

iNOS 발현 검출을 위한 *in vitro* 시스템의 확립 및 적송잎 추출물에 의한 저해효과 검증

김남영¹, 장혜지¹, 이동근¹, 장민경¹, 이승우¹, 전명제¹, 김미향², 김성구³, 이상현^{1*}

Establishment of *In vitro* Detection System for iNOS Expression and the Verification of Suppressive Effect by Pine Needle Extract

Nam-Young Kim¹, HyeJi Jang¹, Dong-Geun Lee¹, Min-Kyung Jang¹, Seung Woo Lee¹, Myong Je Jeon¹, Mihyang Kim², Sung Gu Kim³, and Sang-Hyeon Lee^{1*}

접수: 2011년 3월 10일 / 게재승인: 2011년 3월 25일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study was aimed to verify suppressive effect of pine-needle extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. In order to evaluate suppressive effect on iNOS expression, RAW 264.7 cells were stably transfected using an iNOS promoter-luciferase reporter plasmid yielding RAW 264.7/pGL2-Neom-iNOS_pro11 cells. Established *in vitro* detection system revealed to diminish LPS-induced iNOS expression by 0.1~500 µg/mL of saponin at the concentration-dependant manner. Pine needle extract also diminished LPS-induced iNOS expression to 92 and 88% at 500 and 50 µg/mL, respectively. These results suggest that the *in vitro* detection system developed here could be useful for the verification of suppressive materials on iNOS expression and pine needle extract could be used for the development of functional foods.

Keywords: inducible nitric oxide synthase (iNOS), luciferase assay, pine needles, RAW 264.7 cells

1. 서론

인체가 가지고 있는 면역체계는 외부로부터 침입하는 병원체로부터 인간을 지켜내는 중요한 역할을 하는데, 면역체계를 이루는 중요한 세포들 중에 하나가 대식세포 (microphage) 이며 이들은 병원체로부터 인체를 보호하고, 탐식작용 (phagocytosis)을 하기 때문에 탐식세포라고도 한다. 대식세포는 병원균과 같은 외부자극에 의해 활성화되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), 사이토카인 (cytokine) 등과 같은 염증 유발물질을 다량 분비하여 생체를 보호하지만 이들은 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis)이나 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 천식 (asthma) 등의 만성 염증질환의 발현에도 관여하는 것으로 보고되고 있다 [1-3].

Nitric oxide (NO)는 매우 불안정한 유리기 (free radical)로 L-arginine의 guanidinonitrogen이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 변환이 되면서 생성이 되며 신경계, 면역계, 심장혈관계에 있어서 중요한 전달 물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타내어 쇼크와 다른 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다 [4,5]. NO는 많은 생리적 기능에 관여하고 있으나, 과도한 NO의 생성은 신경세포의 사멸을 유발시키는 것으로 알려져 있다. NO의 합성 효소인 NOS는 정상 생리적 조건에서 존재하는 constitutive형 (cNOS)과 면역반응에 의해 일어나는 inducible형 (iNOS)으로

¹신라대학교 대학원 생명공학과

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

Tel: +82-51-999-5624, Fax: +82-51-999-5636

e-mail: slee@silla.ac.kr

²신라대학교 식품영양학과

²Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

³(주)바이오포트 코리아

³Bioport Korea Co., Busan 619-912, Korea

나뉘며, cNOS는 다시 혈관에 작용을 하는 endothelial형 (eNOS) 과 신경에서 주된 작용을 하는 neuronal형 (nNOS)으로 나뉘게 된다 [6]. 유도성 iNOS는 세포내 칼슘 농도와 외부에서 주입된 calmodulin의 자극과는 무관하게 활성화된 세포에서만 활성을 보이며 다양한 세포에서 유도되어 병리생태학에서 중요한 역할을 한다 [7,8]. NOS의 과다 발현은 뇌출혈, 뇌성마비, 뇌졸중 등의 뇌손상이나 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌 신경질환의 신경독성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 [9].

