

槲皮와 橡木皮 추출물이 대식세포 RAW264.7 활성화에 미치는 영향

趙眞熙[#], 成洛成¹, 李暎鍾^{*}

暎園大學校 韓醫科大學 本草學教室, 1: 농촌진흥청 작물과학원

Effects of *Quercus dentata* and *Quercus acutissima* Extracts on the Activations of Macrophage RAW264.7 Primed with IFN- γ

Jin-Hee Jo[#], Nak-Sull Seong¹, Young-Jong Lee^{*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea
1: National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Objectives : The effects of methanol extracts from the cortex of *Quercus dentata* Thunb. and *Quercus acutissima* Carruth. on the activation of macrophage were examined.

Methods : Methanol extracts of *Quercus dentata* (QD) and *Quercus acutissima* (QA) were applied to cell line RAW264.7 (macrophage), and their effects were examined.

- Results :**
1. Extracts from QD and QA had no specific influence on the cell growth.
 2. Extracts from QD and QA did not activate macrophage independently, but the addition of IFN- γ facilitated the generation of macrophage's nitric oxide(NO).
 3. QD and QA extracts increased the manifestation of iNOS gene, when macrophage was activated by IFN- γ .
 4. QD and QA extracts increased the manifestation of TNF- α in macrophage, which took 2 hours.
 5. QD and QA extracts increased the generation of PGE₂ in macrophage.

Conclusion : QD and QA activate macrophage in the presence of IFN- γ . After activation is primarily facilitated by IFN- γ , it works on macrophage secondarily for the manifestation of iNOS gene and for the generation of TNF- α .

Key words : *Quercus dentata*, *Q. acutissima*, macrophages, activation, TNF- α

* 교신저자 : 이영중, 경원대학교 한의과대학 본초학교실 · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr Tel: 031-750-5415

제1저자 : 조진희, 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2006년 1월 25일 · 수정 : 2006년 3월 20일 · 채택 : 2006년 3월 24일

서 론

槲皮는 참나무과(Fagaceae) 참나무屬(Quercus)에 속하는 떡갈나무 *Quercus dentata* Thunb.의 樹皮이고, 橡木皮는 같은屬에 속하는 상수리나무 *Quercus acutissima* Carruth.의 樹皮이다¹⁾. 떡갈나무는 新修本草²⁾에 “槲若, 味甘苦平 無毒. 主痔止血, 療血痢, 止渴, 取脈灸用之. 皮, 味苦 水煎濃汁, 除蟲及癩, 俗用甚效.”라고 처음 수재되었으며, 잎(槲若, 槲葉)은 止血通淋의 작용이 있기 때문에 吐血, 衄血, 便血, 痔血, 小便淋痛 등에 사용되었고, 줄기껍질(槲皮)은 解毒消腫, 澀腸, 止血의 효능이 있어 瘡癰腫痛, 潰破不斂, 瘰癧, 痔瘡, 痢疾, 腸風下血 등에 사용되었으며, 열매(槲實仁)는 澀腸止瀉의 효능이 있어 腹瀉, 痢疾 등에 사용되었다¹⁾. 상수리나무는 新修本草²⁾에 “橡實, 味苦 微溫 無毒. 主下利, 厚腸胃, 肥健人. 其殼爲散及煮汁服, 亦主利, 並堪染用.”라고 처음 수재된 이후, 열매(橡實)는 收斂固澀, 止血解毒의 효능이 있어 泄瀉, 痢疾, 便血, 痔血, 脫肛, 小兒疝氣, 瘡癰久潰不斂, 乳腺炎, 辜丸炎, 面黥 등에 사용되었고, 줄기껍질(橡木皮)은 解毒利濕, 澀腸止瀉의 효능이 있어 泄瀉, 痢疾, 瘡瘍, 瘰癧 등에 사용되었다¹⁾.

참나무屬의 수피에는 항균, 항산화, 항암 등의 효능이 있고³⁾, 이들 효능은 주로 프라보노이드류 성분과 관련이 있다고 보고되었으며⁷⁾, 열매에도 항암, 항염 등에 유효한 성분이 있고⁸⁾, 또한 트립신억제인자가 있다고 보고되었다⁹⁾. 그리고 참나무屬에 기생하는 겨우살이 *Viscum album* 등의 알콜 추출물에도 항암, 항염 등의 효능이 있으며¹⁰⁾, 그 유효성분 또한 프라보노이드류라고 보고된 바 있다¹¹⁾.

Andresek 등³⁾은 참나무屬인 *Quercus robur*의 수피로부터 80% 메탄올 추출물의 항균 및 항산화효과를, 그리고 Sheu 등⁶⁾은 *Quercus glauca*의 잎에서 추출한 성분이 혈관계에서 유해한 superoxide anion을 제거한다고 보고하였고, Goun 등⁴⁾ 및 Krizkova 등⁵⁾은 *Quercus robur*, *Quercus suber* 등의 메탄올 추출물이 항암효능이 있음을 보고한 바 있다.

한편 대식세포(macrophage)는 인체방어시스템의 초기에 작용하며, 대식세포에 의한 nitric oxide(NO)의 생성(synthesis)은 중요한 면역반응 과정이다. 대식세포에서 NO는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의하여 L-arginine으로부터 신생되며, iNOS gene의 발현을 위해서는 우선 인터페론(IFN- γ)이 필요하고 다음으로는 박테리아성 lipopolysaccharide(LPS)나 cytokines 등이 필요하다¹²⁾. iNOS에 의하여 생성

되는 NO는 항균이나 항암과정과 밀접하게 연관되어 있기 때문에¹⁴⁾, 대식세포 iNOS gene의 발현에 효과가 있는 천연물질에 대한 연구는 다양하게 진행되고 있다.

한의학에서 槲皮와 橡木皮가 解毒消腫의 효능으로 사용되고 있고, 참나무屬 식물에 항암과 산화환원 반응에 관여하는 성분이 있다고 보고되었으므로, 槲皮와 橡木皮가 대식세포의 iNOS gene의 발현에 효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 槲皮와 橡木皮가 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 검증하고자, 槲皮와 橡木皮 추출물이 대식세포의 성장률, NO 신생 및 iNOS gene의 발현, PGE₂ 생성 등에 미치는 영향을 검사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용한 떡갈나무(*Quercus dentata* Thunb.)와 상수리나무(*Quercus acutissima* Carruth.)는 충북 제천군 덕산면 도전리에 야생하는 것을 2004년 5월에 수피를 벗겨내어 채취한 후 음건하였다. 농촌진흥청 작물과학원 약용작물 연구실의 기원식물 감정 후 실험 재료로 사용하였다.

