

# 하고초물추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 염증매개물질 억제효과

장현주<sup>1</sup> · 박숙자<sup>1,2</sup> · 이종록<sup>1,3</sup> · 김상찬<sup>1,2,3\*</sup>

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: BK21 Team, 3: 한방생명자원센터

## Inhibitory Effects of Water Extracy of *Prunellae Spica* on the Production of Pro-inflammatory Mediator in LPS-activated Raw 264.7 Cells

Hyun Ju Chang<sup>1</sup>, Sook Jahr Park<sup>1,2</sup>, Jong Rok Lee<sup>1,3</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2,3\*</sup>

1: College of Oriental Medicine, 2: BK21 Team,

3: Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine, Daegu Haany University

*Prunellae Spica* is the spike or whole plant of *Prunella vulgaris* Linne, which has been used for clearing heat from the liver, brightening the eyes and treating headache in traditional oriental medicines. This study was conducted to evaluate the inhibitory effects of the aqueous extract of *Prunellae Spica* (PSE; PS extract) on the production of NO and PGE2 in LPS-activated Raw 264.7 cells. Cell viability was determined by MTT assay, and all three doses of PS extract (0.03, 0.1 and 0.3 mg/ml) had no significant cytotoxicity during the entire experimental period. The cells were treated with 1  $\mu$ g/ml of LPS 1 h before adding PS extract, and increased NO and PGE2 production were detected in LPS-activated cells compared to control. However, these increases were dose-dependently attenuated by treatment with PS extract. The inhibition of NO by PS extract was due to the suppression of iNOS expression via inhibition of NF $\kappa$ B nuclear translocation and proteolytic degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . The decreased level of PGE2 was derived from inhibition of COX-2 activity, but expression of COX-2 protein was not affected by PS extract. Moreover, PS extract reduced the elevated production of IL-1 $\beta$  and IL-6 by LPS. These results demonstrate that PS extract has inhibitory effects on the production of NO and PGE2 as a consequence of the reduction of proinflammatory cytokines, especially IL-1 $\beta$  and IL-6 in LPS-activated Raw 264.7 cells.

Key words : *Prunellae Spica*, iNOS, COX-2 activity, NF $\kappa$ B.

### 서 론

夏枯草는 脣形科(꿀풀과; Labiatae)에 속한 다년생 초본인 꿀풀(가지대기; *Prunella vulgaris* var. *lilacina* NAKAI)의 지상부 전초를 건조한 것으로<sup>1)</sup> 體는 輕하고 質은 脆弱하며 清香의 氣를 가지고 있다<sup>2)</sup>. 性味는 寒辛苦하며, 肝膽經에 주로 入하여 清肝, 散結의 효능이 있어, 瘰癧, 癭瘤, 乳癰, 目珠夜痛, 羞明流淚, 頭目眩暈, 口眼歪斜, 筋骨疼痛, 肺結核, 急性黃疸型傳染性肝炎, 血崩,

帶下 등을 치료한다<sup>2)</sup>.

夏枯草의 성분으로는 전초로부터 oleanolic acid, ursolic acid, rutin, hyperoside, cis-caffeic acid 및 trans-caffeic acid, vitamin, carotenoid, tannin, 유기산 등이 보고되었고, 꽃으로부터 ursolic acid뿐 아니라 delphinidin과 cyanidin의 glycoside, d-camphor, d-fenchone 및 fenchyl alcohol 등이 보고되었으며, 지상부로부터 sterol( $\alpha$ -spinasterol, stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol)과 각종 ursane 및 oleanane계 triterpenoid들이 보고되어 있다<sup>3)</sup>.

최근까지의 夏枯草의 생리활성연구로는 항 HIV (human immunodeficiency virus) 활성<sup>4,6)</sup> 항염활성<sup>7,8)</sup> 항알러지 활성<sup>9,10)</sup> 항산화활성<sup>8,11)</sup> 항 HSV (herpes simplex virus) 활성<sup>12)</sup> 항돌연변

\* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247

· 접수 : 2009/04/25 · 수정 : 2009/05/27 · 채택 : 2009/06/03

이활성<sup>13)</sup> 등이 보고되고 있으나, 대식세포에 대한 夏枯草의 항염증 활성에 대한 연구는 매우 제한적이다.

대식세포는 여러 종류의 숙주 반응에 관여하여 숙주의 방어와 숙주의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukin-6 (IL-6)와 같은 cytokine을 생산하여 감염 초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 외부세포막에 존재하는 내독소로 대식세포에서 cytokine, NO, prostaglandin E2 (PGE2) 등의 생성을 증가시키며<sup>15)</sup>, 이러한 염증매개 인자들은 전사인자의 활성화에 의해 일어나는 것으로 보고되어 있다<sup>16)</sup>. 따라서 LPS로 activation된 대식세포는 세포수준에서 항염증 물질을 screening하는 데, 널리 사용되고 있는 모델이다.

