金銀花 및 金銀花全草가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향

이동언 · 이재령 · 김영우 · 권영규 · 변성희 · 신상우 · 서성일[1] · 권택규[1] · 변준석 · 김상찬*

대구한의대학교 한의학과, 1 : 계명대학교 의과대학

Inhibition of Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF-α, IL-1β and COX-2 Expression by Flower and Whole Plant of *Lonicera japonica*

Dong Eun Lee, Jae Ryung Lee, Young Woo Kim, Young Kyu Kwon, Sung Hui Byun, Sang Woo Shin, Seong Il Suh[1], Taeg Kyu Kwon[1], Joon Seok Byun, Sang Chan Kim*

College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1: College of Medicine, Keimyung University

Lonicerae Flos has antibacterial effects against Staphylococcus aureus, streptococci, pneumococci, Bacillus dysenterii, Salmonella typhi, and paratyphoid. It is an antiviral agent. The herb has a cytoprotective effect against CCl_4-induced hepatic injury. It has antilipemic action, interfering with lipid absorption from the gut. Nowadays this herb is used mainly in the treatment of upper respiratory infections, such as tonsillitis and acute laryngitis. It is also used in the treatment of skin suppurations, such as carbuncles, and to treat viral conjunctivitis, influenza, pneumonia, and mastitis. Lonicerae Flos is dried flower buds of *Lonicera japonica, L. hypoglauca, L. confusa, or L. dasystyla*. But, for the most part, we use whole plant of *Lonicera japonica*, as a flower bud of it. And, little is known of the original copy of effects of whole plant, except for the '*Bon-Cho-Gang-Mok*', which is written the effects of flower of *Lonicera japonica* are equal to effects of leaves and branch of it. The present study was conducted to evaluate the effect of flower and whole plant of *Lonicera japonica* on the regulatory mechanism of cytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) for the immunological activities in Raw 264.7 cells. In Raw 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to mimic inflammation, flower and whole plant of *Lonicera japonica* water extracts inhibited nitric oxide production in a dose-dependent manner and abrogated iNOS and COX-2. Flower and whole plant of *Lonicera japonica* water extract did not affect on cell viability. To investigate the mechanism by which flower and whole plant of *Lonicera japonica* water extract inhibits iNOS and COX-2 gene expression, we examined the on phosphorylation of inhibitor κBα and assessed production of TNF-α, interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6). Results provided evidence that flower and whole plant of Lonicera japonica inhibited the production of IL-1β, IL-6 and activated the phosphorylation of inhibitor κBα in Raw 264.7 cells activated with LPS. These findings suggest that flower and whole plant of Lonicera japonica can produce anti-inflammatory effect, which may play a role in adjunctive therapy in Gram-negative bacterial infections, respectively.

Key words : Lonicerae Flos, Nitric oxide, iNOS, TNF-α, IL-1β, COX-2

서 론

Macrophage (대식세포)는 자연면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관

* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247
· 접수 : 2005/01/24 · 수정 : 2005/02/25 · 채택 : 2005/03/25

여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 reactive oxygen species (ROS) 와 interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) 및 interleukin-6 (IL-6)와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다[1,2]. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 IL-1β, TNF-α 및 nitric oxide (NO)는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다[3-6]. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 가능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 Polygonum tinctotium[7], Melia azedarach[8], Cyperus rotundus[9,10], Cudrania tricuspidata[11], Farfarae Flos[12], 當歸[13] 등의 한약에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

金銀花는 *Lonicera japonica, L. hypoglauca, L. confusa,* 혹은 *L. dasystyla*의 花蕾이며[14], 우리나라에는 주로 *Lonicera japonica*가 많이 분포되어 있다[15]. 金銀花는 주로 扁桃腺炎, 喉頭炎과 같은 상기도감염의 치료에 사용되고, 또한 癰, 疔과 같은 皮膚化膿症[16] 그리고 바이러스성 결막염, 인플루엔자, 폐렴 등에 사용된다[17]. 또한, 金銀花는 CCl_4로 유발된 간손상에 대하여 cytoprotective 효과[18]를 나타내고, 또한 腸의 지방흡수에 관여하여 antilipemic action을 나타낸다[17].

