

## RAW264.7 대식세포에서 Heme Oxygenase-1의 유도에 의한 개망초 (*Erigeron annuus* L.) 꽃 Methanol 추출물의 항염증 효과

성미선 · 김영화 · 최용민 · 함현미 · 정현상 · 이준수<sup>†</sup>

충북대학교 식품공학과

### Anti-Inflammatory Effect of *Erigeron annuus* L. Flower Extract through Heme Oxygenase-1 Induction in RAW264.7 Macrophages

Misun Sung, Younghwa Kim, Youngmin Choi, Hyeonmi Ham, Heon-Sang Jeong, and Junsoo Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

#### Abstract

This study investigated the anti-inflammatory effect of *Erigeron annuus* L. flower (EAF) methanol extract. We examined the involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the inhibitory activities of EAF methanol extract on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. Cell viability and NO assays were performed. In addition, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and HO-1 expressions were detected by Western blotting and blocking HO-1 activity on NO production. EAF methanol extract (25, 50, 100, 200 µg/mL) significantly inhibited LPS-stimulated NO production ( $p < 0.05$ ; 12.82, 9.61, 6.83, 2.52 µM) in a concentration-dependent manner. EAF methanol extract also reduced the expression of iNOS protein. The EAF methanol extract induced the expression of HO-1 in a dose-dependent manner. Blockage of HO-1 activity by zinc protoporphyrin suppressed EAF methanol extract-induced reductions in the production of NO. The present results suggest that EAF methanol extract has a potent anti-inflammatory effect in RAW264.7 macrophages through the induction of HO-1.

**Key words:** *Erigeron annuus*, anti-inflammation, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase, heme oxygenase-1

#### 서 론

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 국소적 방어반응 중 하나이다. 염증이 발생하면 여러 가지 염증매개인자들이 생성되며 이로 인하여 발열, 홍반, 부종, 기능 장애 등의 증상이 나타난다(1-3). 대식세포는 숙주의 항상성 유지와 같은 여러 종류의 숙주 반응에 관여하는 것으로 알려져 있으며, nitric oxide(NO)와 cytokine을 분비하여 염증 반응 시 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다(4). 일반적인 NO의 형성은 신경계 및 면역계에서 중요한 전달 물질로 작용하여 박테리아를 사멸시키거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만, 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 퇴행성 질병 등의 발생에 관여한다(5,6). Nitric oxide synthase(NOS)는 NO 생성에 관여하는 효소로 세포의 종류에 따라 신경성 NOS(nNOS), 내피성 NOS(eNOS), 유도성 NOS(iNOS)로 구분되며 그중 iNOS는 NO의 과발현에 영향을 미치며 다양한 세포에서 유도되어 병리생태학적 관점에서 중요한 역할을 한다(7). Heme oxygenase-1(HO-1)은 heme 이 carbon monoxide(CO), bi-

liverdin, free iron으로 분해되는 반응을 촉진하는 효소이며 pro-inflammatory cytokines를 줄이고 anti-inflammatory cytokines의 생성을 촉진시키는 생리화학적 기능에 관여한다(8,9). HO-1은 스트레스나 허혈 및 염증 반응에서 유도되며 주로 세포를 보호하는 기전에 작용하는 것으로 알려져 있다(10). HO-1과 CO는 nuclear factor(NF)-κB의 inactivation을 통해 활성화된 대식세포에서 NO의 생성과 iNOS 단백질의 발현을 조절한다고 보고되어 있다(11). 개망초(*Erigeron annuus* L.)는 국화과에 속하는 두해살이풀로서 한국에서 흔히 볼 수 있다. 예로부터 소화불량, 장염으로 인한 복통 및 설사 치료, 혈당 강하작용 등의 약효가 있어 민간요법으로 널리 이용되는 것으로 알려져 있다(12). 본 연구에서는 개망초 꽃(EAF) methanol 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유도하여 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 염증 반응의 중요 매개물질 억제 효과, 즉 NO의 생성에 미치는 영향과 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고 EAF methanol 추출물이 HO-1의 발현에 미치는 영향을 연구하여 EAF methanol 추출물의 항염증 효과에 미치는 HO-1의 역할을 규명하고자 하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr  
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용된 개망초 꽃은 충북대학교 원예과학과에서 제공받아 사용하였다. DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)와 FBS(Fetal bovine serum)는 Hyclone (Logan, UT, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며 zinc protoporphyrin IX(ZnPP)는 Frontier scientific Inc.(Logan)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

