

황기의 COX-2 활성 억제 효과

김은정 · 오오진¹ · 이상국¹ · 양기숙*

숙명여자대학교 약학대학, ¹이화여자대학교 약학대학

Inhibitory effect of Astragali Radix on COX-2 activity

Eun Jeong Kim, O Jin Oh¹, Sang Kook Lee¹ and Ki Sook Yang*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-172,

¹College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract – The root of *Astragalus membranaceus* Bunge (Leguminosae), which has been used for the treatment of hypertension, chronic hepatitis, duodenal ulcers, chronic nephritis and promotion of immunity in folk remedies. Cyclooxygenase (COX-2) is responsible for the production of large amounts of proinflammatory prostaglandins (PGs) at the inflammatory site. Thus, a logical approach to the treatment of inflammatory disease should involve the inhibitors of COX-2. To develop new COX-2 inhibitors from natural products, Astragali Radix was screened by inhibiting prostaglandin E₂(PGE₂) generation in the culture medium using enzyme immunometric assay. Two isoflavone glycosides, 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside and calycosin-7-O-β-D-glucoside isolated from Astragali Radix inhibited COX-2 activity.

Key words – Astragali Radix, COX-2 inhibitor, 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside.

황기(黃芪 *Astragali Radix*)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물인 단너삼 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bunge의 뿌리로 기타 다른 *Astragalus*속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것¹⁻³)으로 황기가 들어 있는 처방으로는 황기건중탕(黃芪建中湯), 황기계지오물탕(黃芪桂枝五物湯), 십전대보탕(十全大補湯), 방기황기탕(防己黃芪湯) 등이 있으며⁴, 생리활성으로는 혈압강하작용⁴, 이뇨 작용⁴, 강장 작용⁵, 면역증강작용⁶, 항염작용⁷ 등이 보고된 바 있다. 황기의 성분으로는 flavonoid 화합물인 astraisoflavans, formononetin, 2'3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyisoflavone 등과 saponin으로 astragaloside, soyasaponin 등이, 그 외 γ-aminobutyric acid, β-sitosterol, polysaccharides 등⁸⁻¹¹)이 보고되어 있다.

염증의 억제에는 크게 phospholipase 저해제, lipoxy-

genase 저해제 및 cyclooxygenase(COX)의 저해제의 작용으로 나눌 수 있다. 이 eicosanoids의 생합성 과정 중 염증 반응은 cyclooxygenase(COX)에 의해 진행되며 두 종류의 이성효소를 가지고 있는데, 여러 가지 생체내 장기의 항상성 유지 및 보호작용들은 COX-1에 의하며, 염증성, 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의한 것이다.¹² COX-2에 의해 생성되는 PGE₂ 합성은 비스테로이드성 항염증약(NSAIDs)에 의해 억제되나 소화성궤양이나 신기능 이상 등의 부작용으로 사용이 제한되어 왔으므로, 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다. 천연물에서는 문 등¹³)이 230여종의 생약에 대해 COX-2 활성 억제에 관하여 검색하였고, 김 등¹⁴)은 종대황 추출물의 COX-2 활성 억제 효과에 대해, 강 등¹⁵)은 양강으로부터 COX-2 억제활성물질을 분리하였으며, Kim¹⁶) 등은 flavonoid인 wogonin의 COX-2 활성 억제 효과를 보고하였다. 본 연구에서는 황기의 80% MeOH

*교신저자 : Fax : 02-710-9578

엑스 및 각 분획과 CH_2Cl_2 와 EtOAc 분획에서 분리한 5가지 화합물에 대해 COX-2 억제활성 효과를 검색하였고, 그 결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 황기(Astragali Radix)는 강원도 정선에서 재배한 5-6년근을 경동시장에서 구입하여 기원을 확인한 후 사용하였으며, 표준품(SMP 97020)은 본 대학 생약표본실에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - LPS(*E. coli* 011:B4), aspirin은 Sigma Chemical Co.의 제품을, DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium), fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 시약은 Gibco-BRL 제품을, prostaglandin E_2 (PGE₂) 및 PGE₂-acetylcholinesterase는 Cayman Co.의 제품을 사용하였고, 항 PGE₂ 항체는 (주)태평양 기술연구원으로부터 제공받았다. TLC plate는 Merck사의 precoated kieselgel 60F₂₅₄, column chromatography의 충전제로 Merck사의 Kieselgel 60(No. 7734, 9385)를 사용하였다. 기타 시약 및 추출용 용매는 분석용 특급이나 일급시약들을 사용하였다.

