

木瓜, 虎杖根 및 乳香 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 nitric oxide 생성에 미치는 영향

이태진 · 우경진 · 서성일¹ · 신상우² · 김상찬² · 권영규² · 박종욱 · 권택규*

계명대학교 의과대학 면역학교실, 1: 계명대학교 의과대학 미생물학교실, 2: 대구한의대학교 한의과대학

Effects of Water Extracts from *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum* and *Boswellia carterii* on LPS-Induced Nitric Oxide Production in Raw 264.7 Cell

Tae Jin Lee, Kyung Jin Woo, Seong Il Shu¹, Sang Woo Shin², Sang Chan Kim², Young Kyu Kwon², Jong Wook Park, Taeg Kyu Kwon*

Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University,

1: Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University, 2: College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

In activated macrophage, large amounts of nitric oxide (NO) are generated by inducible nitric oxide synthase (iNOS), resulting in acute or chronic inflammatory disorders. In Raw 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to mimic inflammation, water extracts from the fruit of *Chaenomeles sinensis*, the root of *Polygonum cuspidatum* and *Boswellia carterii* inhibited the LPS-induced NO production in a parallel dose-dependent manner. To investigate the mechanism by which those extracts inhibits NO production, we examined the expression of iNOS and COX-2 in both mRNA and protein levels. We observed a significant change in the iNOS expression between LPS alone and LPS plus those extracts-treated cells. However, water extracts from *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum* and *Boswellia carterii* did not inhibit COX-2 expression which was induced by LPS treatment in Raw 264.7 cells. These data suggest that water extracts from *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum* and *Boswellia carterii* can modulate anti-inflammatory immune response, which may be in part associated with the regulation of NO synthesis through the regulation of iNOS expression in mouse macrophage cells.

Key words : *Chaenomeles sinensis*, *Polygonum cuspidatum*, *Boswellia carterii*, NO, iNOS

서 론

Macrophage (대식세포)는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 염증반응 시에는 reactive oxygen species (활성산소종)와 interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF- α) 및 interleukin-6 (IL-6) 와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기의 반응에 관여하는 세포로 알려져 있다^{1,2)}. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해 시킬 때 생성되는 IL-1 β , TNF- α 및 nitric oxide (NO)는

숙주에 systemic 한 damage를 유발하는 것으로 보고 되었다³⁻⁵⁾.

NO는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 조절하는 것으로 알려져 있으며, NO는 여러 세포에서 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine로부터 생성된다^{6,7)}. NOS는 Ca²⁺의 의존성에 따라 constituent NOS (cNOS) 와 inducible NOS (iNOS)로 구별된다. cNOS는 Ca²⁺에 의존적으로 짧은 시간 동안 소량의 NO를 생성하여 세포의 정상적인 항상성 유지에 관여하는 효소로써 신경세포에 존재하는 neuronal NOS (nNOS) 와 내피세포에 존재하는 endothelial NOS (eNOS)가 여기에 해당한다⁷⁾. 반면에 세포내의 Ca²⁺의 농도에 관련 없이 대식세포, 혈관 평활근 세포, 내피세포, 간세포 및 심근세포 등의 세포에서 lipopolysaccharide(LPS) 및 interferon- γ (IFN- γ), IL-1, TNF- α 등과

* 교신저자 : 권택규, 대구시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 면역학교실

· E-mail : kwontk@dsmc.or.kr · Tel : 053-250-7846

· 접수 : 2006/03/31 · 수정 : 2006/05/28 · 채택 : 2006/06/12

같은 사이토카인의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 많은 양의 NO 생성에 관여한다. 이러한 과정으로 생성된 NO는 미생물이나 암세포에 대한 활성화된 대식세포의 세포독성기능(cytotoxicity)에 중요한 역할을 하고⁸⁾, 패혈증(sepsis), 출혈 등 쇼크와 관련된 순환부전(circulatory failure)을 유발한다⁹⁻¹⁰⁾.

