

분비나무 줄기 수피 추출물에 의한 HeLa Cell Line의 증식억제 효과와 RAW264.7 세포에서 Lipopolysaccharide에 의해 유도된 Nitric Oxide 생성 저해효과

배기은 · 정한수 · 김동섭 · 최영웅 · 김영숙 · 김영균*
국민대학교 임산공학과

Inhibitory Effect on the Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Formation in RAW264.7 and on the Proliferation of HeLa Cell Lines by the Stem Bark Extracts of *Abies nephrolepis*

Ki-Eun Bae, Han-Soo Chong, Dong-Sup Kim, Young-Woong Choi, Yeung-Suk Kim and Young Kyoon Kim*
Department of Forest product, Kook min University, Seoul, 136-702, Korea

Abstract – *Abies nephrolepis*(Pinaceae) extracts were tested for determined immune system regulating activity based on anti-inflammatory activity, antioxidant activity and anti-proliferative effect on HeLa cell line. The *A. nephrolepis* extracts increased dose-dependently anti-proliferation of HeLa cell line. The DM fraction of the extracts having anti-proliferative effects of HeLa cell line was fractionalized four subfractions(D1~D4). Inflammation-induced NO production was inhibited by D2 and D4 in LPS-activated RAW264.7 macrophages. And also, this fractions showed antioxidant activity examined by DPPH radical scavenging effects. These results suggest that the potential use of DM fraction of *A. nephrolepis* in chemoprevention and regulation overproduction of NO on pathogenic conditions. The mechanism of the inflammatory effects, however, must be evaluated through various parameters in the induction cascade of NO production.

Key words – *Abies nephrolepis*, Pinaceae, Antioxidant, Antiinflammation, Anticancer

Oxidative stress는 수많은 생리학과 병리학 현상에서 중요한 역할을 한다. Oxidative stress에 수반되는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에는 oxygen, superoxide, hydroxy radical, hydrogen peroxide 등이 있으며, 이들은 미토콘드리아내의 전자전달계 및 백혈구 세포의 활성화 등 정상적인 세포기능을 유지하는데 중요한 역할을 담당하는 세포 내 신호전달물질로 작용한다. 하지만 ROS의 조절기능에 이상이 초래되면 염증반응이 발생하거나, 세포사멸을 일으키게 된다.¹⁾ 염증반응은 생체나 조직에 어떠한 기질적 변화가 가해질 때 그 손상부위를 재생하려는 기전으로서, 일단 자극이 가해지면 염증 매개 인자에 의해 세포 간극 활성 산소종의 생성도 급격히 증가된다. 따라서 과도한 ROS의 생성에 의한 세포의 스트레스는 궁극적으로 노화, 암, 뇌졸중,

당뇨병, 관절염, 면역결핍증, 동맥경화 등 여러 성인병의 직접적인 원인으로 알려져 있다.²⁾

내독소의 하나인 lipopolysaccharide (LPS)는 RAW264.7 세포와 같은 대식세포에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키며,^{3,4)} proinflammatory gene들의 유도는 전사인자의 활성화에 의해 일어나게 된다. 이러한 염증매개 물질의 형성은 PhospholipaseA₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 Prostaglandin (PG)으로 바뀌는 과정 및 Nitric oxide (NO)형성과정으로 이어지게 된다.^{5,6)} NO는 IL-1 β , TNF- α , LPS 등과 같은 염증유발인자 및 암 발생인자에 의해 발현되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 과량 발생한다.⁷⁾ 생성된 NO는 free radical의 일종으로 혈관확장, 비선택적 숙주방어등의 작용을 하지만, 지속적 과발현은 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 유도한다. 이처럼 염증과