NO 및 PGE2의 생성에 주요한 역할을 하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 유도성 효소라는 특징이 있다. Nitric oxide synthase (NOS)는 constitutive NOS (cNOS)와 iNOS 두 개의 isoform으로 존재하며, cNOS는 일정한 수준의 NO를 생성하여, 혈관에서 이완작용을 하여 혈압조절을 하거나 신경계에서 신호전달을 담당하는 등 세포의 항상성에 기여하지만, iNOS는 박테리아 내독소 등에 의해 발현이 유도되어 다량의 NO를 생성하여 정상세포에 손상을 유발한다<sup>17)</sup>. PGE2와 같은 프로스타글란딘의 생성에 기여하는 효소는 cyclooxygenase (COX)로 COX-1과 COX-2 두 가지의 isoform이 알려져 있다. COX-1은 신혈관 확장으로 신기능을 유지시키고 위장의 점막을 보호하는 작용을 하는 인체에 유익한 'housekeeping' protein이지만, COX-2는 LPS 등에 의해 유도되어 과도한 PGE2를 생성하여 염증을 매개하는 효소이다<sup>18)</sup>.

NO와 PGE2의 생성에 기여하는 iNOS와 COX-2는 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 활성화에 의해 발현이 조절되는 단백질들이다<sup>16)</sup>. 정상세포 상태에서, NF- $\kappa$ B는 inhibitor인 I $\kappa$ B에 의해 nuclear localization signal 부분이 가려져 있어 핵으로 이동하지 못하고 cytosol에 불활성화 상태로 존재하고 있다. 하지만 LPS와 같은 염증신호가 전달되면 I $\kappa$ B kinase (IKK)가 활성화되어 I $\kappa$ B의 두 곳을 phosphorylation시키고, 인산화된 I $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B에서 분리되고 ubiquitination되어 proteasome에서 degradation되게 된다. I $\kappa$ B로부터 자유로워진 NF- $\kappa$ B는 핵으로 translocation하여 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine 등 target gene의 발현을 증가시킨다<sup>19)</sup>.

대식세포가 염증성 환경에 대응할 때 분비되는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 NO, PGE2 등은 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>20-22)</sup>. 따라서 이러한 염증 매개물질들의 생성 저해제는 septic shock, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이에 저자는 夏枯草추출물이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell의 NO와 PGE2의 생성량, iNOS, COX-2의 발현 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine에 미치는 영향을 살펴보고 이러한 염증매개물질의 발현에 핵심적 역할을 하는 NF- $\kappa$ B의 변화를 살펴보고자 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 추출물의 제조

하고초 (Prunellae Spica, 대원약업사, 대구) 300 g을 물 5 L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000 $\times$  g에서 3분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2  $\mu$ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 하고초추출물 (PSE; Prunellae Spica Extract)의 수율은 7.39 %였으며 실험에서는 DMEM에 녹여 사용하였다.

### 2. 시약

LPS (Escherichia coli 026:B6; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, Antibody는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, MI, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포배양

살치류 대식세포주인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

### 4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 PSE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 PSE를 처리한 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50  $\mu$ l 넣고 4시간 배양 한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

i.e. viability (% control)

$$= 100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control}).$$

### 5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은

세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>-의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50 μl와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 50 μl를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub>-의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

#### 6. Immunoblot analysis

20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000× g로 10분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS antibody와 antirabbit COX-2 antibody를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti I-κBα antibody를 사용하여 I-κBα protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. iNOS, COX-2, I-κBα protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다. 발색후 각 band의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 Densitometric analysis를 하였다.

#### 7. 핵분획의 제조

핵분획은 세포를 ice cold PBS로 2회 세척하고, 이를 PBS와 함께 microtube에 넣은 후, 2,000/ g로 5분간 원심분리하였다. 이후 PBS를 제거하고, 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride를 포함하는 hypotonic buffer를 넣어 10분간 얼음위에 방치한 후, 7,200/ g로 5분간 원심분리하였다. 이후 상등액을 제거하고 crude nuclei가 포함된 pellet에 20 mM HEPES(pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF를 포함하는 extraction buffer를 50 μl를 넣고 30분간 얼음위에 방치하였다. 이 후, 이를 15,800/ g로 10분간 원심분리하여 핵분획이 포함된 상등액을 얻었다.

#### 8. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (5×10<sup>5</sup>/ml)을 분주하고 PSE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 18시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70℃에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

#### 9. COX-2의 활성측정

COX-2 activity는 Cayman chemical사 (MI, USA)로부터 구입한 assay kit를 사용하여 분석하였다. 이 assay kit는 cyclooxygenase의 peroxidase activity를 측정하는 것으로 먼저, 1 mM EDTA를 함유하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8)를 사용하여 3초간 sonification한 다음, 4℃, 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액으로부터 cell lysate를 얻고 BCA법 (Endogen, USA)으로 단백질 정량을 하여 100 ug/40 uL의 농도로 준비하였다. 준비된 cell lysate에 COX-1의 activity를 배제하기 위하여 COX-1의 specific inhibitor인 SC-560을 처리하고 상온에서 5분간 incubation한 후, colorimetric substrate (TMPD)와 arachidonic acid를 첨가하여 25℃에서 5분간 더 incubation하였다. COX-2 activity는 595 nm에서 흡광도를 측정하여 nmol/min/ml (U/ml)으로 나타내었다.