NO 생성을 억제하는 저해제는 septic shock, 만성진환, 동매경화, 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 최근에는 Lonicerae flos¹¹⁾, Polygonum tinctorium¹²⁾, Melia azadarach¹³⁾, Cyperus rotundus¹⁴⁻¹⁵⁾, 當歸¹⁶⁾ 등의 한약에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 또 다른 연구에서는 Lonicera japonica flower의 물추출물이 LPS로 유도된 rat liver sepsis에서 NF-κB p65의 활성억제와 IκBa의 분해억제를 통하여 협염증 효과를 나타냄을 보고하였으나¹⁷⁾, LPS에 의해 유도된 iNOS 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현조절에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자들은 열수추출법으로 추출한 여러 한약재로부터 LPS의 처리에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제하는 한약재를 검색하여 그중에서 비교적 높은 활성을 나타내는 木瓜, 虎杖根 및 乳香을 대상으로 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서의 NO 생성, iNOS, COX-2의 발현에 관한 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

본 연구에 사용한 木瓜, 虎杖根 및 乳香을 포함한 한약재들은 대구한의대학교 附屬 韓方病院에서 구입하였고, 良質의 것을 精選하여 열수 추출한 후 상층액만을 취하여 0.2μm filter (Nalgen, New York, USA)로 여과하였다. 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용할 때까지 -20 °C에 보관하면서 사용하였다.

2. 시약

LPS (E.coli 026:B6, Difco, Detroit, MI, USA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS) 및 antibiotics는 Gibco-BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

3. 세포주 배양

마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포주를 ATCC (Livingstone, MT, USA)로부터 분양받아 2 mM glutamine이 함유된 DMEM 배지에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 μg /ml streptomycin을 첨가한 배지에서 배양하여 실험에 사용하였다. 20 passage를 넘기지 않은 세포만 실험에 사용하였다. iNOS, COX-2 및 ERK antibody는 Santa cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로 구입하여 사용하였다.

4. NO 생성

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 NO²⁻의 형태로서 존재하고 이것을 Griess (1% sulfanilamide in

5% phosphoric acid +1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine in H₂O) 시약을 이용하여 측정하였다. 실험과정을 간략하게 설명하면 세포 배양액 100 μl와 Griess 시약 100 μl를 혼합하여 96 well plated에서 10 분간 반응시킨 후 540nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. NO²⁻의 농도는 sodium nitrate를 회석하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그린 후 그 표준곡선으로부터 농도를 계산하였다.

5. Immunoblot analysis

1.5×10^6 Raw 264.7 세포에 lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS [4-morpholinepropane-sulfonic acid], 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 μM leupeptin, adjusted to pH 7.2)를 첨가하여 세포를 lysis 시켰다. Cell lysate를 10,000 × g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. 단백질은 전기영동한 후 Immobilon-P membranes으로 transfer 하였다. 단백질의 검출은 ECL Western blotting kit (Amersham, USA)를 사용하여 검출하였다.

6. RNA 분리 및 RT-PCR

RNA 분리는 TRIzol을 이용하여 분리하였다. 간략하게 설명하면, 대식세포에서 RNA를 분리하기 위해서 0.1% DEPC가 함유된 PBS로 세척한 후 TRIzol을 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 여기에 클로로포름을 첨가한 다음 원심 분리하여 상층액을 수확하고, isopropanol을 이용하여 RNA를 침강시킨 후 건조하여 RNA를 분리하였다. 5x RT buffer 2 μl, 10mM dNTP 1 μl, MMLV reverse transcriptase (200 U/μl, (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 0.25 μl, RNase inhibitor 0.25 μl, 50 μM oligo dT primer 0.5 μl, DEPC-water 4 μl를 PCR tube에 넣어 RT mixture를 만들고 여기에 total RNA 2 μg를 첨가한 후 42°C에서 1시간동안 cDNA 합성을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarosegel에서 전기 영동하여 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열은 아래와 같다. COX-2 sense: 5' -CCGTGGTGAATGTATGAGCA-3', antisense: 5' -CCTCGCTCTGATCTGTCTT-3; iNOS sense: 5' -ATGGCTTGCCCCCTGGAAGTTCTC-3', iNOS antisense: 5' -CCTC TGATGGTGCCATCGGGCATCTG-3'; GAPDH sense: 5' -GGTAGAACACCGAAGGCCA-3', GAPDH antisense: 5' -GGTAGAACACCGAAGGCCA-3'

결과 및 고찰

1. Raw 264.7 세포에서 LPS 처리에 의한 NO의 생성을 억제하는 한약재의 검색

본 연구에서는 열수 추출된 다양한 한약재를 대상으로 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 조절하는 것으로 알려져 있는 NO의 생성을 억제하는 한약재를 검색하고 NO 생성을 억제하는 그 기전을 규명하고자 실험을 진행하였다. Raw 264.7 세포에서 열수 추출한 여러 한약재를 마우스 대식세포인

Raw 264.7 세포에 먼저 1시간동안 전처리하고 50 ng/ml LPS를 24시간 동안 처리한 후 Griess 반응으로 NO 생성을 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 NO의 생성이 대조군에 비해 2.5배 정도 증가 하였고, 처리한 여러 가지 한약재 중에서 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 가장 많이 억제하는 것을 관찰하였다.