### Methanol 추출물의 제조

개망초 꽃 10 g에 100% methanol 300 mL을 가한 뒤 상온에서 24시간 동안 혼합하여 개망초 꽃으로부터 유용성분을 추출하였다. 추출 후 잔사는 filter paper(TOYO, No. 2)를 이용하여 분리하였고 추출액은 rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C 이하에서 감압 농축하여 추출액을 완전히 휘발시켰다. 추출물은 100% methanol을 이용하여 50 mL로 정용한 뒤 모든 추출물의 농도를 100 mg/mL이 되도록 DMSO(dimethylsulfoxide)에 재용해하였다. 제조된 추출물의 유용 성분이 손실되는 것을 방지하기 위하여 질소 충전 한 후 -74°C에서 보관하였으며 실험에 사용된 추출물은 모두 0.2 µm filter로 멸균하여 사용하였다.

### 세포 배양

실험에 사용된 RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW264.7 대식세포는 직경 10 mm의 culture dish에서 10% FBS, 100 unit/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 incubator에서 37°C로 배양하였다.

### Nitric oxide 함량 측정

RAW264.7 대식세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 6시간 배양한 후에 EAF methanol 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리한 다음, LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액 150 µL와 Griess 시약 20 µL를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 incubator에서 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 산출하였다(13).

### 세포 독성 측정

EAF methanol 추출물의 세포 독성은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다(14). RAW264.7 대식세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 6시

간 배양한 후에 EAF methanol 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리한 다음, LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT(5 mg/mL) 시약을 각 well에 20 µL씩 첨가하고 4시간 동안 37°C incubator에서 반응시킨 후 상정액을 제거하였다. 각 well에 150 µL의 DMSO를 첨가하여 불용성 MTT formazan을 용해한 후 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blot

RAW264.7 대식세포를  $1.0 \times 10^6$  cells/well의 농도로 6-well plate에 분주하여 6시간 배양한 후에 EAF methanol 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리한 다음, LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 세포를 얻어 원심분리 하여 pellet에 lysis buffer를 가하여 -20°C에서 overnight한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 상등액을 모았다. 모은 상등액은 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 10 µg을 5× sample buffer에 넣고 100°C에서 10분간 불활성화시켜 10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 transblotting 한 후 5% non-fat dry milk에서 90분 동안 blocking하였다. iNOS와 HO-1 항체는 1:1000의 비율로 4°C에서 24시간 부착시킨 후 tris-buffered saline Tween-20(TBST) buffer로 10분간 3회 washing하였고 2차 항체는 1:2000의 비율로 희석하여 2시간 상온에서 부착시켰다. TBST buffer로 10분간 3회 washing한 membrane에 ECL(Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)을 처리하여 X-ray film에 감광시켜 암실에서 현상하였다.

### 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균±표준편차로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포독성과 nitric oxide 생성 저해 효과

NO는 L-arginine을 기질로 하여 NOS에 의해 생성되는 무기 유리체로 LPS 처리에 의해 급격히 증가된다(15). NO는 염증 유발에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(16) 매우 불안정하여 NO<sup>2-</sup>의 형태로 바로 전환되기 때문에 NO<sup>2-</sup>의 형태로 Griess 시약을 이용하여 NO의 농도를 정량하였다(17). LPS를 처리한 RAW264.7 대식세포에서 생성된 NO의 함량이 11.48 µM 수준으로 증가하였으며 EAF methanol 추출물을 농도별로(25, 50, 100, 200 µg/mL) 처리하였을 때