2) 시 약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, Minimum essential medium (MEM), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), L- glutamine (200mM), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, TRIzol, ethidium bromide, glycine, glycerol, Tris-HCl 등은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Sodium bicarbonate (NaHCO₃), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma(Louis, MO, USA)에서, recombinant mouse tumor necrosis factor- α (TNF- α), formamide 등은 Boehringer Mannheim (Germany)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 시료의 제조

槲皮와 橡木皮의 메탄올 추출물은 Accelerated

Solvent Extractor (ASE300 : Dionex cooperation, U.S.A)를 이용하여 건조시료 중량의 5배량의 100% 메탄올을 넣고, 추출온도 50°C, 추출시간은 5분씩 3회, 추출압력은 1,500psi에서 1차 추출액을 얻고, 다시 건조시료 중량의 5배량의 100% 메탄올을 넣고, 환류 냉각추출장치를 이용하여 50°C에서 2시간 추출하고 여과하여 2차 추출액을 얻은 다음, 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거 후 추출물을 얻었다. 槲皮 1 Kg에서 92 g, 椴木皮 1 Kg에서 113 g의 건조 분말을 각각 얻었다.

2) RAW 264.7 세포의 배양

생쥐 대식세포 RAW 264.7 cells (American Type Culture Collection, ATCC TIB 71, USA)의 배양에는 DMEM을 사용하였으며¹⁵⁾, 10% DMEM (2 mM glutamine, 100 g/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin)으로, 5% CO₂ 37°C로 조정된 incubator에서 배양하였으며, 1주일에 2 번 계대배양하였다.

3) Cell Proliferation Assay

세포생존율을 측정하기 위하여 MTT reduction 방법을 사용하였다. 96 well plate에 0.5 mg/mL (1 mg/mL)의 MTT 200 μ l를 넣고 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양후에 MTT용액을 제거하고 200 μ l의 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 모든 well에 가하고 부드럽게 혼합하면서 형성된 진한 푸른색의 formazan 결정을 용해시킨 후 microplate를 이용하여 570 nm에서의 UV흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상군에 대한 백분율로 나타났다.

4) NO 량의 측정

배양액내의 nitrite(NO₂⁻) 함량은 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) kit (Bio-Tek, USA)를 사용하여 Griess 반응으로 측정하였다. Kit의 well에 100 μ l의 시료와 동량의 Griess 용액(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% α -naphthylethylene

diamine-HCl-H₂O)을 가하여 실온에서 10 분 동안 반응시킨 다음, Titertek ELISA reader (Flow, Rockville, MD)를 사용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Prostaglandin E₂ 측정

Prostaglandin E₂(PGE₂)용 ELISA kit(Amersham Biosciences, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 24 시간 배양 후 각 well의 배양액으로부터 상등액 50 μ l

를 채취하여 동량의 반응액을 가하여 실온에서 10 분 동안 반응시킨 다음, Titertek ELISA reader를 사용하여 파장 630nm에서 흡광도를 측정하여, 각 well의 PEG₂ 함량을 산출하였다.

6) iNOS와 TNF- α 발현량의 측정

iNOS와 TNF- α 발현량 측정에는 Northern blotting analysis 방법을 이용하였으며, total RNA는 RNA-purification Kit(Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. Total RNA 15-20 μ g을 formaldehyde / formamide를 처리한 후 1.2% agarose로 전기영동한 다음, nylon membrane으로 blotting 하였으며, 이때 buffer로는 20 \times SSC를 사용하였다. Pre-hybridization 후, random [α -³²P] dCTP labeled probes와 42°C에서 20 시간 hybridization을 실시하였으며, 반응 조건은 10% dextran sulfate, 50% formamide, 4 \times SSC, 1 \times Denhardt's solution, 10 g/l salmon sperm DNA 였다. 반응이 끝난 후에 세척 및 건조과정을 거치고 autoradiograph로 검경하였다.

7) 통계 분석

실험 성적은 평균 또는 mean \pm SD로 나타내었고, 통계적 유의성은 unpaired Student t-test에 의하여 검정하였으며, p<0.05 인 경우에 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 槲皮 추출물의 RAW264.7세포 성장률에 대한 영향

槲皮 추출물이 대식세포의 성장(growth)에 대하여 부정적인 또는 긍정적인 영향이 있는지를 검사하기 위하여, 槲皮 추출물의 량을 3-100 μ g/mL 농도로 배양액에 첨가하여 8 시간 동안 배양하면서 槲皮 추출물의 영향을 검사하였다. Mitochondrial dehydrogenase의 활성 능력을 MTT가 청색의 formazan으로 전환시키는 반응인 MTT assay로 살아있는 대식세포(RAW264.7)의 수를 배양시작 1, 2, 4, 8 시간에 측정하여 상호비교한 결과, 배양후 4 시간에 대조군의 세포수는 1.92 \pm 0.28 $\times 10^2$ cells/mL(mean \pm SD)이었고, 첨가된 추출물이 3 μ g/mL 농도인 경우의 세포수는 1.96 \pm 0.28, 10 μ g/mL 농도의 경우에는 1.85 \pm 0.30, 30 μ g/mL의 경우에는 2.00 \pm 0.27, 그리고 100 μ g/mL 농도로 첨가된 경우에는 1.91 \pm 0.32 $\times 10^2$ cells/mL 였다. 대조군과 상호비교한 결과,

槲皮 추출물이 첨가된 모든 실험군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

배양후 8 시간이 경과한 때의 대조군의 세포수는 2.53 ± 0.20 , 첨가된 추출물이 $3 \mu\text{g/mL}$ 농도인 경우의 세포수는 2.47 ± 0.38 , $10 \mu\text{g/mL}$ 농도의 경우에는 2.48 ± 0.17 , $30 \mu\text{g/mL}$ 의 경우에는 2.38 ± 0.18 , 그리고 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가된 경우에는 $2.40 \pm 0.20 \times 10^2$ cells/mL 였다. 대조군과 상호비교한 결과, 槲皮 추출물이 첨가된 모든 실험군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

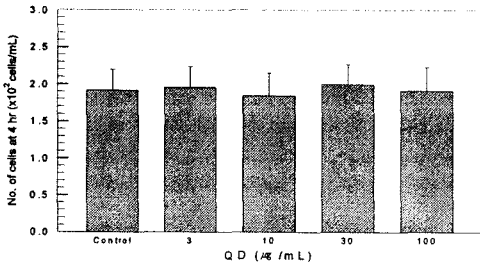


Fig. 1 The effects of *Q. dentata* extract(QD) on the growth rate of cultured macrophage cell line, RAW264.7, for 4 hrs.