金銀花에 대한 연구로, 강 등[19]은 金銀花의 methanol추출액이 수종의 그람양성 및 그람음성균에 항균작용이 있음을 보고하였고, 황[20]은 金銀花의 phenol성 성분을 단리하여 5종의 인체암세포에 적용하여 quercetin에서 항암활성이 있는 것으로 보고하였으며, Lee 등[21]은 金銀花의 BuOH분획이 mouse ear 부종 및 CGN-paw 부종실험에서 prednisolone보다는 약하지만, 용량의 존적으로 부종을 개선시킴을 보고하였다. 또한 Chang 등[22]은 金銀花의 tannin성분이 human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity (HIV-1 RT)를 저해한다고 보고하였으며, Tae 등[23]은 Lonicera japonica의 추출물이 proteinase-activated receptor-2를 매개하여 paw 부종 또는 vascular permeability를 감소시킴을 보고하였고, Lee 등[24]은 Lonicera japonica flower의 물추출물이 LPS로 유도된 rat liver sepsis에서 NFκB p65의 활성억제와 IκBα의 degradation억제를 통하여 항염증효과를 나타냄을 밝혔으나, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS)등의 염증관련단백질 및 cytokine에 대한 연구는 부족한 실정이다.

또한, 우리나라 한약재 시장에서는, 일반적으로 忍冬 莖·葉·花의 혼합물이 金銀花로 많이 유통되고 있는 현실이며, 忍冬 莖·葉·花의 혼합물과 金銀花간의 비교연구는 전무한 상황이다. 이러한 문제에 대하여, 고전에서도 <本草綱目>[25]에서의 "忍冬 莖葉及花 功用皆同"이라는 記載외에는 이를 지적한 내용은 거의 없는 실정이며, 또한 이를 객관적으로 규명한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

이에 저자는 金銀花 및 忍冬 莖·葉·花의 혼합물이 LPS로 활성된 Raw 264.7 cell의 NO의 생성량, iNOS, COX-2의 발현 및 IL-1β, TNF-α 등의 cytokine에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

金銀花와 忍冬 莖·葉·花 (Youngnam, Daegu, Korea)는 각각 300g을 물 5L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거어즈로 1차 여과하고 3000×g에서 3분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 0.2 μm filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하고 사용 때까지 -20℃에서 보관하였다. 金銀花(FLE; flower of lonicera extract) 와 忍冬 莖·葉·花(WPE; whole plant extract)의 수율은 각각 20.0, 20.3%였으며 실험에서는 EMEM에 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 (USA), Cayman (USA), Zymed (USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (USA)에서 구입하였다. TNF-α와 IL-1β의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (서울)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 FLE와 WPE를 농도별로 처치하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml의 농도로 FLE와 WPE를 처치하고 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 배양후 세포에 0.5 ㎎/㎖의 MTT 50㎕를 처치하고, 4시간 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO 50㎕에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

Viability (% control)
= 100×/(absorbance of treated sample)/(absorbance of control).

5. NO생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였

다. 간략하게 설명하면 6 well plate에 cells (1×10^6/ml)을 분주하고 FLE 및 WPE를 각각 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml을 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS처치 후 6, 12, 18, 24시간에 세포배양 상등액 100 ㎕를 취하여, Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H_2O) 100 ㎕와 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, Austria)로 흡광도를 측정하였다. NO_2^-의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

20mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 25mM b-glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer (100ϕ dish당 80㎕)를 가하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000×g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. iNOS와 COX-2의 발현은 antimouse iNOS, COX-2 antibodies를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, anti p-I-kBα antibody를 사용하여 p-I-kBα protein을 측정하였다. 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse와 anti-goat antibody를 사용하였다. iNOS와 COX-2, p-I-kBα protein의 band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham, USA)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다.

7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (1×10^6/ml)을 분주하고 FLE 및 WPE를 각각 1.0, 3.0 mg/ml을 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치후 6시간에 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정전까지 -70℃에서 보관하였다. TNF-α와 IL-1β는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

실험결과

1. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 cell에서 FLE와 WPE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 FLE 및 WPE를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control 군에 비교하여 NO의 생성량이 처리시간 의존적으로 증가하였으며, FLE 및 WPE를 각각 1.0, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 12h, 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, FLE 및 WPE 각각 0.1과 0.3 mg/ml을 처리한 실험군에서는 실험시간 내에 유의한 NO생성억제를 나타내지 못하였다. (Fig. 1).

2. Raw cell의 생존율에 미치는 영향

FLE 및 WPE가 1.0 및 3.0mg/ml (12h, 18h, 24h)의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, FLE 및 WPE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, FLE 및 WPE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. 실험결과 FLE와 WPE의 1.0 및 3.0mg/ml농도는 LPS에 비교하여, 6~24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 2).