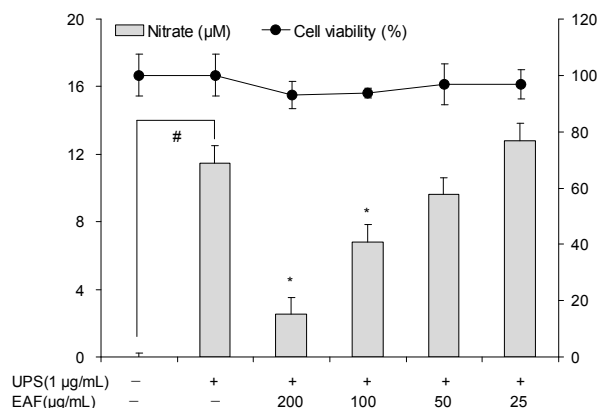


Fig. 1. Effects of the *Erigeron annuus* L. flower methanol extract on cell viability and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean  $\pm$  standard deviation (n=3). LPS, lipopolysaccharides; EAF, *Erigeron annuus* L. flower methanol extract. #p<0.05 compared to control, \*p<0.05 compared to LPS.

12.82, 9.61, 6.83, 2.52  $\mu$ M로 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1). MTT assay를 이용하여 RAW264.7 대식세포에서 EAF methanol 추출물의 세포독성을 확인하였다. EAF methanol 추출물을 농도별로(25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL) 처리한 결과, 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보여 EAF methanol 추출물은 RAW264.7 대식세포에서 독성을 나타내지 않은 것을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 EAF methanol 추출물의 처리 농도를 RAW264.7 대식세포에서 독성을 보이지 않은 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL로 하여 다음 실험을 진행하였다. 이와 같은 결과는 Jang 등(18)과 Zhao 등(19)이 보고한 국화과에 속하는 *Atractylodes japonica*와 *Arctium lappa* L.의 NO 생성 억제에 대한 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

Inducible nitric oxide synthase 생성 억제 효과

NO 생성 억제에 대한 실험결과를 토대로 iNOS 생성에 미치는 EAF methanol 추출물의 영향을 확인하기 위하여 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에 EAF methanol 추출물을 농도별로(25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL) 처리하여 Western blotting을 통해 iNOS 단백질의 발현을 확인하였다(Fig. 2). iNOS는 LPS를 처리하지 않은 상태의 RAW264.7 대식세포에서 거의 발현되지 않았지만 LPS 처리 시 현저하게 증가하였다. EAF methanol 추출물을 처리한 결과 LPS 처리에 의해 증가한 iNOS 단백질 발현이 25, 50  $\mu$ g/mL에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 100, 200  $\mu$ g/mL 처리하였을 때는 감소하였으며 200  $\mu$ g/mL을 처리하였을 때의 iNOS 단백질 발현은 LPS를 처리하지 않은 상태와 비슷한 수준으로 감소되었다. iNOS는 여러 자극에 의해 활성화된 세포에서 유도되어 과량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있으며 염증 반응에서 생성되는 NO는 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다(20). Park과 Son(21) 및 Han 등(22)은 NO 저해 활성