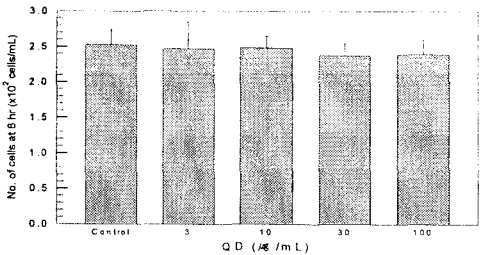


Fig. 2 The effects of *Q. dentata* extract(QD) on the growth rate of cultured macrophage cell line, RAW264.7, for 8 hrs.

2. 橡木皮 추출물의 RAW264.7세포 성장률에 대한 영향

橡木皮 추출물이 대식세포의 성장(growth)에 대하여 부정적인 또는 긍정적인 영향이 있는지를 검사하기 위하여, 橡木皮 추출물의 량을 3-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 배양액에 첨가하여 8 시간 동안 배양하면서 橡木皮 추출물의 영향을 검사하였다. Mitochondrial dehydrogenase의 활성 능력을 MTT가 청색의 formazan으로 전환시키는 반응인 MTT assay로 살아있는 대식세포(RAW264.7)의 수를 배양시작 1, 2, 4, 8 시간에 측정하여 상호비교하였다.

배양후 4 시간에 대조군의 세포수는 1.88 ± 0.17 , 첨가된 추출물이 $3 \mu\text{g/mL}$ 농도인 경우의 세포수는 1.84 ± 0.05 , $10 \mu\text{g/mL}$ 농도의 경우에는 1.86 ± 0.39 , $30 \mu\text{g/mL}$ 의 경우에는

1.86 ± 0.19 , 그리고 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가된 경우에는 $1.81 \pm 0.12 \times 10^2$ cells/mL 였다. 대조군과 상호비교한 결과, 橡木皮 추출물이 첨가된 모든 실험군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다. (Fig. 3)

배양후 8 시간이 경과한 때의 대조군의 세포수는 2.61 ± 0.21 , 첨가된 추출물이 $3 \mu\text{g/mL}$ 농도인 경우의 세포수는 2.66 ± 0.20 , $10 \mu\text{g/mL}$ 농도의 경우에는 2.58 ± 0.11 , $30 \mu\text{g/mL}$ 의 경우에는 2.59 ± 0.28 , 그리고 $100 \mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가된 경우에는 $2.71 \pm 0.29 \times 10^2$ cells/mL 였다. 대조군과 상호비교한 결과, 橡木皮 추출물이 첨가된 모든 실험군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

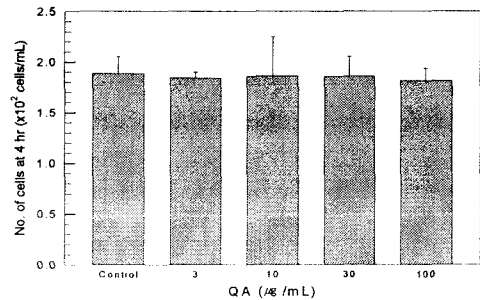


Fig. 3 The effects of *Q. acutissima* extract(QA) on the growth rate of cultured macrophage cell line, RAW264.7, for 4 hrs.

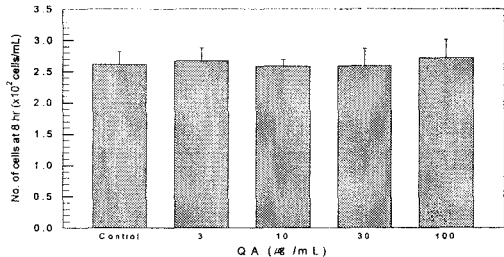


Fig. 4 The effects of *Q. acutissima* extract(QA) on the growth rate of cultured macrophage cell line, RAW264.7, for 8 hrs.

3. IFN-γ의 NO 생성에 대한 영향

대식세포(RAW264.7)를 24시간 배양하였을 때, IFN- γ 및 시료가 첨가되지 않은 대조군의 NO 생성량은 $2.84 \pm 0.33 \mu\text{M/mL}$ 이었으며, 槲皮 추출물 $100 \mu\text{g}$ 이 첨가된 경우에는 2.70 ± 0.54 , 槲皮 추출물과 IFN- γ (10 unit/mL)가 함께 첨가된 경우에는 5.50 ± 1.12 , 橡木皮 추출물 $100 \mu\text{g}$ 이 첨가된 경우에는 2.75 ± 0.51 , 그리고 橡木皮 추출물과 IFN- γ 가 함께 첨가된 경우에는 생

성된 NO 량이 $4.30 \pm 0.01 \mu\text{M/mL}$ 이었다. 대조군과 비교하였을 때, IFN- γ 가 함께 첨가된 경우에만 더 많은 량의 NO가 생성되었으며, 그 생성되는 량은 槲皮 추출물에 의해서는 NO 생성이 현저하였고($p < 0.01$), 橡木皮 추출물에 의해서도 유의한 정도로 NO 생성량이 증가되었다($p < 0.05$)(Fig. 5).

이와같은 결과에 따라 이후의 실험에는 polymyxin B(100 U/mL) 및 IFN- γ (10 U/mL)를 첨가한 상태에서 실시하였다.

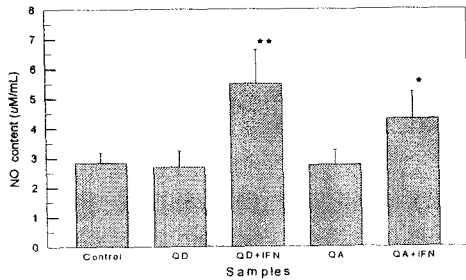


Fig. 5 The effects of *Q. detata*(QD) extract, *Q. acutissima* extract (QA) extract, and interferon- γ on the production of NO in cultured macrophage cell line, RAW264.7, for 24 hrs.

- QD : 100 $\mu\text{g/mL}$ of QD extract was added to medium
- QD+IFND : QD extract(100 $\mu\text{g/mL}$) and interferon- γ (10U/mL) were added to medium
- QA : 100 $\mu\text{g/mL}$ of QA extract was added to medium
- QA+IFND : QA extract(100 $\mu\text{g/mL}$) and interferon- γ (10U/mL) were added to medium

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control group.

