

한약조성물 KCNS-001이 자유라디칼과 염증매개인자에 미치는 영향

이정복¹, 최재환², 방옥선³, 유영범^{3*}

1: (주) 소니메디

2: (주) LG생활건강 기술연구원 후 한방피부과학연구소

3: 한국한의학연구원 뇌질환연구센터

Anti-inflammatory Effects of Herbal Formula KCNS-001 for Mitigating Atopic Dermatitis

Jeong-Bok Lee¹, Jae-Hwan Choi², Ok-Sun Bang³, Young-Beob Yu^{3*}

1: Sonimedi Inc

2: Oriental Herb Cosmeceutical R&D Center, LG Household & Healthcare Ltd/Research Park

3: Brain Disease Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : We determined the anti-inflammatory activity of KCNS-001 that is a herbal formula including 6 medicinal plants and that are used to mitigate atopic dermatitis in oriental medicine.

Methods : To evaluate anti-inflammatory effect of KCNS-001, we measured the production of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-activated Raw 264.7 cells. Cell viability was determined by MTT assay. The concentrations of ROS and relative level of NO were measured with DPPH assay and Griess reagent, respectively. COX-2 and TNF- α were detected by enzyme immuno assay (EIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results : ROS and NO production were reduced by KCNS-001 in a dose-dependent manner. KCNS-001 significantly inhibited activity of COX-2 and suppressed the release of tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Conclusions : These results indicate that the KCNS-001 may have an anti-inflammatory agent for the treatment of various inflammatory disease

Key words : KCNS-001(herbal formula), ROS, NO, COX-2, TNF- α , LPS, Raw 264.7

서론

선천성 면역반응을 담당하는 대식세포(macrophage)는 외인성 세균, 바이러스 등의 식균작용과 함께 염증매개물질들을 분비하는 역할을 한다. 대식세포의 염증매개물질로는 arachidonic acid cascade metabolites인 prostaglandin과 TNF- α 와 같은 cytokines, 산화질소, 활성산소(Reactive

Oxygen Species) 등이 알려져 있으며 류마티스 관절염, 천식, 아토피 등 염증성 질환에 관여한다. 1897년 아스피린(acetylsalicylic acid)이 출시된 이래 40여 종 이상의 소염진통제들이 개발되었으나, 위장관합병증, 심혈관계 안전성 등의 이유로 현재까지 US FDA에 승인되어 판매되는 것은 선택적 COX-2 (cyclooxygenase-2) 억제제인 Celecoxib가 유일하다¹⁾. Cyclooxygenase (COX)는 두 가지 이형(isoform)

* 교신저자 : 유영범, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원 뇌질환연구센터

· Tel : 042-868-9463 · E-mail : ybyu@kiom.re.kr

· 접수 : 2009년 8월 25일 · 수정 : 2009년 9월 18일 · 채택 : 2009년 9월 23일

인 COX-1, COX-2가 존재하며²⁾ arachidonic acid로부터 prostaglandin의 생성에 관여하는 효소이다. 비선택적 소염진통제(non-selective NSAID)들은 생리작용을 담당하는 COX-1의 억제로 위장관합병증 등을 유발하여 선택적 소염진통제(COX-2 selective NSAID) 개발의 가설을 제공하게 되었다³⁾. 외인적 요인에 의한 IL-4, 5, 13 등 cytokine 증가는 B cell을 활성화시키며, IgE 과량생산과 mast cell의 histamine 분비를 유도하게 된다^{4,5)}. Histamine 분비에 의한 가려움증은 피부장벽을 손상시켜 염증을 일으키는 물리적 요인을 제공한다. 피부를 물리적으로 보호하는 ceramide 장벽이 무너지면 glucosylceramide나 spingomyelin 등의 성분이 glucosylceramide spingomyelin deacylase 효소에 의해 염증매개의 중요 기전인 arachidonic acid cascade를 생성하는 원인이 된다⁶⁾.