*Pinus densiflora*는 상록성 침엽수로서 나무줄기가 붉어서 ‘적송 (赤松)’이라고 명명되며, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 전 아시아 지역의 임야에 널리 자생하고 있어 솔잎을 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 예로부터 솔잎을 말려서 가루로 만들어 떡과 같은 음식을 만들거나 차나 한증욕의 재료로 사용하는 등 민간에서 널리 사용되어져 왔다. 소나무류는 강한 살균력, 기관지 천식, 폐질환, 동맥경화, 염증치료 등에 효능이 있는 것으로 알려지면서 건강을 위하여 솔잎분말이나 솔잎차, 솔잎술 또는 솔잎청량음료들이 시판되고 있으나 함유되어 있는 특수성분들에 관한 기초적인 자료는 매우 부족한 상태로 이용되어 왔다. 하지만 최근에는 솔잎에 비타민 C와 K, 카로틴, 플라보노이드, 안토시아닌, 탄닌 및 정유 등이 함유되어 있으며 알칼로이드 성분은 들어 있지 않는 것이 특징이고 다양한 종류의 terpene 화합물이 포함되어 있는 것으로 보고되어져 있으며 솔잎에 함유되어 있는 flavonoid, alkaloid, lignan, 유기산류 등이 혈청 콜레스테롤 저하효과, 항당뇨 효과, 지질저하 및 항산화효과, 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다 [10-14]. 뿐만 아니라 최근 솔잎의 항당뇨 효과, 솔잎 증류액의 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성, 지질저하 및 항산화 효과와 항균효과 등 많은 연구들이 보고되면서 솔잎은 다양한 약리활성을 가진 천연식물로 인정되고 있다 [15-17].

본 연구자들은 이전의 연구에서 적송잎 추출물의 항산화 활성 및 항균활성을 검증하여 보고하였다 [18,19]. 본 연구에서는 NOS의 과다 발현으로 인한 다양한 퇴행성 질환 및 만성염증질환을 예방할 수 있는 건강 기능성 식품의 개발을 위하여 *in vitro* iNOS 발현 검출 시스템을 확립하였고, 적송잎 추출물의 lipopolysaccharide (LPS) 유도성 iNOS 발현에 대한 저해효과를 검증하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 배지

제한효소, DNA ligation kit ver. 2, pyrobest DNA polymerase는 Takara Korea (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 유전자 조작을 위한 숙주로는 대장균 세포 (*E. coli* DH 5α)를 사용하였다. 대장균은 Luria-Bertani (LB)배지 (1% bacto trytone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 이용하여 37°C에서 배양하였다. 대장균 형질전환체의 선별을 위해서는 LB (Difco, USA) 배지에 ampicillin 또는 kanamycin을 최종농도 100 µg/mL 또는 10 µg/mL가 되게 첨가하여 사용하였다. 고체배지는 LB 배지에 한천 (agar)을 1.5%가 되도록 첨가하여 제작하였다. 생쥐

대식세포주 RAW 264.7은 한국세포주은행 (KCLB 40071)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)과 penicillin-streptomycin (100 units/mL, BioWhittaker)을 포함하는 RPMI 1640 (BioWhittaker) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2.2. iNOS 프로모터 유전자의 클로닝 및 리포터 플라스미드의 구축

RAW 264.7 세포를 75T flask에서 48시간 동안 배양하여 phosphate buffered saline (PBS, Bio Whittaker)으로 2번 세척한 후 세포를 회수하고 Genomic DNA Extraction Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 생쥐 iNOS 프로모터 유전자의 클로닝을 위하여 miNOS_pro1-F (5'-CTCGAGGACTTTGATATGCTGAAATCCATA-3', *Xho*I site underlined)와 miNOS_pro1-R (5'-AAGCTTAGTTGACTAGGCTACTCCGTGGAG-3', *Hind*III site underlined)를 primer [20]로 사용하고 RAW 264.7 세포로부터 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 polymerase chain reaction (PCR)법으로 증폭을 행한 후 (95°C, 5분-[94°C, 1분-55°C, 1분-72°C, 1분] 30 cycles-72°C, 10분), pGEM-T easy vector (Promega, WI, USA)에 ligation시켜 pGEMTe-miNOS_pro11을 제작하였다.