기기는 ELISA reader(Bio-TEK instruments, Inc Elx808) UV/VIS Spectrophotometer (Jasco, V-530), NMR (Bruker, Avance 500, 500 MHz, 11.4 Tesla / Avance 600, 600 MHz, 14.1 Tesla), FT/IR (Jasco, FT/IR-430), Mass spectrometer (Jeol, JMS-AX505 WA), GC/MS (Hewlett Packard 6890 GC, Hewlett Packard 5973 MSD) 등을 사용하였다.

추출 및 분획 - 음건하여 세절한 황기(*Astragalus membranaceus*)의 뿌리 6 kg을 80% methanol로 수욕상에서 4시간씩 3회 추출한 뒤 여과하고 여액을 감압농축하여 80% MeOH 추출물 660 g을 얻었다. 이것을 증류수에 현탁시키고 Hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH로 계통적으로 추출하여 hexane 분획 36.3 g, CH_2Cl_2 분획 37.6 g, EtOAc 분획 18.5 g, BuOH 분획 264.0 g, 물 분획 303.6 g을 얻었다. 상기의 80% MeOH 엑스 및 각 분획층에 대해 활성을 검토하고, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획에서 column chromatography를 수행하여 활성물질의 분리를 시도하였다. 황기의 80% MeOH Ex.에서 얻은 CH_2Cl_2 분획 중 17 g을 silicagel column chromatography (*n*-hexane→acetone 100:1→0:1)를 실시하여 13개의 소분획을 얻었고, 이

중 4번째, 7번째와 10번째 분획에서 화합물 1(250 mg), 화합물 2(35 mg), 화합물 3(40 mg)을 분리하였고, 또한 EtOAc 분획 중 8 g을 silica gel column chromatography (CHCl_3 →MeOH 20:1→0:1)를 실시하여 16개의 소분획을 얻었으며, 그 중 8, 10번째 분획에서 화합물 4(9 mg), 화합물 5(16 mg)를 분리하였다.

RAW 264.7 세포에서 COX-2 유발 및 약물처리 - 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 (주)태평양 기술 연구원에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS-DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 1주일에 두 번 계대배양하였다. RAW 264.7 세포를 10% FBS-DMEM에 현탁하여 10×10⁵ 세포/ml로 하였다. 이 현탁액에 최종 농도가 250 μM이 되도록 aspirin을 첨가해 세포에 잔존하는 COX 효소의 활성을 비가역적으로 억제한 후 세포현탁액을 96 well 세포 배양판의 각 well에 200 μl씩 가하고 37°C, 5% CO₂에서 2 시간 동안 배양하여 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 표면에 남아있는 세포를 실험에 사용하였다. 세포가 부착되어 있는 각 well에 1 μg/ml의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM 200 μl씩을 넣었고, 대조군에는 LPS가 없는 배지를 넣었다. LPS가 포함된 배지로 교환한 후 곧바로 검색 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 16시간 배양한 후 그 상층액을 회수하여 유리된 prostaglandin 양을 효소면역분석법을 이용하여 정량하였다. 검색 시료는 DMSO에 녹여 사용하며, 세포배양액 중의 시료의 최종농도가 10 μg/ml이 되도록 하였다.

효소면역분석법(Enzyme Immunometric Assay)을 이용한 prostaglandin(PGE₂)양의 측정 - 항-PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양하였다. 그 후 well에 남아있는 용액을 말끔히 털어낸 후 0.05% Tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시액 200 μl를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂ 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 % inhibition을 구하였다.

Table I. Inhibition of PGE₂ production by MeOH Ex. and fractions of Astragali Radix in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Group	% Inhibition ^{a)}
MeOH Ex.	45.47
Hexane fr.	6.20
CH ₂ Cl ₂ fr.	10.97
EtOAc fr.	55.12
BuOH fr.	0
Water fr.	1.18

^{a)}% inhibition of PGE₂ accumulation in LPS-stimulated macrophage cell line at test concentration of 10 µg/ml

결과 및 고찰

MeOH Ex. 및 분획의 COX-2 억제효과 - 본 실험에서 LPS(1 µg/ml)를 사용하여 대식세포의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 황기의 MeOH Ex.와 각 분획의 10 µg/ml 최종농도로 PGE₂ 생성 저해도를 측정 한 결과 황기의 MeOH Ex. 및 EtOAc 분획에서 각각 45.47%, 55.12%로 어느 정도 억제 효과가 나타났으나, 다른 분획에서는 전혀 나타나지 않았다(Table I).

