

장뇌산삼의 NF-κB 억제를 통한 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과

안상현^{1,2} · 김진택^{1,2} · 신흥묵^{2,3*}

1: 동국대학교 한의과대학 해부학교실, 2: 생리학교실, 3: 동국대학교 한의바이오혁신사업단

Wild Ginseng Exerts Anti-inflammatory Effects via NF-κB inactivation in RAW 264.7 Cells

Sang Hyun Ahn^{1,2}, Jin Taek Kim^{1,2}, Heung Mook Shin^{2,3*}

1: Department of Anatomy, 2: Department of Physiology, Oriental Medicine College, 3: Oriental Medical Bio-Renovatio Institute, Dongguk University

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 are important inflammatory mediators that have been implicated in pathogenesis of inflammation and certain types of human cancers. The present study was designed in order to determine whether Wild ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer) could modulate IκB-kinase (IKK), iNOS and COX-2 gene expression and its immune responses in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 1 μg/ml). Wild ginseng extract dose-dependantly (0.5 - 2 mg/ml) decreased the LPS-induced IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression and its immune responses. Moreover, it inhibited nuclear factor (NF)-κB immune response by LPS. These data be likely to indicate that Wild ginseng may acts as inflammatory regulator and may be possible to develop a useful agent for inflammatory diseases.

Key words : Wild ginseng, RAW 264.7 macrophages, IKK, iNOS, COX-2, NF-κB, Inflammatory diseases

서 론

人蔘(*Panax ginseng* C.A. Mayer)의 기원은 산삼에서 유래하며 효능의 신비함과 수요의 증가에 따라 인위적으로 그 종자를 재배하기 시작하면서 오늘에 이르렀다. 건강의 유지는 물론 다양한 질병의 치료에 우수한 효과를 나타내어 예로부터 靈藥으로 여겨졌으며 그 모양이 사람을 닮았다고 하여 현재 人蔘으로 불리우고 있다. 인삼의 藥性은 微寒, 微溫하고 味는 甘, 微苦하며, 그 효능은 補五臟, 安定神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年 등이 알려져 왔다¹⁾. 인삼은 그 가공방법에 따라 홍삼, 백삼으로 분류되며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있는데, super oxide dismutase (SOD), catalase 활성 증가 및 지질과산화 억제 등을 통한 항산화 효과와 그 항산화 활성성분의 검색이 보고되고 있다^{2,4)}. 또 인삼의 사포닌 성분인 ginsenoside Rh1과 Rh2는 nitric oxide synthase (NOS) 매개 NO 생산을 억제하고

⁵⁾, 20(S)-protopanaxatriol은 nuclear factor kappa B (NF-κB)활성 저해를 통해 iNOS와 COX-2의 생성을 억제함이 보고되었다⁶⁾.

한편 장뇌산삼은 산삼 또는 인삼의 씨앗이나 묘종을 산에 파종하거나 이식하여 자연 상태에서 자라게 함으로서 인삼에서 볼 수 없는 다양한 약리성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 게다가 비료나 농약을 사용하지 않고 잔류 농약이나 중금속 등의 오염에 노출되지 않아 복용이 안전하며 천연 산삼에 버금가는 효능이 임상적으로 알려져 있다. 최근에는 질병의 예방과 치료차원에서 인삼보다 생체방어능이 우수한 장뇌산삼의 재배와 생산에 관심이 쏠리면서 비교적 활발한 연구가 진행되고 있다. 그 주요 내용은 잎의 항산화 활성⁷⁾과 당뇨유발 쥐에서의 지질과산화 및 항산화 효소활성에 미치는 영향⁸⁾, 장뇌산삼이 손상된 간 조직에서 TNF-α와 COX-2 분비 감소에 미치는 면역조직학적 연구⁹⁾ 및 그 증류약침의 apoptosis 유도¹⁰⁾에 대한 연구가 보고되었다. 또 인삼과 장뇌산삼의 비교 연구로는 생리활성 물질¹¹⁾, 페놀성 성분¹²⁾ 및 아미노산¹³⁾ 등의 비교가 보고된 바 있다. 그러나 지속적인 시료의 공급의 어려움과 외래종의 장뇌산삼이 국산 장뇌산삼으로 유통되는 등 시장의 혼란으로 인해 체계적인 효능의 연구가 미흡한 실정이다.