한편, iNOS 발현 검증 시스템을 구축하기 위한 stable transfection이 가능한 리포터 벡터는 pGL2-basic (Promega, USA)을 제한효소 *Sac*I과 *Bam*HI으로 처리하여 생성된 luciferase 리포터 유전자를 포함하는 2.7 kb의 유전자 단편을 pDSRed1-1 (Clontech, USA)의 해당 제한효소 부위에 ligation시켜 얻었으며 pGL2-Neo로 명명하였다. pGEMTe-miNOS_pro11을 제한효소 *Xho*I과 *Hind*III로 처리하여 생성된 1.7 kb의 생쥐 iNOS 프로모터 유전자 단편을 리포터 벡터인 pGL2-Neo의 해당 제한효소 부위에 삽입시켜 iNOS 발현 검증 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-miNOS_pro11을 제작하였다.

제작된 모든 플라스미드들은 제한효소 처리에 의한 단편 및 염기서열의 분석을 통하여 확인하였다.

2.3. Stable transfection

RAW 264.7 세포를 60 mm dish에서 24시간 동안 배양하고 PBS 4 mL로 한번 세척한 후, pGL2-Neo-miNOS_pro11 플라스미드 5 µg과 SuperFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)가 첨가된 FBS가 없는 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 2시간 후, PBS 4 mL로 1번 세척하고 10% FBS와 G418 (최종농도 0.8 mg/mL, BioWhittaker)가 포함된 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였으며, G418에 대해 내성을 나타내는 세포 군집이 형성될 때까지 3일 간격으로 10% FBS와 G418을 포함하는 새로운 배지로 교환하며 계속 배양하였다. Stable transfection의 결과로 iNOS 발현 검증 플라스미드가 genome DNA에 도입된 RAW 264.7 세포를 RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 세포로 명명하였으며 액체 질소에 보관하였다.

2.4. 적송잎 추출물 제조 및 LPS 유도 iNOS 발현 저해효과 검증

본 실험에서 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 깨끗한 물로 씻고 60°C에서 열풍건조한 후 믹서로 분쇄한 분말시료를 추출용 시료로 사용하였다. 적송잎 분말 3 kg에 물 4 L를 첨가하여 80°C에서 12시간 동안 정치하여 추출하는 과정을 총 2번 반복하였으며, 이를 여과지(Whatman No 3, England)로 여과하고 rotary evaporator로 60°C에서 농축한 후 동결 건조하였고 -20°C에 보관하였다.

RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 세포를 60 mm dish에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 배양 세포를 PBS로 세정한 후 새로운 배지로 교환하였고, LPS (최종농도 1 µg/mL)를 첨가한 다음 saponin (최종농도 500, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 µg/mL) 혹은 적송잎 추출물 (최종농도 500, 50, 5, 0.5 µg/mL)을 PBS에 용해 및 희석하여 5 µL씩 처리하였고, 대조군으로 동량의 PBS를 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다.

세포 추출물의 luciferase 활성 측정은 luciferase assay kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 제조사의 manual을 토대로 행하였으며, TD-20/20 luminometer (Turner Design, Sunnyvale CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 luciferase 활성측정 결과는 BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정된 세포 추출물의 단백질 함량으로 표준화하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. iNOS 발현 검출 리포터 플라스미드의 구축

