

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 염증반응에서 甘松齣에서 추출한 8α -hydroxy pinoresinol의 항염증 효과

최선복^{1,2#}, 박성주^{1*}

1 : 원광대 학교한의과 대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 한방체액조절연구센터

Anti-inflammatory Effects of 8α -hydroxy pinoresinol isolated from *Nardostachys jatamansi* on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Cells.

Sun Bok Choi^{1,2#}, Sung-Joo Park^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : *Nardostachys jatamansi* (NJ) is a medicinal herb that has been reported in various traditional systems of medicine for its use in antispasmodic, a digestive stimulant, skin diseases. Previous studies have already reported that NJ effectively protects against inflammation. However, the active compound in NJ is unknown. Therefore, in the present study, we analyzed effects of a compound, 8α -hydroxy pinoresinol (HP), isolated from NJ against lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation in RAW 264.7 cells.

Methods : To examine the anti-inflammatory effect of HP against LPS, intraperitoneally pre-treat the HP (100, 200, 500 and 1,000 nM) 1 h prior to LPS challenges. LPS was stimulated with 500 ng/ml in RAW 264.7 cells. To identify the anti-inflammatory effect of HP, we measured inflammatory mediators such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its derivative nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2). Also we evaluated molecular mechanisms including mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation by western blot.

Results : The HP inhibited production of inflammatory mediators, such as iNOS and its derivative NO, COX-2 and PGE2 in LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. Additionally, HP also inhibited activation of p38 pathway signaling but not extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun NH2-terminal kinase (JNK), and NF- κ B.

Conclusion : Our results suggest that HP has anti-inflammatory functions through the dephosphorylation of p38 and HP can provide beneficial strategy for prevention and therapy of inflammation.

Key words : RAW 264.7 cells, lipopolysaccharide (LPS), *Nardostachys jatamansi* (NJ), 8α -hydroxy pinoresinol (HP), Inflammation

I. 서 론

염증반응은 여러 염증인자들로 인한 병리생리학적 반응으로서, 생체조직에서 병원성 미생물, 중금속 등 외부 이물질의

침입이나 상처에 대한 주요 방어반응으로 나타난다. 대식세포는 이러한 염증반응에서 매우 중요한 역할을 수행하고 있으며, 식세포 작용, 세포 독성 등을 활용하여 숙주를 방어하는 역할을 한다¹⁻³⁾. 이렇듯 염증반응은 생체의 항상성 유지를 위

*Corresponding author : Sung-Joo Park, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

· Tel : +82-63-850-6450 · E-mail : parksj08@wku.ac.kr

#First author : Sun Bok Choi, Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

· Tel : +82-63-850-6837 · E-mail : agraesb@lycos.co.kr

· Received : 9 August 2016 · Revised : 29 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

해 필수적인 반응이지만, 호중구, 대식세포 같은 염증성 세포들의 과도한 반응은 염증성 사이토카인들의 분비를 촉진시키게 되고, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증매개물질을 생성하게 된다^{4,5}. 일반적인 상황에서 NO는 박테리아나 종양을 제거하는 역할을 한다고 알려져 있지만, 과도한 생성은 오히려 염증을 유발하여 조직 손상이나 유전자 변이 등을 일으키게 된다. 이로 인해서 세포나 조직의 기능장애 및 괴사를 일으켜 류마티스 관절염, 패혈증과 같은 염증성질환 등으로 발전될 수 있다^{6,7}. 따라서 염증반응의 조절은 염증질환을 치료하는 것에 있어서 중요한 목표가 된다.

甘松香은 히말라야의 3,000미터 고지에서 자생하는 마타리과 (Valerianaceae family)에 속한 다년생 초본으로 여러 아시아 지역에서 질병치료약으로서 널리 사용되어 왔다^{8,9}. 선행 연구로는 LPS로 유도한 염증반응에서 甘松香의 항염증 효과가 보고되어 있으나¹⁰, 아직까지 甘松香에서 유래한 단일 성분인 8 α -hydroxy pinoresinol (HP)의 항염증 효과는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 대식세포의 세포주인 RAW 264.7 cell에서 HP의 항염증 효과에 대해 관찰하였다. 이를 위해 RAW 264.7 cell에서 HP 전 처리시 LPS로 유도된 염증 매개물질인 iNOS, NO, COX₂, PGE₂의 발현량의 변화를 관찰하였으며, 이에 따른 기전 조사를 위해 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성화를 조사하여 염증반응의 억제에 대한 여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

