

Mouse cell에서 荊芥連翹湯의 iNOS 생성 억제 효과

박정훈 · 김종채 · 홍승욱
동국대학교 대학원 한의학과 안이비인후피부과학교실

The effects of *Hyunggaeyungyo-tang* of suppression of iNOS production on RAW 264.7cell

Jung-Hoon Park · Jong-Che Kim · Seung-Ug Hong

Background and Objectives : The aim of this study was to investigate anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Hyunggaeyungyo-tang*(HYT) on RAW 264.7 cells.

Material and Methods : Two types of experiments were implemented for this study: first, the experiment to study the anti-oxidant effect of HYT using riboflavin; second, in vitro experiment to investigate the suppression of NF- κ B activation using RAW 264.7 cells (I κ B kinase and induce nitric oxide synthase mRNA expression)

Results : 1. The anti-oxidant effects of HYT was dose-dependantly increased.

2. The RAW 264.7cells were treated with LPS for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations(0.4,-1.0mg/ml) of HYT, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced IKK & iNOS mRNA expression were dose-dependantly decreased in HYT treated RAW 264.7cells.

Conclusion : The results suggest that HYT is significantly effective in the treatment of inflammation through the suppression of NF- κ B activation and iNOS production.

Key words : *Hyunggaeyungyo-tang*, anti-inflammation, NF- κ B, iNOS

1. 서 론

염증은 생체 자극에 대한 반응기전이며, 주로 종창, 발적, 발열, 통증을 유발하며, 이후 기능의 장애까지 나타내게 된다. 종창은 염증으로 인해 조직내에서 혈장, 혈구 등이 혈관벽을 뚫고 나오는

교신저자 : 홍승욱, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지
동국대학교 일산분교한방병원 안이비인후피부과
(Tel : 031-961-9085, E-mail : heenthisu@duih.org)
• 접수 2011/03/12 • 수정 2011/03/25 • 채택 2011/04/01

체액을 말하며 이 삼출액이 지각신경을 압박할 경우 심한 통증을 유발시킨다¹⁾.

荊芥連翹湯은 명대 龔廷賢의 《萬病回春》²⁾에 처음 수록되어 風熱이 上發하여 頭上諸症을 야기시킨 것을 다스리는 대표적인 방제로 각종 이비인후질환에 많이 활용하였으며³⁾, 알레르기 비염 중 感受風寒型의 증상에 사용할 수 있는 처방이다. 지금까지 항알레르기 작용에 대한 연구⁴⁾, 유전독성 평가⁵⁾ 등의 실험 연구가 이루어져 왔으며, 특히 송⁶⁾은 형개연교탕가미가 알레르기 비염에 임상적으로 효과가 있음을 보고하였다. 이에 불구하고 형개연교탕에 대한 알레르기 비염 유발 동물 실험에 대한 보고는 아직 이루어지지 않았다.

이에 저자는 형개연교탕의 항산화작용과 항염증 효과를 관찰하기 위하여 RAW 264.7 세포를 이용하여 NF- κ B 활성억제를 통한 항염증효과(iNOS 발현)를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 세포와 실험재료

1) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 마우스의 RAW264.7 cell은 KCLB(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO² incubator(Sanyo, Japan)에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin (Sigma, USA), 100 μ g/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

2) 재료

형개연교탕(Hyunggaeyungyo-tang) 2첩을 증류

수 500 ml에 넣고 2시간동안 진탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축한 후 동결 건조한 것을 사용하였고, MTT assay 결과 형개연교탕 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존율의 변화가 일어나지 않아 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

Table 1. The Amount and Composition of HYT Extract

Herbal Name	Scientific Name	Dose(g)
荊 芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	5.25
連 翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	5.25
防 風	<i>Ledebourieliae Radix</i>	5.25
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	5.25
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	5.25
白 芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	5.25
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	5.25
枳 殼	<i>Aurantii Fructus</i>	5.25
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	5.25
梔 子	<i>Gardeniae Fructus</i>	5.25
白 芷	<i>Angelicae dahuricae Radix</i>	5.25
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	5.25
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.75
Total Amount		66.75

Abbreviation : HYT, Hyunggaeyungyotang

2. 실험 방법

1) 염증 유도 산화 스트레스 완화 효과 조사

항산화능력을 측정하기 위해 Riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mM buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100 μ l, EDTA/cyanide 200 μ l, riboflavin 100 μ l 그리고 항산화 측정할 농도별(1, 2, 4, 6, 8 그리고 10 mg/ml) 형개연교탕 추출물 100 μ l을 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 10번 반복하여 평균값을 계산하였다.