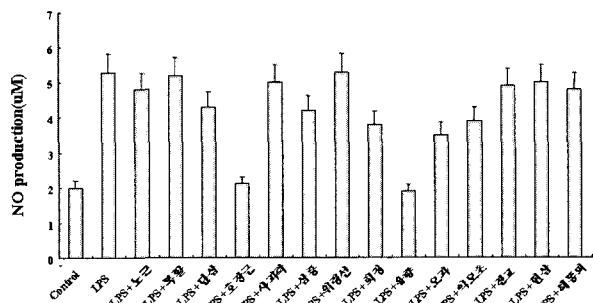


Fig. 1. Effect of water extracts of several plant on the production of NO in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 80 μ g/ml water extracts for 1 hr prior to the addition of LPS (50 ng/ml) and cells were further incubated for 24 hr. Control cell were incubated wit vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were measured as described in Materials and Methods. The values for nitrate are averages \pm S.D. from three independent experiments.

2. 木瓜, 虎杖根 및 乳香의 농도 및 시간에 따른 NO 생성억제
농도에 따른 LPS에 의한 NO 생성 억제 정도를 관찰하기 위해 모과 (10-80 μ g/ml), 호장근 (10-80 μ g/ml), 유향 (10-120 μ g/ml)을 1시간동안 전처리한 후 50 ng/ml LPS를 12 시간 또는 24 시간 동안 처리하여 NO 생성을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 모과 40 μ g/ml 이상의 농도에서 LPS를 처리했을 때 NO의 생성이 억제되는 것을 관찰하였고, 虎杖根과 乳香은 木瓜에 비해 상대적으로 낮은 농도인 10 μ g/ml의 농도부터 농도의 존적으로 LPS에 의한 NO의 생성억제효과를 보였다. 또한 NO 생성의 억제효과는 12 시간 보다 24 시간 LPS를 처리했을 때 보다 높은 것을 알 수 있었다.

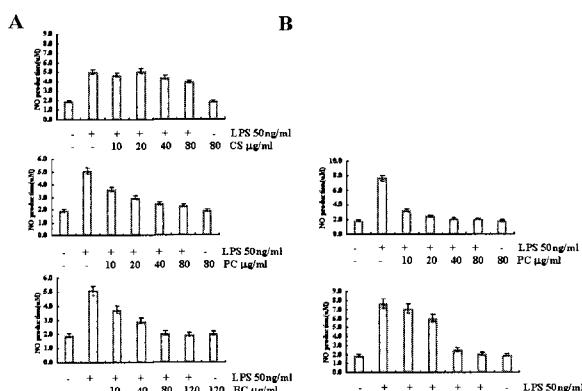


Fig. 2. Inhibition of NO production by water extracts from the fruit of *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC) and *Boswellia carterii* (BC) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of water extracts for 1hr before incubation with LPS (50 ng/ml) for 12 hr (A) and 24 hr (B). The values for nitrate are averages \pm S.D. from three independent experiments.

3. LPS 처리로 유도된 iNOS의 발현에 미치는 영향

木瓜, 虎杖根 및 乳香에 의한 LPS로 유도된 NO 생성억제기전을 규명하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting법을 이용하여 NO의 생성에 관여하는 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현을 분석하였다. 50 ng/ml LPS를 처리하였을 경우 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현이 강하게 유도되었다. 木瓜, 虎杖根 및 乳香에 의해서 농도 의존적으로 iNOS의 mRNA와 단백질 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과를 종합하여 보면 木瓜, 虎杖根 및 乳香에 의해 LPS로 유도되는 NO의 생성을 억제하는 것은 iNOS의 발현조절과 깊은 관련이 있으며, 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등은 LPS에 의한 iNOS의 발현의 증가를 mRNA의 합성단계에서 억제하는 전사조절 단계에서 조절한다는 것을 알 수 있었다.