추출물의 iNOS 발현 저해효과의 검증을 위하여 iNOS 발

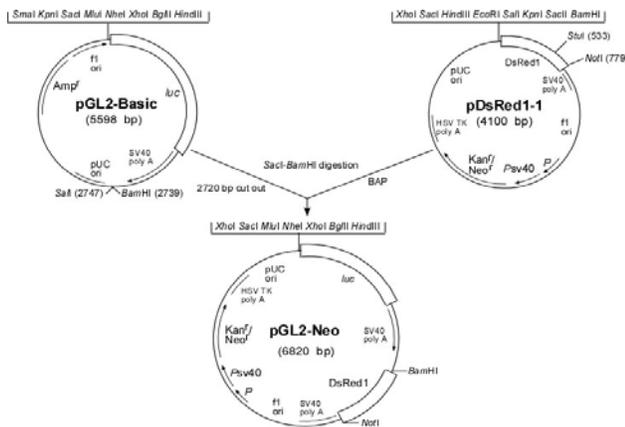


Fig. 1. Construction of a luciferase reporter plasmid for stable transfection. A 2720 bp *SacI*-*Bam*HI fragment which contains the luciferase gene was inserted into the corresponding sites of pDsRed1-1 yielding pGL2-Neo. Amp^r; ampicillin resistance gene, luc; luciferase gene, SV40 poly A; SV40 polyadenylation signal, Psv40; SV40 early promoter, DsRed1; *Discosoma* sp. human codon-optimized red fluorescent protein gene, Kan^r/Neo^r; kanamycin/neomycin resistance gene, pUC ori; pUC plasmid replication origin, f1 ori; f1 single-strand DNA origin.

현 검출 리포터 플라스미드를 구축하였다. 먼저, stable transfection이 가능한 리포터 플라스미드를 구축하기 위하여 pGL2-basic을 제한효소로 처리하여 얻어진 luciferase 유전자를 포함하는 2.7 kb의 유전자 단편을 kanamycin 저항성 유전자를 가진 pDSRed1-1에 ligation시켰으며, G418 처리에 의해 transfection된 세포의 선별이 가능한 구축된 리포터 플라스미드를 pGL2-Neo로 명명하였다 (Fig. 1). RAW 264.7 세포로부터 genomic DNA를 추출하고 생쥐 iNOS 프로모터 영역을 포함하는 1.7 kb의 유전자 단편을 증폭한 후, 리포터 플라스미드 pGL2-Neo에 삽입하여 최종적으로 stable transfection이 가능한 iNOS 발현 검출 리포터 플라스미드 pGL2-Neo-miNOS_pro11를 구축하였다. 구축된 pGL2-Neo-miNOS_pro11을 제한효소 *Xho*I과 *Hind*III로 처리한 후 agarose gel에서 확인 한 결과, 1.7 kb의 iNOS 프로모터 유전자 단편을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

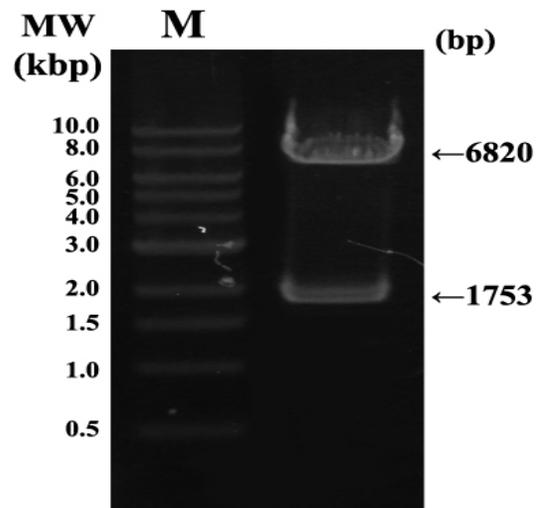


Fig. 2. Confirmation of an iNOS promoter-luciferase reporter plasmid pGL2-Neo-miNOS_pro11 by restriction enzyme. pGL2-Neo-miNOS_pro11 was digested by restriction enzymes *Xho*I and *Hind*III and a 1753 bp mouse iNOS promoter fragment and a 6820 bp pGL2-Neo promoter were confirmed.

3.2. iNOS 발현 검출을 위한 세포주 확립

LPS에 의해 유도되는 iNOS의 발현을 억제하는 물질의 신속하고 용이한 활성 검증을 위하여 iNOS 발현 검출 리포터 플라스미드를 stable transfection시킨 RAW 264.7 세포주를 확립하였다. RAW 264.7 세포에 iNOS 발현 검출 리포터 플라스미드 pGL2-Neo-miNOS_pro11를 transfection시킨 후, G418 처리에 의해 리포터 플라스미드가 세포 유전체에 삽입된 세포주를 확립하였으며, 이를 RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11로 명명하였다.