KCNS-001은 윤 등⁷⁾에 의해 임상에서 유효한 것으로 보고된 아토피 1호방(습열형), 아토피 2호방(혈허풍조형) 및 아토피 3호방(유아기, 소아기)과 항염증, 항균, 소염감 개선 등의 효능이 알려진 본초 중 하수오, 작약, 금은화, 당귀, 계지 및 감초를 중심으로 재구성한 한방조성물이다. 이는 라멜라 액정으로 제형을 구성한 화장품의 예비적 임상에서 아토피 피부염의 개선효과가 관찰되었다. 본 연구에서는 KCNS-001의 약리적 특성을 알아보기 위하여 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)를 이용한 항산화 실험, 산화질소 억제활성, COX-2 억제활성, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 등의 염증관련 매개인자들을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 약물의 추출 및 제조

하수오, 작약, 금은화, 당귀, 계지 및 감초를 세절하여 추출용매(중류수:1,3-부틸렌글리콜 = 7:3)를 400 mL 첨가하고 실온에서 초음파추출기(SM30-CE, 소니메디)로 4시간 동안 추출 하였다. 1~50마이크로미터 크기의 캐트리리지(catridge)형 전처리 여과기를 통과시킨 후 분획분자량이 5,000~300,000달톤의 고분자로 이루어진 한외여과막으로 여과하여 최종 추출물을 얻었다. 이를 rotary vacuum evaporator를 이용해 용매를 전부 제거한 후, 동결건조하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition and Contents of KCNS-001

Korean name	Pharmaceutical name	Amount (g)
하수오	Polygoni multiflori Radix	12
작약	Paeoniae Radix	8
금은화	Lonicerae Flos	6
당귀	Angelicae gigantis Radix	6
계지	Cinnamomi Ramulus	2
감초	Glycyrrhizae Radix	2

2. DPPH에 의한 자유라디칼 소거능 평가

자유라디칼 소거능 평가법은 Blois의 방법⁸⁾에 준하여 실시하였다. 시료를 96 well plate의 각 well에 100 ul씩 넣고 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 용액을 100 uL씩 첨가한 다음 37°C에서 30분간 방치한 후 ELISA reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유라디칼 소거능은 다음 공식으로 계산하였다.

DPPH radical scavenging activity(%) [(AB-AT)/AB] × 100,
AB-absorbance of blank sample,
AT-absorbance of tested extract solution.

3. 세포생존율

Raw 264.7 cell을 96 well plate에 well당 1×10^4 개로 분주하고 24시간 동안 배양한 후 10, 50, 100 ug/mL 농도로 각 시료들을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 흡입하여 제거한 다음 PBS로 1회 세척하고, MTT 용액을 0.5 mg/mL의 농도로 100 uL씩 세포에 첨가하여 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양액을 흡입하여 제거한 다음 DMSO (dimethyl sulfoxide) 200 uL를 첨가하고 shaker에서 10분간 흔들려 준 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다⁹⁾. 세포독성평가는 다음 공식으로 계산되었다.

Cell viability(%) = AT/AC×100,
AC-absorbance of control,
AT-absorbance of tested extract solution.

4. 세포배양

쥐의 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 ATCC로부터 구입하였으며 10% inactivated fetal bovine serum (GIBCO)과 1% penicillin · streptomycin이 포함된 Dul-becco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 배양액으로 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

5. Nitric oxide (NO) 측정

약재 처리하기 전날 24 well plate에 5×10^5 /well 정도로 분주하고 다음날 오전에 배지를 serum free media로 교체한 후 약 8시간 starvation시켰다. 배양 media는 흡입한 후 fresh serum free media 500 ul/well을 넣고 약재를 농도별로 가한 후 LPS stock solution (100 ug/mL)을 2.5 ul/well 처리해주고 16시간 배양하였다. Media 상층액을 96 well plate에 100 ul를 옮기고 동량의 Griess reagent (100 ul)를 가하고 30분간 상온에서 배양한 다음 발색의 정도를 microplate reader의 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도(uM)는 NaNO₂ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6. Cyclooxygenase-2 (COX-2) 측정

LPS 처치 후 18시간에 Amersham Prostaglandin E2 Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) Kit (Amersham Cat No. RPN222)를 이용하여 COX-2의 양을 측정하였다. Kit에서 제공되는 stock 용액을 500 ml bottle에 옮긴 후 DDW로 volume을 조정하였다. Prostaglandin E2 conjugate 하기 위해 1X assay buffer 6 ml를 가하고 거품이 생기지 않게 잘 녹인 후 3 ml를 취해 3 ml의 assay buffer와 섞어 희석시켰다. Antibody는 1X assay buffer 6 ml로 희석시킨 후 거품이 생기지 않게 잘 녹여 2 ml를 취해 4 ml의 assay buffer에 희석시켰다. 1X assay buffer 3.9 ml에 Stock standard 100 ul를 섞은 후 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 pg으로 희석하여 goat-anti mouse IgG가 coating 된 96 well plate에 loading하였다.

7. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 측정

TNF-α는 LPS 처치 후 18시간에 적당량의 배지를 취하여 1/100로 희석하고, Diasource TNF-α ELISA Kit (Diasource Cat No. CMC3013) protocol에 따라 측정하였다. Antibody는 4~8°C에서 overnight (16시간 이상)하여 코팅하고, 상온에서 1시간 blocking 하였다. Sample detection antibody는 상온에서 2시간 반응시킨 후, mouse HRP 1시간 처리하였다. 기질(TMB sol) 100 ul를 처리한 후 20분간 암소에서 배양시켜 정지용액을 100 ul 처리해 주고 상온에서 30분 이내로 배양한 후 ELISA reader 450 nm에서 측정하였다.

8. 통계처리

모든 측정 결과는 3회 반복의 독립적인 실험에서 도출된 대표값의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다. 각 실험군간의 차이는 Graph Pad Prism program의 Student t-test를 수행하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. RAW 264.7 cell의 ROS 생성에 미치는 영향

LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 ROS 생성정도를 측정하기 위하여 KCNS-001 10, 25, 50, 100 ug/mL의 농도로 처리하여 생성되는 ROS 양을 측정하였다. LPS군에서는 control군에 비교하여 유의성 있게 증가하였으며, KCNS-001 처리군에서 유의하게 ROS 생성을 억제하였다(Fig. 1).

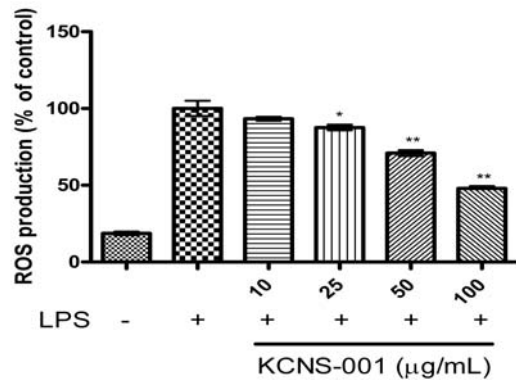


Fig. 1. Effect of KCNS-001 on LPS-induced reactive oxygen species production in RAW 264.7 macrophages

Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs LPS alone).

2. NO 생성에 미치는 영향

KCNS-001의 10, 50, 100 ug/mL을 처리한 Raw 264.7 cell에서 NO 생성억제 효과를 살펴 본 결과 27% (10 ug/mL), 59% (50 ug/mL) 및 62% (100 ug/mL)의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

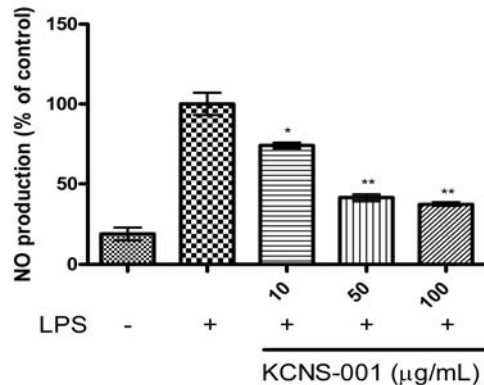


Fig. 2. Effect of KCNS-001 on LPS-induced nitric oxides production in RAW 264.7 macrophages

RAW 264.7 cells were treated with KCNS-001 and the cells were further incubated for 16 hr. The concentration of nitric oxide in culture medium were measured as described in the methods section. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs LPS alone).

3. 세포 생존율에 미치는 영향

KCNS-001에 의한 RAW 264.7 cell의 ROS 및 NO 생성감소가 세포독성에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 10, 50, 100 ug/mL로 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. 실험결과 대조군에 비하여 92% (50 ug/mL) 및 96% (100 ug/mL)의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 3).

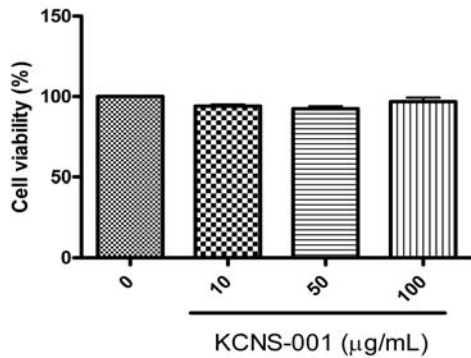


Fig. 3. Effect of KCNS-001 on viability of RAW 264.7 macrophages

RAW 264.7 cells were treated with KCNS-001 and the cells were further incubated for 48 hr. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments and shown as percentage cell viability compared with the untreated control cells.