지금까지 알려진 바로는 LPS를 처리한 후 6-8시간이 경과되었을 때 iNOS mRNA가 증가하여 안정한 상태에 이르게 되고 그 후로 NO 생산이 일정한 수준으로 계속해서 16-20 시간 지속된다고 알려져 있으며¹⁸⁾, 또한 LPS에 의한 iNOS의 유도단계에 영향을 미치는 저해제들은 전처리나 병용처리가 후처리보다 더 강한 저해활성을 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구결과에서 보여주는 바와 같이 木瓜, 虎杖根 및 乳香이 iNOS 유도단계를 억제하는 저해제들과 동일한 저해활성 경향을 나타내는 것으로 볼 때, 木瓜, 虎杖根 및 乳香은 LPS에 의해 Raw 264.7 세포가 활성화 될 때 iNOS의 전사 유도단계를 억제한다고 추정 할 수 있었다.

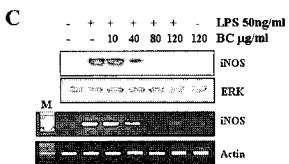
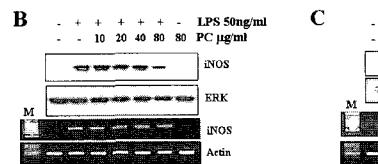
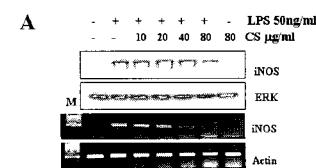


Fig. 3. Effect of water extract from *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC) and *Boswellia carterii* (BC) on LPS-induced iNOS mRNA and protein expression. Raw 264.7 cells pretreated with indicated concentrations of CS, PC and BC before incubation with LPS for 24 hr. Total RNA was prepared and RT-PCR analysis was performed as described in Materials and Methods. The whole lysates were analyzed by immunoblot analysis using against iNOS and ERK antibodies. To ascertain that the total level of each iNOS did not change, blot were stripped and reprobed with the ERK antibody. (A) *Chaenomeles sinensis* (CS), (B) the root of *Polygonum cuspidatum* (PC) and (C) *Boswellia carterii* (BC).

4. LPS 처리로 유도된 COX-2의 발현에 미치는 영향

木瓜, 虎杖根 및 乳香에 의한 LPS로 유도된 COX-2의 발현 억제기전을 규명하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting법을 이용하여 COX-2의 발현을 분석하였다. LPS를 처리하였을 경우 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현이 강하게 유도되었다. 그러나 iNOS와는 달리 木瓜, 虎杖根 및 乳香에 의해서 LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현을 mRNA 또는 단백질 수준에서 억제하지는

못하였다(Fig. 4).

본 연구에서 NO의 생성을 억제한다고 관찰된 木瓜, 虎杖根 및 乳香의 어떠한 성분이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제하는지 또한 어떠한 기전을 통해 억제하는지는 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

그러나 기존에 알려진 바로는 木瓜는 모과나무 (*Chaenomeles sinensis*)의 성숙한 과실로, 性味는 辛溫하고 肝脾로 歸經하여 舒筋活絡, 和胃化濕하는 효능으로 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 腳氣腫痛을 치료하는 要藥으로 사용되는데¹⁹⁾, 그 화학성분으로는 정유성분, flavonoid, proanthocyanidin, tannin, 산성 triterpene 등이 보고되어 있다²⁰⁻²¹⁾. 이 중 proanthocyanidin 성분이 NOS의 활성을 억제하여 NO의 생성을 억제하여 항염증 반응을 유발한다는 보고가 있다²²⁾.

虎杖根 (*Polygonum cuspidatum*)은 虎杖 (*Polygonum cuspidatum*)의 根茎과 根으로, 性味는 苦微寒하고 肝膽肺로 歸經하여 活血祛瘀, 祛風利濕하는 효능으로 風濕痺痛, 跌打損傷 등에 常用되어 왔는데¹⁹⁾, resveratrol, lignan sulfate, decursin, piceid, emodin 등 중요한 생리활성을 지닌 물질이 함유되어 있음이 밝혀졌다²³⁻²⁶⁾. 이 중 NO의 생성을 억제하는 것으로 알려진 성분은 resveratrol²⁷⁾과 decursin²⁸⁾ 등이 있다.