#### 10. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 통계학적 분석에는 SPSS program 17.0 (SPSS, Chicago)을 사용하였다. 실험군간의 효과 비교를 위하여 Independent t-test를 사용하였으며, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

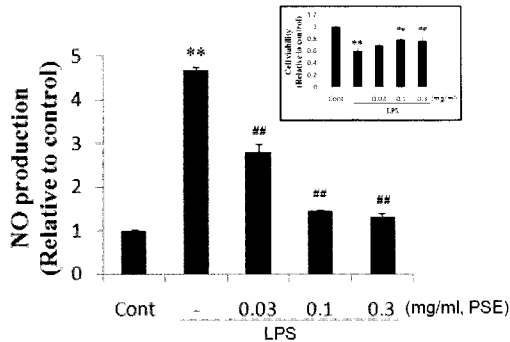
### 1. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 NO production에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 PSE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 PSE를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 LPS처리 후 유의하게 4.5배 정도 증가하였으며, PSE를 처리한 실험군에서는 전농도에서 유의한 NO억제를 나타내었으며, 0.1과 0.3 mg/ml에서는 control수준으로 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 1). PSE가 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, PSE의 세포독성으로 Raw 264.7 cell의 감소에 인한 것인지를 관찰하기 위하여, PSE를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. LPS단독 처리에서는 control에 비교하여 약 60%의 세포독성을 나타내었으나, LPS와 PSE (0.03, 0.1, 0.3 mg/ml)를 처리한 군에서는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 0.1과 0.3 mg/ml에서는 세포독성억제가 관찰되었다(Fig. 1. inserted Figure).

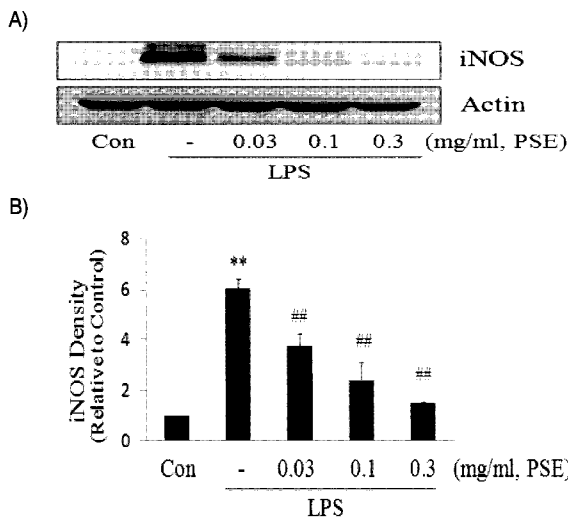
### 2. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 iNOS 발현에 미치는 영향

산화질소 (nitric oxide; NO)는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되므로<sup>23)</sup>, PSE의 NO 생성 억제에 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처리시에는 iNOS 단백질의 발현

이 6배 정도로 유의하게 증가되었으나, LPS에 PSE 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 농도의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2).



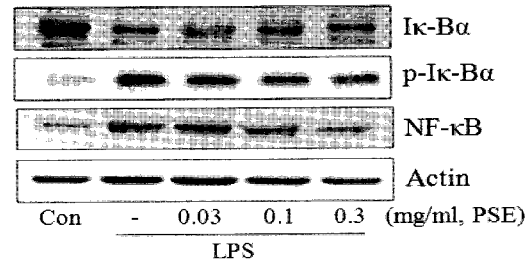
**Fig. 1. Effects of PSE on the production of NO by LPS.** Raw 264.7 cells were treated with 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml of PSE dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Inserted figure shows cell viability determined by MTT assay after treatment with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of PSE for 24 h. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01)



**Fig. 2. Effect of PSE on the induction of iNOS by LPS.** The level of iNOS protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without PSE pretreatment (i.e. 1h before LPS). The actin was used as a loading control (A). The relative density levels of protein bands were measured by scanning densitometry. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (B). (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01)

3. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 NFκB발현에 미치는 영향  
일반적인 상태에서 NFκB는 세포질에서 억제분자인 IκBa, IκBβ, IκBe 등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS-TLR의 자극에 의해 NFκB signaling cascade가 활성화되면 IκB 등의 억제인자가 인산화되면서 NFκB가 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도하게 한다. IκB protein의 종류는 IκBa, IκBβ, IκBe 등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NFκB의 억제단백질은 IκBa이다<sup>24)</sup>. 그러므로, 본 연구에서 세포

질에서 IκBa, p-IκBa, 핵분획에서 NFκB 단백질의 발현을 평가하였다. 세포질에서 IκBa는 LPS처치에 의하여 감소하였으나, PSE의 전처치에 의하여 감소된 IκBa가 회복되었으며, 이와 동일하게 p-IκBa는 LPS에 의해 발현이 증가되었으나, PSE에 의해 그 발현이 감소되었다. 그리고 핵분획에서의 NFκB는 LPS 처치에 의해 증가하였으나, PSE의 전처치에 의하여 NFκB량이 감소하였다. 이러한 결과는 PSE가 IκBa의 인산화를 억제하고 그로 말미암아 NFκB가 핵으로의 전위됨을 억제함을 나타낸다.



