

청목노상(*Morus alba* L.)추출물에 의한 Lipopolysaccharide로 유도된 Raw 246.7 cell에서 염증 억제효과

조영제* · 안봉전¹

경북대학교 식품공학과, ¹대구한의대학교 화장품약리학과

Anti-inflammatory Effect Of Extracts from *Cheongmoknosang* (*Morus alba* L.) in Lipopolysaccharide-stimulated Raw Cells

Young-Je Cho* and Bong-Jeun An¹

Department of Food Engineering, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

Received July 31, 2007; Accepted February 25, 2008

With extracts from *Cheongmoknosang*, anti-inflammatory effect was examined in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. LPS (10 ng/ml) treatment increased the production of inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α but the ethanol extracts from *Cheongmoknosang* slightly decreased the production of TNF- α and also reduced the expression of iNOS and the production of COX-2. It seems that anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Cheongmoknosang* is partly due to the inhibition of iNOS and COX-2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and AP-1 in Raw 264.7 cells.

Key words: anti-inflammatory, *Cheongmoknosang* leaves, effectextracts

서 론

최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며,¹⁾ 보다 건강하게 오래 살려는 인류의 필요성에 따라 근래에 이르러 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 다양한 자원으로부터 다양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서도 특히 식물자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다.²⁾ 이러한 식물 자원 중 뽕잎은 2,200여년 전부터 섭취되어 왔으며, 세계 최초의 의약서인 신농본초경(神農本草經)에 뽕잎과 뽕나무 뿌리껍질인 상백피(桑白皮)가 약으로 좋다고 기록되어 있어서 뽕나무를 섭취한 역사는 매우 길다. 그 후 소송(蘇頌), 신선복식방(神仙服食方), 깎다양생기(喫茶養生記), 오차경(吾妻經), 본초강목(本草綱目) 등 중국과 일본의 한방서에서 뽕잎의 효과와 먹는 방법 등이 많이 기록되어 있는데, 우리나라에서의 기록은 조선조 선조 때 허준의 동의보감(東醫寶鑑)에 '뽕잎은 따뜻하고 독이 없으며 각기(脚氣)와 수종(水腫)을 없애

주고 대·소장을 이롭게 하며 하기(下氣)하고 풍통(風痛)을 없앤다.'라 되어 있다. 이러한 뽕잎은 중국의 청초점(靑草店)에서 당뇨병, 뇌 중풍, 각기병 등을 치료하는데 이용되고 있다.³⁾

LPS (엔도톡신)는 그람 음성균의 외막 구성성분이며 옛날부터 발열물질로서 알려져 있다. 단구 세포 또는 macrophage는 미량의 LPS에 의해 활성화되고 다양한 사이토카인, 아라키돈산 대사산물, 활성산소, NO 등을 생산, 방출한다.⁴⁻⁸⁾ 생체의 면역기구로서 제1선을 담당하는 macrophage는 골수에서 생산되는 탐식세포로서 체내에 들어온 이물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, hydrogen peroxide (H₂O₂)나 nitric oxide(NO)와 같은 각종 세포독성물질을 분비하여 이종세포나 암세포를 파괴하는 면역세포이다.⁹⁾ 또한 세균이나 이물질을 탐식 제거하는 과정에서 interleukin-1(IL-1), IL-6 그리고 tumor necrosis factor (TNF- α)와 같은 여러 가지 사이토카인과 phosphatase와 같은 효소를 분비하여 체내면역현상을 조절하여 염증반응, 조혈기구 등에도 관여하는 면역계의 주요 방어기구이다.¹⁰⁻¹³⁾

따라서 본 연구에서는 생리활성 탐색연구의 일환으로 국내에 육종되는 108종의 뽕잎 중에서 청목노상을 선정하여 macrophage cell 라인인 Raw cell을 이용하여 항염증 효과를 검증하기 위하여 세포내의 단백질의 변화를 western blotting을 통하여 염증 억제효과를 검토하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-54-530-1265; Fax: +82-54-530-1269
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