乳香은 유향나무 (*Boswellia carterii*)의 樹脂로서, 性味는 辛苦溫하고 心肝脾에 歸經하여 活血止痛, 消腫生肌의 효능으로 心腹疼痛, 產後瘀血刺痛 등에 이용되어 왔는데¹⁹⁾, 박²⁹⁾ 등에 의하면 혈액암세포에서 항암효과가 있음이 보고 되었으며, 주성분은 수지(樹脂), α·β-보스웰산 (boswellic acids), 오리바노래진, 아라비산 등이 보고 되었다. 이 중 α·β-보스웰산은 LPS에 의해 유도되는 TNF-α의 생성을 억제한다고 알려져 있다³⁰⁾.

iNOS 나 COX-2의 발현 조절에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NF-κB, AP-1, C/EBP 등이 있다³¹⁾. 본 연구 결과에서 보는 바와 같이 Raw 264.7 세포에서 LPS는 iNOS 및 COX-2의 발현을 강하게 유도하였고 이렇게 유도된 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현을 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등이 억제하였지만, COX-2의 발현은 억제하지 못하였다.

이러한 결과를 종합하여 보면 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등이 LPS에 의한 iNOS mRNA 전사를 조절하는 전사조절인자 NF-κB, AP-1, C/EBP 중 promoter에 binding하는 활성을 저해하거나 발현량을 감소시켜 iNOS의 mRNA 및 단백질의 합성을 억제시키는 것으로 생각된다. 지금까지 알려진 바로는 iNOS의 promoter 부위에 존재하는 NF-κB부위가 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성에 관여한다고 보고 되었다³²⁾. 추후 NF-κB luciferase reporter system을 이용한 실험을 통해 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등이 NF-κB의 promoter 활성에 영향을 주어 LPS에 의한 iNOS의 발현을 억제하는지 아니면 AP-1, C/EBP 등과 같은 다른 전사조절인자를 통해 iNOS의 발현을 조절하는지 검정해야 될 것으로 생각된다. 그러나, 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등은 LPS에 의한 COX-2의 유도를 저해하지 못하는 것으로 보아 LPS에 의한 iNOS 및 COX-2의 발현 조절은 상호 다른 전사조절인자에 의해 조절될 것이라는 가능성을 제시해 준다.

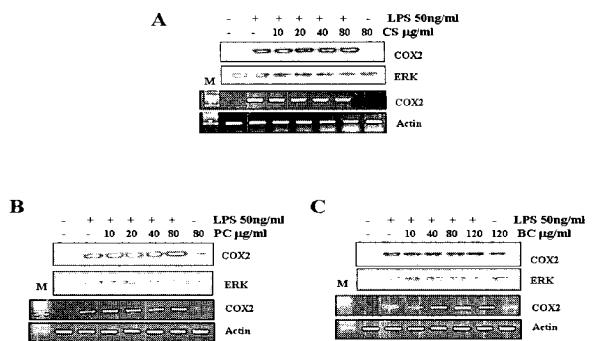


Fig. 4. Effect of water extract from *Chaenomeles sinensis* (CS), the root of *Polygonum cuspidatum* (PC) and *Boswellia carterii* (BC) on LPS-induced COX-2 mRNA and protein expression. Raw 264.7 cells were pretreated with indicated concentrations of CS, PC and BC, before incubation with LPS for 24 hr. Total RNA was prepared and RT-PCR analysis was performed as described in Materials and Methods. The whole lysates were analyzed by immunoblot analysis using against COX-2 and ERK antibodies. To ascertain that the total level of each iNOS did not change, blot were stripped and reprobed with the ERK antibody. (A) *Chaenomeles sinensis* (CS), (B) the root of *Polygonum cuspidatum* (PC) and (C) *Boswellia carterii* (BC).