화합물의 COX-2 억제효과 - 황기의 80% MeOH Ex.에서 얻은 CH₂Cl₂ 분획을 silica gel column chromatography를 실시하여 분리한 화합물 1, 2, 3은 기기분석 결과와 문헌¹⁷⁻²⁰⁾과의 비교로 각각 β-sitosterol, β-sitosterol 3-O-β-[6'-O-palmitoyl]-glucoside, β-sitosteryl 3-O-β-D-glucopyranoside로 확인, 동정하였으며, EtOAc 분획에서 silica gel column chromatography를 실시하여 분리한 화합물 4와 5도 기기 분석 결과와 문헌²¹⁻²⁴⁾과의 비교로 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-D-glucoside, Calycosin-7-O-β-D-glucoside로 확인, 동정하였다. 분리한 5가지 화합물에 대해서 LPS(1 µg/ml)를 사용하여 대식세포의 COX-2 활성을 유도한 모델에서 각각 10 µg/ml 농도로 PGE₂ 생성 저해도를 측정한 결과는 다음과 같다(Table II). Isoflavone glycoside인 화합물 4와 5는 각각 억제율이 85.77%, 71.45%로 황기 MeOH 엑스나 EtOAc 분획보다 훨씬 우수한 COX-2 활성 억제 효과를 나타내었으나, 화합물 1, 2, 3의 억제율은 각각 27.79%, 0%, 9.4%이었다. COX-2 활성 억제 효과를 나타낸 화합물 4와 5의 농도를 각각 3, 1, 0.3, 0.1 µg/ml로 희석하여 측정하였을 때 농도 의존적으로 효과를 나타내었으며(Fig. 1), IC₅₀ (µg/ml)를 구한 결

Table II. Inhibition of PGE₂ production by compounds 1-5 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

Group ^{b)}	% Inhibition ^{a)}
Compound 1	27.79
Compound 2	0
Compound 3	9.40
Compound 4	85.77
Compound 5	70.45

^{a)}% inhibition of PGE₂ accumulation in LPS-stimulated macrophage cell line at test concentration of 10 µg/ml

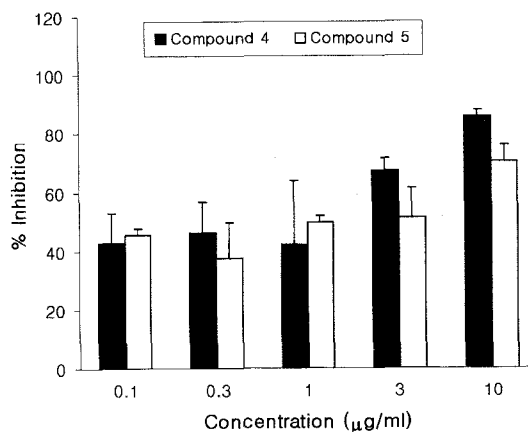
^{b)}Compound 1 : β-sitosterol

Compound 2 : β-sitosterol 3-O-β-[6'-O-palmitoyl]-glucoside

Compound 3 : β-sitosteryl 3-O-β-D-glucopyranoside

Compound 4 : 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside

Compound 5 : Calycosin-7-O-β-D-glucoside

**Fig. 1.** Inhibitory effect of compounds 4 and 5 on COX-2 induction in cultured RAW 264.7 cell.

^{a)}Results are expressed as mean ± S.D. performed in triplicate.

Compound 4 : 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside

Compound 5 : Calycosin-7-O-β-D-glucoside

Table III. Inhibitory effect of compound 4 and 5 on LPS-stimulated COX-2 induction

	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
Compound 4	1.35	2.91
Compound 5	2.59	5.81

^{a)}IC₅₀: Concentration required for 50% inhibition of control value (100%)

Compound 4: 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glucoside

Compound 5: Calycosin-7-O-β-D-glucoside

과, 각각 1.35 $\mu\text{g/ml}$, 2.59 $\mu\text{g/ml}$ 로 농도로 환산했을 때, 2.9 μM , 5.81 μM 이었다(Table III).