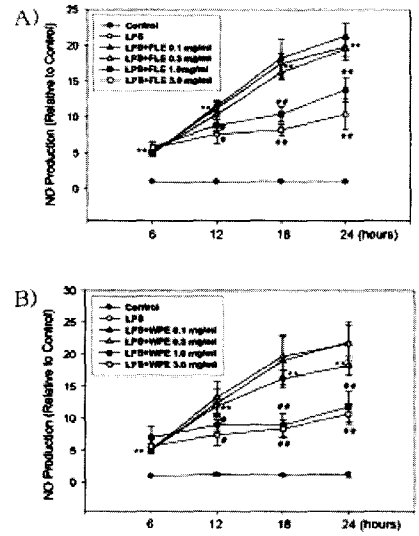

Fig. 1. Effects of FLE(A) and WPE(B) on the production of NO in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml of FLE and WPE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cells were further incubated for 6~24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman-Keuls test (significant as compared to Control, **P < 0.01, significant as compared to LPS alone, #P < 0.05, ##P < 0.01).

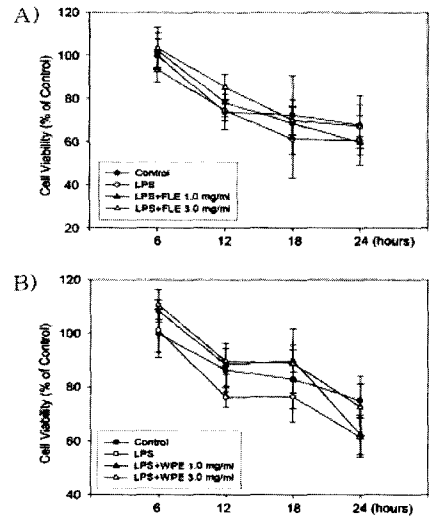

Fig. 2. Effects of FLE(A) and WPE(B) on the cell viability in LPS stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with 1.0, 3.0 mg/ml of FLE and WPE dissolved in EMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cells were further incubated for 6~24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. Data represent the mean ± S.D. with eight separate experimets.

3. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향

NO 생성 억제기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 줄어들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 iNOS단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

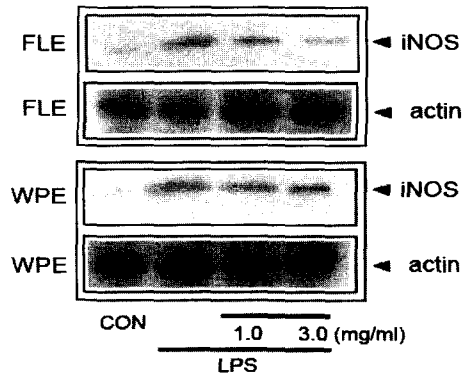

Fig. 3. Effect of FLE and WPE on the induction of iNOS by LPS. Inhibition of FLE and WPE on LPS-stimulated iNOS protein expression. The level of iNOS protein expression was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1μg/ml) with or without FLE and WPE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

4. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 COX-2발현에 미치는 영향

Prooxidant나 proinflammatory stimuli에 의해 MEKK-1, NFκB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin 합성을 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다[26,27]. 본 실험에서 LPS처치시에는 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 줄어들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 더욱 현저히 줄어 들어, LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 COX-2 단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

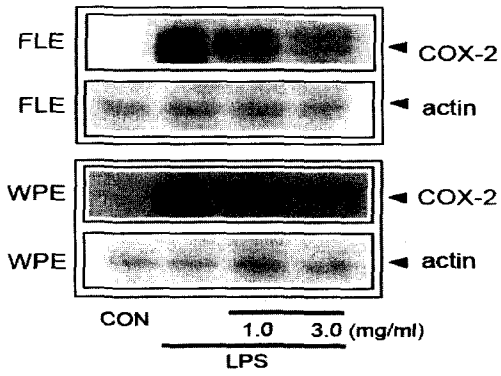

Fig. 4. Effect of FLE and WPE on the induction of COX-2 by LPS. Inhibition of FLE and WPE on LPS-stimulated COX-2 protein expression. The level of COX-2 protein was monitored 18h after treatment of cells with LPS (1μg/ml) with or without FFE and WPE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

5. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 p-IκB발현에 미치는 영향

Virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되는 NFκB는 iNOS나 TNF-α유전자의 발현에 관련된다[28]. Resting cell에서 NFκB는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 IκBα, IκBβ, IκBε, p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NFκB signaling cascade가 활성화되면, NFκB가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, BclXL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. IκB protein의 종류중, 가장 풍부한 NFκB의 inhibitory protein은 IκBα이다[29]. 본 실험에서는 IκBα의 phosphorylated form을 측정하였다. LPS처치시에는 p-IκBα 단백질이 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 p-IκBα의 량이 줄어들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 p-IκBα의 량이 더욱 현저히 줄어 들어 LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 p-IκBα 단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5)