4. 槲皮 추출물의 NO 생성에 대한 영향

Polymyxin B(100 U/mL) 및 IFN- γ (10 U/mL)가 함유된 상태에서, 槲皮 추출물을 첨가하였을 때 대식세포(RAW264.7)가 생산하는 NO 생산량을 시간별로 측정된 결과, 槲皮 추출물이 첨가되지 않은 대조군은 NO 생산량이 배양시간이 경과함에 따라 다소 증가하는 경향성은 보였으나, 그 정도가 매우 완만하였다. 槲皮 추출물이 3 $\mu\text{g/mL}$ 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가된 경우에도 대조군과 마찬가지로 NO 생산량이 배양시간이 경과함에 따라 다소 증가하는 경향성은 보였으나, 그 증가정도는 매우 완만하였다. 槲皮 추출물을 30 $\mu\text{g/mL}$ 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가된 경우에는 NO 생산량이 배양시간이 경과함에 따라 증가하였

다(Fig. 6).

槲皮 추출물을 농도별로 첨가하여 24 시간동안 배양한 다음, 대식세포가 생성한 NO 량을 측정된 결과, 대조군의 NO 생성량은 2.85 ± 0.27 , 槲皮 추출물 3 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군은 2.61 ± 0.22 , 10 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군은 3.04 ± 0.54 , 30 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군은 4.21 ± 1.01 , 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 $5.68 \pm 1.01 \mu\text{M/mL}$ 이었다. 대조군과 비교하였을 때, 30 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 유의하게 상승하였으며($p < 0.05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 유의하게 상승하였다($p < 0.01$)(Fig. 7).

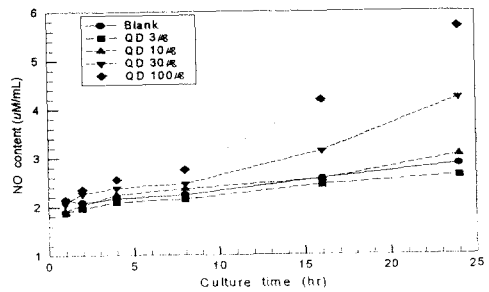


Fig. 6 The increasing patterns of NO contents produced by macrophage. The macrophages was cultured with *Q. dentata*(QD) in presence of Polymyxin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL).

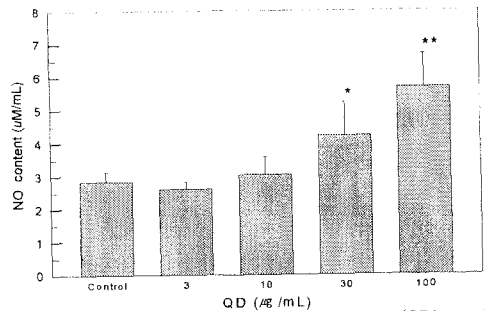


Fig. 7 Dose-dependent effects of *Q. detata* extract(QD) on NO production by RAW264.7 cells. All media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL). 3-100 $\mu\text{g/mL}$ of QD was added to the media, and the cells were incubated for 24 hrs.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control group.

5. 橡木皮 추출물의 NO 생성에 대한 영향

Polymyxin B(100 U/mL) 및 IFN- γ (10 U/mL)가 함유된 상태에서, 橡木皮 추출물을 첨가하였을 때 대

식세포(RAW264.7)가 생산하는 NO 생산량을 시간별로 측정된 결과, 檫木皮 추출물이 첨가되지 않은 대조군의 NO 생성량이 배양시간이 경과함에 따라 다소 증가하는 경향성을 보였으나, 그 정도는 매우 완만하였다. 檫木皮 추출물이 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 첨가된 경우에도 대조군과 마찬가지로 NO 생산량이 배양시간이 경과함에 따라 다소 증가하는 경향성은 보였으나, 그 증가정도는 역시 완만하였다. 檫木皮 추출물을 10, 30 또는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가된 경우에는 NO 생산량이 배양시간이 경과함에 뚜렷하게 증가하는 경향성을 보였다(Fig. 8).

檫木皮 추출물을 농도별로 첨가하여 24 시간동안 배양한 다음, 대식세포가 생성한 NO 량을 측정된 결과, 대조군의 NO 생성량은 2.63 ± 0.50 , 檫木皮 추출물 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군은 2.80 ± 0.35 , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군은 3.02 ± 0.53 , 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군은 3.68 ± 0.62 , 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 4.26 ± 0.72 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 이었다. 대조군과 비교하였을 때, 檫木皮 추출물 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 유의하게 상승하였으며 ($p < 0.05$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군의 NO 생성량은 현저하게 상승하였다($p < 0.01$) (Fig. 9).

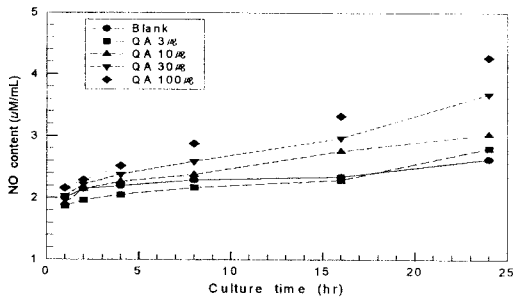


Fig. 8 The increasing patterns of NO contents produced by macrophage. The macrophages was cultured with *Q. acutissima* extract(QA) in presence of Polymyxin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL).

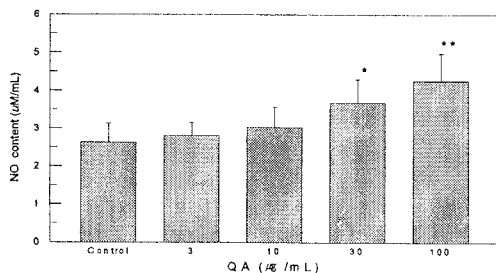


Fig. 9 Dose-dependent effects of *Q. acutissima* extract(QA) on NO production in RAW264.7 cells. All media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL). 3-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of QA

was added to the media, and the cells were incubated for 24 hrs.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control group.

6. 檫木皮 추출물의 iNOS 발현에 대한 영향

iNOS gene을 급격하게 발현시키는 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가한 것을 positive control로 하여 iNOS gene의 발현을 검사하였다(1st lane from left in Fig. 10). LPS 첨가군은 LPS inhibitor인 Polymyxin B를 첨가하지 않았으며, 나머지 실험군에는 Polymyxin B(100 U/mL) 및 IFN- γ (10 U/mL)를 첨가하였다.

檫木皮 추출물을 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 Northern blotting Analysis 방법으로 iNOS gene의 발현량을 검사한 결과, 檫木皮 추출물이 첨가된 경우에는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로부터 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 첨가된 량이 증가함에 따라 iNOS gene의 발현량은 점차 상승하였다(Fig. 10 upper).

