

미강에탄올추출물의 RAW264.7 세포에서 항염증효과

박정숙[#] · 김미혜^{*}

남부대학교 대체의학과, *남부대학교 향장미용학과

(Received September 26, 2011; Revised October 27, 2011; Accepted November 3, 2011)

Anti-Inflammatory Effects of Rice Bran Ethanol Extract in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells

Jeong-Suk Park[#] and Mi-Hye Kim^{*}

Department of Alternative Medicine Nambu University of Gwangju 506-606, Korea

*Department of Cosmetology, Nambu University of Gwangju 506-606, Korea

Abstract — The aim of the present study is to investigate the anti-inflammatory effect of a Rice Bran Ethanol Extract (RBE). Inflammation, such as a bacterial infection in vivo metabolites, such as external stimuli or internal stimuli to the defense mechanisms of the biological tissue a variety of intracellular regulatory factors deulin inflammatory TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, such as proinflammatory cytokines, prostagrandin, lysosomal enzyme, free radicals are involved in a variety of mediators. The present study was designed to determine the effect of the RBE on pro-inflammatory factors such as NO, iNOS expression and TNF- α , IL-1 β , IL-6 in lipopolysaccharide (LPS) - stimulated RAW264.7 macrophages cells. The cell toxicity was determined by MTS assay. To evaluate of anti-inflammatory effect of RBE, amount of NO was measured using the NO detection kit and the iNOS expression was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). And proinflammatory cytokines were measured by ELISA kit. As a result, the RBE reduced NO, iNOS expression and TNF- α , IL-1 β , IL-6 production without cytotoxicity. Our results suggest that the RBE may have an anti-inflammatory property through suppressing inflammatory mediator productions and appears to be useful as an anti-inflammatory material.

Keywords □ rice bran ethanol extract, anti-inflammatory, cytokine, NO, iNOS

쌀(*Oryza sativa* L.)은 우리나라의 주곡 작물로 인체활동에 필요한 다양한 영양분을 공급하며, 미강은 현미를 백미로 도정할 때 얻어지는 부산물로 쌀의 영양분 95%를 가지고 있다.¹⁾ 미강은 양질의 단백질과 식이섬유 및 각종비타민, 미네랄을 함유하고 있으며, phytic acid, γ -oryzanol, α -tocopherol, α -tocotrienol과 같은 항산화물질 등 다양한 생리활성물질들을 가지고 있다.²⁾ 이들 성분들은 혈중 콜레스테롤을 저하시켜 만성질환의 예방에 효과가 있음을 보고되었으며,³⁾ HepG2 간암세포주와 자궁경부암 세포주에서 tocotrienol이 암세포 증식을 억제하여 항암활성을 나타내었으며,⁴⁾ 항산화효과^{5,6)}와 혈압상승억제 효과^{7,8)} 등 다양한 생리적 기능에 대한 연구가 보고되어왔다. 특히 Toshihiro 등⁹⁾의 보고에 의하면 미강분획추출물을 마우스에 투여시 유의할만한

항염성을 보고하였다.

염증은 다양한 경로를 통한 외부 감염, 생체 내 대사산물 등 내·외적 자극에 대한 생체 내 방어기전의 발현으로서, 세포 내 다양한 염증 조절인자들이 매개체로서 관여하며, 알레르기, 아토피, 관절염, 심장병, 뇌질환, 순환기 장애뿐만 아니라 암 등과 같은 다양한 질환의 원인을 제공하게 된다.¹⁰⁾ 염증의 증상으로는 홍반, 부종, 열, 통증 그리고 기능 상실 등이 나타난다.¹¹⁾ 또한 염증반응은 세균감염과 같은 외부 자극이나 생체내 대사산물과 같은 내부자극에 대한 생체조직의 방어기전으로^{12,13)} 세포내 다양한 염증조절인자들인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 등과 같은 proinflammatory cytokines, prostagrandin, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여한다.¹⁴⁾ 특히 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 염증 반응의 전사 인자인 NF- κ B를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 nitric oxide(NO)

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-970-0167 (팩스) 062-970-0162
(E-mail) pk0207@nambu.ac.kr