결 론

활성화된 대식세포에서는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 nitric oxide (NO)가 생성 된다. 이러한 과정에서 생성된 NO는 급성 또는 만성 염증반응에 의해 유발되는 질병을 유발한다. 본 연구에서는 열수 추출된 여러 가지 한약재 중에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하는 한약재를 탐색하였다. 그결과 木瓜, 虎杖根 및 乳香에서 추출된 산물이 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하는 것을 관찰 하였다. 또한 이러한 NO의 증가는 木瓜, 虎杖根 및 乳香의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성이 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하는 기전을 규명하기 위해서 iNOS와 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현을 조사하였다. 木瓜, 虎杖根 및 乳香에서 열수 추출된 산물은 LPS에 의해 유도된 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현을 감소시켰다. iNOS의 발현을 억제하는 木瓜, 虎杖根 및 乳香 중에서 乳香이 가장 낮은 농도에서 효과적으로 iNOS의 발현을 저해함을 알 수 있었다. 반면에 LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현은 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등에 의해서 영향을 받지 않음을 관찰하였다. 이러한 결과를 종합하여 보면 木瓜, 虎杖根 및 乳香 등에서 열수추출된 산물은 iNOS의 발현을 조절하여 NO 생성량을 조절하여 LPS에 의해 유발되는 항염증반응을 조절하므로 염증반응에 관련된 면역치료제로 활용할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원 (02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic

- mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol.* 144(4):1425-1431, 1990.
2. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-350, 1997.
 3. Cetkovic-Cvrlje, M., Eizirik, D.L. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 6(4):399-406, 1994.
 4. MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 81(4):641-650, 1995.
 5. Liu, R.H., Hotchkiss, J.H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res.* 339(2):73-89, 1995.
 6. Forstermann, U., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M., Murad, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 42(10):1849-1857, 1991.
 7. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357(Pt 3):593-615, 2001.
 8. Nathan, C., Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 78(6):915-918, 1994.
 9. Szabo, C., Mitchell, J.A., Gross, S.S., Thiemermann, C., Vane, J.R. Nifedipine inhibits the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther.* 265(2):674-680, 1993.
 10. Thiemermann, C., Szabo, C., Mitchell, J.A., Vane, J.R. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(1):267-271, 1993.
 11. 이동언, 이재령, 김영우, 권영규, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 금은화 및 금은화전초가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, CoOX-2 및 cytokine에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 19(2):481-489, 2005.
 12. 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(2):217-226, 2000.
 13. 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 beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 406(3):301-309, 2000.
 14. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 76(1):59-64, 2001.
 15. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 17(3):771-776, 2003.
 16. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정현택, 김윤철. 활성화된 설치류 Rae 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. *대한한의학방제학회지.* 10(2):189-197, 2002.
 17. Lee, J.H., Ko, W.S., Kim, Y.H., Kang, H.S., Kim, H.D., Choi, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. *Int J Mol Med.* 7(1):79-83, 2001.
 18. Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256(5054):225-228, 1992.
 19. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 永林社, 서울, p 272-273, 420-421, 410-411, 2003.
 20. Lee, M.H., Han, Y.N. A new in vitro tissue factor inhibitory triterpene from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Planta Med.* 69(4):327-331, 2003.
 21. Hamauzu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., Omanyuda, M. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *J Agric Food Chem.* 53(4):928-934, 2005.
 22. Li, W.G., Zhang, X.Y., Wu, Y.J., Tian, X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin.* 22(12):1117-1120, 2001.
 23. Chen, L., Han, Y., Yang, F., Zhang, T. High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum*. *J Chromatogr A.* 907(1-2):343-346, 2001.
 24. Yang, F., Zhang, T., Ito, Y. Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 919(2):443-448, 2001.
 25. Jayasuriya, H., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., McLaughlin, J.L., Chang, C.J. Emodin, a protein tyrosine

- kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *J Nat Prod.* 55(5):696-698, 1992.
26. Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y., Bai, D., Zhong, D. Constituents from *Polygonum cuspidatum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 50(5):605-608, 2002.
27. Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 126(3):673-680, 1999.
28. 노대철, 최희철, 이승용, 김영호, 노문철, 김영국, 이현선. 호장근의 쿠마린에 의한 Raw264.7 세포주의 nitric oxide 생성 저해 활성. *생약학회지*. 31(3):181-188, 2001.
29. 박래길, 오광록, 이광규, 문연자, 김정훈, 우원홍, 유향주출물의 HL-60 혈액암세포에서 세포사멸 유도효과. *약학회지*, 45(2):161-168, 2001.
30. Syrovets, T., Buchele, B., Krauss, C., Laumonnier, Y., Simmet, T. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha induction in monocytes by direct interaction with IkappaB kinases. *J Immunol.* 174(1):498-506, 2005.
31. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalphaphosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol.* 139(1):11-20, 2003.
32. Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 269(7):4705-4708, 1994.