**Fig. 3. Effects of PSE on the expression of IκBα and NFκB by LPS.** The level of IκBα, p-IκBα and NFκB protein were monitored 15min, 15min and 60 min after treatment of cells with LPS (1µg/ml) with or without PSE pretreatment, respectively (i.e. 1h before LPS). The actin was used as a loading control .

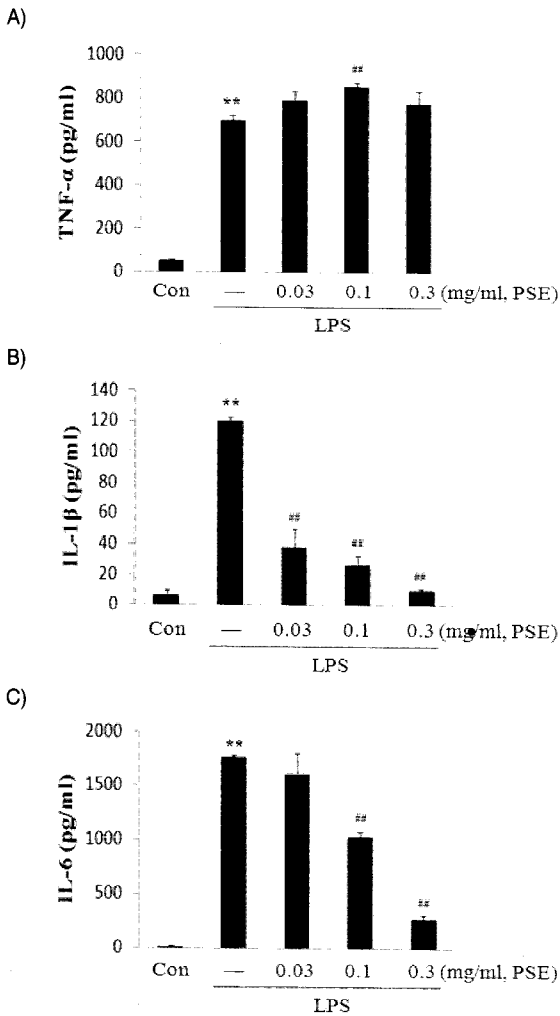
4. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 내재면역에 있어서 중요한 역할을 하고<sup>16)</sup>, tumor cell에 대하여서는 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과도 관련되어 있다<sup>25)</sup>. 본 연구에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으나, PSE는 실험 전 농도에서 TNF-α의 생성량을 감소시키지 못하였을뿐만 아니라, 0.03 mg/ml에서는 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4A). IL-1β는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화하는<sup>25)</sup> cytokine으로, 본 연구에서도 LPS의 자극에 의하여 IL-1β의 분비가 유의성있게 증가하였으며, PSE는 0.03, 1.0, 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1β의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다(Fig. 4B). IL-6는 분화된 B-cell이 plasma세포로 분화되도록 촉진시키고 항체의 분비를 자극한다. 또한 IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, PSE 0.1, 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 PSE 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4C).

5. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 PGE2 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향

Arachidonic acid로부터 생성되는 PGE2는 염증, 부종, 통증 및 발열을 일으키며, 염증반응시 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다<sup>26)</sup>. 본 실험에서 LPS는 PGE2의 생성을 유의성 있게 증가시켰으며, PSE 0.1, 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 PGE2를 유의성 있게 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 5A). PSE

가 LPS유도로 증가된 PGE2를 감소시키는 결과에 따라, PGE2를 생성하는 COX-2 protein의 발현을 평가하였다. LPS 처리시에는 COX-2 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS에 PSE를 처리한 전 실험군에서는 COX-2의 발현을 감소시키지 못하였다(Fig. 5B). 이는 LPS와 PSE를 동시에 처리하였을 때 PGE2의 생성이 저해된 결과와는 일치하지 않는 결과이다.



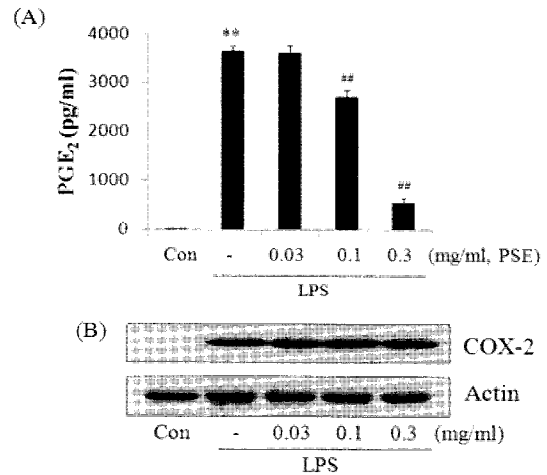
**Fig. 4. The effect of PSE on the production of inflammatory cytokines.** Production of TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-6 (C) was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of PSE for 12 h. The relative levels of cytokines were determined by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (\*, significant as compared to control. \*\*P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P<0.05, ##P<0.01)

**6. PSE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell의 COX-2 activity에 미치는 영향**

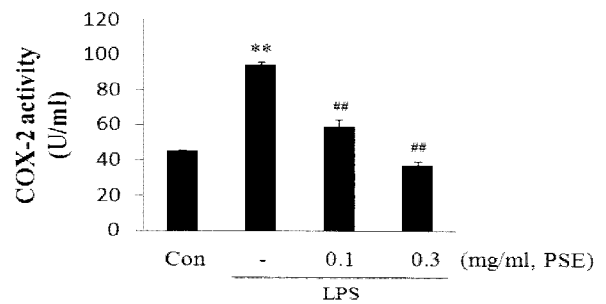
PSE가 LPS유도로 증가된 COX-2 protein의 발현을 감소시키지 못한 결과에 따라, COX-2 protein의 활성도를 평가하였다.