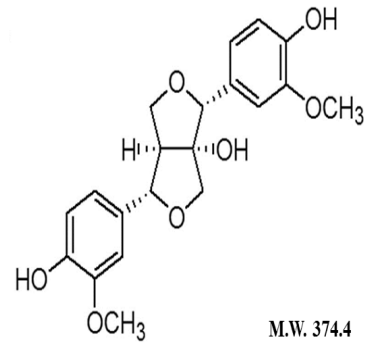
1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 甘松香 (*Nardostachys jatamansi*)은 움니허브 (서울, 대한민국)에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 확인을 받은 후 사용하였다. 甘松香을 열수 추출한 뒤 얻어낸 甘松香 물 추출물 15g을 H₂O로 현탁하여 녹는 부분을 ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH)을 이용하여 순차적으로 분획하였다. 얻어낸 EtOAc 분획물 2.2 g을 silica gel column (6.5 × 60 cm, 70–230 mesh, Merck)을 이용하여 n-Hexane/EtOAc (4:1–1:2)의 용매조건으로 용출하여 6개의 소분획물 (Fr. 1–6)을 얻었다. Fraction 5 (201.9 mg)는 MeOH/H₂O(1:2)의 용매를 이용하여 MPLC (column : ODS-S-50 B, 120 Å, 50 μ m)를 실시하여 5개의 소분획물 (Fr. 5-1 - Fr. 5-5)을 얻었다. Fraction 5-2 (41.3 mg)와 5-3 (24.9 mg)은 MeOH/H₂O (1:2)의 용매를 이용해 MPLC를 실시하여 8 α -hydroxy pinoresinol (27.4 mg)(Scheme 1)을 얻었다. 본 데이터는 보고된 참고문헌과 동일하게 진행되었다¹¹.

2) 시약

Roswell Park Memorial Institute culture medium (RPMI-1640), fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서



M.W. 374.4

Scheme 1. The structure of 8 α -hydroxy pinoresinol (HP).

구입하였다. LPS는 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, total and phospho-specific MAPKs 항체 (p38; extracellular signal-regulated kinase 1/2 [ERK 1/2]; c-Jun NH₂-terminal protein kinase [JNK])는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-I κ -B α 는 Santa Cruz (CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 세포주

RAW 264.7 cell은 마우스의 대식세포주이며, 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에는 10% FBS와 1% penicillin and streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지가 사용되었으며, 세포는 37°C, 5% CO₂조건 배양기에서 배양하였다.

2. 방법

1) MTT 분석

HP의 RAW 264.7 세포의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640 배지에서 2 × 10⁵/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 LE를 처리하였다. 24시간동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정했다. 세포의 생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 control cell과의 비율로 나타내었다. [즉, viability (%) = 100 × (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)]

2) 일산화질소 (Nitric Oxide) 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent; 0.5 %의 sulphanilamide, 2.5 %의 phosphoric acid 및 0.5 % naphthylethylendiamide)

은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nM에서 흡광도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, HP를 농도별로 처리하였다. LPS를 500 ng/ml로 자극한 후 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액을 취해 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브를 통해 계산하였다.

3) PGE2 분석

PGE₂수준은 manufacture's protocol (Stressgen Biotechnologies, MI, USA)에 따라 immunoassay kits로 측정되었다.

4) Western blot 분석

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/dish로 배양하고 serum free RPMI-1640 media로 12시간 starvation 시킨 뒤 HP를 시간별로 (6, 9, 12, 24 시간) 전 처리 후 LPS 500 ng/ml로 30분간 자극하였다. Cold PBS로 3회 세척한 후 cell을 획득하여 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 cell pellet을 수거하였다. RIPA lysis buffer (RIPA buffer 1 ml + phosphatase inhibitor 10 μ l + protease inhibitor 10 μ l)를 넣은 뒤 단백질을 lysis 시키고 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량을 하였다. 동일한 양의 단백질에 sampling buffer (4x)를 넣은 뒤 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 membrane에 옮겨 5% skim milk로 2시간 blocking하였다. iNOS, COX-2의 활성화와 p38, JNK, ERK의 phosphorylation, NF- κ B를 ECL detection용액 (Amersham)으로 확인하였다.

5) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 실시한 뒤 그 평균값을 기준으로 Mean \pm S.D.로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램의 one way ANOVA에 준하였다. p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. HP의 RAW 264.7 cell에 대한 독성

HP가 RAW 264.7 cell의 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 HP 처리 농도 1,500 nM 이상에서 세포생존율이 80% 이하로 떨어져 유의성 있는 영향을 나타냈다. 이에 HP 100 nM에서 1,000 nM까지의 농도를 이후 진행된 실험의 유효 농도로 설정하였다 (Fig. 1).

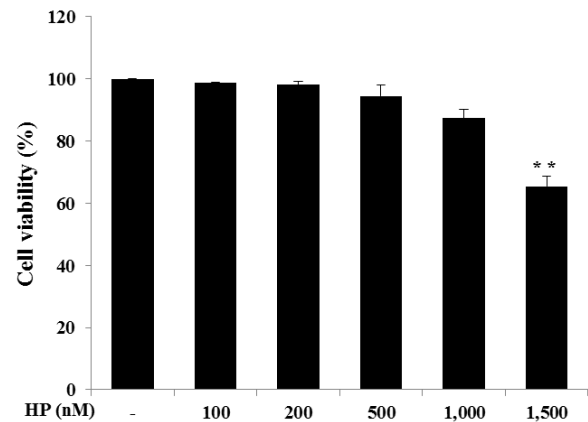


Fig. 1. The effect of HP on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with HP at the indicated dose or DMSO. After 24 h, cell viability was measured by the MTT assay as described in materials and methods. The values are the means \pm S.E. of three independent experiments. **p < 0.001 vs control.

2. LPS로 유도한 NO 생성에 미치는 HP의 효과

iNOS에 의한 NO의 과도한 생성은 염증반응의 대표적인 특징이다. 이에 RAW 264.7 cell에서 HP가 LPS로 유도된 iNOS의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 Western blot analysis를 통해 확인해 보았다. RAW 264.7 cell에 HP (100, 200, 500, 1,000 nM)로 1시간 전 처리한 후, LPS로 자극하였다. LPS 처리군에 비해 HP 전 처리시 농도 의존적으로 iNOS의 생성을 억제하였으며, NO의 생성을 측정할 결과 iNOS의 발현양과 일치하게 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제하였다 (Fig. 2).

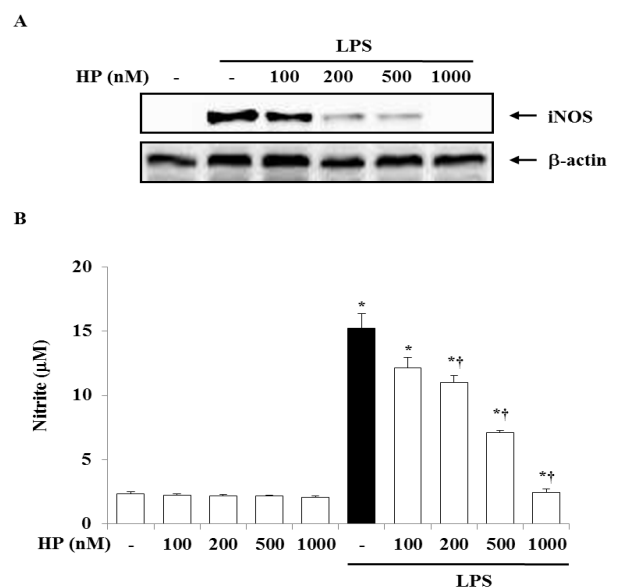


Fig. 2. Effects of HP on inflammatory mediators in RAW 264.7 cells against LPS challenge. RAW 264.7 cells were pre-treated with HP at the indicated dose or DMSO for 1 h. And stimulated for 24 h with or without LPS (500 ng/ml). LPS-induced (A) iNOS and (B) NO release was measured by western blot analysis and Griess reaction as described in materials and methods. The values are the means \pm S.E. of three independent experiments. *p < 0.05 vs control, †p < 0.05 vs LPS treatment alone.