재료 및 방법

추출물의 제조. 본 실험에서 사용된 뽕잎은 경북 상주시 소재 잠사곤충시험장에서 108종의 표본 묘목에서 채취하여 4°C에서 저온 저장하면서 이용하였다. *Helicobacter pylori* 저해 실험은 108종의 시료를 모두 사용하였으며, 항염증 실험을 위하여 *Helicobacter pylori* 저해 효과가 가장 우수한 청목노상 품종을 선정하여 뽕잎을 수거하고, 이를 건조시킨 후 분쇄하여 저온저장 하면서 이용하였으며, 뽕잎의 물 추출물은 시료 1g을 증류수 200 ml에 넣고 액이 100 ml가 될 때까지 가열 한 후 냉각하고, 에탄올 추출물은 시료 1g을 80% 에탄올 100 ml에 가하여, 이들 모두를 150 rpm에서 24시간 교반 추출 한 뒤 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하고, 각각의 상정액을 Whatman No. 1 여과지로 여과하여 시료로 사용하였으며, 항염증 실험을 위해서 각각의 추출물을 40 µg/ml과 80 µg/ml의 농도로 제조하여 사용하였으며, 시료는 0.1 µm pore size의 milipore filter를 통하여 여과시킨 액을 사용하였다.

시약 및 기기. 항염증효능 검정에 사용된 시약은 lipopolysaccharide(LPS), 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MTT)와 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 1차와 2차 antibody는 BD Bioscience(San Diego, USA), Cayman(Ann Arbor, USA), Zymed(South San Francisco, USA)에서 각각 구입하였다. Tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1β와 IL-6의 ELISA kit는 Pierce endogen (Rockford, IL., USA)에서 구입하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였으며, UV/vis spectrophotometer(Hitachi, Japan), centrifuge(Hitachi, Japan), ELISA reader(Bio Rad, Japan) 등을 사용하여 측정하였다.

세포배양. Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 Gibco사의 fetal bovine serum(FBS)를 10%, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 dish에 cell의 밀도가 2~3×10⁶/ml 정도가 되게 계대 배양하여 5% CO₂ 조건으로 cell 상태를 유지하였다. 실험을 할 때는, 80%의 confluency와 20회 이하 passages 조건을 준수하여 실험 시, 실험 전 12시간은 FBS를 제거한 배지로 cell을 배양시켰다.

Nitric Oxide 측정. NO 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide(NO)의 양을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태는 griess reagent(Sigma, USA)를 사용하였으며, 6 well plate에 2×10⁶개의 cell을 confluency가 80% 일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 LPS 50 µM을 control 군을 뺀 모든 well에다 넣어서 자극시켰다. 2 시간 후에 시료를 40-80 µg/ml의 농도로 처리하여 실험하였다. NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10 분간 차광시켜 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blotting에 의한 iNOS 발현 측정. Sample을 준비한 다음 raw cell의 confluency가 80% 때에 DMEM배지를 거두어 내고 무혈청 배지인 EMEM배지로 교환한 후에 약물을 처리하여 위와 같은 조건으로 배양하고 적정시간에 상정액은 제거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scrapper로 cell을 수확한 후에 lysis buffer를 넣어서 세포를 용출시켰다. 수확된 protein은 BSA (bovine serum albumin)으로 작성한 standard curve에 OD값을 대입시켜서 protein량을 보정하였다. 그 후에 coomassie blue로 염색하여 재보정한 protein을 western sample로 사용하였다.¹⁴⁾ 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후에 gel를 떼어내어서 transfer buffer에 10~15분 정도 담근 후 transfer buffer에 스펀지 2장을 깔고 그 위에 filter paper 1장 올려놓고 3 mm paper와 nitrocellulose filter도 buffer에 살짝 담근 후 양쪽 스펀지와 2 mm paper 사이에 nitrocellulose paper 그리고 gel를 잘 밀착시킨 후에 전극을 꽂아서 transfer시켰으며, 190 mA에서 1시간 이상 transfer한 후에 ponceau S에 2분 정도 담근 후에 band를 확인하였다. PBS로 2회 씻은 후 꺼내서 blocking buffer로 overnight시켜 background는 제거시켰다. 2번 씻은 후에 1:1,000으로 1차 antibody를 붙인 후 2차 antibody를 1:1,000 동안 붙인 후, 0.5% tween 20 PBS로 수차례 세척한 후에 ECL kit(Amersham Pharmacia, England)를 사용하여 film에 옮겼다.