또한 檫木皮 추출물 첨가하고 반응시간에 따른 발현량을 검사한 결과, 1 시간 및 2 시간 반응시킨 경우에는 iNOS gene 발현량이 추출물이 첨가되지 않은 (lane 0 in Fig. 10) 대조군과 발현량이 거의 동일하였으나, 4 시간 및 8 시간 반응시킨 경우에는 그 발현량이 현저하게 상승하였다. (Fig. 10 below).

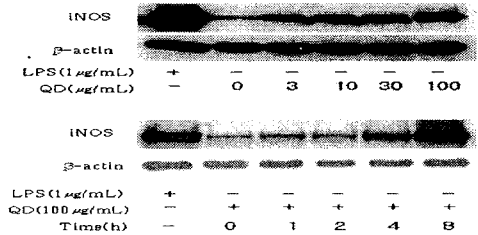


Fig. 10 Effects of *Q. dentata* extract(QD) on iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells. The media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and 10 U/mL IFN- γ , but the medium for LPS-added test group contained only IFN- γ .

-(upper) Dose-dependent effects of QD

-(below) Time-dependent effects of QD(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

7. 檫木皮 추출물의 iNOS 발현에 대한 영향

檫木皮 추출물을 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 Northern blotting analysis 방법으로 iNOS gene의 발현량을 검사한 결과, 檫木皮 추출물이 첨가

된 경우에는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로부터 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 첨가된 량이 증가함에 따라 iNOS gene의 발현량은 점차 상승하였다(Fig. 11 upper)

또한 椴木皮 추출물 첨가하고 반응시간에 따른 발현량을 검사한 결과, 1 시간 및 2 시간 반응시킨 경우에는 iNOS gene 발현량이 대조군과 발현량이 거의 동일하였으나, 4 시간 및 8 시간 반응시킨 경우에는 그 발현량이 현저하게 증가하였다(Fig. 11 below).

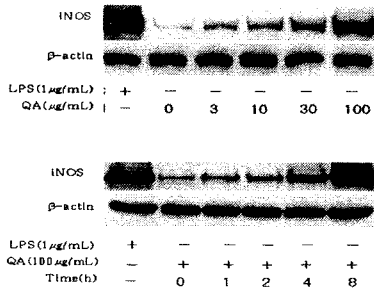


Fig. 11 Effects of *Q. acutissima* extract(QA) on iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells. The media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and 10 U/mL IFN- γ , but The medium for LPS-added test group contained only IFN- γ .

-(upper) Dose-dependent effects of QA

-(below) Time-dependent effects of QA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

8. 槲皮 추출물의 TNF- α 발현에 대한 영향

槲皮 추출물을 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 Northern blotting analysis 방법으로 TNF- α gene의 발현량을 검사한 결과, 槲皮 추출물이 첨가된 경우에는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로부터 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 TNF- α gene의 발현량에 큰 변화가 없었으나, 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가한 경우에는 TNF- α gene 발현이 현저하게 증가되었으며, 이는 槲皮 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 첨가할 때 대식세포가 왕성하게 활성화됨을 시사하였다(Fig. 12 upper).

또한 槲皮 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하고 반응시간에 따른 발현량을 검사한 결과, 2 시간 이후에는 TNF- α gene의 발현량이 현저하여 대식세포가 충분히 활성화되기에는 2 시간 정도가 소요됨을 알 수 있었다(Fig. 12 below).

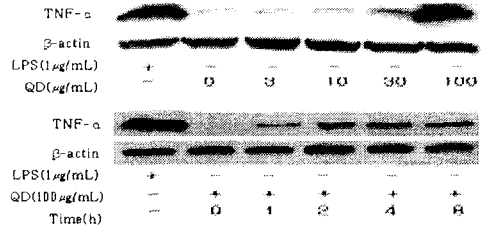


Fig. 12 Effects of *Q. dentata* extract(QD) on TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cells. The media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and 10 U/mL IFN- γ , but the medium for LPS-added test group contained only IFN- γ .

-(upper) Dose-dependent effects of QD

-(below) Time-dependent effects of QD(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

9. 椴木皮 추출물의 TNF- α 발현에 대한 영향

椴木皮 추출물을 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 Northern blotting Analysis 방법으로 TNF- α gene의 발현량을 검사한 결과, 椴木皮 추출물이 첨가된 경우에는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로부터 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 TNF- α gene은 거의 발현되지 않았으며, 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가한 경우에는 TNF- α gene 발현이 현저하였으며, 이는 椴木皮 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 첨가할 때 대식세포가 왕성하게 활성화됨을 시사하였다(Fig. 13 upper).

한편, 椴木皮 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하고 반응시간에 따른 발현량을 검사한 결과, 2 시간 이후에는 TNF- α gene의 발현량이 현저하여 대식세포가 충분히 활성화되기에는 2 시간 정도가 소요됨을 알 수 있었다(Fig. 13 below).

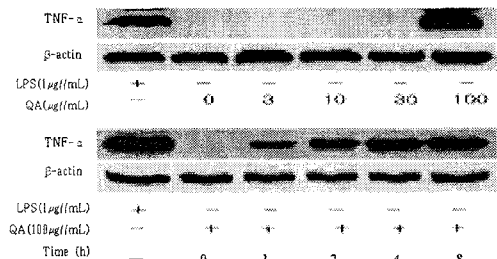


Fig. 13 Effects of *Q. acutissima* extract(QA) on TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cells. The media contained the LPS inhibitor Polymyxin B(100 U/mL) and 10 U/mL IFN- γ , but the medium for LPS-added test group contained only IFN- γ .

-(upper) Dose-dependent effects of QA

-(below) Time-dependent effects of QA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

10. 槲皮 추출물의 PGE₂ 생성에 대한 영향

Prostaglandin E₂(PGE₂)는 여러 조직에서 생산되어 소화관확장, 신혈관확장 등의 활성이 있는 안정한 물질이며, 대식세포에서도 생성된다. 대식세포에서 유리되는 PGE₂는 상기 활성과 함께 림프구변형억제, 세포독성억제 등의 활성이 있고 여러 염증반응을 조절하며, 과도하면 부작용을 유발하기도 한다. PGE₂ 역시 대식세포의 활성정도를 판단하는 한 지표가 되므로 검사하였으며, 배양된 대식세포 배지에서 PGE₂를 측정하기 위하여, 정량곡선을 준비하여 시료가 첨가된 실험군들의 PGE₂ 함량산출의 기준으로 삼았다(Fig. 14).