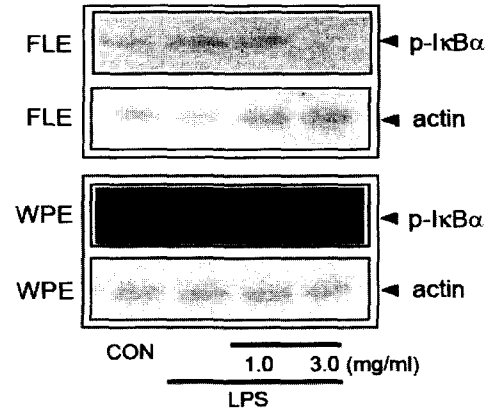

Fig. 5. Effect of FLE and WPE on the induction of p-IκBα by LPS. Inhibition of FLE and WPE on LPS-stimulated p-IκBα protein expression. The level of p-IκBα protein was monitored 15min after treatment of cells with LPS (1μg/ml) with or without FLE and WPE pretreatment (i.e. 1h before LPS)

6. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 TNF-α에 미치는 영향

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다[28]. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다[30]. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, FLE 및 WPE는 1.0 과 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 TNF-α의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다 (Fig. 6).

7. Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 IL-1β에 미치는 영향

IL-1β는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNFα, IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다[30]. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, FLE 및 WPE는 1.0 과 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1β의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다 (Fig. 7).

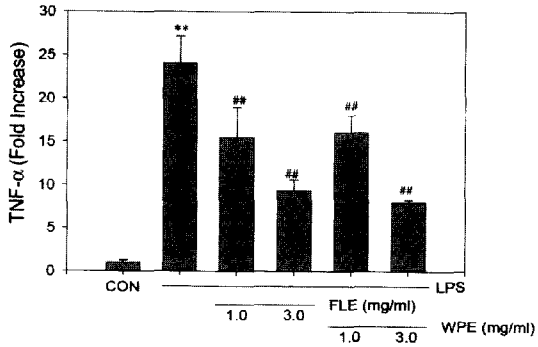

Fig. 6. The effect of FLE and WPL on LPS-stimulated TNF-α production. Production of TNF-α was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of FLE and WPE for 6 h. The amount of TNF-α was measured by immunoassay as described in experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman - Keuls test (*: significant as compared to control, **P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01)

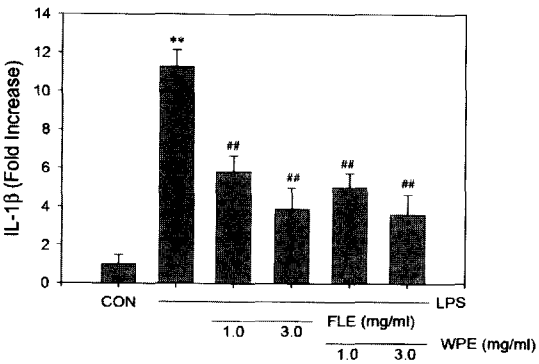

Fig. 7. The effect of FLE and WPL on LPS-stimulated IL-1β production. Production of IL-1β was measured in the medium of Raw264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of FLE and WPE for 6 h. The amount of IL-1β was measured by immunoassay as described in experimental procedures. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by Newman - Keuls test (*: significant as compared to control, **P < 0.01, #: significant as compared to LPS alone, ##P < 0.01)

고 찰

金銀花는 *Lonicera japonica, L. hypoglauca, L. confusa,* 혹은 *L. dasystyla*의 花蕾이며[14], 주로 편도선염, 후두염과 같은 상기도감염의 치료에 사용되고, 또한 癰, 疔과 같은 피부화농증[16] 그리고 바이러스성 결막염, 인플루엔자, 폐렴 등에 사용된다[17].

金銀花에 대한 연구로는, 강 등[19]은 金銀花의 methanol추출액이 수종의 그람양성 및 그람음성균에 항균작용이 있을 보고하였으며, 정 등[31]은 金銀花의 ethyl acetate분획이 세포분열 및 세포성장에 관여하여 그 작용을 촉진시킴을 보고하였고, Chang 등[22]은 金銀花의 tannin성분이 human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity (HIV-1 RT)를 저해한다고 보고하였다. Chang 등[32]은 金銀花에서 분리한 ochnaflavone이 흰 쥐의 혈소판에서 phospholipase A2를 저해함을 보고하였고, 박[33]은 金銀花의 EtOAc분획이 과산화지질생성을 억제함을 보고하였고, 홍 등[34]은 金銀花와 포공영추출물이 첨가된 치약은 치면세균막의 형성을 감소시킴을 보고하였다.