2) NF- κ B 활성 관련 염증효소 유전자 발현 억제 효과 조사

형개연교탕이 NF- κ B 활성에 관여하는 I κ B kinase(IKK)와 염증효소인 induce nitric oxide synthase(iNOS)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사증합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10^5 cells/well을 6well에 plating 하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(1 μ g/ml, Sigma)를 2시간 처리하여 NF- κ B 활성을 유도한 후 형개연교탕 추출물 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/ml를 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCRkit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK와 iNOS primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table II). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

3) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity의 수치화를 위해 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)를

이용한 영상분석을 실시하였다. 유의성은 ANOVA test(SPSS17, SPSS, USA)를 통해 확인하였고, $p < 0.05$ 의 경우 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 항산화효과

형개연교탕 추출물의 항산화 효율은 1 mg/ml에서 $17 \pm 1.6\%$, 2 mg/ml에서 $35 \pm 1.9\%$, 4 mg/ml에서 $43 \pm 2.1\%$, 6 mg/ml에서 $54 \pm 2.7\%$, 8 mg/ml에서 $64 \pm 2.3\%$, 10 mg/ml에서 $71 \pm 2.3\%$ 로 농도-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

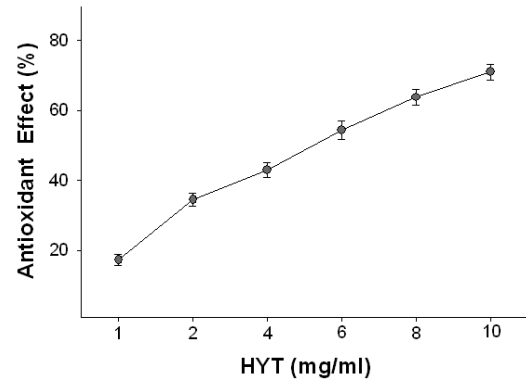


Fig. 1. The anti-oxidant effects of HYT.

The anti-oxidant effects of HYT were dose-dependantly increased.

Abbreviation : HYT, *Hyunggaeyungyotang*.

Table II. The Primer of IKK, iNOS and β -actin mRNA

Primer		Primer Sequences	Product (bp)	No. of Cycles
IKK	sense	5' CCA CCC AGT TCC ACA AGT CT 3'	380	35
	antisense	5' CCT CCA CTG CGA ATA GCT TC 3'		
iNOS	sense	5' AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC 3'	527	30
	antisense	5' AGA ACT GAG GGT ACA TGC TGG AGC C 3'		
β -actin	sense	5' GGA GAA GAT CT GCA CCA CAC C 3'	840	35
	antisense	5' CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG 3'		

Abbreviation : IKK, I κ B kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

2. RAW 264.7 세포내 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현 억제

1) IKK mRNA 발현 억제

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 IKK mRNA 발현은 증가하였는데, 형개연교탕 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 IKK mRNA 발현량에 비해 0.25 mg/ml에서 1.0%, 0.5 mg/ml서 31.8%, 1.0 mg/ml에서 70.8%, 2.0 mg/ml에서 96.7%가 감소하였다 (Fig. 2).

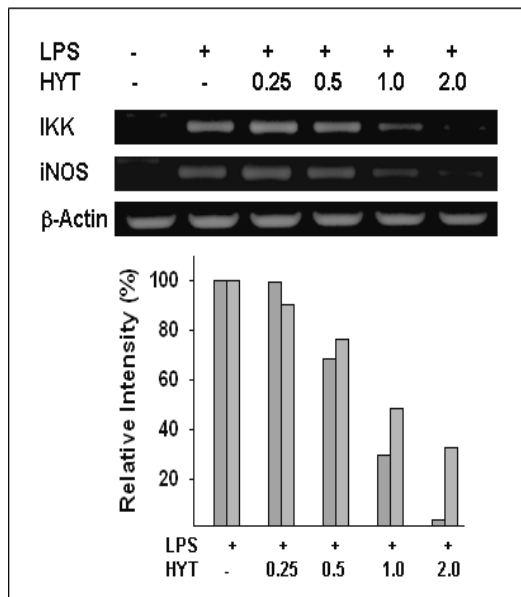


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced IKK & iNOS mRNA expression by HYT.

The RAW 264.7 cells were treated with LPS for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4, 1.0 mg/ml) of HYT, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced IKK & iNOS mRNA expression were dose-dependently decreased in HYT treated RAW 264.7 cells.