와 Prostaglandin E2(PGE2)를 생성하여 염증을 일으킨다.^{15,16)} 또한 NO가 필요이상으로 생성되면 염증 반응의 항진, 과도한 혈관 확장에 의한 패혈성 쇼크 유발, 상처 치유의 억제, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.¹⁷⁾ 다양한 염증성 질환에서 주된 치료제인 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)가 사용된다. 그러나 이 제제들은 항염증 효과도 있지만 부작용 발생우려로 장기간 사용이 어렵다. 최근 이러한 제제들을 대신 할 수 있는 소재를 개발하기 위하여 천연물에서 유효성분을 얻으려는 노력들이 시도되고 있다.¹⁸⁾

본 연구에서는 천연물중 기능성소재로 사용되고 있는 미강에탄올추출물의 항염성 그 면역기전에 대한 기초적인 생리 활성에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 이에 RAW264.7 세포에서 NO의 생성, iNOS의 발현 정도와 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량 등을 조사하여 미강에탄올추출물의 항염성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출물제조

본 실험에 사용한 시료는 2009년 전남순천에서 생산된 일미벼를 2010년 8월 순천미곡처리장(MC-90A, Wakayama Co. Ltd., Japan)에서 도정하여 제공받은 즉시 시료로 사용하였다. 미강 100 g을 99.9% 에탄올 1 l를 가하여 40°C에서 4시간씩, 3회 추출한 후 회전진공농축(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)한 후, 동결건조하여 5.7 g의 미강추출물을 얻었다.

시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL사(Grand Island, USA), Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA), Cell Titer 96® AQ_{ueous} One Solution(MTS)은 Promega사(Madison, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 ELISA kit는 eBioscience사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였고 NO(Nitric Oxide) detection kit는 iNtRON Biotechnology사(Suwon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Total RNA를 분리시 Easy Blue® 시약(iNtRON Biotechnology, Korea) 사용하였고, QuantiTect® Reverse Transcription Kit(Qiagen, USA)를 구입하여 cDNA를 합성에 사용하였다. 이외에 실험에 사용된 시약은 모두 분석용 시약 특급을 사용하였다.

세포배양

실험에 사용한 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10%

FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지를 사용하였다. 세포는 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

MTS assay

Rice Bran Ethanol Extract의 세포에 대한 독성은 Desai¹⁹⁾ 등의 방법에 준하여 측정하였다. 세포 독성 측정은 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetrazolium inner salt(MTS) assay 방법으로 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정한다. 96 well plate에 1.0×10⁵ cells/well의 RAW264.7 세포를 분주하고 18시간 동안 배양한 후 Rice Bran Ethanol Extract를 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 20 μ l의 MTS solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 4시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

Nitric oxide 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Wang 등²⁰⁾의 방법에 따라 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양한 후 Rice Bran Ethanol Extract를 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 전 처리하고 1시간 후에 LPS 10 μ g/ml 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양액과 동량의 Griess Reagent를 가하고 10분간 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RAW264.7 세포에서 발현되는 iNOS의 유전자발현에 대한 Rice Bran Ethanol Extract의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 RAW264.7 세포를 60 mm dish에 4.0×10⁶ cells이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양하였다. Rice Bran Ethanol Extract를 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 전처리하고 LPS 10 μ g/ml 처리 후 6시간 동안 배양하였다. 세포를 수거하여 4°C에서 2,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 Easy Blue® 시약(iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 QuantiTect® Reverse Transcription Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 μ g에 Table I의 primers (sense, anti-sense) 1 μ l 및 10×buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 1U Tag polymerase를 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 45초,

Table I – The Primers for PCR

Primer		Sequences
iNOS	Sense	5'-GAC CAG ATA AGG CAA GCA CA-3'
	Antisense	5'-CTT GTC TTT GAC CCA GTA GC-3'
GAPDH	Sense	5'-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'
	Antisense	5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3'

annealing을 위해 55~60°C에서 45초 및 extension을 위해 72°C에서 60초 조건으로 30 cycles을 수행하였다. PCR 반응의 표준 대조구로 GAPDH를 사용하였다(Table I). 이후 증폭된 DNA산물을 1.5% agarose gel를 사용하여 100 volt에서 30분간 전기영동하여 UV에서 관찰하였다.