金銀花의 독성연구로는, 강[19] 등이 金銀花추출물을 생쥐에 1~3g/kg투여한 후 72시간까지 관찰한 결과 사망의 례가 없음을 보고하였고, 한 등[35]은 金銀花에 물과 유기용매 (ether, ethyl acetate 및 hexane)를 사용하여 추출한 추출물을 흰 쥐의 섬유모세포에 적용하여 세포독성을 조사한 결과, 물분획에서만 독성이 있었을 뿐 유기용매로 추출한 추출물에서는 독성이 매우 미약함을 보고하였다.

金銀花의 성분연구에 대하여서는 심 등[36]이 ginnol, sterol, glycoside를 보고하였으며, Wang 등[37]은 chlorogenic acid, flavonoid 및 tannin을 분리하여 이들이 그람 양성 및 음성균에 대하여 항균작용을 나타냄을 보고하였고, 손 등[38]은 triterpenoid saponin류를 분리하였으며, Mathida 등[39]은 金銀花의 경엽으로부터 새로운 4종의 iridoid glycosides를 분리하였고, Wang 등[40]은 27가지의 monoterpenoids와 30가지의 sesquiterpenoids불질을 분리하였고, 이때 발견된 주 구성물질은 정유성분으로 linalool, geraniol, aromadendrene, eugenol 등임을 보고하였다. 또한 박[33]은 金銀花의 EtOAc분획에서 8가지 종류의 flavonoid성분, 즉 hydnocarpin, quercetin, astragalin, isoqueritrin, rhoifolin, ruteolin, apigenin, lonicerin을 분리하였으며, 이중 비교적 다량으로 얻어진 7종의 flavonoids을 이용하여 항염증작용, 항산화작용을 검토하여 그 효능과 기전을 밝혔다. Kawai 등[41]은 *Lonicera japonica*에서 aglycone을 가진 oleanolic acid와 hederagenin구조가 있는 saponin을 분리하였으며 다량의 iridoid glycoside, 즉 loganin, secoxyloganin, secologanin dimethyl acetal, vogeloside, epivogeloside를 분리하였고, Kwak 등[42]은 *Lonicera japonica*로부터 새로운 triterpenoid saponin인 loniceroside C를 분리하였고, 이의 항염증효과를 croton oil에 의한 mouse의 ear edema를 개선시킴을 통하여 보고하였다.

또한 金銀花의 항암작용에 대한 연구로는 Rim 등[43]은 金銀花의 ethanol추출액이 항암작용을 가짐을 보고하였고, 황[20]은 金銀花의 phenol성 성분을 단리 (isolation)하여 5종의 인체암세포 (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15)에 적용하여 quercetin에서 항암활성이 있는 것으로 보고하였으며, 김 등[44]과 한 등[45]은 金銀花 ethyl acetate 가용성 분획에서 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암효과를 연구하였으며, 정 등[46]은 金銀花의 EtOAc분획이 2-aminofluorene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 4-nitro-O-phenylenediamine과 같은 mutagen에 의한 돌연변이와 종양생성등을 억제한다고 보고하였다.

金銀花의 염증 또는 부종관련 연구로는, Lee 등[21]은 金銀花의 BuOH분획이 mouse ear edema 및 CGN-paw edema실험에서 prednisolone보다는 약하지만, 용량의존적으로 부종을 개선시킴을 보고하였으며, Tae 등[23]은 Lonicera japonica의 추출물이 proteinase-activated receptor-2를 매개하여 paw edema 또는 vascular permeability를 감소시킴을 보고하였고, Lee 등[24]은 Lonicera japonica flower의 물추출물이 LPS로 유도된 rat liver sepsis에서 NFκB p65의 활성억제와 IκBα의 degradation억제를 통하여 항염증효과를 나타냄을 밝혔으나, COX-2, iNOS등의 염

증관련단백질 및 cytokine에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 열수추출된 金銀花 (FLE)와 忍冬 莖 · 葉 · 花의 복합물 (WPE)이 LPS로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표들에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

산화질소 (nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다[47]. Inducible NOS (iNOS)는 염증시 대량으로 생성되고, constitutively expressed NOS (cNOS)는 저농도에서 생리적으로 작용한다[48]. NOSs는 constituent NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, cNOS 에는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endotherial constitute NOS (ecNOS)로 이러한 cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor-α (TNFα)등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 장시간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다[7,8,11,49,50]. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

Raw 264.7 cell에서 FLE와 WPE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 FLE 및 WPE를 0.1, 0.3, 1.0, 3.0mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성량이 처리시간 의존적으로 증가하였으며, FLE와 WPE를 1.0 ~ 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 12h, 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으나, FLE와 WPE을 0.1 ~ 0.3 mg/ml 처리한 실험군에서는 실험시간내에 유의한 NO생성억제를 나타내지 못하였다.