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

· E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2372

· 접수 : 2007/03/25 · 채택 : 2007/04/11

본 연구는 소백산에서 자연적으로 재배되고 있는 장뇌산삼의 항염증 효능을 조사하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서의 IκB kinase (IKK), iNOS 및 cyclooxygenase (COX)-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 또한 면역조직화학적 방법을 통하여 NF-κB p65, iNOS 그리고 COX-2 생성에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW 264.7 대식세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고, 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다.

2. 장뇌산삼 추출물의 제조와 투여

시료의 제조는 경북 영주시 풍기군의 소백산에서 채취한 약 10여년 근의 장뇌산삼 350 g를 증류수 500 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 추출액과 다시 3시간 재탕한 추출한 액을 모아 여과하였다. 여과한 추출액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압·농축한 후 동결 건조하여 36.60 g (수득율 10.46%)의 건조 추출물을 얻었다.

3. 염증반응 유도 및 장뇌산삼 추출물 처리

RAW 264.7 대식세포를 5×10⁵ cells/well을 6 well에 plating 하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(LPS, 1 µg/ml)를 2시간 처리하여 염증반응을 유도한 후 장뇌산삼 추출물 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다.

4. IKK, iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 측정

NF-κB 활성화에 관여하는 IKK, 염증효소인 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 양상을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다.

Table 1. The primer for IKK, COX-2, iNOS and β-actin mRNA

Primer	Primer sequences	Product (bp)	No. of cycles
IKK	sense 5' CCA CCC AGT TCC ACA AGT CT 3'	380	35
	antisense 5' CCT CCA CTG CGA ATA GCT TC 3'		
COX-2	sense 5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	35
	antisense 5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'		
iNOS	sense 5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense 5'-AGAAGTGGAGGTTACATGCTGGAGCC-3'		
β-actin	sense 5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

Abbreviation: IKK, IκB kinase; COX-2, cyclooxygenase-2; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

LPS로 NF-κB 활성을 유도한 다음 24시간동안 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma)를 사용하여 추출하고 UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK와 iNOS primer를 PCR machine으로 반응시켰다 (Table 1). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기 영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2 (Optima, USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 통해 비교하였다.

5. 면역조직화학적 반응 관찰

RAW 264.7 세포 5×10⁵ cells/well을 coating slide에 plating 하고 12시간 후에 LPS 1 µg/ml를 2시간 처리하여 염증반응을 유도한 후 장뇌산삼 추출물 1mg/ml을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 대식세포를 10% NBF에 10분간 고정하였다. Proteinase K (20 µg/ml, DAKO, USA)에 5분 동안 proteolysis를 실시하고 특이적 면역반응을 억제하기위해 blocking serum인 10% normal goat serum에서 12시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-NF-κB p65 (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)와 mouse anti-iNOS (1:100, Santa Cruz Biotech.), mouse anti-COX-2 (1:100, Santa Cruz Biotech.)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, DAKO)에 실온에서 24시간동안 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex (ABC) kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하였다.

결 과

1. 장뇌산삼 추출물의 IKK mRNA 발현 및 NF-κB 활성화 억제

장뇌산삼 추출물은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS 처리에 의한 IKK mRNA 발현을 감소시켰다. 즉 0.5mg/ml에서 4.5±0.023%, 1mg/ml에서 11.8±0.02%, 1.5mg/ml에서 26.5±0.012% 그리고 2.0mg/ml에서 60.0±0.017%로 유의하게 농도 의존적 감소를 보였다 (Fig. 1-A). 면역조직화학적 관찰 결과, LPS 처리군에서의 NF-κB p65 양성반응은 증가하였는데, 주로 핵막 주변과 핵 내에서 강한 양성 반응을 보였다. 이에 반해 장뇌산삼 추출물은 1.0 mg/ml 처리 시 NF-κB p65 양성반응은 감소하였으며, 특히 핵 내에서 잘 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-B).

2. 장뇌산삼 추출물의 iNOS mRNA 발현과 생성 억제

LPS 처리 후 장뇌산삼 추출물의 처리는 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS mRNA 발현을 감소시켰는데, 0.5 mg/ml에서 6.7±0.02%, 1.0 mg/ml에서 8.6±0.04%, 1.5 mg/ml에서 24±0.02% 그리고 2 mg/ml에서 25.4±0.03%로 농도 의존적 감소를 보였다

(Fig. 2-A). 면역조직화학적 관찰 결과, LPS 처리에 의한 iNOS 양성반응이 세포질과 핵막주변에서 강하게 반응을 보였으며, 이러한 양성반응은 1.0 mg/ml의 장뇌산삼 추출물 처리에 의하여 현저히 감소하였다 (Fig. 2-B).