*교신저자(E-mail): ykkim@kookmin.ac.kr
(Tel): 82-2-910-4825

암사이의 연관성은 150년 전부터 알려져 왔으며, 1863년 Virchow는 만성염증이 발생한 부위에서 암이 발생하는 경향이 높음을 밝혔다.⁸⁾

본 연구에 앞서 나무 150수종의 각 추출물에 대한 HeLa Cell line의 증식억제 효과에 대하여 screening하였고, 그 결과 15 수종에서 우수한 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 그 중 하나인 분비나무(*A. nephrolepis*, Pinaceae)를 공시재료로 선택하였다. 우리나라 전국 산야지에 분포하는 분비나무는 한국을 비롯하여 중국 북동부, 동부 시베리아에 널리 분포하며 소나무과(Pinaceae)의 상록침엽교목이다. 꽃의 개화기는 4-5월이며 열매는 9월에 익으며 위로 향하고 긴 난형 또는 난상 원통형이며 길이 4-5.5 cm, 직경 2-2.5 cm로서 녹색이고 실편은 녹색이다. 잎은 선형이며, 전나무와 유사하나 잎 끝이 돌로 갈라지고 구상나무보다 얇고 가늘다.⁹⁾ 분비나무에 관한 선행 연구로는 분비나무 잎의 페놀성 화합물들이 갖는 암을 비롯한 질환의 예방 효능에 대해 보고되어 졌다.¹⁰⁾ 또한 수피 추출물이 N-Smase 와ceramide에 억제효과를 보여 면역 반응이 교란되는 것을 막는다고 보고되어 있다.¹¹⁾ 그 외에 분비나무와 같은 과에 속하는 프랑스 산 해송(*Pinus maritima*, Pinaceae)의 수피로부터 페놀성 물질로 구성된 Pycnogenol이라는 추출물에 대한 연구가 보고되어 있다.¹²⁾ Pycnogenol은 free radical을 제거하여 NO생성을 조절하며, Pro-inflammatory cytokine인 Interlukin-1의 생성을 저해하여 항염 작용을 가짐을 확인하였다.

따라서, 본 연구는 선행 실험결과 분비나무 추출물이 HeLa cell line에 대한 증식억제 효과가 있다는 점과 소나무과 식물 추출물의 항암, 항염 있다는 점에 착안하여 분비나무 추출물이 항염증제로도 응용 가능성이 있는지 알아보하고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료 - Methanol, n-hexane, dichloromethane, and ethyl acetate는 Duksan pure chemicals (Ansan, Korea)에서 구입하였으며, silica gel는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Welgene Bioscience (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 AMRESCO (Solon, Ohio)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphoric acid는 Duksan pure chemicals (Ansan, Korea), naphthylethylenediamine dihydrochloride는 ACROS (Nes jersey, USA)에서 구입하였다. L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co. (CA, U.S.A.)에서 구입 하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl),

sulfanilamide는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다.

분비나무의 추출 및 분리 - 분비나무줄기 수피 600 g을 MeOH을 용매로 46°C에서 5시간씩 3회 추출하였다. 추출물을 여과하고 감압 농축기로 농축하여 MeOH추출물(75.81 g)을 얻었다. 추출물을 물과 n-hexane (n-Hex)을 1:1로 섞어 용매 극성 분리를 진행하여 n-hexane fraction을 얻었고, n-hexane 분획하고 남은 물fraction과 DM (Dichloromethane)을 1:1로 섞어 DM 층을 얻었다. 이와 동일한 방법으로 ethyl acetate (EA) fraction 그리고 water (Aqu) fraction을 순차적으로 얻었다. 각 fraction을 여과한 후 유기용매를 제거하기 위해 감압 농축기로 농축하였고, 수율은 n-hexane (8.64 g, 11.4%), DM (21.91 g, 28.9%) EA (6.46 g, 8.5%) 그리고 Aqu (34.09 g, 51.6%)을 얻었다. 이 중 HeLa cell line에 대한 증식억제 효과와 Nitric oxide (NO)억제 활성이 뛰어난 DM fraction을 MeOH : DM = 15:1에서 10:1, 5:1, MeOH로 단계적으로 극성을 높인 전개 용매를 이용하여 Vacuum dry chromatography로 4개의 소분획 (D1~D4)으로 나누었다.