3. LPS로 유도한 염증 매개물질에 미치는 HP의 효과

염증반응시 염증 매개물질인 COX-2와 PGE₂의 발현양이 증가하게 되는데, 이에 HP가 미치는 영향을 확인해 보았다. RAW 264.7 cell에서 정상군에 비해 LPS 처리군에 COX-2의 과발현을 확인할 수 있었다. 그러나 HP 1,000 nM 전 처리군에서 유의성 있게 COX-2의 생성이 억제된 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, COX-2에 의한 PGE₂의 발현양 역시 HP 500 nM, 1,000 nM 처리군에서 LPS 처리군에 비해 유의하게 억제되었다 (Fig. 3).

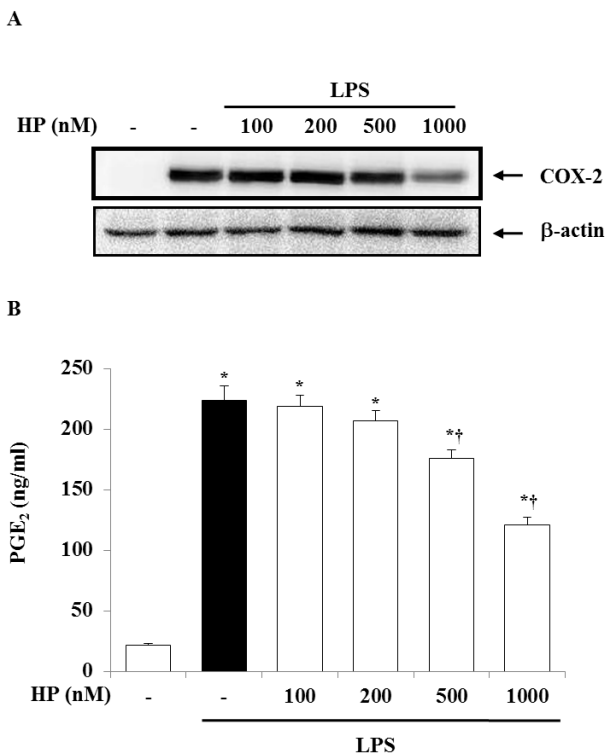


Fig. 3. Effects of HP on LPS induced production of COX-2 and PGE₂ in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with HP at the indicated dose or DMSO for 1h. And stimulated for 24h with or without LPS (500ng/ml). LPS induced (A) COX-2 and (B) PGE₂ production was measured by western blot analysis and ELISA. *p < 0.05 vs control, †p < 0.05 vs LPS treatment alone.

4. HP가 MAPKs 및 NF-κB의 활성화에 미치는 효과

LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 HP의 항염증 효과를 확인하였는데, 어떠한 신호전달경로에 의해서 이러한 효과를 나타내는지 관찰하기 위해 대표적인 신호전달경로인 MAPKs와 NF-κB의 활성을 확인해 보았다. HP 1,000 nM의 농도로 시간별로 (6, 9, 12, 24시간) 전 처리한 뒤 LPS를 30분간 자극하였다. LPS로 자극된 Raw 264.7 cell에서 p38, ERK, JNK가 인산화 된 것을 확인하였으며, HP 9-24시간 전 처리 시 ERK, JNK의 인산화는 억제하지 못하였으나, p38의 인산

화를 억제하였다. 추가적으로, NF-κB의 활성화 지표인 IκB-α의 분해를 조사한 결과, HP가 NF-κB의 활성화에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