4. COX-2 억제에 미치는 영향

Arachidonic acid cascade에서 prostaglandin 등 염증 매개인자를 생성하는 주요 인자인 COX-2의 억제에 KCNS-001의 효과를 살펴보았다. 그 결과 LPS에 의해 유도된 COX-2를 KCNS-001의 처치에 의해 35% (10 µg/mL), 81% (50 µg/mL) 및 87% (100 µg/mL) 억제하였다(Fig. 4).

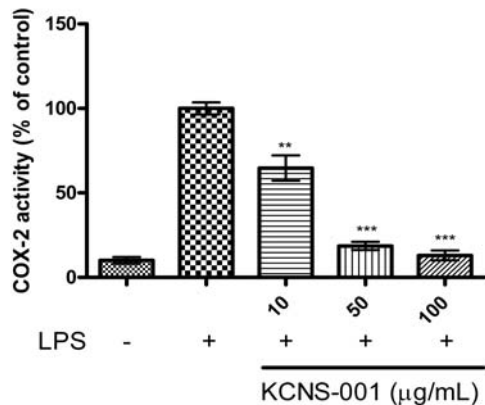


Fig. 4. Effect of KCNS-001 on COX-2 activity in LPS-induced RAW 264.7 macrophages

The activity of COX-2 were measured at 18 h after treatment of cells with or without KCNS-001. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, and *** : $p < 0.001$ vs LPS alone).

5. TNF-α 생성에 미치는 영향

TNF-α는 macrophage와 mast cell에서 분비되는 염증 매개인자이며, tumor cell에 세포 독성을 나타낸다. LPS에 의해 유도된 TNF-α는 KCNS-001 100 µg/mL 농도에 서만 억제활성을 나타내었다(Fig. 5).

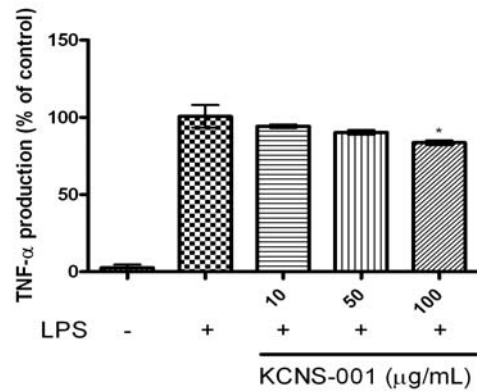


Fig. 5. Effect of KCNS-001 on TNF-α release in LPS-induced RAW 264.7 macrophages

Production of TNF-α was measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with or without KCNS-001. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (* : $p < 0.05$ vs LPS alone).

고찰

KCNS-001을 구성하는 주요 약물인 하수오(何首烏)는 마디풀과에 속한 다년생 초목인 하수오(*Polygonatum multiflorum*)의 덩이뿌리를 건조한 것으로, 보익정혈(補益精血), 윤장통변(潤腸通便)의 효과로, 피부탈색 등에 활용 하였으며¹⁰⁾, 작약(芍藥)은 paeoniflorin을 주성분으로 항염 증, 항고혈압 활성 등의 약리작용이 알려져 있다¹¹⁾. 금은화(金銀花)는 인동과에 속한 다년생 반상록 덩굴성 관목 인 인동(*Lonicera japonica*) 또는 그 변종의 꽃봉오리를 건조한 것으로, 청열해독(清熱解毒), 풍열해독(風熱解毒)이 알려져 있고, 염증매개인자의 억제에 의한 아토피성 피부염 효과가 보고되었으¹²⁾, 당귀(當歸)는 decursin과 decursinol angelate를 주성분으로 하여 항암, 항당뇨 효과 등이 보고된 바 있다¹³⁾. Cinnamaldehyde를 포함하는 계지(桂枝)는 해열효과가 잘 알려져 있고¹⁴⁾, 콩과에 속한 다년생 초본생이며 glycyrrhizin을 주성분으로 함유하고 있는 감초(甘草)(*Glycyrrhiza glabra*)는 보비익기(補脾益氣), 청열해독(清熱解毒), 윤폐지해(潤肺止咳), 완급지통(緩急止痛)의 효능으로 이미 아토피 치료에 널리 활용되고 있다¹⁵⁾.