Polymixin B(100 U/mL) 및 IFN- γ (10 U/mL)가 함유된 상태에서, 槲皮 추출물을 농도별로 첨가하여 24 시간동안 배양한 다음, 대식세포가 생성한 PGE₂ 생성량을 측정된 결과, 대조군의 PGE₂ 생성량은 0.40 \pm 0.12, 槲皮 추출물 10 μ g/mL 첨가군은 4.5 \pm 1.29, 30 μ g/mL 첨가군은 8.75 \pm 1.5, 그리고 100 μ g/mL 첨가군의 PGE₂ 생성량은 10.5 \pm 2.08 pg/mL 이었다. 대조군과 비교하였을 때, 槲皮 추출물이 첨가된 모든 실험군의 PGE₂ 생성량은 현저하게 상승하였다(p<0.01)(Fig. 14).

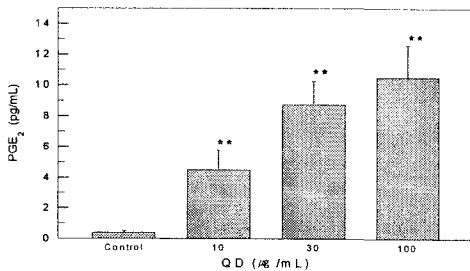


Fig. 14 Dose-dependent effects of *Q. detata* extract(QD) on prostaglandin E₂(PGE₂) by RAW264.7 cells. All media contained the LPS inhibitor Polymixin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL). 3-100 μ g/mL of QD was added to the media, and the cells were incubated for 24 hrs.

** p<0.01 significantly different from control group.

11. 橡木皮 추출물의 PGE₂ 생성에 대한 영향

橡木皮 추출물의 첨가에 따른 PGE₂ 생성량의 변화 역시 槲皮 추출물의 경우와 같은 방법으로 검사하

였다. 橡木皮 추출물을 농도별로 첨가하여 24 시간동안 배양한 다음, 대식세포가 생성한 PGE₂ 량을 측정된 결과, 대조군의 PGE₂ 생성량은 0.25 \pm 0.19, 橡木皮 추출물 10 μ g/mL 첨가군은 1.50 \pm 0.42, 30 μ g/mL 첨가군은 2.62 \pm 0.48, 그리고 100 μ g/mL 첨가군의 PGE₂ 생성량은 6.06 \pm 0.42 pg/mL 이었다. 대조군과 비교하였을 때, 橡木皮 추출물 첨가군 모두 PGE₂ 생성량이 현저하게 상승하였으며(p<0.01), 첨가되는 추출물의 량이 증가함에 따라 생성되는 PGE₂의 량도 상승하였다(Fig. 15).

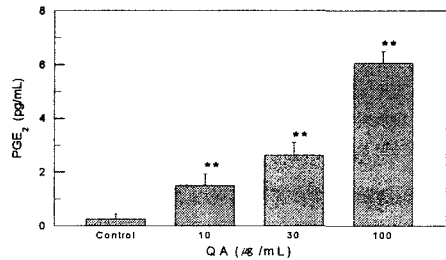


Fig. 15 Dose-dependent effects of *Q. acutissima* extract(QA) on PGE₂ by RAW264.7 cells. All media contained the LPS inhibitor Polymixin B(100 U/mL) and IFN- γ (10 U/mL). 3-100 μ g/mL of QA was added to the media, and the cells were incubated for 24 hrs. ** p<0.01 significantly different from control group.

고찰

참나무 科(Fagaceae)의 참나무 屬(*Quercus*)에 속하는 식물들은 중요한 활성수용체를 생산하고 열매는 식용 전분과 탄닌을 생산하며 우리나라에서는 落葉樹種의 6종과 常綠樹種 5종이 자라고 있는데 常綠樹種은 남부에 국한되어 있지만 落葉樹種은 전국 각지에 분포하며 兩原잡종과 三原잡종을 만든다¹⁶⁾.

참나무 屬에 속하는 떡갈나무 *Quercus dentata* Thunb.와 상수리나무 *Quercus acutissima* Carruth.는 잎, 열매 및 줄기껍질이 약용되고 있다. 떡갈나무는 新修本草²⁾에 “槲若,味甘苦平無毒.主痔,止血,療血痢,止渴,取脈灸用之.皮,味苦水煎濃汁,除蟲及癩,俗用甚效.”라고 처음 수재된 이래 本草綱目¹⁷⁾에 橡木皮는 “氣味 苦平 無毒.主治 惡瘡 因風犯露致腫者,煎汁日洗,令膿血盡乃止.止水痢,消瘰癧”이라 하였고, 槲木皮는 “俗名 赤龍皮.氣味 苦澁無毒.主治 煎服,除蟲及漏,甚效.煎湯,洗惡瘡,良.能吐瘰癧,澁五臟.止赤白痢,腸風下血”이라 하였다.

채취시기에 대해 圖經本草¹⁸⁾에 “槲若... 不拘時採

其葉並皮用.”이라 하였고, 또한 “橡實 … 不拘時採其皮並實用”이라하여 樹皮는 수시로 채취할 수 있다고 하였다.

떡갈나무 껍질에는 탄닌 3.07-14.44%가 함유되어 있으며, 탄닌에는 gallic acid, catechin, gallocatechin, catechin-(4a→8) gallocatechin, gallocatechin(4a→8)catechin, 3-O-galloylepigallocatechin-(4β→8)-catechin, gallocatechin(4a→6)catechin, 등이 함유되어 있으며, 상수리나무 껍질에는 탄닌 5-10%가 함유되어 있다¹¹⁾.

체내 염증과정에서는 다량의 nitric oxide(NO), prostaglandin E2 (PGE₂) 등의 염증인자가 생성되는데, 이들은 septic shock 혹은 rheumatoid arthritis(류마티스성 관절염)와 같은 염증성 질병의 원인이 되기도 하지만, NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 갖고 있어 체내에서 부족해서도 안된다¹⁴⁾. 포유동물에서 분리한 nitric oxide synthase (NOS)는 물리화학적 성상에 따라 type I, II, III 등 3종류의 동종 효소로 나뉘는데 type I (neuronal NOS)과 III (endothelial NOS)은 세포속에서 계속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS (constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS (iNOS)로 나누어진다¹⁵⁾. 이러한 NOS 들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 생성하는데²⁰⁾, 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다. 일반적인 NO의 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 유발한다²¹⁾.

TNF-α는 활성화된 macrophage, fibroblast 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 종양세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개 물질로 알려져 있다¹⁹⁾. 대식세포는 능동 및 수동 면역에서 매우 중요한 역할을 한다. LPS에 의한 대식세포의 활성화는 TNF-α와 같은 다양한 염증 매개물질을 유도하는 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO 형성과정으로 이어진다¹⁹⁾.