사이토카인 생성량 측정. 대식세포를 배양하여 6-well에 cells(1×10⁶/ml)을 분주하고 agonist (세포 자극제)를 농도별 또는 시간별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS(1 µg/ml)를 처리하고, LPS 처리 후 24시간동안 시간대 별로 세포 배양액을 취하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70°C에서 보관하며 TNF-α 함량을 enzyme immuno assay(EIA) kit를 사용하여 측정하였으며, TNF-α의 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

결과 및 고찰

청목노상 추출물이 LPS로 염증이 유도된 raw 264.7 cell의 nitric oxide production에 미치는 영향. NO는 free radical 중의 하나로서, 매우 불안정한 분자이다. NO는 산소나 superoxide에 의하여 NO₂, N₂O₃, N₂O₄, nitrite (NO₂⁻) 및 nitrate (NO₃⁻)와 같은 안정한 nitrogen oxide로 바뀌어진다.⁴⁾ NO는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 만들어지며, NOS는 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS(eNOS) 및 neuronal NOS(nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 분류할 수 있다.⁵⁾ 청목노상 추출물 자체가 염증 유발에 관여하는지 여부를 판단하기 위하여 LPS로 염증을 유도시키지 않은 raw 264.7 cell에 청목노상 물추출물 및 에탄올추출물을 80 µg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정된 결과, Fig. 1에서와 같이 LPS를 처리함으로써 대식세포가 자극을 받아 13 µM의 NO를 생성

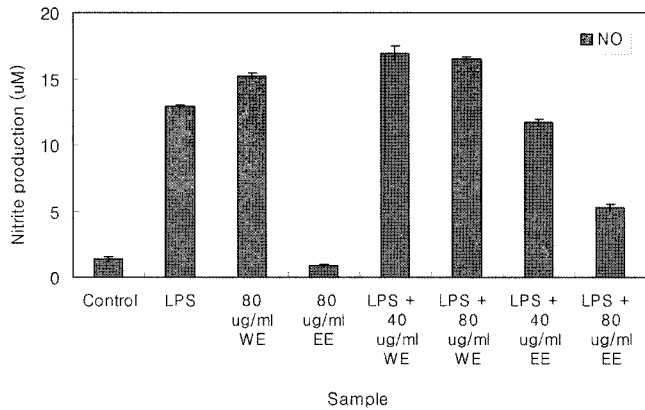


Fig. 1. Effect of extracts from *Cheongmoknosang* on the production of NO in raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of extracts from *Cheongmoknosang* dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with nine separate experiments. LPS: 10 ng/ml LPS treatment, WE: 80 $\mu\text{g/ml}$ water extracts treatment, EE: 80 $\mu\text{g/ml}$ ethanol extracts treatment, LPS+WE: 10 ng/ml LPS and water extracts (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) treatment, LPS+EE: 10 ng/ml LPS and ethanol extracts (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) treatment.