세포배양 - RAW264.7 대식세포와 HeLa Cell line은 한국 세포주은행에서 동결상태로 구입하였다. RAW264.7 대식세포는 FBS (10%)과 penicillin (100 U/ml)와 streptomycin sulfate (100 µg/ml)가 함유된 DMEM배지에서 습한 조건의 37°C, 5% CO₂ Incubator에서 배양하였다. HeLa Cell line은 RAW264.7 대식세포와 동일한 방법으로 배양하였다.

세포독성 - 본 실험에서 RAW264.7 대식세포에 대한 D1~D4의 세포독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하고, HeLa cell line에 대한 분비나무 추출물과 D1~D4 fraction의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 사용하였다.¹³⁾ 간단히 기술하면 먼저 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 DMSO에 녹인 시료를 다양한 농도 (6.25~400 µg/ml)로 DMEM 배지에 희석하여 첨가하였다. DMSO의 처리 농도는 배지 대비 0.1%이하가 되도록 하였다. 이를 다시 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 MTT 시약 (5 mg/ml)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO 20 µl를 첨가한 후 orbital shaker를 이용하여 녹였다. 30분 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였으며, Control의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다. 또한 흡광도가 50% 감소할 때 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)값을 구하여 시험물질 간의 세포 독성을 비교하였다.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 - 항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다.¹⁴⁾ 간단히 기술하면 Methanol 1000 ml에 DPPH (M.W 394.3) 118.29 g 를 넣고 교반시켜 300 µM의 DPPH solution을 만들었다. 300 µM DPPH 400 µl에 시료용액 1 ml

을 넣어 섞은 후 실온에서 30분간 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서의 흡광도를 측정 하였다. 결과 값은 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며, positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다.

Nitric oxide (NO) 측정 - 본 실험은 LPS를 이용하여 RAW264.7 대식세포에서 Nitric oxide synthase enzyme을 발현시키고 생성된 NO의 양을 Griess 시약으로 측정하였다. RAW264.7 대식세포는 Phenol red가 없는 DMEM에 10% FBS와 penicillin (100 U/ml)와 streptomycin sulfate (100 µg/ml)를 첨가하여 배지로 사용하였다. 24 well plate에 RAW264.7대식세포를 2×10⁵ cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 시료 (D1~D4)를 여러 농도로 처리하였다. 이를 1시간 전처리한 후 LPS (1 µg/ml)를 가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양 상등액 100 µl와 Griess reagent [1%(w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylene-diamine-HCl] 100 µl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 sodium nitrite 용액을 이용하여 작성하였고, 이를 이용하여 흡광도 평균을 nitrite양으로 환산하여 비교하였다. Positive control로는 L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL)을 사용하였다.

결과 및 고찰

HeLa cell line에 대한 세포독성 - 먼저 분비나무 추출물의 각 fraction (n-Hex, DM, EA, Aqu.)에 대한 세포독성을 MTT assay로 확인하여 세포증식억제 효과가 가장 뛰어난 fraction을 확인하였다. 그 후 HeLa cell line에 대한 세포증식억제 효과가 뛰어난 DM fraction의 소분획(D1~D4)의 세포독성을 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 n-Hex 과 DM fraction에서 세포독성 효과를 나타냈으며, EA 와 Aqu. fraction에서는 세포독성효과를 보이지 않았다(Fig. 1). 세포독성 효과를 나타낸 n-Hex과 DM fraction의 IC₅₀가 각각 147.80 µg/ml, 100.95 µg/ml으로 측정되었다. 이러한 결과에 근거하여 DM fraction을 소분획(D1~D4)으로 나누었으며, 이번 연구의 시료로 정하게 되었다.