한의학에서 槲皮와 橡木皮가 解毒消腫의 효능으로 사용되고 있고, 참나무 屬 식물에 항암과 산화환원 반응에 관여하는 성분이 있다고 보고되었으므로, 槲皮와 橡木皮가 대식세포의 iNOS gene의 발현에 효

과가 있을 것으로 생각된다. 이에 저자는 槲皮와 橡木皮가 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 검증하고자, 떡갈나무 *Quercus dentata* Thunb.와 상수리나무 *Quercus acutissima* Carruth.의 수피 추출물이 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 검증하고자 각 추출물의 대식세포(cell line RAW264.7)에 대한 영향을 조사하였다.

본 연구에서는 우선 각 추출물이 대식세포의 성장에 영향을 미치는지를 검사한 결과 槲皮와 橡木皮 추출물은 RAW264.7 cell의 growth를 촉진시키거나 또는 억제시키는 등의 특별한 영향이 없는 것으로 판단되었다(Fig. 2,4).

그리고 대식세포가 활성화되는지를 판단하는 기준으로 우선 NO의 생성여부를 검사하였다. 대식세포에서의 NO 생성에는 우선 IFN-γ가 촉발기능을 담당하며, 그 다음으로 LPS 등의 항원에 의해 NO 생성이 2차적으로 증폭되므로²³⁾, 본 연구에서는 槲皮 및 橡木皮 추출물이 대식세포의 NO 생성에 영향을 미치는지를 검정하기 위하여, 우선 그 과정에 IFN-γ에 의한 촉발과정이 요구되는지를 검사하였다. 또한, 상기한 바와 같이, NO 생성은 LPS에 의해서도 촉발될 수 있기 때문에 실험과정중에 공기중의 박테리아 잔해물 등 LPS를 포함하는 물질들의 영향을 차단하기 위하여, LPS의 inhibitor인 polymixin B(100 U/mL)를 첨가한 상태에서 실시하였다.

대식세포를 활성화시킬 수 있는지를 검사하는 과정에서, 槲皮와 橡木皮 추출물은 독자적으로는 대식세포를 활성화시키지 않았으나, IFN-γ가 첨가된 경우에는 대식세포의 NO 생성을 촉진하였고(Fig. 5), 이는 NO를 생산하는 iNOS gene이 발현된 결과임을 확인하였다(Fig. 10). 이와 더불어 槲皮와 橡木皮 추출물이 첨가된 경우에는 3 μg/mL으로부터 100 μg/mL 까지 첨가된 양이 증가함에 따라 iNOS gene의 발현량은 점차 상승하였으며(Fig. 11), 이는 iNOS gene의 발현이 증폭되는 요인이 槲皮와 橡木皮 추출물의 영향임을 시사한다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 槲皮와 橡木皮에는 직접적으로 대식세포를 활성화시키는 성분은 없으나, IFN-γ에 의하여 대식세포의 활성화가 촉발되면 이를 증폭시키는 작용을 하는 성분이 함유되어 있다고 생각된다.

대식세포가 일단 활성화되면 그 결과로 TNF-α가 생산되기 시작한다. 활성화 과정에서 대식세포는 초기에는 IFN-γ, CD40 등 외부에서 유래되는 cytokines에 의해 활성화되어 TNF-α 등의 cytokines을 생산하지만, 대식세포는 스스로도 TNF-receptor를 보유하

고 있다³⁷⁾. 대식세포가 1차적으로 활성화되어 소량의 TNF- α 가 생산되면, 생산된 TNF- α 는 대식세포의 표면에 있는 TNF-receptor와 재반응하는 과정을 되풀이함으로써 대량의 TNF- α 를 분비하기 때문에, TNF- α 의 함량은 대식세포의 활성화를 판단하는 중요한 지표가 된다. 대식세포가 분비하는 TNF- α 의 발현양상을 iNOS와 같은 방법으로 검사한 결과, 槲皮와 椴木皮 추출물의 영향으로 대식세포에서의 TNF- α 발현은 증폭되었으며, TNF- α gene의 발현량으로 미루어 보아 대식세포가 충분히 활성화되는데에는 2시간 정도가 소요됨을 알 수 있었다(Fig. 12). 또한 대식세포가 완전히 활성화되면 PGE₂ 등의 물질들을 분비하므로²³⁾, 본 연구에서 PGE₂를 검사하였다. 槲皮 및 椴木皮 추출물의 첨가로 대식세포의 PGE₂ 생성량 또한 현저하게 상승하였음은 추출물에 의하여 대식세포가 완전히 활성화됨을 시사하였다(Fig. 15, 16).

이상의 결과에서 槲皮와 椴木皮 추출물에는 대식세포를 활성화시키는 성분이 함유되어 있으며, 그 작용은 1차적으로 IFN- γ 가 대식세포의 활성화를 촉발한 다음에 2차적으로 대식세포에 작용하여 iNOS gene의 발현 및 TNF의 생산을 증폭시키는 기능이라고 생각된다.

NO를 생성하는 효소(NOS; nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS(cNOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS(iNOS)의 두가지로 크게 분류된다. 본 연구에서 검사한 iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나, 외부상처에 대한 반응 및 염증같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines인 interleukin-1이나 TNF, LPS 등에 의해 유도되고 glucocorticoids에 의해 그 효소의 유도가 저해되며, 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있고, iNOS에 의해 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상등 생체에 유해한 작용을 나타낸다. iNOS에 의하여 생성되는 NO는 항균과정이나 항암과정과 밀접하게 연관되어 있기 때문에¹³⁾, 대식세포 iNOS gene의 발현에 효과가 있는 천연물질에 대한 연구는 다양하게 진행되고 있다. 본 실험결과에서, 槲皮와 椴木皮 추출물은 RAW264.7 cell의 growth를 촉진시키거나 또는 억제시키는 등의 대식세포의 growth에는 특별한 영향이 없이(Fig. 2,4), iNOS gene의 발현을 증폭시키는 효과가 있었는데 이에 대해서는 주목할 필요가 있다고 생각된다. 한편, TNF는 IL-1과 더불어 면역계와 염증계를 연결시키는 주요 cytokine으로 분류되고 있으며 여러 가