세포배양액 내의 Cytokines 측정

RAW264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 18시간 동안 배양한 후 Rice Bran Ethanol Extract를 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 전 처리하고 1시간 후에 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 후 24시간 동안 배양하여 세포배양액을 얻은 다음 배양액에 함유된 TNF- α , IL-1 β , IL-6을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

통계적 분석

실험결과는 평균 \pm 표준오차(Mean \pm S.E.)로 계산하였고, 각 군간의 유의성 검증은 students' t-test를 사용하였다. $p < 0.05$ 일 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

Rice Bran Ethanol Extract의 RAW264.7 세포에 대한 독성

Rice Bran Ethanol Extract의 세포독성을 보기 위하여

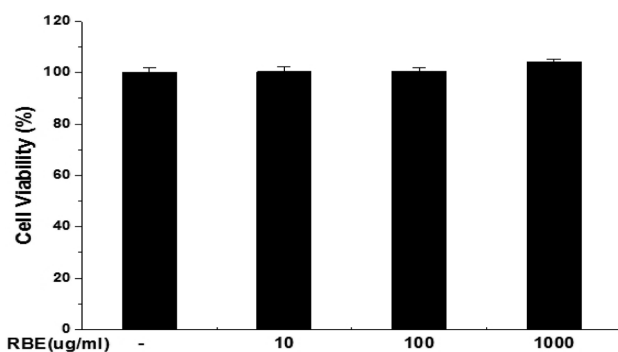


Fig. 1 – Effects of RBE on the cell viability of RAW 264.7 cells. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells. RBE : Rice Bran Ethanol Extract.

RAW264.7 대식세포에 Rice Bran Ethanol Extract을 농도 의존적(10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$)으로 처리한 후 MTS assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 실험 결과 cell viability가 101.8%, 102.4%, 102.7%, 106.7%로 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 이는 Rice Bran Ethanol Extract이 보여주는 항염 효과가 세포 생존율의 감소가 아닌 시료의 약리활성으로 사료된다.

Rice Bran Ethanol Extract의 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

대식세포들은 염증반응에서 중추적인 역할을 하며,²¹⁾ NO, HNO₂, ONOO-와 같은 활성 질소(reactive nitrogen species, RNS)는 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성된다.²²⁾ 활성산소의 일종으로 최근 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서,²³⁾ NOS(Nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는데, 특히 iNOS(inducible NOS)가 염증반응에 관여하며, TNF- α , LPS와 같은 염증성 사이토카인의 자극이 있을 때 발현된다.²⁴⁾

염증 유발물질로 사용되는 LPS를 이용하여 RAW264.7 세포의 NO 생성에 대한 Rice Bran Ethanol Extract의 효과를 측정한 결과(Fig. 2), RAW264.7 세포만 배양한 대조군에서 NO의 농도는 매우 낮게 측정되었으나, LPS를 처리한 군에서 NO의 농도는 현저히 증가되었다. Rice Bran Ethanol Extract을 처리한 실험군은

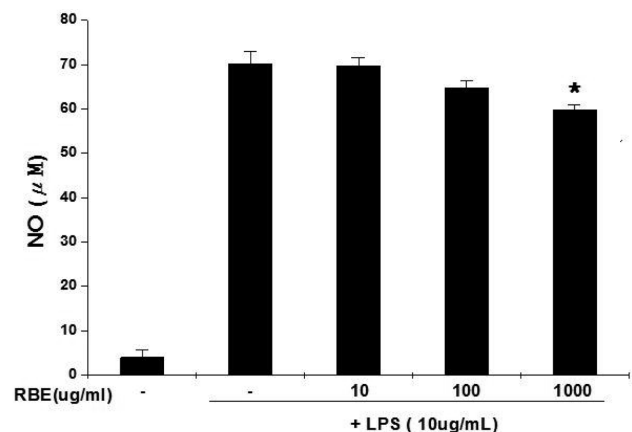


Fig. 2 – Inhibitory effects of RBE on NO Production in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. RAW 264.7 cells were treated with or without LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) and then with Rice Bran Ethanol Extract and incubated for 24 h. The nitrite concentrations in medium were determined by NO Detection Kit. Results of three independent experiments were averaged mean value of three independent experiments (SD=bars), and asterisks indicate significantly different from treatment with LPS alone (*: $p < 0.05$ compared to LPS). RBE: Rice Bran Ethanol Extract, LPS: Lipopolysaccharide.