확립된 *in vitro* iNOS 발현 검출 시스템의 LPS에 의한 발현 유도 및 면역 활성 표준물질에 의한 발현 저해효과를 saponin으로 검증하였다. Saponin은 인삼, 도라지, 콩 등에 많이 함유되어 있으며, 면역증강 효과, 지양강장, 항산화 활성 및 항암활성 등에 관한 연구결과가 보고되고 있다 [21-23]. RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 세포를 배양하고 여

기에 염증유발물질인 LPS를 처리하여 iNOS 발현을 유도한 후 면역 활성이 뛰어난 것으로 알려진 saponin을 처리하여 활성을 측정된 결과, LPS 만을 처리하여 iNOS 발현을 유도시킨 대조군에 비해 saponin을 최종농도 500과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 iNOS 발현이 각각 97과 88% 저해되었고, 0.5와 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에도 각각 14와 6% 저해되는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이 결과로 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현이 saponin 농도에 의존적으로 저해되는 것을 확인할 수 있었고, 본 연구로 개발된 *in vitro* iNOS 발현 검출 시스템은 면역 활성물질의 활성 검증에 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

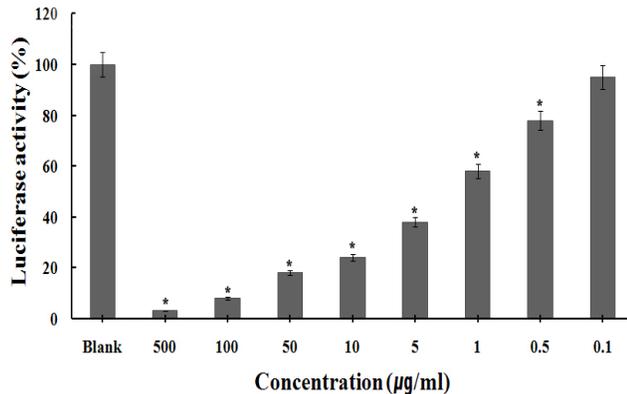


Fig. 3. Evaluation of the developed *in vitro* detection system for suppression of iNOS expression. RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 cells were exposed with LPS (final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then treated with indicated concentrations of saponin. Luciferase activity was measured using a luciferase assay kit and normalized to the protein concentration of cell lysates. The values were expressed a percentage of maximum activity in the culture treated with LPS alone. Means \pm SEM for three plates are shown.

*ANOVA $p < 0.0001$ compared with LPS alone (blank).

3.3. *In vitro* iNOS 발현 검출 시스템을 이용한 적송잎 추출물의 LPS 유도성 iNOS 발현 저해효과 검증

RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 세포에 LPS를 처리하여 iNOS 발현을 유도한 후 적송잎 추출물을 처리하여 활성을 측정된 결과, LPS 만을 처리하여 iNOS 발현을 유도시킨 대조군에 비해 적송잎 추출물을 최종농도 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하였을 때 iNOS 발현이 92% 저해되었고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에도 88% 저해되어 saponin과 비슷한 iNOS 저해활성을 보였다 (Fig. 4). 한편, 적송잎 추출물을 최종농도 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 처리하였을 때에는 LPS 유도성 iNOS 발현을 거의 저해하지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이 결과로, 최종농도 500~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 솔잎 추출물은 LPS 유도성 iNOS 발현을 효과적으로 저해할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. Yoon 등은 솔잎 추출물이 대조군에 비해 2.5배의 높은 장관면역 활성을 나타내므로 솔잎추출물의 기능성 소재로서의 가능성을 제시하였으며, Choi 등은 솔잎 추출물이 LPS/IFN- γ -stimulated microglia에서 NO 생산을 억제한다고 보고하였다 [24,25]. 본 연구의 결과로 솔잎 추출물이 iNOS의 활성을 저해하는 것으로 판단되었다.