하여 positive control의 효과를 나타내었으며, 청목노상 물추출물군에서는 추출물의 첨가에 의해 대식세포를 더 자극하여 control에 비해 NO의 생성량이 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 청목노상 80% 에탄올추출물의 경우 추출물을 첨가하지 않은 raw 264.7 cell 배양액인 control군에 비해 NO 양의 증가가 관찰되지 않아 에탄올추출물 자체가 염증유발 반응에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 추출물간의 차이는 추출물에 유리된 성분의 차이에 의한 것으로 판단되었다. 또한 LPS로 염증이 유도된 raw 264.7 cell에서 청목노상 추출물의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 LPS와 함께 청목노상 추출물을 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO량을 측정된 결과 Fig. 1에서와 같이 청목노상 물추출물 처리군의 경우 LPS 단독처리군에 비해 NO의 양이 증가하였으나, 청목노상 에탄올추출물 처리군에서 40 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 처리에 의해 LPS 처리군보다 상대적으로 낮은 NO 생성량을 나타내었다. Byun 등¹⁵⁾은 현삼 메탄올 추출물에서, Kim 등¹⁶⁾은 상황 물추출물에서 LPS로 유도된 Raw cell의 NO production에 미치는 영향을 관찰한 결과 NO 생성량이 억제된 결과를 나타내었다고 보고하였으며, 본 실험의 결과 청목노상 에탄올추출물도 NO 생성을 저해함으로써 인해 염증억제제로 활용할 수 있을 것이라 판단되었다.

청목노상 추출물이 LPS로 염증이 유도된 raw 264.7 cell의 iNOS 발현에 미치는 영향. iNOS는 바이러스를 포함하는 전염성의 병원체에 대하여 방어하는 역할을 하며, 여러 염증 질환, 순환계 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다.^{6,7)} NO 생성 억제기작에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사한 결과 Fig. 2에서와 같이

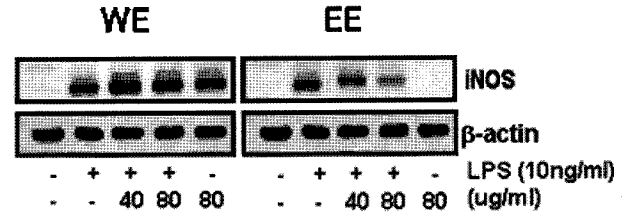


Fig. 2. Effect of extracts from *Cheongmoknosang* the production of iNOS in LPS stimulated raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of extracts from *Cheongmoknosang* dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of iNOS were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with nine separate experiments. LPS: 10 ng/ml LPS treatment, WE: 80 $\mu\text{g/ml}$ water extracts treatment, EE: 80 $\mu\text{g/ml}$ ethanol extracts treatment, LPS+WE: 10 ng/ml LPS and water extracts (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) treatment, LPS+EE: 10 ng/ml LPS and ethanol extracts (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) treatment.

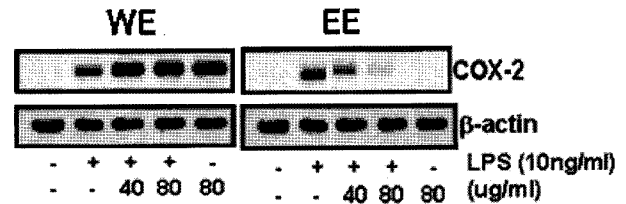


Fig. 3. Effect of extracts from *Cheongmoknosang* the production of COX-2 in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of extracts from *Cheongmoknosang* dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of COX-2 were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with nine separate experiments. LPS: 10 ng/ml LPS treatment, WE: LPS+40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ water extracts treatment, EE: LPS+40 and 80 $\mu\text{g/ml}$ ethanol extracts treatment.

Raw cell에서 LPS처리에 의해 iNOS 발현이 현저히 증가하였으며, 청목노상 물추출물 처리에 의한 iNOS 발현도 NO의 결과와 마찬가지로 발현이 LPS에 비해 상대적으로 증가함을 나타내었으나, 청목노상 에탄올추출물 처리구에서는 첨가된 추출물의 농도가 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80 $\mu\text{g/ml}$ 로 높아질수록 density가 현저히 감소하는 억제현상이 관찰되어 적절한 처리 농도만 제시된다면 우수한 염증억제 효과를 나타낼 수 있을 것이라 추측되었다. 이는 NO생성 결과와도 일치하는 실험 결과를 나타내었다. So 등⁸⁾은 대식세포에서 산터덕에 의해 iNOS 발현이 억제되었다는 결과를 보고하였으며, Byun 등¹⁵⁾은 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw cell의 iNOS 발현에 미치는 영향을 조사한 결과에서도 처리군에서 iNOS 발현이 감소한 결과를 나타내었다고 보고하였다.