LPS 처리시에는 COX-2 단백질의 activity가 2배정도 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 증가는 PSE의 전처리에 의해 활성도가 유의하게 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 0.3 mg/ml의 농도에서는 control수준으로 COX-2의 활성도를 억제

하였다(Fig. 6). 이는 LPS와 PSE를 동시에 처리하였을 때 PGE2의 생성이 저해된 결과와 일치하는 결과로서 PSE가 COX-2의 활성도를 억제함으로써 PGE2의 생성을 억제함을 나타낸다.



**Fig. 5. Inhibition of LPS-activated PGE2 production and COX-2 expression by PSE.** Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of PSE for 24 h. To determine the level of PGE2, the cultured medium was collected and directly assayed for PGE2 (A). Equal amounts of total protein (50 µg/lane) were resolved by SDS-PAGE, and then expression of COX-2 protein was determined by immunoblot using specific anti-COX-2 antibody(B). The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (\* significant compared with the control, \*\*P<0.01, # significant compared with the LPS alone, ##P<0.01).



**Fig. 6. Inhibitory effect of PSE on the LPS-induced COX-2 activity.** COX-2 enzyme activity was determined by measuring the oxidation of TMPD caused by peroxidase activity of COX as described in Methods. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (\*, significant compared with the control, \*\*P<0.01, # significant compared with the LPS alone, ##P<0.01)

**고찰**

본 연구는 清熱瀉火藥으로 사용되는 夏枯草의 항염증효과를 평가하기 위하여, LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 夏枯草물 추출물의 전처치가 염증매개물질에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

夏枯草는 清肝, 散結의 효능이 있어, 癰癤, 癭瘤, 乳癰, 目珠夜痛, 羞明流淚, 頭目眩暈, 口眼歪斜, 筋骨疼痛, 肺結核, 急性黃疸型傳染性肝炎, 血崩, 帶下 등을 치료한다<sup>2)</sup>. 夏枯草에 대한 연구로는 항산화활성<sup>11)</sup>, 발암억제<sup>27,28)</sup> 및 세포자멸사유도<sup>29)</sup>, 1,2상해독화 효소의 조절<sup>28,30)</sup>, 항고지혈<sup>31)</sup>, 감상선기능 조절<sup>32)</sup> 및 항염증작용<sup>33)</sup>

등의 다양한 연구결과가 보고되어 있다. Lamaison 등<sup>11)</sup>은 *Prunella vulgaris*가 자유기 소거능으로 말미암아 강한 항산화활성을 나타내며, 이러한 활성은 주로 rosmarinic acid에 의한 것임을 보고하였으며, Lee 등<sup>27)</sup>은 *Prunella vulgaris* 화수로부터 세포독성성분으로 ursolic acid를 분리하였으며, 이 ursolic acid는 임파구성백혈병세포인 P-388, L-1210 및 인간폐암세포주인 A-549, 인간장암세포인 HCT-8, 유방암세포주인 MCF-7세포에 대하여 강한 세포독성이 있음을 보고하였다.

또한, 박 등<sup>28)</sup>은 夏枯草 약침액이 10, 30 mg/ml에서 CYP1A1의 효소활성을 저해하고, 발암물질과 DNA의 결합을 저해하여 돌연변이와 암발생의 억제에 유의할 것이라 보고하였으며, 이 등<sup>29)</sup>은 夏枯草의 ethyl acetate분획이 U937 (Human leukemic monocyte lymphoma cell line) 인간임파종세포에 대하여 caspase-3 및 PARP cleavage의 활성화를 경유하여 DNA를 분절시킴으로서 apoptosis를 유도함을 보고하였고, 손 등<sup>30)</sup>은 夏枯草 추출물이 생쥐간암세포주인 Hepa1c1c7세포에서 phase II enzyme의 일종인 QR을 유도하며, glutathione의 생성을 유도함을 보고하였고, 황<sup>31)</sup>은 夏枯草의 에틸아세테이트 분획이 MAO-A, MAO-B에 대하여 각각 IC50이 1.20 mg/ml, 12 µg/ml로서 높은 MAO저해 활성을 나타냄을 보고하였다.