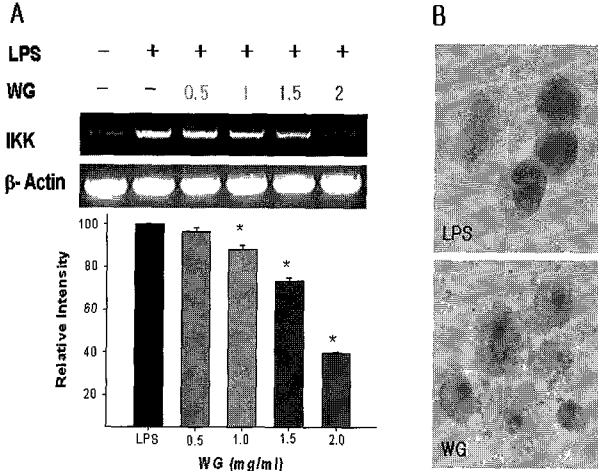


Fig. 1. Wild Ginseng (WG) Inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced IκB kinase (IKK) mRNA expression and immune reaction for nuclear factor (NF)-κB activation in RAW 264.7 macrophages. A. Inhibition of IKK mRNA expression. The LPS-induced IKK mRNA expression were dose-dependently decreased by WG treatment. B. Morphological changes in immune reaction for NF-κB p65. x1000. *, p<0.05 compared with LPS.

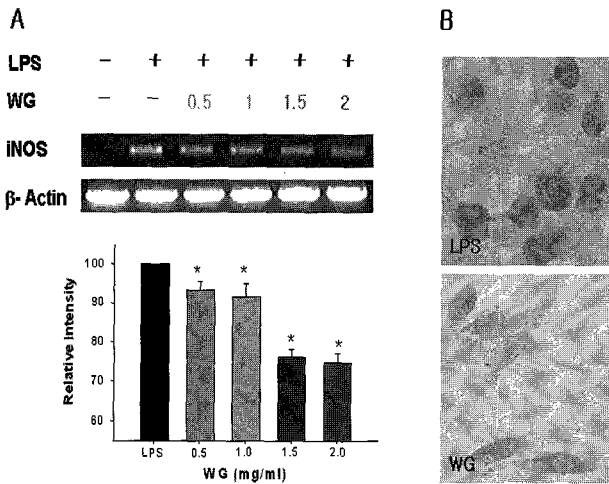


Fig. 2. WG inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression and immune reaction for iNOS in RAW 264.7 macrophages. A. Inhibition of iNOS mRNA expression. WG inhibits LPS-induced iNOS mRNA expression in dose-dependant manner. B. Morphological changes in immune reaction for iNOS. x1000.

3. 장뇌산삼 추출물의 COX-2 mRNA 발현과 생성 억제

장뇌산삼 추출물은 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포에서의 COX-2 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 즉 0.5 mg/ml에서 1.6±0.01%, 1 mg/ml에서 15.8±0.04%, 1.5 mg/ml에서 25.9±0.03%, 2 mg/ml에서 77.6±0.03%로 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 3-A). 또한 면역조직화학적 관찰에서도 LPS 처리에 의한 세포질과 핵막주변에서의 COX-2 양성반응은 장뇌산삼 추출물 1.0

mg/ml 처리에 의하여 현저히 감소하였으며 특히 세포질에서 잘 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-B).

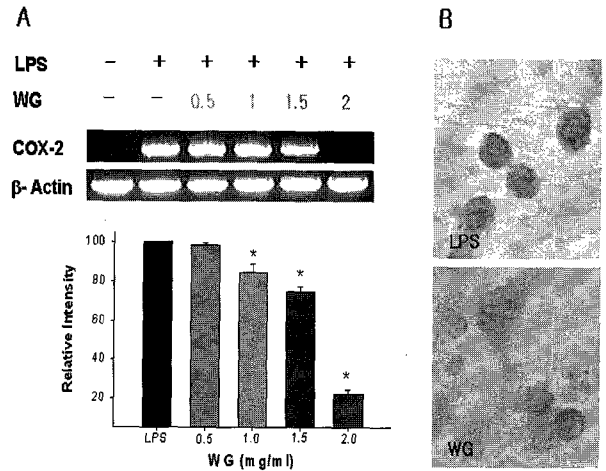


Fig. 3. WG Inhibits LPS-induced COX-2 mRNA expression and immune reaction for COX-2 in RAW 264.7 macrophages. A. Inhibition of COX-2 mRNA expression. The LPS-induced COX-2 mRNA expression were dose-dependently decreased with WG. B. Morphological changes in immune reaction for COX-2. x1000.