농도 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며 1000 µg/ml에서 유의한 억제를 보였다. Choi 등²⁵⁾에 의하면 유색 미 거 추출물에서 농도 의존적으로 NO가 억제됨을 보고하였다.

염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 유전자 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있으며,²⁶⁾ iNOS는 LPS, IFN-γ, IL-1β 및 TNF-α 등의 자극에 의해 대식세포, 내피세포, 간세포, 심근세포 등에서 장기간 다량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ iNOS는 세포내에 존재하지 않으나 일단 자극에 의해 유도가 되면 NO를 생성하며 생성된 NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상과 같은 작용을 하며 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO의 합성효소인 iNOS의 유전자 발현에 대한 Rice Bran Ethanol Extract의 효과를 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과(Fig. 3), RAW264.7 세포만 배양한 대조군에서는 iNOS의 유전자발현이 나타나지 않았으나 LPS 10 µg/ml를 처리한 군에서는 iNOS의 유전자 발현이 대조군에 비하여 현저히 증가하였다. Rice Bran Ethanol Extract를 처리 한 실험군은 농도 의존적으로 iNOS의 발현이 억제되었다. 특히 100 µg/ml, 1000 µg/ml에서는 유의한 수준으로 억제되었다. 이런 결과는 Rice Bran Ethanol Extract이 LPS에 의해 유도되는 iNOS 유전자의 발현을 효과적으로 억제시켜 NO의 생성을 억제시킨 것으로 사료된다. Chun

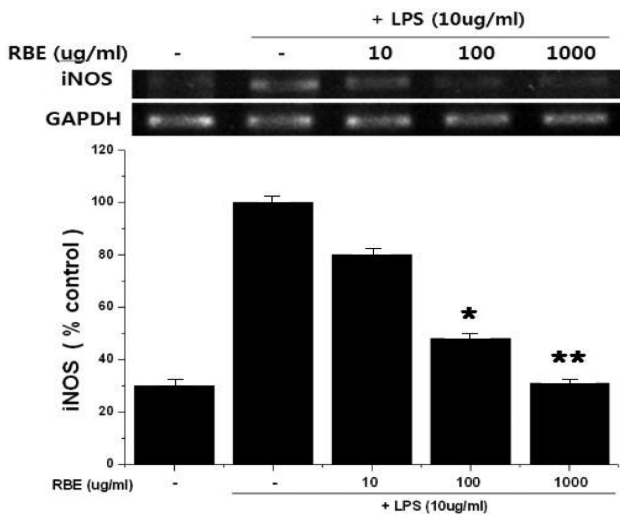


Fig. 3 – Inhibitory effects of RBE on iNOS Expression in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments and asterisks indicate the significant differences (*: p<0.05 compared to LPS; **: p<0.01 compared to LPS). Quantification of iNOS mRNA expression was measured by densitometric analysis. the values were expressed as a percentage of maximal band intensity in culture treated with LPS alone. Data are the mean±S.E.M. of iNOS/GAPDH. RBE: Rice Bran Ethanol Extract, LPS: Lipopolysaccharide.

등²⁹⁾의 보고에 의하면 RAW264.7 세포에 흑미분획을 처리시 NO와 iNOS의 발현이 억제됨을 보고하였고, Reiko 등³⁰⁾의 보고에 의하면 미강유에 함유된 hydroxycinnamic acid derivatives가 염증반응의 전사인자인 NF-κB의 활성을 저해시킴으로 NO와 iNOS의 발현이 억제됨을 보고하였다. 이러한 결과는 미강내 함유된 다양한 물질들의 우수한 항염효과로 사료된다.