소분획으로 나눈 D1~D4의 모든 시료에서도 세포독성 효과가 있는 것으로 나타났으며, 농도 의존적으로 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 중 D1의 시료가 IC₅₀ 194.26 µg/ml으로 가장 우수한 효과를 보였다. 또한 D2, D3, D4의 IC₅₀를 확인한 결과 각각 201.46 µg/ml, 195.64 µg/ml, 220.91 µg/ml으로써 그 효과가 확인되었다(Fig. 2). 이 결과로 볼 때, 분비나무의 DM fraction에 항암효과를 가지고 있는 성분이 있음을 추측할 수 있었다.

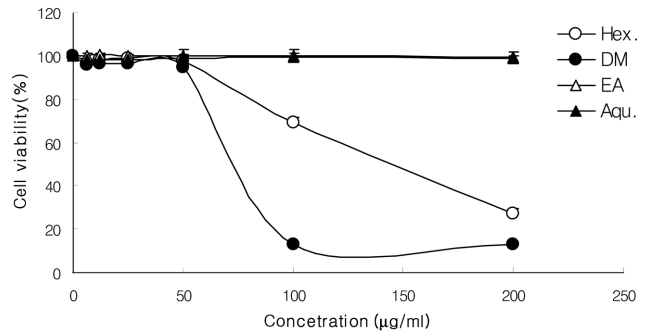


Fig. 1. Cell cytotoxicity of *A. nephrolepis* extracts on HeLa cell lines. Cells were exposed to each fractions (from 6.25 µg/ml to 200 µg/ml). Cytotoxicity was assessed by MTT assay after 24 h. incubation. The proliferative response of HeLa cell lines are markedly reduced in a concentration-dependent manner in the presence of Hex and DM fractions.

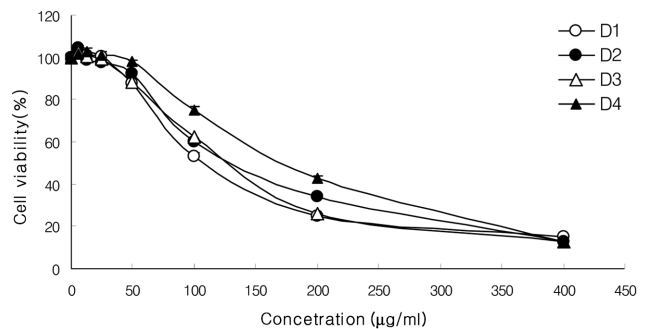


Fig. 2. Cell cytotoxicity of D1~D4 on HeLa cell lines. Cells were exposed to D1~D4 (from 6.25 µg/ml to 400 µg/ml). Cytotoxicity was assessed by MTT assay after 24h. incubation. The proliferative response of HeLa cell lines are markedly reduced in a concentration-dependent manner in the presence of D1~D4 fraction.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 - 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성 라디칼 (free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화 측정에도 많이 이용되고 있다. 분비나무 추출물과 기존에 잘 알려져 있는 항산화제인 ascorbic acid를 대조군으로 하여 DPPH라디칼 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 항산화활성의 측정결과 시료의 처리농도에 비례하게 항산화활성을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 1). 그 중에서 D2와 D4가 항산화 효과가 높았으며, positive control인 ascorbic acid와 비교하였을 때, 분비나무 추출물의 DM fraction이 뛰어난 항산화 효과를 나타내지는 않는 것으로

Table I. Antioxidant activity on DM fraction of *A. nephrolepis* extract

Treatment	IC ₅₀ (μg/μl) ^{a)}
	DPPH radical scavenging activity
D1	852.59±3.22
D2	435.73±4.23
D3	809.92±3.23
D4	136.55±5.13
Ascorbic acid	3.98±3.22

^{a)}IC₅₀ values were calculated from regression lines using three five different concentrations. Data represent the mean±S.D. (Standard deviation) of triplicate experiments.

