davurica* (LED.) R. Knuth. (aerial part); No.24, *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc (root); No.25, *Aster scaber* Thunb. (aerial part)].

과, *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc의 뿌리, *Aster scaber* Thunb.의 지상부가 대조의 발현량에 비하여 각각 89.0% 및 91.2% 발현되어 실험에 사용된 식물추출물 중에서는 비교적 낮은 발현을 나타내었으나 대부분의 추출물들이 염증반응으로 유도되는 COX-2의 발현에 대해 억제효과를 나타내지 못하였다 (Table 3, Fig. 3).

6. Total reactive oxygen species (ROS) 소거능

33점의 식물추출물 중에서 선발된 11점의 시료에 대해서 활성산소원으로 SIN-1이 사용된 반응계에서의 total ROS에 대한 소거활성을 살펴본 결과, Table 4에 나타낸 바와 같이 대부분의 시료들의 IC₅₀가 대조물질인 trolox의 IC₅₀ ($4.60 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$)보다는 높았으나 대체적으로 우수한 소거활성을 나타내었으며 특히, *Alpinia officinarum* Hance의 근경은 $8.55 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC₅₀을 나타냄으로써 11개의 시료 중에서 가장 좋은 활성을 보였다 (Table 4).

염증반응은 우리 몸의 감염 또는 조직의 손상을 통해 일어

Table 4. Total ROS scavenging activity of the selected 11 plant part extracts.

Sample No.	Scientific name	Used part	Scavenging activity on ROS (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)
4	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	rhizome	8.55 ± 0.01
5	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	fruit peel	119.85 ± 2.59
6	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i> Regel	flower	13.96 ± 0.12
9	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	stem	21.15 ± 0.55
10	<i>Agrimonia pilosa</i> L. var. <i>japonica</i> Nakai	leaf	15.30 ± 0.29
13	<i>Ulmus arvifolia</i> Jacq	trunk peel	14.10 ± 0.19
14	<i>Gastrodia elata</i> Blume	root	160.49 ± 10.41
18	<i>Gossypium nanking</i> Meyen	seed	20.85 ± 0.52
22	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (LED.) R. Knuth.	aerial part	16.53 ± 0.23
24	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	root	14.11 ± 0.15
25	<i>Aster scaber</i> Thunb.	aerial part	13.56 ± 0.09
Trolox			4.60 ± 0.11

나게 되며, 염증성 장질환 (inflammatory bowel disease) 및 자가면역질환 (autoimmune disease) 등의 원인이 된다 (Prava, 2011; Venkatesha *et al.*, 2011). 이러한 반응은 대식세포를 대표로 하는 다양한 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, prostaglandin, nitrite 등의 염증매개물질들을 분비하여 발생하게 된다 (Finotto *et al.*, 1994; Naven and Weissman, 1991; Owens and Grisham, 1993). Nitrite는 사이토카인의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화되어 생성되는 것으로, iNOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다 (Waddington *et al.*, 1999). iNOS는 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있으며, iNOS에 의해 증가된 nitrite는 패혈성 쇼크 (septic shock), 조직 손상, 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis) 등과 같은 질병을 유발하는 원인물질의 하나이다 (Salerno *et al.*, 2002). 프로스타글란딘은 다양한 세포로부터 COX라는 효소에 의해 생성되는 데, COX는 두 종류가 존재한다. COX-1은 대부분의 조직에서 존재하며, 프로스타글란딘 생성에 관여하고 COX-2는 성장인자, 사이토카인 등과 같은 요인에 의해 발현이 증가되어 다양한 프로스타글란дин을 생성함으로써, 염증관련 질병을 유발하는 것으로 밝혀져 있다 (Hendel and Nielsen, 1997; Vane *et al.*, 1998). 염증은 사이토카인의 네트워크와 다양한 염증인자 (inflammatory mediator)들의 유발 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정을 통해서 일어나게 되며, nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 많은 염증성 질환을 일으키는 병인으로 알려져 있는데, iNOS와 COX-2와 같은 염증인자를 전사시키고 TNF-α, IL-1β, IL-6 등 여러 염증성 사이토카인의 생성에 있어 중요한 역할을 한다. 그리고, TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 염증성 cytokine들은 활성화된 대식세포에서 주로 생산되며 선천면역과 관계되어 내피세포와 백혈구에 작용하여 미생물에 대한 초기 염증반응을 자극하고 조절한다 (Kim *et al.*, 2010). 한편, nitric oxide

(NO)는 superoxide (O_2^-)와 반응하여 peroxynitrite ($ONOO^-$) 생성을 유도하는데, 그 생성량은 병적인 상태에서 증가한다 (Beckman and Crow, 1994).

본 연구는 33가지의 약용식물 추출물이 항염증 효과를 나타내는지를 관찰하였다. 염증반응을 인위적으로 일으키기 위해 Gram 음성균의 세포벽 성분인 LPS로 RAW 264.7 세포를 자극하였고 LPS로 염증반응을 유발하면서 각 약용식물 추출물을 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종농도가 되게 처리하여, 약용식물 추출물의 항염증효과를 다양한 염증매개물질, 즉 nitrite, TNF-α, IL-6의 분비량을 측정하고, 염증반응을 매개하는 주요 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현 양, 염증반응의 핵심전인 신호전달분자인 Iκ-Bα의 분해정도를 관찰함으로 평가하였으며 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 peroxynitrite에 대한 저해활성을 분석하였다.