Rice Bran Ethanol Extract의 TNF-α, IL-1β, IL-6 생성에 미치는 영향

염증성 사이토카인은 염증을 나타내는 중요한 지표로 Rice Bran Ethanol Extract이 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 RAW264.7 세포에 LPS 10 µg/ml 단독 처리 또는 LPS와 Rice Bran Ethanol Extract을 농도 의존적으로 처리한 후 배지에 생성된 TNF-α, IL-1β, IL-6의 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다. LPS에 의해 유도되는 TNF-α 생성에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 4), 농도 의존적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며 특히 1000 µg/ml에서는 유의한 수준이었다. LPS에 의해 유도되는 IL-1β, IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 5, 6), 농도 의존적으로 감소하는 경향은 보였으나 유의성은 없었다. 염증에는 많은 매개물질이 관여하는데 활성화된 림프구 및 대식세포 등의 여러 세포에서 분비되는 cytokine을 보면, 염증반응에 관계하는 cytokine으로는 TNF-α와 IL-1β, IL-6, IL-8 등이 있다.³¹⁾ TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로 선천면역반응에 있어서 중요한 역할을 하며 Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에서 세포독성을 나타내며 만성염증과 관련되어 있다.³²⁾ Islam 등³³⁾의 보고에 의하면 dextran sulphate sodium으로 대장염을 유발시킨 쥐에게 phytosterol ferulates의 혼합물인 γ-oryzanol투

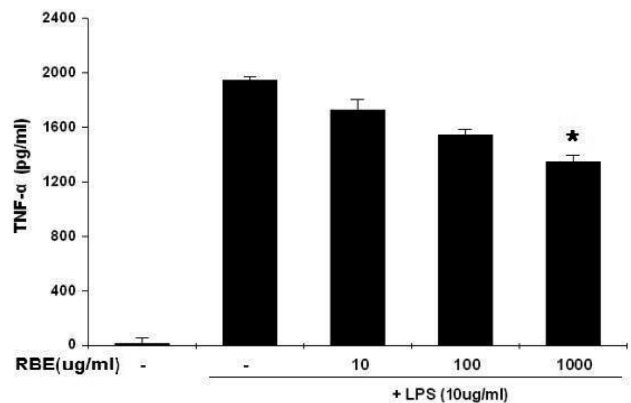


Fig. 4 – Inhibitory effects of RBE on the production of TNF-α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments (SD=bars) and asterisks indicate the significant differences (*: p<0.05 compared to LPS). RBE: Rice Bran Ethanol Extract, LPS: Lipopolysaccharide.

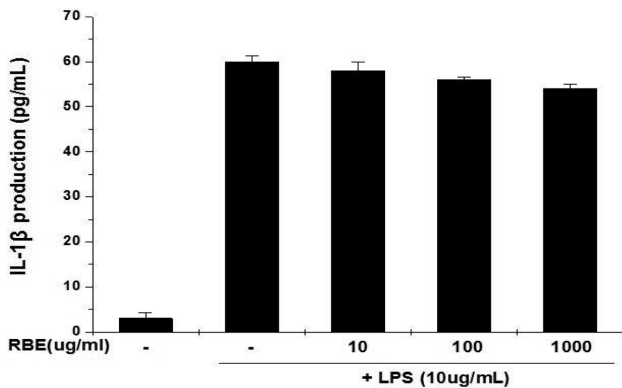


Fig. 5 - Inhibitory effects of RBE on the production of IL-1 β in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments (SD=bars). RBE: Rice Bran Ethanol Extract, LPS: Lipopolysaccharide.