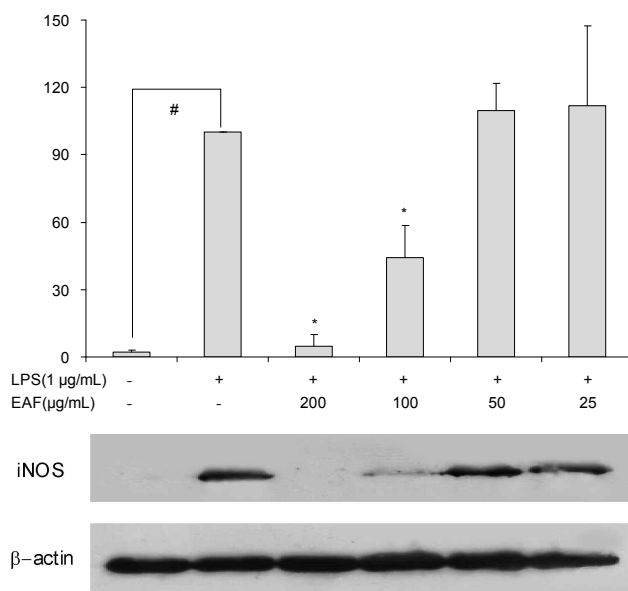
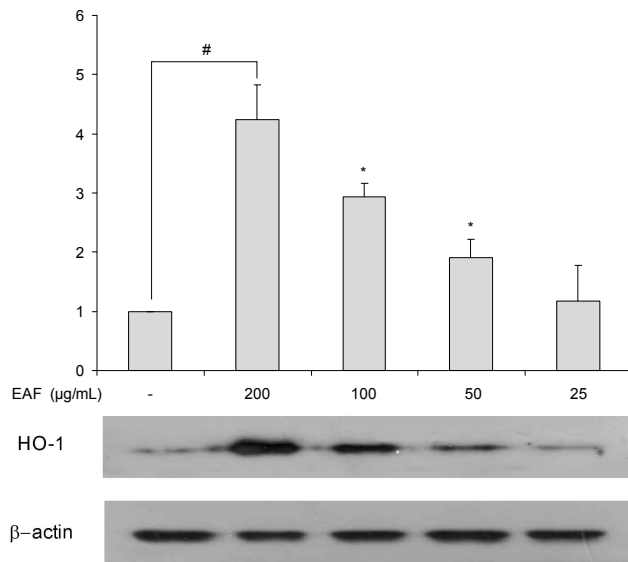


Fig. 2. Effects of the *Erigeron annuus* L. flower methanol extract on lipopolysaccharide-stimulated inducible nitric oxide synthase protein expression in RAW264.7 macrophages. The values were expressed as a percentage of band intensity of iNOS in culture treated with lipopolysaccharide alone. Each value is expressed as a mean  $\pm$  standard deviation (n=3). LPS, lipopolysaccharides; EAF, *Erigeron annuus* L. flower methanol extract; iNOS, inducible nitric oxide synthase. #p<0.05 compared to control, \*p<0.05 compared to LPS.

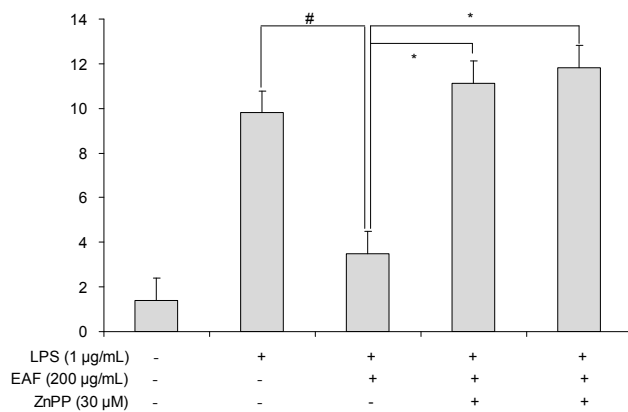
을 높게 나타낸 *Euphorbia supina* Rafin과 *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* 추출물은 iNOS 단백질 발현도 효과적으로 저해한다고 보고하였다. 본 연구 결과 EAF methanol 추출물의 NO 생성 억제와 iNOS 단백질 발현 저해는 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 EAF methanol 추출물에 의한 iNOS 단백질의 발현 억제는 NO의 생성 억제에 영향을 미친다고 판단된다.

Heme oxygenase-1(HO-1)의 발현 효과

HO-1은 heme을 CO, biliverdin, free iron으로 분해시키는 효소이며(8) HO-1의 유도는 산화적 손상으로부터 세포 내 지질 및 단백질들을 보호하는 방어 기작의 하나로 보호 작용을 할 뿐 아니라 염증 반응을 약화시키기도 한다(23). EAF methanol 추출물은 RAW264.7 대식세포에서 농도 의존적으로 HO-1의 발현을 유도하였다(Fig. 3). EAF methanol 추출물에 의한 HO-1 발현이 NO 생성에 미치는 영향에 대해 확인하기 위해 HO-1의 inhibitor인 ZnPP를 사용하였다. 실험결과 ZnPP를 처리하여 HO-1의 발현을 저해하였을 때 추출물에 의해 감소된 NO의 함량이 다시 증가되었다(Fig. 4). HO-1의 heme 분해에 의해 생성된 CO와 biliverdin/bilirubin은 iNOS와 COX-2의 활성화 및 발현 및 NO의 생성을 억제하며 biliverdin은 pro-inflammatory cytokines인 IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제시키는 것으로 보고되었다(24,25). Kim 등(26)과 Hwangbo 등(27)은 *Chrysanthemum*