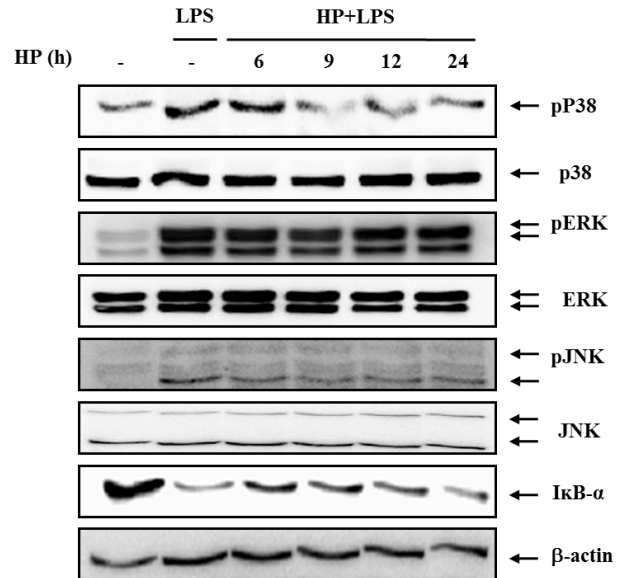


Fig. 4. The effect of HP on MAPKs phosphorylation in RAW 264.7 cells against LPS challenge. RAW 264.7 cells were pre-treated with HP (1,000 nM) or DMSO for indicated times and then stimulated with or without LPS (500 ng/ml) for 30 min. Total cellular proteins were detected with phosphor-specific p38, ERK, JNK and IκB-α antibodies and p38, ERK, JNK and β-actin were used as loading controls. Detail methods were described in materials and methods. Representative western blots of at least three separate experiments are shown.

IV. 고찰

염증반응은 일반적으로 외부의 감염으로부터의 방어기작으로 작용하게 되어 침입하는 유기체를 불활성화 시키거나 이를 제거하여 조직을 정상적으로 유지시키는데 기여한다. 그러나 과도한 염증반응은 염증매개물질 분비를 촉진시켜 패혈증, 다발성장기부전 등으로 발전할 수 있으며, 이는 사망과 직결된 문제이다¹²⁾. 대표적으로 염증 유도 물질인 LPS는 대식세포에서 염증반응을 촉진시키는 중요한 자극원으로 사용된다. 이는 대식세포 세포주인 RAW 264.7 cell에서 TLR4를 통한 MAPKs 및 NF-κB를 활성화 시키게 되어 다양한 염증 매개물질을 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 이는 염증반응 정도를 판단하는 것에 있어서 중요한 척도가 된다¹³⁾. 따라서 초기 염증을 조절하는 것은 매우 중요한 문제이다. 본 연구에서는 대식세포의 세포주인 RAW 264.7 cell을 사용하였으며, 그람 음성균의 외막성분인 LPS를 가지고 염증을 유발하였다.

甘松香은 性은 溫하고, 味는 辛, 甘하며 理氣止痛, 開鬱醒脾 등의 효능이 있어 氣滯胸悶, 脘腹脹痛, 食少 등의 병증을 치료하는 약물로 사용되어 왔다¹⁴⁾. 추가적으로 선행연구에서는 LPS에 의한 endotoxin shock뿐만 아니라, 여러 효과들이 입증되어 있어^{10,15,16)}, 이상의 선행연구를 살펴본 바 甘松香의 유래 단일 성분인 HP 또한 유의하게 항염증 효과가 나타날 것으로 사료되어 본 실험의 성분으로 선택하였다.

염증반응이 나타나게 되면 대표적 특징으로는 염증 매개물질인 NO와 PGE₂의 발현이 증가된다. NO는 NOS에 의해 L-아르기닌으로부터 NO를 생성하며, 이는 병리학적으로 중요한 작용을 한다고 알려져 있다. 따라서, LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 과량의 NO를 생성하게 된다. 이와같이 과량이 방출될 경우 NO는 대식세포의 종양, 조직의 손상, 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{17,18)}. 또한, PGE₂는 NO와 마찬가지로 염증반응에 중요한 역할을 하며 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성된다. 이는 혈관 확장, 통증, 발열작용 등을 증가시키고 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다¹⁹⁾. 따라서 본 지표들은 약물의 항염증 효능을 평가하는데 유용한 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서 HP는 이러한 병리학적 영향을 미치는 iNOS의 발현과 이에 따른 NO의 생성을 억제하며, COX-2와 PGE₂의 생성 역시 HP가 억제함으로써, 염증을 조절한다는 것을 알 수 있다.