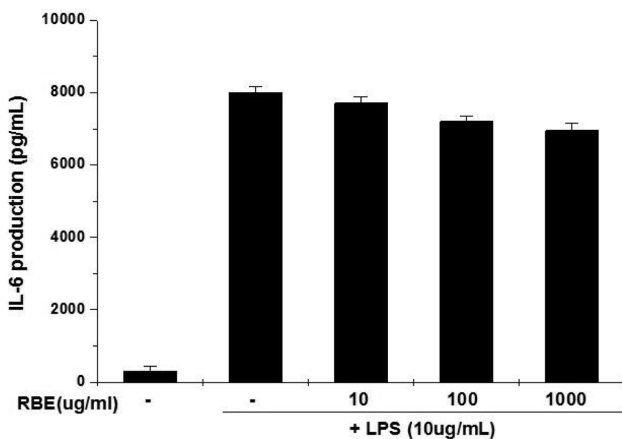


Fig. 6 - Inhibitory effects of RBE on the production of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments (SD=bars). RBE: Rice Bran Ethanol Extract, LPS: Lipopolysaccharide.

여시 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성억제와 염증성 사이토카인의 유전자 발현억제를 보고하였다.

결론

기능성소재로 활용할 수 있는 Rice Bran Ethanol Extract에 대한 항염성과 그 면역기전에 대한 기초적인 생리 활성을 측정하였다. 실험결과 실험에 사용된 Rice Bran Ethanol Extract은 세포독성을 나타내지 않았다. 세포 독성이 없음을 확인 한 후 LPS로 처리한 RAW264.7 세포에서 Rice Bran Ethanol Extract의 NO 생성억제를 평가한 결과 RAW264.7 세포만 배양한 대조군에서 NO의 농도는 매우 낮게 측정되었으며, LPS를 처리한 군에서 NO의 농도는 현저히 증가되었다. 그러나 Rice Bran

Ethanol Extract을 처리한 실험군은 NO 생성이 유의성 있게 억제 되었으며, RAW264.7 세포를 LPS로 처리 시 iNOS 유전자가 발현되어 NO를 생성하게 되므로 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 평가 하였다. LPS 처리시 iNOS 유전자 발현이 유의하게 증가 되었으나, Rice Bran Ethanol Extract을 전 처리한 실험군에서 iNOS 유전자의 발현이 감소하였다. Rice Bran Ethanol Extract에 의한 iNOS 유전자의 발현 억제는 NO 생성억제를 유도하였음을 의미한다. Proinflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 LPS를 처리한 군에서 TNF- α 의 분비가 현저하게 증가되었으나 Rice Bran Ethanol Extract를 처리한 군에서는 유의한 억제 효과를 나타냈다. IL-1 β , IL-6의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 농도 의존적으로 감소하는 경향은 보였으나 유의성은 없었다.

이상과 같은 결과로 Rice Bran Ethanol Extract은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성억제, iNOS 유전자의 발현을 억제시켰으며, proinflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비량도 억제시켰다. 이러한 실험 결과들은 기능성소재로 사용되고 있는 Rice Bran Ethanol Extract의 항염성과 그 면역기전에 대한 기초적인 생리 활성을 객관적으로 입증한 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Shin, H. G. : Development and Research Trends of Functional Food. Food Science and Industry, *Korean Society of Food Science and Technology* **30**, 2 (1997).
- 2) Bae, S. M., Kim, J. H., Cho, C. W., Jeong, T. J., Yook, H. S., Byun, M. W. and Lee, S. C. : Effect of irradiation on the antioxidant activity of rice hull, rice bran and barley bran. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 246 (2002).
- 3) Qureshi, A. A., Mo, H., Packer, L. and Peterson, D. M. : Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3130 (2000).
- 4) Choi, H. I., Ye, E. J., Kim, S. J., Bae, M. J., Yee, S. T., Park, E. J. and Park, E. M. : Anticancer (in vitro) and anti-allergy effects of rice bran extracts. *J. Korean Soc. Food Sic. Nutr.* **35**, 1297 (2006).
- 5) Osawa, T., Narashima, R., Kawakishi, S., Namaki, M. and Tashiro, T. : Antioxidative defense system in rice hull against damage caused by oxygen radicals. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3085 (1985).
- 6) Lai, P., Li, K. Y., Lu, S. and Chen, H. H. : Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chem.* **117**, 538 (2009).
- 7) Muramoto, G. and Kawamura, S. : Rice protein and anti-hypertensive peptide (angiotensin converting enzyme inhibitor)