지 암세포의 괴사에 관여하는 단백질로 알려져 있다. TNF- α 는 혈액과 조직사이의 구조물인 endothelial cells을 자극하여 ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1과 같은 adhesion 분자의 생산을 촉진하여 백혈구를 염증부위로 이동하게 한다. 염증부위에 축적된 백혈구는 cytokine을 지속적으로 분비하여 미생물과 종양세포에 대한 독성을 유지한다²⁴⁾. 본 실험 결과, 槲皮와 椴木皮 추출물이 대식세포의 growth에는 특별한 영향이 없이 iNOS gene 발현 및 TNF- α 생산을 증폭시킨다는 점은 槲皮와 椴木皮 추출물을 항균 및 항암제로 활용할 수도 있음을 시사한다. 이에 대해서는 이들 추출물이 동물의 in vivo 대식세포에서도 동일한 효과를 나타내는지 검사하는 등의 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

한편, NO와 TNF- α 는 소량이 생성되었을 경우에는 上記한 바와 같은 효능이 있으나, 많은 양이 생성되면 내재성 발열원으로 작용하기도 하고, 혈청단백질의 합성자극, 혈구세포의 생성억제 등의 부작용을 표출하기도 한다²⁵⁾. 또한, 대식세포에서 유리되는 PGE₂도 림프구변형억제, 세포독성억제, 염증반응을 조절하는 등의 활성이 있지만, 과다하게 생산되면 부작용을 유발하기도 한다²³⁾.

이와 같은 결과로 미루어보아, 槲皮 및 椴木皮는 IFN- γ 존재하에서 대식세포를 활성화시키는 효능이 있으며, 1차적으로 IFN- γ 에 의하여 활성화가 된 다음에 2차적으로 대식세포에 작용하여 iNOS gene의 발현 및 TNF의 생산을 증가시키는 효능이 있다고 사료된다. 본 연구에서 얻어진 槲皮와 椴木皮 추출물의 대식세포에 대한 효과를 효율적으로 활용하기 위해서는 보다 구체적인 작용기전 및 과량을 투여하였을 때 발생할 수 있는 문제점, 이들 추출물이 동물의 in vivo 대식세포에서도 동일한 효과를 나타내는지 검사하는 등의 추가적 실험이 필요하다고 생각된다.

결론

떡갈나무 *Quercus dentata* Thunb.와 상수리나무 *Quercus acutissima* Carruth.의 樹皮인 槲皮 및 椴木皮 메탄올 추출물이 대식세포(cell line RAW264.7)의 활성화 과정에 대한 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 槲皮 및 椴木皮 추출물은 대식세포의 cell growth에는 특별한 영향이 없었다.

2. 槲皮 및 橡木皮 추출물은 독자적으로는 대식세포를 활성화시키지 않았으나, IFN- γ 가 첨가된 경우에는 대식세포의 nitric oxide(NO) 생성을 촉진하였다.
3. 槲皮 및 橡木皮 추출물은 IFN- γ 에 의하여 대식세포의 활성화가 촉발되면 iNOS gene의 발현을 증폭시키는 효능이 있었다.
4. 槲皮 및 橡木皮 추출물은 대식세포에서의 TNF- α 발현을 증폭시키는 효능이 있었고, 그 효능의 발현에는 2 시간 정도가 소요되었다.
5. 槲皮 및 橡木皮 추출물은 대식세포의 PGE2생성량 또한 현저하게 상승시키는 효과를 보였다.

이와 같은 결과로 미루어보아, 槲皮 및 橡木皮는 IFN- γ 존재하에서 대식세포를 활성화시키는 효능이 있으며, 1차적으로 IFN- γ 에 의하여 활성화가 촉발한 다음에 2차적으로 대식세포에 작용하여 iNOS gene의 발현 및 TNF- α 의 생산을 증가시키는 효능이 있다고 사료된다.

참고문헌

1. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1999:2권 431-435.
2. 蘇敬 等撰 尙志鈞 輯校. 新修本草(輯復本). 合肥:安徽科學技術出版社. 1981:360.
3. Andrensek S, Simonovska B, Vovk I, Fyhrquist P, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom. *Int J Food Microbiol.* 2004;92(2):181-7.
4. Goun EA, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Kline MA, Cunningham G, Nguyen C, Miles H. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81(3):337-42.
5. Krizkova L, Lopes MH, Polonyi J, Belicova A, Dobias J, Ebringer L. Antimutagenicity of a suberin extract from *Quercus suber* cork. *Mutat Res.* 1999;446(2):225-30.
6. Sheu SY, Tsuang YH, Hsu FL, Lu FJ, Chiang HC. Superoxide anion scavenge effect of

- Quercus glauca* Thunb. in whole blood of patients with ankylosing spondylitis. *Am J Chin Med.* 1997;25:307-15.
7. Meng Z, Zhou Y, Lu J, Sugahara K, Xu S, Kodama H. Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. *Clin Chim Acta.* 2001;306:97-102.
8. Kitada S, Leone M, Sareth S, Zhai D, Reed JC, Pellicchia M. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. 2003. 46(20):4259-64.
9. Medvedkov AA, Ivashov AV. Isolation and some properties of protein inhibitor of trypsin from acorns of the oak tree. *Ukr Biokhim Zh.* 1994;66(6):67-72.
10. Bar-Sela G, Haim N. Abnoba-viscum (mistletoe extract) in metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil and leucovorin-based chemotherapy. *Med Oncol.* 2004;21(3):251-4.
11. Kim YK, Kim YS, Choi SU, Ryu SY. Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. *Arch Pharm Res.* 2004;27(1):44-7.
12. Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30:145-158.
13. Lorschach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 1993;268:1908-1913.
14. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochem Sci.* 1997;22:477-481.
15. Liu QP, Fruit K, Ward J, Correll PH. Negative regulation of macrophage activation in response to IFN- and lipopolysaccharide by the STK/RON receptor tyrosine kinase. *J Immunol.* 1999;163:6606-6613.
16. 이창복, 김윤식, 김경석, 이정석. 신고 식물분류학. 서울:향문사. 1986:180.

17. 陳貴廷 主編. 本草綱目通釋. 北京:學苑出版社. 1992:1485,1486.
18. 蘇頌 撰, 胡乃長 王致譜 輯注. 圖經本草 輯復本. 福建:龍源出版公社. 1988:374.
19. 신경민, 박영미, 김인태, 홍선표, 홍정표, 이경태. Amygdalin의 Murine Macrophage Raw 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과. 생약학회지. 2003;34(3):223-227.
20. Knowles RG, Mocada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. TIBS. 1992;17:399-402.
21. Stuehr HHJ, Kwon NS, Weise M, Nathan C. Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc Natl Sci USA. 1991;88:7773-7.
23. Lance M, Joan SH. Regulation of TNF- α production in activated mouse macrophages by progesterone. J Immuno. 1998;160:5098-5104.
24. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. Crit Care Med. 1993;447-463.
25. Le J, Vilcek J. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with Multiple Overlapping Biological Activities. Lab Invest. 1987;56:234-248.