특히, 정 등<sup>31)</sup>은 夏枯草가 고지방식으로 유도된 고지질혈증에 대하여 유의한 지질감소효과를 가지며, 또한 고지방식으로 유도된 간조직 중의 acetyl-CoA carboxylase와 fatty acid synthetase활성을 유의성 있게 감소시킴을 보고하여 夏枯草의 본초학적 이외의 또 다른 효능을 밝혔으며, 김 등<sup>3)</sup>은 꿀풀夏枯草 및 줄기의 MeOH추출물에는 ursolic acid가 함유되어 있으나, 제비꽃의 MeOH추출물에서는 TLC 및 GC에서 ursolic acid가 함유되어 있지 않음을 근거로, 제비꽃을 꿀풀夏枯草의 대용으로 사용할 수 없음을 밝혀, 김 등<sup>35)</sup>이 제시한 夏枯草의 기원식물은 꿀풀夏枯草라는 연구결과와 동일한 연구결과를 발표하였다.

또한, 배 등<sup>32)</sup>은 夏枯草가 영류, 나력 등에 다용되는 점을 고려하여, 夏枯草수침이 sodium levothyroxine의 경구투여로 유발된 갑상선기능항진증에 흰쥐에 대하여 혈청중 T3, T4를 유의하게 감소시키고, TSH를 유의하게 증가시킴을 보고하였으며, 이 등<sup>36)</sup>은 sodium triiodothyronine의 복강주사로 유발된 갑상선기능항진증에 대하여 꿀풀夏枯草 및 덩싸리夏枯草 모두 유의하게 T3, T4 및 TSH를 조절하며, 꿀풀夏枯草 및 덩싸리夏枯草간의 유의한 차이는 없음을 보고하였다.

특히, 고 등<sup>33)</sup>은 夏枯草의 항염증효과로서, 花夏枯草 (*Prunella vulgaris*)와 土夏枯草(*Thesium chinensis*)의 물추출물은 carageenin에 의한 부종을 억제하였으며, 또한 adjuvant유발 관절염에서도 억제효과를 나타냄을 보고하였다. 그러나, 夏枯草의 항염증효과에 대한 연구는 매우 미흡한 실정으로, 본 연구에서는 夏枯草의 iNOS 억제 기전 및 염증성관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 수행하기 위하여 열수추출된 夏枯草 (PSE)가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증매개물질들에 미치는 영향을 평가하였다.

Raw 264.7 cell에서 PSE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위

하여 PSE를 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 다량 증가하였으며, PSE를 0.03 ~ 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 농도의존적으로 유의성있는 NO의 생성억제를 나타내었다.

PSE가 0.03, 0.1 및 0.3 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, PSE의 세포독성으로 인한 세포수의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, PSE의 농도 및 시간에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다.

실험결과 실험에 사용된 PSE의 전농도는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 0.1과 0.3 mg/ml에서는 유의한 증가를 유도하였다. 그러나, 본 연구는 NO의 감소가 PSE의 세포독성에서 유인하였는지를 평가하고자 한 까닭으로 cell viability가 0.1과 0.3 mg/ml에서 증가하였다하더라도 PSE의 NO생성억제에는 영향을 미치지 못하는 결과이다.

NO는 L-arginine으로부터 NOS를 경유하여 생성되므로<sup>23)</sup>, NO 생성의 억제에 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처리시에는 iNOS 단백질이 6배 정도 강하게 유도되었으나, LPS에 PSE 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 iNOS의 양이 농도의존적으로 유의하게 감소하였다.

NO를 생성하는데 관여하는 iNOS의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NFκB, AP-1, C/EBP등이 있으며, 이들 중 NFκB가 대표적인 전사조절인자로 알려져 있다<sup>16)</sup>. NFκB는 apoptosis의 억제, cell cycle의 조절, oncogenesis 등과도 관련이 있으며<sup>19)</sup>, 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF-α 등의 유전자 발현에 관련한다<sup>16)</sup>. 일반적인 상태에서 NFκB는 세포질에서 억제단백질인 IκBα, IκBβ, IκBε, p105, p100 등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 활성화되어 NFκB 신호전달계가 작동되면 IκB, p105, p100이 인산화가 진행되면서 NFκB가 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. IκB 단백질의 종류는 IκBα, IκBβ, IκBε등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NFκB의 억제 단백질은 IκBα이다<sup>19)</sup>.

본 연구에서 세포질의 IκBα는 LPS처리시 IκBα 단백질이 세포내에서 감소하였으나, LPS에 PSE를 처리한 실험군에서는 IκBα의 양이 급격히 증가하였으며, 또한 p-IκBα는 LPS에 의해 증가하였으며, PSE에 의해 IκBα의 인산화가 억제되었다. 핵분획에서의 NFκB는 LPS에 의해 증가되었고, PSE에 의해 NFκB는 감소하였다. 이러한 결과는 IκBα, p-IκBα와의 결과와 같이 고려해 볼 때, LPS에 의해 IκBα의 인산화가 증가되고, 이차적으로 NFκB가 핵으로 전위되는 과정을 PSE가 유의하게 억제하고 있음을 의미한다. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 내재면역에 있어서 중요한 역할을 하고<sup>16)</sup>, 만성염증성 반응과 관련되어 있다<sup>25)</sup>. 본 연구에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의하게 촉진시켰으나, PSE는 전농도에서 TNF-α의 감소를 나타내지 못하였다. 한편, IL-1β는 단핵구, 대식세포, B-cell, 수지상세포, 간세포 등에서 분비되는 IL-1β는 TNF-α,

IL-2, IL-6와 함께 pro-inflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙, NK cell의 activity를 활성화한다<sup>25)</sup>. 또한 IL-1은 septic shock<sup>37)</sup>, 화상<sup>38)</sup> 등의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다<sup>39)</sup>.