Cyclooxygenase(COX)는 prostaglandin H synthase (PGHS)라고도 불리우며 membrane phospholipid를 prostaglandin류(prostaglandins, thromboxanes)로 변환시키는데 중요한 조절효소로 작용한다. Prostaglandin류들은 arachidonic acid로 대표되는 20개의 탄소를 가진 불포화 지방산의 oxidative cyclization에 의해 생성되는데 COX에 의해서 arachidonic acid가 PGG₂와 PGH₂가 되고, 이들은 계속해서 PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , PGI₂, thromboxane A₂ 등을 포함한 다양한 eicosanoid들로 만들어진다. Aspirin으로 대표되는 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)는 생체에 고르게 분포하는 COX 활성을 억제함으로써 상처부위의 염증성 prostaglandin의 생성을 억제하여 소염, 진통 효과를 나타낸다. 그러나, prostaglandin류들은 생체 내 다양한 조직에서 만들어지며, 염증반응 뿐만 아니라 혈액응고, 면역반응, 신장기능, 위장관 보호, 신경조직의 성장과 발달, 상처의 치유, 혈관 조절 및 골조직의 대사등에 관여하는 것으로 알려져 있다^{25,26}. 그러므로, NSAIDs 약물들의 부작용²⁷인 위 점막 손상, 신장기능 이상, 혈소판응집 저해 등은 COX를 비선택적으로 억제함으로써 각 조직의 보호 역할을 하는 prostaglandin의 생성이 억제되어 일어난다.

COX는 생체내에서 두 종류의 이성 효소가 존재하는 것으로 최근 밝혀져 있는데²⁸, 정상 상태에서 발현하여 위장관 보호, 신장기능조절과 같은 신체의 항상성 유지에 관여하는 COX-1과, 염증이나 oxidative stress, 기타 면역 반응시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포내 발현이 증가하는 COX-2가 있음이 알려져 있다. 최근 기존 NSAIDs의 부작용을 감소시키기 위해 COX-2 효소만을 선택적으로 억제하는 천연물로부터의 약물 개발이 많이 이루어지고 있다. 또한, COX-2 저해제는 염증의 치료뿐만 아니라, 암 예방의 측면에서도 기대되어지고 있다. 연구에 의하면, 암세포 및 악성 종양 조직에서 COX-2가 많이 유도되어 정상 세포에 비해 훨씬 많은 양의 prostaglandin이 생성되며, 종양조직내의 prostaglandin량의 증가는 대부분 COX-2 발현의 증가로 인한 것이고, PGE₂와 같은 prostaglandin류는 혈관 생성을 촉진하고 세포의 증식을 도울 뿐만 아니라 면역능력을 억제하므로, prostaglandin류의 과잉생성은 암세포의

성장에 좋은 환경을 형성해 준다²⁹. 또한 COX-2의 과도한 발현은 apoptosis를 억제시키고 암 세포의 전이 능력을 증대시킨다.

지금까지 이루어진 COX-2 저해제 탐색 연구는 분리 정제한 COX 효소를 이용한 실험과 COX가 발현되는 세포주를 이용하는 실험으로 구분할 수 있는데, 특히, 마우스의 대식세포에 LSP를 처리하면 prostaglandin 생합성이 증가하게 되는데, 이는 주로 COX-2 효소에 기인하는 것³⁰으로 COX-2 억제 활성 검색에 유용한 것으로 사료된다. 여러 Flavonoid 화합물에 대해 COX-2 억제 활성이 검토되었다. Di Carlo 등³¹의 연구에서 J774A.1 대식세포주를 이용하여 quercetin, galanigin, apigenin, 그리고 naringenin이 농도 의존적으로 COX-2 활성을 억제한다고 보고하였고, Chen 등³²은 RAW 264.7 대식세포주를 이용하여 rutin, quercetin, quercetin pentaacetate의, Kim 등¹⁶은 황금에서 분리한 wogonin의 COX-2와 NOS 억제효과를 보고하였다. 본 실험에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 최종농도로 각 시료의 PGE₂ 생성 저해도를 측정한 결과 MeOH Ex.와 EtOAc 분획에서 각각 45.47%, 55.12%로 억제 효과가 나타났으며, EtOAc 분획에서 분리한 isoflavonone glycoside인 7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-O- β -D-glucoside(IC₅₀ 2.91 μM)와 Calycosin-7-O- β -D-glucoside(IC₅₀ 5.81 μM)에서 강한 COX-2 활성 억제 효과를 나타내었으며, 그 활성은 처음으로 보고되는 것이다.

사 사

본 연구의 일부는 2000년도 숙명여자대학교 확충 기반사업 연구비에 의해 수행되었기에 감사의 말씀을 드립니다.

인용문헌

1. 생약학연구회(2000) 현대생약학, p. 268. 학창사, 서울.
2. 김태희, 이경순, 문영희, 박종희, 육창수, 황완균(2000) 본초학, p. 393. 계축문화사, 서울.
3. 생약학교재편찬위원회(2001) 생약학, p. 478. 동명사, 서울.
4. 上海科學技術出版社(1985) 중약대사전, vol. 1, p. 121. 소학관, 東京.
5. Hikino, H., Funayama, S. and Endo, K. (1976) Hypotensive principles of Astragalus and Hedysarum roots. *Planta Med.* 30: 297-302.