FLE와 WPE가 1.0 및 3.0mg/ml (12h, 18h, 24h)의 농도 및 시간에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, FLE와 WPE의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하였는지를 관찰하기 위하여, FLE와 WPE의 농도별 시간별 정도에 따라, MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험결과 FLE와 WPE의 1.0 및 3.0mg/ml농도는 6~24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

다음으로는, NO 생성 억제기작에 관한 iNOS단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot analysis를 이용하여 세포질내에서의 iNOS단백질의 발현량을 조사하였다. LPS처치시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 줄어 들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 더욱 현저히 감소하여, LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 iNOS단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

COX-2는 prooxidant나 proinflammatory stimuli (i.e. TPA, LPS, TNFα, ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NFκB의 활성화를 경유하여 생성되고, prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다[26,27]. 또 Monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인 IL-1β, TNF-α와 LPS, fibroblast growth factor등에 의해서 증가하고, glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현억제가 유도된다[51]. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료의 target molecule이 되고 있다[28].

본 연구에서 COX-2단백질은, LPS처치시 강하게 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 줄어들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 COX-2의 량이 더욱 현저히 줄어 들어 LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 COX-2 단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

iNOS나 COX-2의 발현에 관여하는 것으로 알려진 전사조절인자로는 NFκB, AP-1, C/EBP등이 있으며[28], 이들 중 대표적인 전사조절인자는 NFκB이다[52]. NFκB는 cell apoptosis의 억제, cell cycle regulation, oncogenesis등과도 관련이 있으며[29], virus나 bacteria 감염시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNFα유전자의 발현에 관련된다[28]. Resting cell에서 NFκB는 cytoplasm에서 inhibitory molecule인 IκBα, IκBβ, IκBε, p105, p100등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS나 Tat, Tax 등의 자극에 의해 NFκB signaling cascade가 활성화되면 IκB, p105, p100이 degradation되면서 NFκB가 핵으로 translocation하여 COX-2, iNOS, Bcl-XL, cIAPs 등의 전사를 유도한다. IκB protein의 종류는 IκBα, IκBβ, IκBε등으로 알려져 있지만, 세포에서 가장 풍부한 NFκB의 inhibitory protein은 IκBα이다[29].

본 실험에서는 IκBα의 phosphorylated form을 측정하였으며, LPS처치시에는 p-IκBα 단백질이 유도되었으나, LPS에 FLE 혹은 WPE 1.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 p-IκBα의 량이 줄어들었으며, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 p-IκBα의 량이 더욱 현저히 줄어들어 LPS와 FLE 혹은 WPE를 동시처리시 FLE와 WPE의 농도 의존적으로 p-IκBα 단백질의 량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 iNOS나 COX-2의 감소기작에, NFκB의 translocation이 FLE와 WPE에 의해 억제됨을 간접적으로 시사하는 것이라 할 수 있다.

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다[28]. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성염증성 반응과 관련되어 있다[30]. 본 실험에서 LPS는 TNF-α의 분비를 유의하게 촉진시켰으며, FLE 및 WPE는 1.0 과 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 TNF-α의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다.

한편, IL-1β는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNFα, IL-2, IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1β는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다[30]. 또한

IL-1은 septic shock[53], burn[54], 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury[55]의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide등의 매개물질합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다[56]. 본 실험에서 LPS는 IL-1β의 분비를 유의성 있게 증가시켰으며, FLE 및 WPE는 1.0 과 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 유의하게 IL-1β의 생성량을 줄였으며, 농도의존적인 감소를 나타내었다.

이러한 연구결과는 FLE 및 WPE가 NFκB의 억제단백질중의 하나인 IκBα의 phophorylation을 억제하여 NFκB가 핵안으로 translocation되는 기작을 억제하며, 그러한 결과로 NO, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6의 감소가 초래되는 것을 의미하며, FLE와 WPE는 적어도 gram-negative bacterial infection에 의한 염증반응에는 같은 기전을 통해, 염증관련지표들을 억제함을 알 수 있다.