본 실험에서는 라멜라 액정 화장품으로 예비적 임상에서 아토피피부염에 효과가 관찰된 KCNS-001 한약조성물이 Raw 264.7 cell에서 염증성 매개인자들에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. KCNS-001 처치 후 ROS의 억제 활성을 확인한 결과 25, 50, 100 µg/mL에서 농도의존적 활성이 관찰되었으며, NO 생성 억제활성에서도 약제 처치 후 16 h에서 유의한 활성이 관찰되었다. ROS 및 NO 생성감소가 세포독성에 기인한 것인지를 알아보기 위한 MTT assay에서 세포 생존율이 감소하지 않아, KCNS-001의 항산화 및 NO 생성억제 효과는 세포독성에 기인하지 않은 것으로 생각되었다.

ROS는 과량생성에 따른 노화¹⁶⁾, 암 생성 및 전이¹⁷⁾, 뇌혈관질환 등의 중요 질환에 관여하고 있는 것이 널리 알려져 있고, 특히 염증반응에 있어서 NO 생성과 함께 중요한 역할을 담당하고 있다¹⁸⁾. ROS는 xenobiotics에 의해 생성되고 superoxide dismutase (SOD)에 의해 과산화수소(H₂O₂)로 변환되며, catalase 및 glutathione peroxidase 등에 의해 물(H₂O)로 전환되어 라디칼이 소거된다. 또한 생성된 과산화수소는 산화철 등에 의해 hydroxyperoxide가 형성되면 DNA, protein, lipid 등에 산화적 손상을 입히게 된다¹⁹⁾. NO의 대사에는 NADPH 의존적 효소인 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) 및 inducible NOS (iNOS) 등이 관여하는데 특히 iNOS는 염증 자극에 있어서 지속적으로 생성되는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 세균 등의 외인성 인자의 침입에 의해 macrophage에서의 TNF- α , INF- γ 등의 생성은 iNOS를 유도하게 된다²¹⁾. ROS와 NO의 생성억제 효과가 관찰된 KCNS-001이 대식세포와 활막세포 등 염증관련세포에서 arachidonic acid cascade에 관여하는지를 확인하기 위하여 COX-2의 발현을 ELISA방법을 이용하여 실험하였다. arachidonic acid cascade의 과정에는 COX-1, COX-2, 5-lipoxygenase 등의 효소들이 염증매개 물질들인 prostaglandin 및 leukotrien 합성에 관여한다²²⁾. 특히 아토피성 피부염의 경우 staphylococcus, 집먼지 진드기 등 외인성 인자에 의해 protease activated receptor-2 (PAR-2)가 활성화되고 이에 따라 피부의 ceramide 장벽이 붕괴된다²³⁾. 피부 장벽의 붕괴는 Th1과 Th2 면역조절의 불균형을 유발하게 되며 이 과정에서 ceramide 유도체들이 arachidonic acid cascade과정을 거쳐서 염증 매개인자를 생성하게 된다. LPS 처치에 따라 증가된 COX-2는 KCNS-001 처치에 따라 농도 의존적으로 감소하는 경향이 나타나는 것을 확인하였다.

아토피성 피부염은 helper T 세포의 autoimmunity (Th1)의 TNF- α , INF- γ 와 humoral immunity (Th2)의 IL-4, 5, 13 등 cytokines의 불균형에 기인하는데, IL-4 등은 IgE와 histamine을 증가시켜 가려움증을 유발하는 원인이 된다²⁴⁾. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 염증을 매개하는 인자이기도 하지만, 피부장벽의 보호물질인 ceramide를 생성하는 데도 중요한 역할을 한다. LPS에 의해 유도된 TNF- α 는 KCNS-001에 100 ug/mL에서 만 약한 활성을 나타내었다.

아토피성 피부염의 한방조성물인 KCNS-001의 NO, COX-2 등 염증매개인자의 억제효과를 확인하였으며, 하수오, 작약, 금은화, 당귀, 계지, 감초 등 그 구성인자와 paeoniflorin, cinnamaldehyde, glycyrrhizin 등 구성성분의 활성효과는 지속적으로 연구를 수행하고 있다.