Abbreviation : LPS, lipopolysaccharide; HYT, *Hyunggaeyungyotang*; IKK, I κ B kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

2) iNOS mRNA 발현 억제

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 형개연교탕 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.25 mg/ml에서 9.7%, 0.5 mg/ml서 24%, 1.0 mg/ml에서 51.9%, 2.0 mg/ml에서 67.4%가 감소하였다 (Fig. 2).

IV. 고 찰

형개연교탕은 明代 龔延賢의 《萬病回春》²⁾에 처음 수록되어 風熱이 上發하여 頭上諸症을 야기시킨 것을 다스리는 대표적인 方劑로 腎經風熱로 인한 兩耳腫痛의 치료에 사용되었으며, 清熱, 和血, 解毒작용이 있기 때문에, 耳病뿐만 아니라 中耳炎, 扁桃腺炎 등 각종 이비인후과 질환에도 응용한다. 처방 중의 荊芥, 連翹, 防風은 散風熱하여 消腫하고, 當歸, 川芎은 和血行血하여 諸經의 血凝氣聚를 散하며, 白芍藥, 白芷는 除風止痛하고, 柴胡, 黃芩, 梔子是 小陽火를 瀉하며, 桔梗, 枳殼은 胸膈을 利하게 하고 快氣宣通하며, 甘草는 諸藥을 和하고 急迫을 緩和하는 역할을 한다^{3,7)}. 이상에서 살펴본 바와 같이 형개연교탕은 散風, 解熱, 消腫, 行血, 止痛, 散火, 利氣하는 약효를 지니고 있어서 上焦, 頭面部 및 넓게는 호흡기 계통의 염증을 치료하는 작용이 있고, 알레르기 비염 치료의 빈용 처방으로 보고 되어 임상적 연구⁸⁾가 이루어진바 있다.

기존의 형개연교탕과 관련된 실험적 연구를 살펴 보면 1986년도에 최초로 膿耳와 관련하여서 해열 진통 및 소염작용에 대한 연구가 있었고⁹⁾, 그 후 1990년에는 이 처방의 항알레르기작용과 관련해 histamine과 serotonin에 대한 혈관 투과성 및 지연형 homologous PCA 등에 미치는 영향에 관한 연구가 있었으며⁴⁾, 1997년에는 이 처방과 이에

麗澤通氣湯 등을 가미한 처방이 진통, 국한성 부종, 지연형 반응 및 Histamine의 혈관투과성에 미치는 영향에 대한 실험이 있었으며¹⁰⁾, 2003년에는 호흡기 계통 감염증의 주요 원인균으로 알려진 *Klebsiella pneumoniae*에 대한 항균 작용에 대한 실험이 있었고¹¹⁾, 2007년에는 RAW cell을 사용하여 알레르기 반응에 관련이 있는 NO production, iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α 등에 미치는 영향¹²⁾과 본방 투여에 따른 유전독성 평가 실험이 있었고⁵⁾, 2008년에는 추출물의 28일 경구반복투여에 따른 독성시험¹³⁾과 rat의 수태능 및 초기 배발생에 미치는 영향을 연구¹⁴⁾한 실험이 있었다.

한편 산화스트레스는 활성산소종/활성질소종의 발생과 항산화 방어기제간에 심각한 불균형을 초래되는 상황을 말한다. 산화질소 소모가 동반된 산화반응은 이차적인 산화, 질소화 및 nitrosation/nitrosylation 물질을 생성하고 이러한 이차적인 nitrated species는 독특한 염증성 세포 신호 전달성을 나타낸다¹⁵⁻⁷⁾. 염증성 산화물에 의한 산화, 질소화스트레스는 내피세포 기능성 장애¹⁸⁾, 고혈압¹⁹⁾, 동맥경화²⁰⁾, 허혈/재관류 손상²¹⁾ 및 염증반응¹⁵⁾의 병리기전을 주도하는데, 다양한 자극은 큰포식세포 내 inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 발현시켜 L-arginine과 산소분자로부터 많은 양의 NO 생성을 촉진시킨다²²⁾. 최근에는 iNOS의 전사인자 NF- κ B/Rel 활성 억제를 통한 NO 생성 저해로 기인된 항염증효과에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 특히 *Cirsium rhinoceros*(大薊)²³⁾, *Curcuma longa*(鬱金)²⁴⁾, *Rosmarinus officinalis*²⁵⁾ 등과 같이 약재에서 NO 조절제를 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.