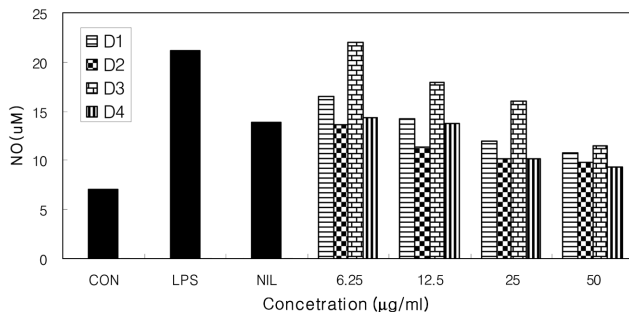


Fig. 3. Inhibitory effect of D1~D4 on the nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS(1 μg/ml) in the presence of D1~D4 (from 6.25 μg/ml to 50 μg/ml). L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL) was used as an assay positive control at a concentration of 10 μM. NO production was determined by ELISA method. Sample concentration was determined using MTT assay.

보여진다.

Nitric oxide(NO) 생성 측정 - 활성산소 중 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Nitric oxide(NO)생성에 대한 D1~D4의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 D1~D4 및 그 유도체가 LPS에 의해 유도되는 iNOS에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 iNOS에 의해 유도되는 NO생성에 대한 시험물질의 저해 활성을 Griess 반응을 이용하여 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 NO가 과량 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, D1~D4를 처리한 군에서는 농도 의존적으로 NO생성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서 D2 fraction과 D4 fraction에서 NO 생성 억제효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

RAW264.7대식세포에 대한 세포독성 - D1~D4의 세포독성을 알아보기 위한 MTT assay의 결과의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포독성을 평가하기 위한 MTT assay결과 D1~D4 모두 6.25~50 μg/ml의 처리 농도에서 유의성 있는

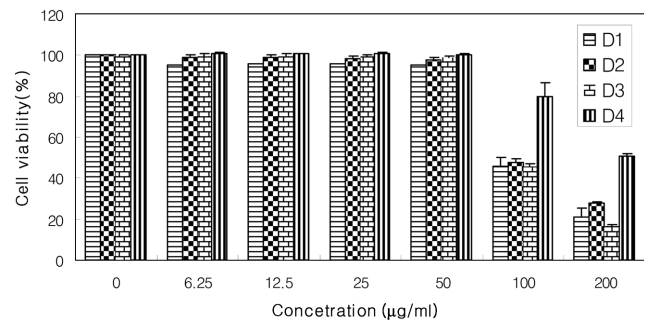


Fig. 4. Cell cytotoxicity of D1~D4 on RAW264.7 cells. Cell viability was assessed by the MTT assay in RAW264.7 macrophages pretreated with D1~D4 for 24 h. The results demonstrated that the D1~D4 fractions had no cytotoxicity to RAW264.7 macrophages tested at dosage less than 50 μg/ml.

세포독성을 나타내지 않아서 실험결과에서 나타난 NO의 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 확인하였다(Fig. 4).

결론

염증은 조직의 상해나 파괴에 의해서 일어나는 과정에서 상해를 보호하는 증상으로서 최근에 들어서 선천성 면역, 암과 매우 긴밀한 관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 활성산소와 NO의 과발현으로부터 유도되는 염증은 세포의 구성분인 DNA손상, 단백질의 변이 및 신경손상 등을 일으켜 악성세포인 암을 유발할 수 있다. 본 연구진은 천연물의 성분 중에 항암효과가 있는 물질을 검색하는 과정에서 분비나무 추출물이 중앙증식억제 효과를 나타냄을 발견하였다. 이 추출물의 DM fraction을 Vacuum dry chromatography를 실시하여 네 가지 fraction (D1~D4)을 얻었다. 네 가지 fraction이 HeLa cell line에 대하여 농도 의존적으로 세포증식억제 효과가 나타나는 것을 MTT assay로 확인할 수 있었다. 앞서 이야기하였듯이 항암, 항염증 연구가 활발히 진행되고 있는 점에 착안하여, LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW264.7 대식세포로 분비나무 추출물이 항염증 제로도 응용 가능성이 있는지 알아보고자 하였다. 염증은 생체나 조직에 기질적 변화가 일어날 때 손상부위를 수복 재생하려는 기전으로 이 과정에서 수반되는 혈관 확장, 세포막 유동성 증가, 부종 등의 현상은 세포외로 유리된 화학적 매개 인자에 의해 더욱 증진되며 염증 매개 인자의 자극에 의해 세포 간극 활성 산소종의 생성도 급격히 증가된다는 점에 기인하여 분비나무 추출물 DM fraction (D1~D4)의 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 그 결과 D2와 D4 fraction에서 항산화 효과가 좋은 것으로 나타났다.