본 연구에서 LPS는 IL-1 $\beta$ 의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, PSE는 실험에 사용된 전농도에서 농도의존적으로 유의하게 IL-1 $\beta$ 의 생성량을 감소시켰다. 특히 PSE 0.3 mg/ml은 control수준으로 IL-1 $\beta$ 를 감소시켰다.

단핵구나 대식세포에서 분비되는 IL-6는, B-cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, antibody의 분비를 촉진하는 것으로, IL-6의 level은 염증성 병변에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에서 LPS는 IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, PSE 0.1, 0.3 mg/ml은 LPS로 유도된 IL-6를 농도의존적으로 유의성 있게 감소시켰다.

일반적으로 PGE2는 염증, 부종, 통증 및 발열을 일으키는 것으로, PSE 0.1, 0.3 mg/ml의 농도는 LPS로 증가된 PGE2를 유의하게 감소시켰다. PGE2는 arachidonic acid로부터 COX-2에 의해 생성되며 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다<sup>26)</sup>. PSE가 LPS유도로 증가된 PGE2를 감소시키는 결과에 따라, PGE2를 생성하는 COX-2 protein의 발현을 평가하였으나, PSE는 LPS에 의한 COX-2의 발현을 억제하지 못하였다. 그러나 PSE는 LPS에 의해 증가된 COX-2의 activity를 가 유의하게 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 0.3 mg/ml의 농도에서는 control수준으로 COX-2의 활성도를 억제하였다. 이는 PSE가 COX-2의 활성도를 억제함으로써 PGE2의 생성을 억제함을 나타낸다.

이러한 연구결과는 PSE가 NF $\kappa$ B의 억제단백질중의 하나인 I $\kappa$ Ba의 phosphorylation을 억제하여 NF $\kappa$ B가 핵안으로 translocation되는 기전을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6의 감소가 초래되는 것을 의미하며, 또한 COX-2의 활성도를 억제함으로써 PGE2의 생성을 억제함을 나타낸다. 그러나, 본 연구는 하고초 抽出物이 in vitro에서 나타내는 연구결과이므로, 향후 in vivo에서의 효능 및 효능기전이 확보되어야 할 것으로 생각된다.

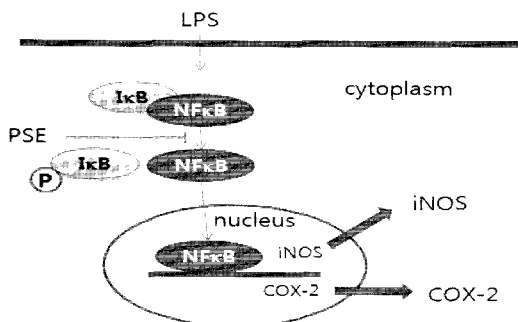


Fig. 7. Inhibitory effects of *Prunellae Spica* on the production of pro-inflammatory mediator in LPS-activated Raw 264.7 cells.

## 결론

하고초추출물(PSE)의 항염증효능을 평가하기 위하여, Raw 264.7 cell을 LPS (+/- PSE)로 활성화시킨 후 nitric oxide의 생성량, inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2의 발현 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), PGE2 등의 염증매개물질에 미치는 영향을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

LPS는 NO의 생성량을 유의성있게 증가시켰으며, PSE 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml을 전처치한 실험군에서는 증가된 NO를 유의하게 억제하였다. 또한 PSE처리군은 LPS단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 PSE에 의한 NO의 생성억제는 iNOS 단백질의 발현 감소에서 유래한다. LPS에 의해 감소된 I $\kappa$ Ba는 PSE에 의해 발현이 증가되었으며, 핵분획에서의 NF $\kappa$ B발현은 PSE의 전처치에 의하여 유의하게 감소하였다.

이에 따라 염증성 cytokine 역시 PSE에 의해 유의하게 감소되었다. LPS에 의하여 유의하게 증가된 PGE2는 PSE에 의해 유의하게 감소되었으며, 이러한 PGE2의 감소는 PSE가 COX-2의 활성을 억제함으로써 기인한다. 이러한 결과로 보아, PSE는 감염에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 pro-inflammatory cytokine생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구소)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, p 383, 1997.
2. 본초학고수. 본초학. 서울, 영림사, p 169, 1992.
3. 김주선, 강삼식, 이경순, 장승업, 원도희. 하고초(夏枯草, *Prunellae Herba*)로부터 Ursolic acid의 함량분석. 생약학회지 31(4):416-420, 2000.
4. Liu, S., Jiang, S., Wu, Z., Lv, L., Zhang, J., Zhu and Wu, S. Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotte*. Life Sci. 71: 1779-1791, 2002.
5. Lam, T.L., Lam, M.L., Au, T.k., Ip, D.T., Ng, T.B., Fong, W.P. and Wan, D.C. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. Life Sci. 67: 2889-2896, 2002.
6. Kageyama, S., Kurokawa, M. and Shiraki, K. Extract of *Prunella vulgaris* spikes inhibits HIV replication at reverse transcription in vitro and can be absorbed from intestine