청목노상 추출물이 LPS로 염증이 유도된 raw 264.7 cell의 COX-2 발현에 미치는 영향. Prooxidant나 proinflammatory stimuli(i.e. TPA, LPS, TNF α , ROI, etc)에 의해 MEKK-1, NF κ B의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin synthesis를 증가시켜 염증반응에 있어서 중추적 역할을 한다.^{17,18)} 또 monocyte에서 COX-2의 발현은 proinflammatory agent인

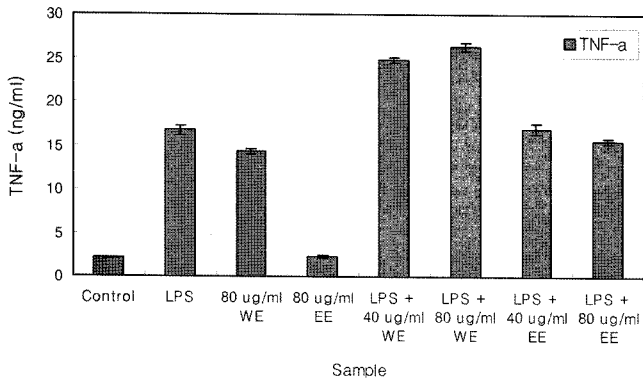


Fig. 4. Effects of extracts from *Cheongmokban* on the production of TNF- α in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 40 and 80 μ g/ml concentrations of extracts from *Cheongmokban* dissolved in D.W for 1 h prior to the addition of LPS (10 ng/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Control cells were incubated with vehicle alone. The concentrations of TNF- α were monitored as described in the experimental procedures. Data represent the mean \pm S.D. with nine separate experiments. LPS: 10 ng/ml LPS treatment, WE: 80 μ g/ml water extracts treatment, EE: 80 μ g/ml ethanol extracts treatment, LPS+WE: 10 ng/ml LPS and water extracts (40 and 80 μ g/ml) treatment, LPS+EE: 10 ng/ml LPS and ethanol extracts (40 and 80 μ g/ml) treatment.

IL-1 β , TNF- α 와 phosphatidic acid, fibroblast growth factor 등에 의해서 증식하고 glucocorticoid와 IL-4, IL-13에 의해 발현 억제가 유도된다. 그러므로 COX-2에 선택적인 inhibitor의 개발은 염증의 치료 target molecule이 되고 있다. 본 실험에서 LPS 처리시 COX-2 단백질이 유도되었으며, 청목노상 물추출물을 처리한 실험군에서는 LPS 처리군에 비해 상대적으로 높은 값을 나타내었으나, 청목노상 에탄올추출물 처리구의 경우 Fig. 3에서와 같이 청목노상 추출물의 처리농도가 높아질수록 LPS 처리군에 비해 농도 의존적인 COX-2의 억제 양상이 관찰되어 염증억제 효과가 우수한 것으로 판단되었다($p < 0.01$). Byun 등¹⁵⁾은 현상 메탄올 추출물을 처리에 의해 COX-2의 양이 현저히 줄어들었다고 보고하였다.

청목노상 추출물이 LPS로 염증이 유도된 raw 264.7 cell의 TNF- α 생성에 미치는 영향. TNF- α 의 생성은 Fig. 4에서와 같이 다른 실험데이터와 마찬가지로 청목노상 물추출물에 의해서 control에 비해 증가됨이 관찰되었고, 청목노상 알코올 추출물에 의해 다소 억제되는 것을 확인 할 수가 있었다. TNF- α 는 LPS를 처리하고 6시간만 되어도 일정량 이상을 만들어 낼 수 있는데, 청목노상 물추출물 처리구에서는 어떤 성분인지는 알 수 없으나 LPS보다도 더 많은 TNF- α 를 만들어 낼 수 있다는 흥미로운 결과를 나타내는 것으로 보아 추출 시 사용하는 용매에 따라 상반된 결과를 얻을 수도 있는 것으로 판단되었으며, 이에 대한 연구는 차후 지속적으로 이루어져야 한다고 생각된다.