결 론

金銀花(FLE) 및 忍冬 莖·葉·花의 혼합물 (WPE)이 murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cell을 LPS로 활성화시킨 후 nitric oxide의 생성량, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 및 interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 사이토카인에 미치는 영향을 살펴본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

FLE 1.0, 3.0 mg/ml 및 WPE 1.0, 3.0 mg/ml을 처치한 실험군에서는 12h, 18h와 24h에서 유의성있게 NO의 생성을 억제하였으며, cell viability를 측정한 결과, FLE와 WPE의 1.0 및 3.0 mg/ml농도는 6~24시간 동안 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. LPS에 의하여 증가된 iNOS는, FLE과 WPE의 농도의존적으로 발현량이 감소되었으며, FLE 또는 WPE를 3.0 mg/ml 처치한 실험군에서는 iNOS의 량이 현저히 감소하였다. 또한, FLE와 WPE는 LPS로 증가된 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. LPS에 의해 유도된 p-IκBα는 FLE 혹은 WPE에 의해 농도의존적으로 감소되었으며, NFκB의 translocation이 FLE와 WPE에 의해 억제됨을 시사한다. TNF-α와 IL-1β는 LPS에 의해 유의성있게 증가되었으며, FLE와 WPE는 농도의존적으로 TNF-α와 IL-1β를 유의성 있게 감속시켰다.

이러한 결과로 보아, 金銀花(FLE) 및 忍冬 莖·葉·花의 혼합물(WPE)은 gram-negative bacterial infection에 의한 염증 또는, 과량의 NO 및 과량의 proinflammatory cytokine생성과 관련된 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Corbett, J.A. and Mac Daniel, M.L. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide syntheses. J. Exp. Med. 181, 559-568, 1995.
5. Cetkovic-Cvrlje, M. and Eizirik, D.L. TNF and IFNγ potentiate the deleterious effects of IL-1β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine, 6, 399-406, 1994.
6. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999.
7. 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, 217-226, 2000.
8. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol. 406, 301-309, 2000.
9. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S, K.Y. Chai, Kwon, T.O., Y.G. Yun, N.Y. Kim, H.T. Chung. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 76, 59-64, 2001.
10. 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 17(3):771-776, 2003.
11. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudrania tricuspidata on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol. 35, 21-28, 2000.
12. T.G. Yoon, B.H. Byun, T.K. Kwon, S.I. Suh, S.H. Byun, Y.K. Kwon, S.C. Kim. Inhibitory effect of Farfarae Flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide

production in lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 18(3): 908-913. 2004.

13. 장선일, 김형진, 황기명, 배현옥, 윤용갑, 정헌택, 갑윤철. 활성화된 설치류 RAW 264.7 대식세포에서 당귀에탄올 추출물의 항염증 효과. 대한한의학방제학회지. 10(2):189-197, 2002.
14. W. C. Evans. Trease and Evans Pharmocognosy (15th Ed). p 484. Saunders, London, 2002.
15. 나민균, 하티탄횡, 안인파, 이상명, 김영호, 이종필, 성락선, 이경순, 배기환. 金銀花의 품질평가. 생약학회지. 31(3): 340-344, 2000.
16. 이금택, 최병태, 이용태, 고우신. 자운고가 金銀花가 흰쥐의 창상에 미치는 효과. 진단학회지. 20(1):132-141, 1999.
17. Kee Chang Huang. The Pharmacology of Chinese herbs. (2nd Ed). p 260, 388-389. CRC, Boca Raton. 1999.
18. 박선관, 최병기, 이은방. 사염화탄소 유발 간독성에 대한 金銀花의 작용. 응용약물학회지. 10, 23-36, 2002.
19. 강옥희. 金銀花의 약리작용에 관한 연구. 우석대학교 석사학위논문. 1983.
20. 황윤정. 주엽나무잎 및 金銀花의 phenol성 성분. 충북대학교 석사학위논문. 1994.
21. S.J. Lee, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang and H.P. Kim. Antiinflammatory activity of Lonicera japonica. Phytotherapy research. 12, 445-447, 1998.
22. Chang, C.W., Lin, M.T., Lee, S.S., Liu, K.C., Hsu, F.L., Lin, J.Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-alpha activities by lignans isolated from Chinese herbs, Phyllanthus myrtifolius Moon, and tannins from Lonicera japonica Thunb and Castanopsis hystrix. Antiviral Res. 27(4):367-374, 1995.
23. Tae, J, Han, S.W., Yoo, J.Y., Kim, J.A., Kang, O.H., Baek, O.S., Lim, J.P., Kim, D.K., Kim, Y.H., Bae, K.H., Lee, Y.M. Anti-inflammatory effect of Lonicera japonica in proteinase-activated receptor 2- mediated paw edema. Clin Chim Acta. 330(1-2):165-171, 2003.
24. 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-kappa B alpha degradation in rat liver. Int J Mol Med. 7(1):79-83, 2001.
25. 陳貴廷. 本草綱目通釋(上). p 1129. 學苑出版社. 北京. 1992
26. Surh, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. Food Chem Toxicol. 40(8): 1091-1097, 2002.
27. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down- regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. 480-481, 243-268, 2001
28. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-κBα phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. British journal of pharmacology. 139, 11-20, 2003.
29. 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.
30. 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.
31. 정규찬, 권동린, 백석환, 김성한, 장현욱. 金銀花(Lonicerae flos)의 ethyl acetate분획이 돌연변이 원성에 미치는 영향. 대한약학회지. 32, 328-333, 1988.
32. Chang, H.W., Baek, S.H., Chung, K.W., Son, K.H., Kim, H.P. and Kang, S.S. Inactivation of phospholipase A2 by naturally occuring biflavonoid, ochnaflavone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 843-849, 1994.
33. Park, J.O. Study on the inhibition of lipid peroxidation by Lonicerae Flos' EtOAc fraction., Department of Pharmacy Graduate School, Yeungnam University. MS thesis. 1989.
34. 홍석진, 최유진, 임희순, 손재범, 정성숙. 金銀花와 포공영추출물이 첨가된 치약의 치면세균막 및 치은염에 미치는 영향. 대한구강보건학회지. 25(4):347-355, 2001.
35. 한두석, 한종현, 백승화, 김일광. 金銀花 추출물의 세포독성에 관한 연구. 원광한의학. 3, 23-32, 1993.
36. Sim, K.S., Moon, C.K., Ryu, C.K., Cheon, I.S., Chung, J. H. and Park, D.S. Ginnol, steroids and glycosides from Lonicerae Flos. Yakhak Nonminjip. Seoul Univ. Press, 4, 79, 1979.
37. Wang, L., Yee, L. Studies on the components of the flowers of Lonicera japonica Thumb, and their antibacterial activities. Hsiang-kang Ch'in Huk Hsue Than Pao. 8, 1115, 1981.
38. Son K.H., Jung K.Y. Chang H.W., Kim H.P. and Kang S.S. Triterpenoid saponins from the aerial parts of Lonicera japonica. Phytochemistry. 35, 1005-1008, 1994.
39. Machida K, Sasaki H, Iijima T, Kikuchi M. Studies on the constituents of Lonicera species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of Lonicera japonica THUNB. Chem Pharm Bull. 50(8):1041-1044, 2002.
40. Wang, G., Zhu, X., Wang, J., Jia, W., Yuan, Y., Nan, P. and Yuan, P. Analysis of chemical constituent of essential oil in Lonicera japonica Thumb. cultivated on the northern plain