결 론

본 연구에서는 아토피성 피부염 한방조성물인 KCNS-

001이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 ROS, NO와 arachidonic acid cascade의 염증 매개인자인 COX-2, 그리고 macrophages의 염증 매개 cytokine인 TNF- α 의 억제효과를 확인하였다. KCNS-001은 ROS와 NO를 농도 의존적으로 억제하였고, COX-2의 발현을 억제하였다. TNF- α 는 고농도에만 약한 억제활성을 나타내었다. 이상의 결과는 KCNS-001의 아토피성 피부염 치료기전 중 항염증과 밀접한 관련이 있음을 추정할 수 있으며, 피부 보호효과, 항균효과 등을 수행함으로써 그 기전을 좀 더 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 뇌질환연구센터 기관고유사업과 전략적테마연구사업의 일부 지원을 받아 연구되었음

참고문헌

1. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med.* 1999 ; 340 : 1888-99.
2. Kujubu DA, Fletcher BS, Varmum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991 ; 266 : 12866-72.
3. Capone ML, Tacconelli S, Di Francesco L, Sacchetti A, Sciulli MG, Patrignani P. Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007 ; 82 : 85-94.
4. Barland CO, Aettersten E, Brown BS. Imiquimod induced interleukin-1 alpha stimulation improves barrier homeostasis in aged murine epidermis. *J Invest Dermatol.* 2004 ; 122 : 330-6.
5. Heinzmann A, Daser A. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 ; 127 : 170-80.
6. Higuchi K, Takara R, Hara J, et al. A new assay system of spingomyelin deacylase and their biochemical characterization in atopic stratum corneum. *J Dermatol Sci (Abst).* 1997 ; 15 : 120.
7. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자에 대한 임상적 연구; 한의학적인 임상유형분류 및 치료. *대한한의학 회지.* 2001 ; 22(2) : 10-21.
8. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 181 : 1199.
9. Seo JY, Lee JH, Kim NW, Her E, Chang SH, Ko

- NY, Yoo YH, Kim JW, Seo DW, Han JW, Kim YM, Choi WS. Effect of a fermented ginseng extract, BST 204, on the expression of cyclooxygenase-2 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2005 ; 5(5) : 929-36.
10. Guan S, Su W, Wang N, Li P, Wang Y. Effects of radix polygoni multiflori components on tyrosinase activity and melanogenesis. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008 ; 23(2) : 252-5.
 11. Chang Y, Wei W, Zhang L, Xu HM. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on synoviocytes activities in rat collagen-induced arthritis. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 121(1) : 43-8.
 12. Chan BC, Hon KL, Leung PC, Sam SW, Fung KP, Lee MY, Lau HY. Traditional Chinese medicine for atopic eczema: PentaHerbs formula suppresses inflammatory mediators release from mast cells. *J Ethnopharmacol.* 2008 ; 120(1) : 85-91.
 13. Son SH, Kim MJ, Chung WY, Son JA, Kim YS, Kim YC, Kang SS, Lee SK, Park KK. Decursin and decursinol inhibit VEGF-induced angiogenesis by blocking the activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Cancer Lett.* 2009 ; 280(1) : 86-92.
 14. Ma YY, Huo HR, Li CH, Zhao BS, Li LF, Sui F, Guo SY, Jiang TL. Effects of cinnamaldehyde on PGE2 release and TRPV4 expression in mouse cerebral microvascular endothelial cells induced by interleukin-1beta. *Biol Pharm Bull.* 2008 ; 31(3) : 426-30.
 15. Saeedi M, Morteza-Semnani K, Ghoreishi MR. The treatment of atopic dermatitis with licorice gel. *J Dermatolog Treat.* 2003 ; 14(3) : 153-7.
 16. Edman U, Garcia AM, Busuttill RA, Sorensen D, Lundell M, Kapahi P, Vijg J. Lifespan extension by dietary restriction is not linked to protection against somatic DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell.* 2009 ; 8(3) : 331-8.
 17. Lawless MW, O'Byrne KJ, Gray SG. Oxidative stress induced lung cancer and COPD : opportunities for epigenetic therapy. *J Cell Mol Med.* 2009 Jul 7. [Epub ahead of print].
 18. Csiszar A, Labinskyy N, Jimenez R, Pinto JT, Ballabh P, Losonczy G, Pearson KJ, de Cabo R, Ungvari Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev.* 2009 ; 130(8) : 518-27.
 19. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys.* 2009 ; 46(1) : 9-15.
 20. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6(12) : 3051-64.
 21. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* 1996 ; 316 : 209-15.
 22. Fredenburgh LE, Ma J, Perrella MA. Cyclooxygenase-2 inhibition and hypoxia-induced pulmonary hypertension: effects on pulmonary vascular remodeling and contractility. *Trends Cardiovasc Med.* 2009 ; 19(2) : 31-7.
 23. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci.* 2003 ; 23(15) : 6176-80.
 24. Elias PM, Schmutz M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009 ; 9(4) : 265-72.