초 록

108종의 뿌리 중 청목노상추출물에 의한 LPS로 염증을 유발한 Raw 264.7 세포에서 항염증 효과를 측정된 결과, 청목노상 에탄올추출물 자체는 염증반응에 관여하지 않았으며, 청목노상

에탄올추출물이 LPS 처리에 의해 증가된 염증관련 NO, iNOS, COX-2의 발현을 억제하고, TNF- α 의 생성을 억제함으로써 항염증 효과가 있음이 확인되었다.

Key words: 청목노상추출물, 항염증

참고문헌

- Robert, I. L. (1994) In Functional Foods Phytochemicals and antioxidants. Goldberg, I. (Ed.) Chapman & Hall, New York. pp. 393.
- Lee, S. E., Bang, J. K., Song, J., Seong, N. S., Park, H. W., Chung, H. G., Kim, G. S. and An, T. J. (2004) Inhibitory Activity on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) of Korean Medicinal Herbs. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **12**, 73-78.
- Lee, W. C., Kim, A. J. and Kim, S. Y. (2003) The study on the Functional materials and Effects of Mulberry leaf. *Food Sci. and Indust.* **36**, 2-14.
- Gross, S. S. and Wolin, M. S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 737-769.
- Stuehr, D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1411**, 217-230.
- Kroncke, K. D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 147-156.
- Oshima, H. and Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253-264.
- So, M. S., Lee, J. S. and Yi, S. Y. (2004) Inhibition of nitric oxide and cytokines in Macrophages by *Codonopsis lanceolata*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 986-990.
- Nirupama, S., Anil, K. S., Battu, A., Sangita, M., Sudip, G. and Nasreen, Z. E. (2005) Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **334**, 1092-1101.
- Iwona, M., Barbara, M., Violetta, R. S., Romuald, M., Zbigniew, S., Maciej, K. and Stefania, G. K. (2006) Proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 and TNF- α) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Immunology Letters.* **102**, 79-82.
- Syu-ichi, K., Ai, S., Ayako, T., Takako, H., Yuu, O., Mayuko, U., Yutaro, O., Norimichi, N. and Masaaki, I. (2005) Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide(LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages. *Life Sciences.* **25**, 1-9.
- Anfernee, K. T., Chi-Keung, W., Xiao-Ling, S., Mengsu, Y. and Wang-Fun, F. (2005) Honokiol inhibits TNF- α -stimulated NF- κ B activation and NF- κ B-regulated gene expression through suppression of IKK activation. *Biochem. Pharm.*, **70**, 1443-1457.
- Naoko, K., Satsuki, K. and Shinichi, W. (2005) IL-17 suppresses TNF- α -induced CCL27 production through induction of COX-2 in human keratinocytes. *J. of Allergy and Clin. Immunol.*, **116**, 1144-1150.
- Minter, M., Towbin, J., Harter, J. and McCabe, E. R. (1989)

- Enzyme product blot for nondestructive assay of protein catalytic function in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* **178**, 22-26.
15. Diker, K. S. and Hascelik, G. (1994) The bactericidal activity of tea against *Helicobacter pylori*. *Letters in Appl. Microbiol.* **19**, 299-300.
 16. Byun, S. H., Yang, C. H. and Kim, S. C. (2005) Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 164.7 cells. *Kor. J. Herbol.* **20**, 7-16.
 17. Kim, S. C., Jung, Y. S., Lee, J. R., Kim, Y. W., Byun, B. H., Kwon, T. K., Suh, S. I., Byun, S. H. and Kwon, Y. K. (2004) Inhibition effect of *Phellinus Iigniarius* water extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated Raw 164.7 cells. *Korean J. Ori. Phy. Pathol.* **18**, 880-886.
 18. Suh, Y. J. (2002) Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol.* **40**, 1091-1097.
 19. Suh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* **480**, 243-268.