- from rice. *Nippon. Shokuhin. Kougyo.* **34**, 18 (1991).
- 8) Lee, K. Y., Kim, J. H., Son, J. R. and Lee, J. S. : Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of Heugjinju rice (*Oryza sativa* L). *Korean J. Postharvest. Sci. Technol.* **8**, 296 (2001).
 - 9) Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N. and Arai, K. : Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2313 (2000).
 - 10) Rocca, B. and FitzGerald, G. A. : Cyclooxygenases and prostaglandins shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 603 (2002).
 - 11) Craing, C. : Introduction to CNS Pharmacology. In Craing C. Stitzel R(eds.), *Modern Pharmacology*, 4th ed. Boston: Little, Brown & Co. 329 (1994).
 - 12) MacSween, R. and Whaley, K. : *Muir's Textbook of Pathology*, 13th ed. London: Edward Arnold (1992).
 - 13) Kang-Rotondo, C. H., Major, S., Chiang, T. M., Myers, L. K. and Kang, E. S. : Upregulation of nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes after ultraviolet B and bradykinin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **12**, 57 (1996).
 - 14) Seo, S. J., Choi, H. G., Chung, H. J. and Hong, C. K. : Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines. *Br. J. Dermatol.* **147**, 655 (2002).
 - 15) Shew, R. L., Papka, R. E., McNeill, D. L. and Yee, J. A. : NADPH-diaphorase- positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* **14**, 637 (1993).
 - 16) Kwqagkmata, H., Ochiai, H., Mantani, N. and Terasawa, K. : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* **28**, 217 (2000).
 - 17) Weller, R. : Nitric oxide - a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br. J. Dermatol.* **137**, 665 (1997).
 - 18) Masaki, M., Matsushita, M. and Wakitani, K. : Inhibitory effect of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. *Inflamm. Res.* **47**, 187 (1998).
 - 19) Desai, A., Vyas, T. and Amiji, M. : Cyroroxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2745 (2008).
 - 20) Wang, S., Chen, Y., He, D., He, L., Yang, Y., Chen, J. and Wang, X. : Inhibition of vascular smooth muscl cell proliferation by serum from rats treated orally with Gastrodia and Uncaria decoction, a traditional Chinese formulation. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 458 (2007).
 - 21) Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K. H., Kantarci, A. and Van Dyke, T. E. : Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect. Immun.* **72**, 2312 (2004).
 - 22) Delanty, N. and Dichter, M. A. : Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* **98**, 145 (1998).
 - 23) Weisz, A., Ciatiello, L. and Esumi, H. : 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 (1996).
 - 24) Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. : Nitric oxide: physiology. Pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 (1991).
 - 25) Choi, S. P., Kang, M. Y. and Nam, S. H. : Inhibitory activity of the extracts from the pigmented rice brans on inflammatory reactions. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 222 (2004).
 - 26) Hseu, Y. C., Wu, J. Y., Chang, W. H. and Lu, F. J. : Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int. Inmunopharmacol.* **5**, 1914 (2005).
 - 27) Sarkar, D., Saha, P., Gamre, S., Bhattacharjee, S., Hariharan, C. and Ganguly, S. : Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF-κB pathway. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1264 (2008).
 - 28) Chae, S. W., Kim, J. S., Kang, K. A., Bu, H. D., Lee, Y. and Hyun, J. W. : Antioxidant activity of Jionoside D from *Clerodendron trichotomum*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1504 (2004).
 - 29) Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. and Kitts, D. : Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5271 (2003).
 - 30) Nagasakaa, R., Chotimarkorna, C., Shafiqulb, I., Horib, M., Ozakib, H. and Ushioa, H. : Anti-inflammatory effects of hydrocinnamic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**, 615 (2007).
 - 31) 대한병리학회 병리학(3판). 서울: 고문사 **65**, 81 (1997).
 - 32) Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. and Kim, S. G. : Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-α and COX-2 expresstion by sauchinone effects on I-Ba phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of Pharmacology* **139**, 11 (2003).
 - 33) Islam, M. S., Murata, T., Fujisawa, M., Nagasaka, R., Ushio, H., Bari, A. M., Hori, M. and Ozaki, H. : Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *British Journal of Pharmacology* **154**, 812 (2008).