**Fig. 3.** Effects of *Erigeron annuus* L. flower extract on the production of heme oxygenase-1. RAW264.7 cells were treated with the *Erigeron annuus* L. flower methanol extract at concentrations of 25, 50, 100 or 200 µg/mL for 24 hr. Each value is expressed as a mean  $\pm$  standard deviation (n=3). The results were expressed as fold compared to band intensity of untreated RAW 264.7 cells which was assigned a value of 1. LPS, lipopolysaccharides; EAF, *Erigeron annuus* L. flower methanol extract; HO-1, heme oxygenase-1. #p<0.05 compared to control, \*p<0.05 compared to LPS.



**Fig. 4.** Involvement of heme oxygenase-1 in the inhibitory effects of the *Erigeron annuus* L. flower methanol extract on lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean  $\pm$  standard deviation (n=3). LPS, lipopolysaccharides; EAF, *Erigeron annuus* L. flower methanol extract; ZnPP, zinc protoporphyrin IX. #p<0.05 compared to LPS, \*p<0.05 compared to EAF treated with LPS.

*boreale* Makino와 *Tussilago farfara* 추출물에 의해 유도된 HO-1이 항염증 특성을 조절한다고 보고하였다. 본 실험결과 EAF methanol 추출물에 의해 발현된 HO-1은 NO의 생성을 억제할 수 있으며 이로 인해 염증 반응에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 염증 반응에 관여하는 iNOS 단백질의 발현과 NO의 생성은 NF- $\kappa$ B의 inactivation을 통해 억제되며 NF- $\kappa$ B의 inactivation은 mitogen-activated protein

kinase(MAPK) signaling pathway에 의해 조절된다는 연구가 보고되어 있다(28). 또한, HO-1의 발현이 iNOS의 발현과 iNOS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제하며 이는 NF- $\kappa$ B의 inactivation을 통해 조절된다는 연구가 보고된바 있다(29). 본 연구결과 EAF methanol 추출물의 항염증 효과는 iNOS의 발현을 억제하고, HO-1의 발현을 유도하여 NO의 생성을 조절하는 것으로 판단된다. 따라서 EAF methanol 추출물이 iNOS 발현과 NO 생성을 조절하는 NF- $\kappa$ B의 활성화, MAPK signaling pathway에 관여하며 MAPK의 활성이 HO-1의 발현에 미치는 영향에 대해 연구되어야 할 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 지역농과계기반조성사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 요약

본 연구에서는 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에서의 NO 생성 및 iNOS와 HO-1 단백질 발현의 변화를 측정하여 개망초(*Erigeron annuus* L.) 꽃(EAF) methanol 추출물의 항염증 효과를 확인하였다. RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리한 결과 NO의 함량이 11.48 µM 수준으로 증가하였다. 그러나 EAF methanol 추출물(25, 50, 100, 200 µg/mL)을 처리하였을 때 NO의 함량이 12.82, 9.61, 6.83, 2.52 µM로 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 EAF methanol 추출물은 NO의 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 저해하였으며 HO-1 단백질의 발현을 유도하였다. EAF methanol 추출물에 의한 HO-1 발현이 NO 생성에 미치는 영향에 대해 확인하기 위해 HO-1의 inhibitor인 ZnPP를 사용하였다. 실험결과 ZnPP를 처리하여 HO-1의 발현을 저해하였을 때 추출물에 의해 감소된 NO의 함량이 다시 증가되었다. 본 연구 결과, EAF methanol 추출물은 염증을 유발하는 중요 인자인 NO를 저해하였고, iNOS의 발현을 억제시켰으며 산화적 손상으로부터 세포 보호 방어 기작에 관여하는 HO-1의 발현 등 항염증에 우수한 효과를 보였으며 항염증 연구의 기초 자료로 활용될 것으로 예상된다.