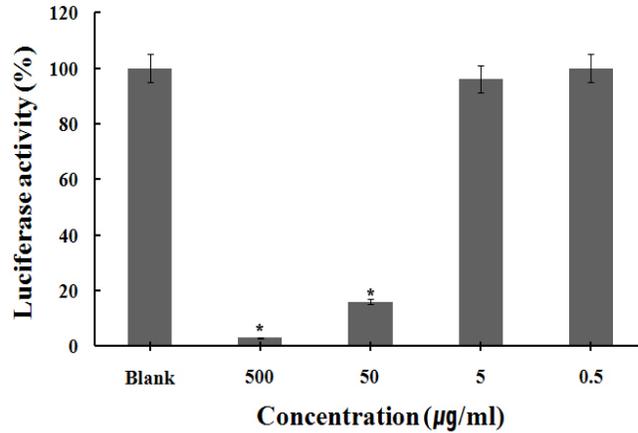


Fig. 4. Verification of suppressive effect of pine needle extract on LPS-induced iNOS expression using the *in vitro* detection system. RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 cells were exposed with LPS (final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and then treated with indicated concentrations of pine needle extract. Luciferase activity was measured using a luciferase assay kit and normalized to the protein concentration of cell lysates. The values were expressed a percentage of maximum activity in the culture treated with LPS alone. Means \pm SEM for three plates are shown.

*ANOVA $p < 0.0001$ compared with LPS alone (blank).

본 연구로 LPS 유도성 iNOS 발현을 신속하고 용이하게 검증할 수 있는 *in vitro* iNOS 발현 검출 시스템을 확립하였으며, LPS 유도성 iNOS 발현을 효과적으로 저해하는 활성 성분이 적송잎 추출물에 포함되어 있음을 검증할 수 있었다. 따라서, 개발된 *in vitro* iNOS 발현 검출 시스템은 다양한 기능성 추출물의 신속한 활성 검증에 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한, iNOS 발현 저해활성을 나타내는 적송잎 추출물에 대한 추가적인 연구를 통해 NOS 과다발현으로 인한 류마티스 관절염, 다발성 경화증 등의 만성염증 질환과 퇴행성 뇌신경 질환을 예방할 수 있는 기능성 면역 활성 소재로의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 본 연구진이 보고한 적송잎 추출물의 항산화 활성 및 항균활성 [18,19]과 함께 본 연구에서 보고되는 적송잎 추출물의 iNOS 발현 저해활성 연구결과가 더해지면 적송잎 추출물을 이용한 건강식품개발과 고기능성 소재로의 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결론

본 연구는 우리나라에서 전통 의약품으로 널리 사용되어 온 적송잎 추출물이 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현에 대한 저해효과를 검증하고자 하였다. 이를 위하여 iNOS 프로모터-루시페라제 리포터 플라스미드로 RAW 264.7 세포를 stable transfection시켜 RAW 264.7/pGL2-Neo-miNOS_pro11 세포를 제작하였고, 생성된 *in vitro* 검출시스템의 효용성은 LPS 처리 후에 생성되는 iNOS 발현이 0.1~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위의 saponin 농도에 의존적으로 감소하는 것으로 검증하였

다. 적송잎 추출물은 500과 50 µg/mL의 농도에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 각각 92와 88% 감소시켰다. 본 연구결과로 개발된 *in vitro* 검출 시스템은 iNOS 발현을 저해하는 물질을 검증하는데 이용이 가능할 것이며, 적송잎 추출물은 기능성 식품 개발에 사용이 가능할 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성 사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