염증과정 중에 많은 양의 염증유도 사이토카인 (Proinflam-

matory cytokines) 이 생성되는데, 포유세포에서 iNOS는 interferon- γ , LPS 그리고 다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다. NOS중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다.¹⁵⁾ 이렇게 활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW264.7 대식세포를 이용하여 NO생성량 변화를 측정하였다. 그 결과 D1~D4 fraction이 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO생성을 농도 의존적으로 뚜렷하게 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 D2과D4 fraction에서 NO생성 억제 효과가 뛰어났다. 또한 D1~D4 fraction의 세포독성이 NO생성 억제 효과에 영향을 끼치진 않았는지 D1~D4 분획물의 RAW264.7대식세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통해 알아보았고, 그 결과 D1~D4 모두 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않았다. 이는 본 실험에서 확인된 NO의 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 나타내었다.

이러한 결과들로 볼 때, HeLa cell line 증식억제 효과를 가지고 있는 분비나무 추출물의 DM fraction 중 NO 생성 억제 효과와 항산화 효과 모두 뛰어난 D2와 D4 fraction에 항암 및 항염증에 관련된 성분임을 추측해 볼 수 있었다. 이 사실에 기초하여 분비나무 추출물의 DM fraction은 항암 및 항염증 물질의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

사 사

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(과제번호: S210707L010110 과 S120808L1101104)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

인용문헌

- McCord, J. (1974) Free radicals and inflammation: protection of synorrial fluid by superoxide dismutase. *Science*. **185**: 529-531.
- Pharham, P. (2005) *The Immune System*. Garland Science, New York.
- Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee S.H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 617-620.
- MukIS, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S. and Kuno, K. (1996) Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kapperB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 145-151.
- Vane, J. A. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like durgs. *Nat. New. Biol.* **23**: 232-235.
- Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**: 2304-2312.
- Richard, G. and Salvador, M. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258.
- Balkwill F., Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. **357**: 537-45.
- 이창복 (1999) *대한식물도감*, **233** 향문사, 서울.
- Lee, S. J., Lee, K. W., Lee, H. J. (2004) *Abies nephrolepis* leaf phenolics prevent the inhibition of gap junction intercellular communication by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. *Biofactors*. **21**(1-4): 357-60
- Kim, S. K., Jung, S. M., Ahn, K. H., Jeon, H. J., Lee, D. H., Jung, K. M., Jung, S. Y. and Kim, D. K. (2005) Identification of three competitive inhibitors for membrane-associated, Mg^{2+} -dependent and neutral 60 kDa sphingomyelinase activity. *Arch Pharm Res.* Aug; **28**(8): 923-9
- Fabio, V., Kobuchi, H. and Lester, P. (1998) Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med.* May; **24**(7-8): 1120-9.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- Yokozawa, T., Chen, D. P., Kong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I. and Nishioka, I. (1998) Study on the inhibitory effect of tanins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol.* **56**: 213-222.
- Joydeb, K. K., Young, J. S. (2008) Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutation Research*. **659**: 15-30.

(2009년 3월 10일)