- in vivo. Chem. Chemother. 11: 157-164, 2000.
7. Jung, Y.B., Roh, K.J., Jung, J.A., Jung, K., Yoo, H., Cho, Y.B., Kwak, W.J., Kim, D.K., Kim, K.H. and Han, C.K. Effect of SKI 306X, a new herbal anti-arthritis agent, in patients with osteoarthritis of the knee: a double-blind pla-cebo controlled study. Am. J. Chin. Med. 29: 485-491, 2001.
  8. Ryu, S.Y., Oak, M.H., Yoon, S.K., Cho, D.I., Yoo, G.S., Kim, T.S. and Kim, K.M. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. Planta Med. 66: 358-360, 2000.
  9. Au, T.K., Lam, T.L., Ng, T.B., Fong, W.P. and Wan, D.C. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. Life Sci. 68: 1687-1694, 2001.
  10. Liu, F. and Ng, T.B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. Life Sci. 166: 725-735, 2000.
  11. Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C. and Carnat, A. Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. Lamaison, J.L., Phar. Acta. Helv. 66: 185-188, 1991.
  12. Xu, H.X., Lee, S.H., Lee, S.F., White, R.L. and Blay, J. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. Antiviral Res. 44: 43-54, 1999.
  13. Lee, H. and Lin, J.Y. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in medicine. Mutat. Res. 204: 229-234, 1988.
  14. Lee, Y.S., Kim, H.S., Kim, S.K., Kim, S.D. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 10: 8-15, 2000.
  15. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol. 144: 1425-1431, 1990.
  16. 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 saquinone effects on I- $\kappa$ B phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British journal of pharmacology. 139: 11-20, 2003.
  17. Tome, L., Yu, L., de Castro, I., Campos, S., Seguro, A. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. Nephrol Dial Transplant 14: 1139-1145, 1999.
  18. Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38: 97-120, 1998.
  19. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. Am J Pathol. 159(2):387-397, 2001.
  20. McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A. and Corbett, J.A. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211: 24-32, 1996.
  21. Corbett, J.A. and Mac, Daniel, M.L. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. J. Exp. Med. 181: 559-568, 1995.
  22. Cetkovic-Cvrije, M. and Eizirik, D.L. TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 6: 399-406, 1994.
  23. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 333: 664-666, 1988.
  24. 손갑호, 김성훈. 시호(柴胡), 인진(茵陳)의 간암세포에 대한 항암활성 및 항암제와의 상승(相乘)작용. 대한한약학회지 16(2): 414-432, 1995.
  25. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides. 37(6):355-361, 2003.
  26. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 6: 3051-3064, 1992.
  27. Lee, K.H., Lin, Y.M., Wu, T.S., Zhang, D.C., Yamagishi, T., Hayashi, T., Hall, I.H., Chang, J.J., Wu, R.Y., Yan, T.H. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. Planta Med. 54(4):308-311, 1988.
  28. 박신화, 조경희, 손윤희, 임종국, 남경수. 발암과정 생화학적 표식자를 이용한 하교초 약침액의 암예방 활성 측정. 생약학회지 32(2):163-167, 2001.
  29. 이은옥, 김성훈. 하교초 ethyl acetate분획의 U937세포에 대한 세포괴사 유도효과. 동의생리병리학회지 17(2):293-296, 2003.
  30. 손윤희, 이기택, 박신화, 조경희, 임종국, 남경수. 참이차 및 꿀풀하교초에 의한 NAD(P)H:quinone reductase와 glutathione S-transferase의 유도. 생약학회지 32(4):269-273, 2001.
  31. 정병운, 정지천. 하교초가 고지방 식이에 의해 유발된 비만에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 23(3):386-395, 2002.
  32. 裴恩禧, 姜成吉. 足三里 및 脾俞의 夏枯草水鍼이 甲狀腺機能亢進 癩癧에 미치는 影響. 慶熙醫學, 8(1):57-66, 1992.
  33. 高仁玆, 劉承兆, 李殷芳. 한국산 하교초류의 약물학적 연구 (I), 소염작용에 대하여, 생약학회지 17(3):232-241, 1986.



34. 황금희. 하고초의 Monoamine Oxidase 저해활성. 생약학회지 37(3):157-161, 2006.
35. 김선희, 안덕균. 하고초의 기원에 관한 문헌적 고찰. 본초학회지 2(1):127-133, 1987.
36. 李兪燮, 韓相源. 꿀풀과 및 땃싸리 夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. 대한침구학회지 14(1):494-502, 1997.
37. Casey, L.C., Balk, R.A., Bone, R.C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med. 119: 771-778, 1993.
38. Wogensen, L., Jensen, M., Svensson, P., Worsaae, H., Welinder, B., Nerup, J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1 $\beta$  in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. Eur J Clin Invest. 23: 311-319, 1993.
39. Takabayashi, T., Shimizu, S., Clark, B.D., Beinborn, M., Burke, J.F., Gelfand, J.A. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. Surgery. 135(5):544-554, 2004.