고찰

산삼의 일종인 長腦山蔘은 노두가 길게 자란다고 해서 붙여진 이름이다. 특별히 이의 기원에 대한 기록은 없으나 산삼 또는 인삼의 씨앗이나 어린 묘종을 산에 파종하거나 이식하여 자연 상태에서 재배한 것으로 인삼에 비하여 효능이 우수한 것으로 알려져 있다. 인삼의 기원은 산삼에서 유래하였으며 신비의 약효가 알려지면서 인위적으로 재배하게 되었고 그 모양이 사람을 닮았다고 하여 人蔘이라 명명하게 되었다. 장뇌산삼의 효능은 神農本草經¹⁾에 기재된 인삼의 補五臟, 安定神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年의 효능으로 유추할 수 있다. 그러나 산삼은 아직 그 품질이나 분류에 대한 정확한 관리와 체계적인 연구가 미흡한 실정이며 외래종이 국산 장뇌산삼으로 유통되는 등 시장의 혼란으로 소비자의 피해가 늘고 있다. 따라서 인삼과 장뇌산삼의 효능 등 비교연구를 통해 품질과 유통체계의 확립은 물론 국통의 ٪가 임야임을 비추어볼 때 재배기술의 보급을 통해 농가 고부가 산업으로 육성 발전시킬 가치가 인정된다.

본 연구는 약리 활성면에서 인삼보다 효과가 더 좋은 것으로 알려진 장뇌산삼이 RAW 264.7 대식세포에서 LPS 처리에 의한 NF-κB 활성화와 IKK, iNOS 및 COX-2의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

대식세포는 세균감염에 대한 숙주방어 기전에 중요한 역할을 수행하며, 가장 중요한 염증 cytokine의 근원이 된다. 염증성 반응이 있을 때 대식세포는 iNOS를 통한 NO를 생성하여 면역계의 방어기능 및 염증반응에 관여한다^{14,15)}. 본 실험에서 대식세포의 LPS의 자극은 iNOS 유전자 발현을 증가시켰으며 이는 장뇌산삼 추출물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였고, 면역조직화학적 관찰을 통하여 LPS에 의해 증가된 NO의 생성 역시 감소함을 알 수 있었다. 또한 유도성 동종효소 (inducible isoform)

로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에서 유도되고 prostaglandin을 분비하여 류마티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, helicobacter pylori 유도 위염 등 만성 염증질환이나 혈관신생에 관여한다^{16,17} LPS에 의한 대식세포 자극은 COX-2 유전자 발현을 증가시켰으며 이는 장뇌산삼 추출물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 나아가 면역조직화학적 관찰에서도 LPS에 의해 유도된 COX-2의 핵막주변부 세포질에서의 양성반응이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다.

한편 전사인자 NF- κ B는 p50 subunit family (p50, p52)와 p65 subunit family (p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성된다. NF- κ B는 정상 상태에서 그 inhibitor인 I κ B 단백질 (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl3)들과 결합한 불활성화 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokine (예, TNF- α , IL-1), bacterial/viral infection (예, LPS, dsRNA), stress (예, ROS, UV, adriamycin, 방사선)등의 다양한 자극에 의해 ERK1/2 (p42/44), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway를 통해 NF- κ B의 전사유도가 일어나는데^{18,21}, I κ B 단백질이 인산화 되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 표적 유전자의 NF- κ B 결합부위(consensus sequence: 5'-GGGPPuNNPyPyCC-3')에 결합하여 iNOS와 COX-2를 포함하는 많은 염증 cytokines의 발현을 조절한다^{22,24}.