단일농도 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$ or $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)에서 수행한 일차검색실험결과, *Inula britannica* var. *chinensis* Regel (flower) 등 3개의 추출물이 NO 생성에 대해 45.3~34.5%의 저해활성을 나타내었고, *Quercus acutissima* Carruth. (trunk peel)를 포함하는 15개의 추출물이 80% 이상의 peroxynitrite 저해활성을 나타내었다. 또한, *Inula britannica* var. *chinensis* Regel (flower)를 비롯한 7개의 시료가 IL-6 분비를 저해하였으며 *Citrus unshiu* Markovich (fruit peel), *Alpinia officinarum* Hance (rhizome)과 *Inula britannica* var. *chinensis* Regel (flower)은 control (DMSO)에 비해 53.7~25.7%의 protein 함량을 나타내 Iκ-Bα의 분해를 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고, *Ulmus arvifolia* Jacq (trunk peel)과 *Gastrodia elata* Blume (root)는 LPS 유도된 대조군의 47.3~29.7%의 iNOS 발현 감소를 나타내었다. 이러한 1차 검색으로부터 선별된 11개 식물 추출물의 여러 농도에 대해 peroxynitrite 및 total ROS에 대한 저해활성을 추가로 살펴본 결과 peroxynitrite에 대해서는 $1.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서 *Alpinia officinarum* Hance

(rhizome) 등 4개의 시료가 40% 이상의 비교적 우수한 저해 효과를 보였으며, total ROS에 대해서는 *Alpinia officinarum* Hance (rhizome) 등 6개의 시료가 비교적 우수한 소거활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이들 결과들을 종합할 때, 33가지의 약용식물 추출물중 *Alpinia officinarum* Hance의 근경, *Inula britannica* var. *chinensis* Regel의 꽃, *Ulmus arvifolia* Jacq의 수과 그리고 *Aster scaber* Thunb.의 지상부는 본 연구에서 분석된 염증관련 인자들에 대해서 효과적으로 작용하는 것으로 확인되었는 바, 차후 보다 다양한 농도에서 염증반응을 매개하는 iNOS 및 COX-2 등의 다양한 효소의 발현과 Iκ-Bα의 분해 등 염증반응의 신호전달물질의 변화를 관찰함으로써 항염증소재로의 가능성을 타진할 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업 (PJ007083201003, PJ007083201007, PJ007437201003 & PJ007437201004)의 추출물시료 제공과 연구비 지원으로 수행된 결과이며 이에 깊은 감사 드립니다.

LITERATURE CITED

- Beckman JS and Crow JP.** (1994). Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. Biochemical Society Transactions. 21:330-334.
- Finotto S, Ohno I, Marshall JS, Gauldie J, Denburg JA, Dolovich J, Clark DA and Jordana M.** (1994). TNF-alpha production by eosinophiles in upper airways inflammation (nasal polyposis). Journal of Immunology. 153:2278-2289.
- Jeoung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK and Lim BO.** (2009). Comparative effects on anti-inflammatory activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:97-101.
- Hendel J and Nielsen OH.** (1997). Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. American Journal of Gastroenterology. 392:1170-1173.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Jukian F, Mantovani A and Farnarier C.** (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends in Immunology. 24:25-29.
- Kim DW, Yun HJ, Heo JY, Kim TH, Cho HJ and Park SD.** (2010). Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells. The Korea Journal of Medicinal Crop Science. 18:101-106.
- Journal of Herbology.** 25:103-112.
- Kooy, NW, Royall, JA, Ischiropoulos, H and Beckman JS.** (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radical Biological and Medicine. 16:149-156.
- LeBel CP, Ischiropoulos H and Bondy SC.** (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chemical Research in Toxicology. 5:227-231.
- Naven N and Weissman C.** (1991). Prolonged corticosteroid treatment exerts transient inhibitory effect on prostaglandin-E2 release from rabbits eyes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 42:101-105.
- Nishida T, Yabe Y, Fu HY, Hayashi Y, Asahi K, Eguchi H, Tsujii M, Hayashi N and Kawano S.** (2007). Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappa B. Digestive Diseases and Sciences. 52:1890-1896.
- Owens MW and Grisham MB.** (1993). Nitric oxide synthesis by rat pleural mesothelial cells-induction by cytokines and lipopolysaccharide. American Journal of Physiology. 265:L110-L116.
- Pravda J.** (2011). Crohn's disease: Evidence for involvement of unregulated transcytosis in disease etio-pathogenesis. World Journal of Gastroenterology. 17:1416-1426.
- Reddy MM, Mahipal SVK, Subhashini J, Reddy AC, Roy KR, Reddy GV, Reddy PRK and Reddanna P.** (2006). Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. Reproductive Toxicology. 22:493-500.
- Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G and Siracusa MA.** (2002). Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. Current Pharmaceutical Design. 8:177-200.
- Soe JS, Lee TH, Lee SM, Lee SE, Seong NS and Kim J.** (2009). Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW 264.7 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:173-178.
- Vane JR, Bakhele YS and Botting RM.** (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 38:97-120.
- Venkatesha SH, Yu H, Rajiah R, Tong L and Moudgil KD.** (2011). Celastrus-derived celastrol suppresses autoimmune arthritis by modulating antigen-induced cellular and humoral effector responses. Journal of Biological Chemistry. 286:15138-15146.
- Waddington SN, Mosley K and Cattell V.** (1999). Induced nitric oxide (NO) synthesis in heterologous nephrotoxic nephritis; effects of selective inhibition in neutrophil-dependent glomerulonephritis. Clinical and Experimental Immunology. 118:309-314.