LPS는 대식세포에서 TLR4와 결합함으로써 활성화되어 다양한 염증물질들을 합성 및 분비를 통해 염증반응을 개시에 중요한 작용을 한다. 염증반응이 일어나면 MAPKs는 세포내 핵 안으로 이동하여 신호전달에 의해 인산화되는 것을 관여하며, 현재까지 p38, ERK, JNK가 알려져 있다^{20,21)}. 본 연구에서 HP의 전 처리가 ERK, JNK의 인산화는 억제하지 못하였지만, p38의 신호전달 활성을 억제하였다. 이러한 결과들을 종합해보면, HP는 p38의 신호전달 활성억제를 통해 NO, PGE₂와 같은 염증 매개인자를 억제하여 염증을 조절하는 것으로 생각된다. 더욱이 HP의 항염증 효과는 염증성 질환의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 생각되며, HP의 *in vivo* 실험 및 다른 질환모델에서의 추가적인 실험을 진행하는데 있어 중요한 척도가 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서, LPS에 의한 RAW 264.7 cell의 자극에서 甘松香 유래 단일성분인 HP의 항염증 효과를 관찰하였을 때 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HP는 RAW 264.7 cell에서 100-1,000 nM의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. HP는 RAW 264.7 cell에서 LPS 처리군에 비해 iNOS와 NO의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
3. HP는 RAW 264.7 cell에서 LPS 처리군에 비해 COX-2와 PGE₂의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. HP는 RAW 264.7 cell에서 p38의 인산화를 억제하였다.

이상의 결과로 보아 HP는 RAW 264.7 cell에서 염증반응에 대한 보호 효과를 가지며 항염증 치료에 응용할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kwon DJ, Ju SM, Youn GS, Choi SY, Park J. Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF- κ B and AP-1 activation in RAW 264,7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2013 ; 58 : 479-86.
2. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005 ; 365(9453) : 63-78.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 ; 348(2) : 138-50.
4. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007 ; 19(3) : 289-95.
5. Kang YJ, Wingerd BA, Arakawa T, Smith WL. Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J Immunol.* 2006 ; 177(11) : 8111-22.
6. Noguchi S, Nakatsuka M, Konishi H, Kamada Y, Chekir C, Kudo T. Nafamostat mesilate suppresses NF- κ B activation and NO overproduction in LPS-treated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2003 ; 3(9) : 1335-44.
7. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991 ; 21(4) : 361-74.
8. Gowda DK, Shetty L, A P K, Kumari SN, Sanjeev G, P N. The efficacy of nardostachys jatamansi against the radiation induced haematological damage in rats. *J Clin Diagn Res.* 2013 ; 7(6) : 982-6.
9. Bagchi A, Oshima Y, Hikino H. Neolignans and Lignans of Nardostachys jatamansi Roots1. *Planta Med.* 1991 ; 57(1) : 96-7.
10. Bae GS, Seo SW, Kim MS, Park KC, Koo BS, Jung WS, Cho GH, Oh HC, Yun SW, Kim JJ, Kim SG, Hwang SY, Song HJ, Park SJ. The roots of Nardostachys jatamansi inhibits lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Nat Med.* 2011 ; 65(1) : 63-72.
11. Yang MC, Lee KH, Kim KH, Choi SU, Lee KR. Lignan and terpene constituents from the aerial parts of Saussurea pulchella. *Arch Pharm Res.* 2007 ; 30(9) : 1067-74.
12. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996 ; 77(1) : 110-7.

13. Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB, Tridandapani S. Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J Immunol* 2004 ; 173 : 360-6.
14. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. Younlin publisher, 2010 : 458-9.
15. Bae GS, Park HJ, Kim DY, Song JM, Kim TH, Oh HJ, Yun KJ, Park RK, Lee JH, Shin BC, Sim HJ, Hong SP, Song HJ, Park SJ. Nardostachys jatamansi protects against cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas*, 2010 ; 39(4) : 520-9.
16. Bae GS, Park KC, Koo BS, Choi SB, Jo IJ, Choi CM, Song HJ, Park SJ. The inhibitory effects of Nardostachys jatamansi on alcoholic chronic pancreatitis. *BMB Rep*, 2012 ; 45(7) : 402-7.
17. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991 ; 43(2) : 109-42.
18. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 1993 ; 178(2) : 749-54.
19. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Michell A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Tox Oncol*, 2002 ; 21 : 93-101.
20. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*, 2000 ; 25(1) : 7-9.
21. Celec P. Nuclear factor kappa B—molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother*, 2004 ; 58(6-7) : 365-71.