I κ B의 인산화는 I κ B kinase로 알려진 IKK (IKK α , β)에 의해 일어나게 되는데, IKK α 는 초기 발생단계에서 피부나 골격의 형성에 관여하고^{25,26}, IKK β 는 염증반응이나 anti-apoptotic 유전자 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁷. 이와 같이 IKK에 의한 NF- κ B 활성의 조절은 발생, 면역반응 등의 정상 생리기능에도 중요하지만 염증성 질환, 암, 동맥경화 등 여러 질병들의 병리기전과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 비정상적인 NF- κ B의 활성화를 조절하면 퇴행성·난치성 질환의 발병이나 진행을 억제할 수 있어 의약품 개발의 표적으로 주목받고 있다. 이에 기초하여 최근에는 Curcuma longa²⁸, Rosmarinus officinalis²⁹, Cudrania tricuspidata³⁰, Cyperus rotundus³¹, Melia azedarach³², Lonicera japonica³³, Scrophularia buergeriana³⁴ 등 천연물로부터 NF- κ B 활성 조절 및 NO 저해를 통한 염증치료제 개발에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 실험에서 LPS 처리는 RAW 264.7 세포에서의 IKK 유전자 발현을 증가시켰으며, NF- κ B p65의 면역조직화학적 관찰에서도 핵막과 핵 내부에서 강한 양성반응 보여 NF- κ B 활성에 관한 이전 보고³⁵와 일치된 결과로 나타났다. 그러나 장뇌산삼 추출물의 처리는 LPS에 의해 증가된 IKK 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으며, NF- κ B p65의 면역조직화학적 결과도 핵막과 핵 내부에서의 양성반응을 현저하게 감소시켰다. 이러한 IKK 감소는 I κ B의 인산화 유도 억제로 이어져 NF- κ B는 불활성 상태로 남게 되고, 전사를 유도해야 할 NF- κ B의 불활성화에 의해 iNOS와 COX-2의 유전자 발현과 면역조직화학적 양성반응을 감소시킬 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 장뇌산삼은 LPS의 자극에 의하여 유도된 Raw 264.7 세포의 IKK, iNOS 및 COX-2 유전자 발현을 유의하게 감소시키는 효과를 확인할 수 있었다. 나아가 면역조직화학적 관찰에서도 LPS에 의해 유도된 NF- κ B의 활성 억제, iNOS 및 COX-2의 핵막주변부 세포질에서의 양성반응을 현저히 감소시킴을 확인하였다.

결론적으로 장뇌산삼 추출물은 LPS에 의한 IKK 유전자 발현을 저해하고 이는 NF- κ B 활성을 차단함으로써 염증효소 iNOS와 COX-2의 유전자 발현과 면역조직화학적 양성반응을 억제한 것으로 유추된다. 따라서 장뇌산삼은 다양한 염증성 질환의 예방과 치료제로서의 효능이 인정되며, 이에 관한 지속적인 연구가 기대된다.

결 론

장뇌산삼의 항염증효능을 확인하기 위하여 그 열수 추출물이 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서의 염증관련 cytokine에 미치는 영향을 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

장뇌산삼 추출물은 LPS의 처리에 의해 유도된 IKK의 유전자 발현과 면역조직화학적 NF- κ B 활성을 저해하였다. 장뇌산삼 추출물은 LPS의 처리에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2 유전자 발현과 면역조직화학적 양성반응을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로부터 장뇌산삼은 I κ B의 인산화를 억제하고 이는 NF- κ B 활성을 저해함으로써 염증에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현을 억제한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 동국대학교 한의바이오혁신사업단 연구과제의 결과이며, 연구에 사용된 장뇌산삼 시료를 제공해준 산하산삼연구소 안 대영 소장께 감사드립니다.

참고문헌

- 徐樹枬, 朱兵占. 神農本草經. 河北, 河北科學技術出版社. p 10, 1996.
- Lee, H.C., Hwang, S.G., Lee, Y.G., Sohn, H.O., Lee, D.W., Hwang, S.Y., Kwak, Y.S., Wee, J.J., Joo, W.H., Cho, Y.K., Moon, J.Y. In vivo effects of Panax ginseng extracts on the cytochrome P450-dependent monooxygenase system in the liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed guinea pig. Life Sci. 71(7):759-769, 2002.
- 성금수, 전철, 권용훈, 김경현, 장재철. 홍삼추출물 투여가 생쥐 간에서 항산화 효소 활성과 지질과산화에 미치는 효과. J Ginseng Res. 24(1):29-34, 2000.
- 김정선, 김규원, 최강주, 곽영규, 임광식, 이경희, 정해영. 홍삼 사포닌의 항산화활성 성분 Screening. Korean J Ginseng sci. 20(2):173-178, 1996.