6. Tomoda, M., Shimizu, N., Ohara, N., Gonda, R., Ishii, S. and Otsuki, H. (1992) A reticuloendothelial system-activating Glycan from Roots of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry* 31(1): 63-66.
7. Zang, Y. D., Wang, Y. L., Shen, J. P. and Li, D. X. (1984) Hypotensive and antiinflammatory effects of Astragalus saponin I. *Acta. Pharm. Sin.* 19: 333-337.
8. Hirotsu, M., Zhou, Y., Rui, H. and Furuya, T. (1994) Cycloartane Triterpene Glycosides from the Hairy Root Cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* 37(5): 1403-1407.
9. Zhou, Y., Hirotsu, M., Rui, H. and Furuya, T. (1995) Two Triglycosidic Triterpene Astragalosides from the Hairy Root Cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry* 38(6): 1407-1410.
10. Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M. and Yoshikawa, M. (1983) Saponin and Sapogenol. XXXVI. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of *Astragalus membranaceus* BUNGE(3). Astragalosides III, V, and VI. *Chem. Pharm. Bull.* 31(2): 709-715.
11. Kitagawa, I., Wang, H. K., and Yoshikawa, M. (1983) Saponin and Sapogenol. XXXVII. Chemical Constituents of Astragali Radix, the Root of *Astragalus membranaceus* BUNGE(4). Astragalosides VII and VIII. *Chem. Pharm. Bull.* 31(2): 716-722.
12. Golden, B. D. and Abramson, S.B. (1999) Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 25: 359-378.
13. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱 (1998) 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. *약학회지* 42(2): 214-219.
14. 하혜경, 이제현, 김정숙(2000) 종대황 추출물의 COX-2 활성 억제 효과. *응용약물학회지* 8: 73-77.
15. 강삼식, 김주선, 손건호, 김현표, 장현욱(2000) 양강으로부터 COX-2 억제활성물질의 분리. *생약학회지* 31(1): 57-62.
16. Chi, Y. S., Cheon, B. S. and Kim, H. P. (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1195-1203.
17. 김진숙, 김연태, 김정숙(1996) 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 뿌리의 성분 연구(I). *생약학회지* 27(4): 336-341.
18. 강삼식, 김주선, 강윤정, 한혜경(1990) 음양곽의 성분 에 관한 연구(II). *생약학회지* 21(1): 56-59.
19. Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1989) Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Smilax china*. *Kor. J. Pharmacogn.* 20(2): 76-82.
20. Chang, I. M., Yun, H. S. and Kazuo, Y. (1981) Revision of ¹³C-NMR Assignment of β -Sitosterol and β -Sito-steryl-3-O- β -D-glucopyranoside Isolated from *Plantago asiatic* Seed. *Kor. J. Pharmacogn.* 12(1): 12-24.
21. He, Z. Q. and Findly, J. A. (1996) Constituents of *Astragalus membranaceus*. *J. Nat. Prod.* 54(3): 810-815.
22. Hatano, T., Takagi, M., Ito, H. and Yoshida, T.(1998) Acylated flavonoid glycosides and accompanying phenolics from Lycorice. *Phytochemistry* 47(2): 289-293.
23. 김진숙, 김정숙(1997) 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge) 뿌리의 성분 연구(II). *생약학회지* 28(2): 75-79.
24. 백남인, 김영숙, 경중수, 박기현(1996) 황기의 간기능 보호 성분. *생약학회지* 27(2): 111-116.
25. Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M., Frank, J. and Reindeau, D. (1996) Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 111: 445-454.
26. Kawaguchi, H., Pilbeam, C., Harrison, J. and Raisz, L. (1995) The role of prostaglandins, in the regulation of bone metabolism. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 313: 36-46.
27. Isselbacher, K. J. et al. (1994) Harrison's Principles of Internal Medicine (13th ed.) 2, p. 1543.
28. Vane, J. R., Bakhle, Y. S. and Botting, R. M. (1998) Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 97-120.
29. Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J. T., Zhu, L., Miller, P. W., Wollman, J., Herschman, H. and Dubinett, S. M. (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophage Up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 58: 1208-1216.
30. Lee, S. H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D. (1996) Selective expression of mitogen inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267: 25934-25938.
31. Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M. and Di Carlo, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences* 68: 921-931.
32. Chen, Y. C., Shen, S. C., Lee, W. R., Hou, W. C., Yang, L. L. and Lee, T. J. F. (2001) Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Biochem.* 82(4): 537-548.