of Henan Province. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih. 17, 268-270, 1992.

41. Kawai, H., Kuroyanagi, M., Umehara, K., Ueno, A. and Satake, M. Studies on the saponins of Lonicera japonica Thumb. Chem. Pharm. Bull. 36, 4769-4775, 1998.
42. Kwak, W.J., Han, C.K., Chang, H.W., Kim, H.P., Kang, S.S., Son, K.H. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from Lonicera japonica. Chem Pharm Bull. 51(3):333-335, 2003.
43. Rim, B.M., Rim, C.W., Choi, J.Y., Chung, Y.S. and Jeong, H.G. Effects of Lonicera Japonica extract as a biological response modifier. Envirin. Mut. Car. 12, 45-54, 1992.
44. 김경진, 한두석. 金銀花 가용성 ethyl acetate 소분획의 인체 구강유상피암종세포에 대한 항암효과. 원광치의학. 8(2): 31-41, 1998.
45. 한두석, 백경현, 김영옥, 최규은, 곽정숙, 백승화. 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제6보). 金銀花 ethyl acetate 가용성 분획의 인체 구강유상피암종세포에 미치는 세포독성작용. 생약학회지. 29(1):22-27, 1998.
46. Chung, K.C., Kwon, D.Y., Baek, S.H., Kim, S.H. and Chang, H.W. Effect of Lonicerae Flos' ethyl acetate Fraction on Mutagenicity. Yakhak Hoeji. 32, 328-333, 1988.
47. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 333, 664-666, 1988.
48. Kubes, p. Inducible nitric oxide synthase; a little bit og good in all of us. Gut. 47, 6-9, 2000.
49. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 69, 625-635, 2001.
50. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of Rhodiola sachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 76, 119-123, 2001.
51. Linton, M.F., Fazio, S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Pharmacol. 4(2):116-123, 2004.
52. 박혜준, 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신. 오미소독음이 마우스 복강 대식세포에서 NO의 분비과정에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 16(2):921-927, 2002.
53. 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.
54. Wogensen, L., Jensen, M., Svensson, P., Worsaae, H., Welinder, B., Nerup, J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1β in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. Eur J Clin Invest. 23, 311-319, 1993.
55. Shito, M., Wakabayashi, G., Ueda, M., Shimazu, M., Shirasugi, N., Endo, M. et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. Transplantation. 63, 143-148, 1997.
56. 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.