5. Park, Y.C., Lee, C.H., Kang, H.S., Kim, K.W., Chung, H.T., Kim, H.D. Ginsenoside-Rh1 and Rh2 inhibit the induction of nitric oxide synthesis murine peritoneal macrophage. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40: 751-757, 1996.
6. Oh, G.S., Pae, H.O., Choi, B.M., Seo, E.A., Kim, D.H., Shin, M.K., Kim, J.D., Kim, J.B., Chung, H.T. 20(S)-protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor- κ B in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer Letters.* 205: 23-29, 2004.
7. Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Choi, H.D., Cho, H.Y. Antioxidant activities of cultivated and wild korean ginseng leaves. *Food Chemistry.* 92: 535-540, 2005a.
8. Jung, C.H., Seog, H.M., Choi, I.W., Choi, H.D., Cho, H.Y. Effects of wild ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 98(3):245-250, 2005b.
9. 안상현, 조성준, 윤창환, 조민경, 김진택, 신흥복. 장뇌산삼이 Benzopyrene으로 유도된 간조직의 TNF- α 와 COX-2의 면역조직학적 분포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(6): 1568-1572, 2005.
10. 폭경승, 이선구, 권기록. pH 및 전해질 조절 산양산삼 증류약 침의 apoptosis에 관한 실험적 연구. *대한침구학회지* 21(6):1-17, 2004.
11. Lee, H.J. Studies on the comparison of bioactive compounds and cell cultures of panax ginseng C.A. Meyer and mountain ginseng. MS Thesis, Ajou University, Korea. 2000.
12. Yoo, B.S., Lee, H.J., Byun, S.Y. Differences in phenolic compounds between korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnology and Bioengineering.* 15: 120-124, 2000.
13. Lee, H.J., Yoo, B.S., Byun, S.Y. Differences in free amino acids between korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnology and Bioengineering.* 15: 133-328, 2000.
14. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder S.H, Russell S.W, Murphy W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(22):7738-7742, 1985.
15. Belvisi, M., Barnes, P.J., Larkin, S., Yacoub, M., Tadjkarimi, S., Williams, T.J., Mitchell, J.A. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *Eur J Pharmacol.* 283(1-3):255-258, 1995.
16. Rothkötter, H.J., Pabst, R., Bailey, M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immuno immunopath.* 72: 157-165, 1999
17. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93(5):705-716, 1998.
18. Je, J.H., Lee, J.Y., Jung, K.J., Sung, B., Go, E.K., Yu, B.P., Chung, H.Y. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 566(1-3):183-189, 2004.
19. Chandrasekar, B., Marelli-Berg, F.M., Tone, M., Bysani, S., Prabhu, S.D., Murray, D.R. Beta-adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via beta2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(2):304-311, 2004.
20. Bozinovski, S., Jones, J.E., Vlahos, R., Hamilton, J.A., Anderson, G.P. Granulocyte/대식세포-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1 in vivo. *J Biol Chem.* 277(45):42808-42814, 2002.
21. Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sathe, S., Cicek, M., Casey, G., Sizemore, N. The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene.* 24(6):1021-1031, 2005.
22. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., Murphy, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(20):9730-9734, 1993.
23. Xie, Q.W, Kashiwabara, Y., Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 269(7):4705-4708, 1994.
24. Baeuerle, P.A. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 95: 729-731, 1998.
25. Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. Karin Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science.* 284: 316-320, 1999.
26. Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., Akira, S. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science.* 284: 313-316, 1999.
27. LiQ, Van Antwerp D., Mercurio F., Lee K.F., Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science.* 284; 321-325, 1999.

28. Pan, M.H, Yn, S., Lin-shiau, Lin, J.K. Comparative Studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and Its Hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1665-1676, 2000.
29. Lo, A.H., Liang, Y.C, Shoei-Yn Lin-Shiau, Ho, C.T., Lin, J.K. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating NF- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 23(6):983-991, 2002.
30. 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.
31. 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 extracts of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophages cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 76: 59-64, 2001.
32. 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 extractes from *Melia azedarach*. *Eur. J. Pharmacol.* 406: 301-309, 2000.
33. 이동언, 이재령, 김영우, 권영규, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 금은화 및 금은화전초가 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(2):481-489, 2005.
34. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 20(2):7-16, 2005.
35. Tan, C.M., Xenoyannis, S., Feldman, R.D. Oxidant stress enhances adenylyl cyclaseactivation. *Circ Res.* 77(4):710-717, 1995.