## 문헌

- Sarkar D, Fisher PB. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 236: 13-23.
- Fierro IM, Serhan CN. 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 34: 555-566.
- Yun HJ, Hoe SK. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinhotang in RAW 264.7 cells. *Korean J Herbol* 23: 169-178.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis fac-

- tor and L-arginine-dependent mechanism act as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.
5. Jaffrey SR, Snyder SH. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 417-440.
  6. Choi YJ, Jo WS, Kim HJ, Nam BH, Kang EY, Oh SJ, Lee GA, Jeong MH. 2010. Anti-inflammatory effect of *Chlorella ellipsoidea* extracted from seawater by organic solvents. *Korean J Fish Aquat Sci* 43: 39-45.
  7. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Synder SH, Russell SW, Murphy WJ. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734.
  8. Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
  9. Lee TS, Chau LY. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Natl Med* 8: 240-246.
  10. Otterbein LE, Chai AM. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol* 279: 1029-1037.
  11. Oh GS, Pae HO, Chung HT. 2003. Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. *Free Radical Biol Med* 34: 1136-1145.
  12. Yoo NH, Jang DS, Yoo JL, Lee YM, Cho JH, Kim JS. 2008. Erigeron flavanone, a flavanone derivative from the flowers of *Erigeron annuus* with protein glycation and aldose reductase inhibitory activity. *J Nat Prod* 71: 713-715.
  13. Bae IK, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 513: 237-242.
  14. Kim JH, Kim DH, Beak SH, Lee HJ, Kim MR, Kwon HJ, Lee CH. 2006. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 71: 1198-1205.
  15. Jeung YJ, Choi SY, An CS, Jeon YH, Park DK, Lim BO. 2009. Comparative effect on anti-inflammatory activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* grown in germinated brown rice extracts in murine macrophage RAW264.7 cells. *Korean J Med Crop Sci* 17: 97-101.
  16. Weisz A, Cicatiello I, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
  17. Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, Choi DK, Choi WS. 2007. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *J Ethnopharmacol* 112: 49-54.
  18. Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. 2004. *Atractylodes japonica* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. *Biol Pharm Bull* 27: 324-327.
  19. Zhao F, Wang L, Liu K. 2009. *In vitro* anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L. through inhibition on iNOS pathway. *J Ethnopharmacol* 122: 457-462.
  20. Hung YC, Guh JH, Cheng ZJ, Chang YL, Hwang TL, Liao CH, Tzeng CC, Teng CM. 2001. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of IkappaB-alpha stabilization. *Eur J Pharmacol* 418: 133-139.
  21. Park SC, Son DY. 2011. Inhibitory effects of *Euphorbia supina* Rafin on the production of pro-inflammatory mediator by LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 486-492.
  22. Han J, Kim Y, Sung J, Um Y, Lee Y, Lee J. 2009. Suppressive effects of *Chrysanthemum zaxadskii* var. *latilobum* flower extracts on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1685-1690.
  23. Takahashi T, Moriga K, Akagi R, Sassa S. 2004. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem* 11: 1545-1561.
  24. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-263.
  25. Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimixuka K, Nalesnik MA, Kaizu T, Uchiyama T, Liu F, Murase N, Bauer AJ, Bach FH. 2004. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 127: 595-606.
  26. Kim Y, Sung J, Sung M, Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2010. Involvement of heme oxygenase-1 in the anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum boreale* Makino extracts on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 131: 550-554.
  27. Hwangbo C, Lee HS, Park J, Choe J, Lee JH. 2009. The anti-inflammatory effect of tussilagone, from *Tussilago farfara*, is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 9: 1578-1584.
  28. Yoon WJ, Moon JY, Song G, Lee YK, Han MS, Lee JS, Ihm BS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. 2010. *Artemisia tikudo* essential oil attenuate LPS-induced inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK activation in TAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 1222-1229.
  29. Srisook K, Palachot M, Mongkol N, Srisook E. 2011. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- $\kappa$ B activation. *J Ethnopharmacol* 133: 1008-1014.

(2011년 8월 8일 접수; 2011년 9월 30일 채택)