References

- Moncada, S. (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J. R. Soc. Med.* 92: 164-169.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB journal* 6: 3051-3064.
- Andreaskos, E., B. Foxwell, and M. Feldmann (2004) Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol. Rev.* 202: 250-265.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994) Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13: 301-313.
- Jaffrey, S. R. and S. H. Snyder (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 417-440.
- Tsao, L. T., C. Y. Lee, L. J. Huang, S. C. Kuo, and J. P. Wang (2002) Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by a synthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1961-1968.
- Vodovotz, Y., D. Russell, Q. W. Xie, C. Bogdan, and C. Nathan (1995) Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophage. *J. Immunol.* 154: 2914-2925.
- Lowenstein, C. J., E. W. Alley, P. Raval, A. M. Snowman, S. H. Snyder, S. W. Russell, and W. J. Murphy (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9730-9734.
- Chabrier, P. E. and M. Auguste (1999) Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1029-1035.
- Lee, Y. H., S. H. Shin, Y. S. Choi, and S. Y. Lee (1996) Development of the health foods containing the extract from *Pinus strobus* leave. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 25: 379-389.
- Kim, Y. M., Y. K. Jeong, M. H. W. Y. Lee, and H. I. Rhee (2006) Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21: 756-761.
- Busserolles, J., E. Gueux, B. Balasinska, Y. Piriou, E. Rock, Y. Rayssiguier, and A. Mazur (2006) *In vivo* antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) barks in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 77: 22-27.
- Park, H. G., M. R. Cha, J. H. Hwang, J. Y. Kim, M. S. Park, S. U. Choi, H. R. Park, and Y. I. Hwang (2006) Antimicrobial activity of the extract from *Pyrola japonica* against *Bacillus subtilis*. *J. Life Sci.* 16: 989-993.
- Wei, F. X., M. Y. Li, Y. H. Song, and H. Z. Li (2008) Apoptosis and activity changes of telomerase induced by essential oil from pine needles in HepG2 cell line. *Zhong. Yao. Cai.* 31: 1197-1200.
- Chung, Y. J., M. W. Bae, J. S. Chung, and M. S. Chung (2002) Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 691-695.
- Park, N. H. and S. H. Lee (2003) Antimicrobial activity of pine needle extract and horseradish on the growth of vibrio. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 185-190.
- Kim, Y. M., Y. K. Jeong, M. H. Wang, W. Y. Lee, and H. I. Rhee (2006) Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21: 756-761.
- Kim, N. Y., M. K. Jang, D. G. Lee, K. H. Yu, H. J. Jang, M. H. Kim, S. G. Kim, B. H. Yoo, and S. H. Lee (2010) Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts. *Nut. Res. and Practice* 4: 16-22.
- Kim, N. Y., M. K. Jang, M. J. Jeon, D. G. Lee, H. J. Jang, S. W. Lee, M. H. Kim, S. G. Kim, and S. H. Lee (2010) Verification of antimicrobial activities of various pine needle extracts against antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Life Sci.* 20: 589-596.
- Kim, Y., H. Y. Min, H. J. Park, E. J. Lee, E. J. Park, H. J. Hwang, C. Jin, Y. S. Lee, and S. K. Lee (2004) Suppressive effects of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methanol extract on lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Cancer Prev.* 13: 419-424.
- Ryu, D. S., S. H. Kim, and D. S. Lee (2008) Immunomodulating activity of *Salicornia herbacea* extract. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 135-141.
- Estrada, A., G. S. Katselis, B. Laarveld, and B. Barl (2000) Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comparative Immunol. Microbiol. Infectious Diseases* 23: 27-43.
- Jeon, H. K., S. C. Kim, and N. P. Jung (1991) Effects of Ginseng Saponin Fraction and Cyclophosphamide on the Tumoricidal Activity of Mouse Macrophage and the Antitumor Effect. *Kor. J. Ginseng Sci.* 15: 99-105.
- Yoon, J. A., K. W. Yu, S. H. Shin, and H. Y. Cho (2010) Activation of intestinal immune system by an orally administered methanol extract from pine needles. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 356-362.
- Choi, H. S., D. Hang, S. J. Cho, S. C. Kang, E. S. Sohn, S. P. Lee, S. N. Pyo, and E. W. Son (2006) Immunomodulatory activity of pine needle (*Pinus densiflora*) extracts in macrophages. *J. food Sci. Nutr.* 11: 105-109.