NO는 중성구와 큰포식세포를 포함하는 염증성 세포에서 미량 생산된다. 큰포식세포는 inducible NOS(NOS2)를 포함하고 있고, 중성구는 기본적으로 constitutive NOS(NOS1)를 발현하며, 염증성 반응이 있을 때 NOS2를 발현한다. 큰포식세포에

서 유래된 NO는 L-arginine 의존적인 병원균 제거능력을 나타내고 면역조절 역할을 한다²⁶⁾. NO에 매개된 세포유해작용에 분자생물학적 기전은 주로 Fe-S-NO 유도체를 불활성화 시키기 위한 enzyme 4Fe-4S center의 산화, ribonucleotide reductase의 불활성화에 의한 DNA 합성 저하 또는 단백질 합성의 일반적인 저하로 설명된다^{24,27)}. 다양한 급성 또는 만성 염증반응시 NO의 생성은 증가되어 조직 손상에 기여하며, 조직내 NOS 발현과 NO²/NO³가 다양한 염증성 질환 시 증가되어 있다^{28,29)}.

본 연구는 형개연교탕 추출물의 iNOS mRNA 발현 역제를 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophages에 LPS를 처리하였는데, 그람음성세균의 세포벽 성분인 LPS는 강력한 면역시스템 활성화 물질로서 국소염증, 항체생성 및 심한 감염의 경우에는 패혈성쇼크를 유발한다고 보고되었다³⁰⁾. 이러한 LPS분자는 CD14와 결합하고, PKC와 PKA와 같은 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다^{30,2)}. CD14는 단핵구와 호중구에서 잘 발현되는 55-kDa의 glycosylphosphatidylinositol-anchored protein으로 LPS 수용체라고 알려져 있으며, LPS와 강하게 결합한다³³⁾. LPS 처리 후 RAW 264.7 macrophages에서의 iNOS 발현은 증가하지만, 형개연교탕 추출물 처리시 iNOS 발현은 감소되었다. 이는 형개연교탕 추출물이 NF- κ B 활성을 억제한 결과로서, 형개연교탕 추출물은 I κ B kinase(IKK) 활성을 감소시키며 이는 NF- κ B/Rel의 억제자인 I κ B의 인산화 유도 감소로 이어져 NF- κ B/Rel는 불활성상태 남게 되어 생쥐 iNOS 유전자의 TATA box 앞쪽 55bp와 917bp 위치의 NF- κ B /Rel 결합부위³⁴⁾에 결합하여 전사 유도해야 할 NF- κ B/Rel 감소에 의해 iNOS 발현 감소가 유도된 것으로 사료되며, IKK mRNA 발현도 형개연교탕 추출물에 대해 농도 의존적으로 감소하였다.

우수한 항산화능이 있는 형개연교탕의 투여는 점막손상을 완화시켰는데, 산호성백혈구 수 감소, Substance P 생성 감소 그리고 MIP-2 생성 감소 등이 관찰되었다. 또한 산화스트레스에 의한 NF- κ B p65, p-IKB 그리고 iNOS 증가도 감소되었다. 이상의 결과로 형개연교탕은 과도한 산화스트레스 조절을 통해 전사인자 NF- κ B 활성 억제를 통한 항염증작용으로 점막의 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 각종 염증성, 알레르기성의 호흡기 질환에서 항균, 항염증 작용을 목적으로 형개연교탕을 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

형개연교탕의 iNOS 생성 억제를 통한 항염증효과를 살펴본 본 연구는 RAW 264.7 세포에서 IKK mRNA와 iNOS mRNA 발현 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 형개연교탕 추출물의 항산화 효율은 농도 의존적으로 증가하였다.
2. 형개연교탕은 RAW 264.7 세포에서 농도의존적으로 IKK mRNA와 iNOS mRNA의 발현을 억제하였다.

이상의 결과로 iNOS mRNA 발현 억제능이 있는 형개연교탕은 NF- κ B 활성 조절을 통한 iNOS 생성억제로 항염증작용을 일으켜 점막 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Stanley L, Robbins, M.D. : Text Book of Path, 2nd ed., W.B. Saunders Company,

- 1963:61-5.
2. 龔廷賢. 增補萬病回春 下卷. 서울:일증사. 1994:12.
3. 신재용. 方藥合編解說. 서울:신광문화사. 1989:169.
4. 유대섭, 진영상, 정규만. 荊芥連翹湯의 항알레르기작용에 대한 실험적 효과. 대한한방소아과학회지. 1990;4(1):19-30.
5. 지선영, 황순이, 이종록, 김상찬. 荊芥連翹湯 추출물의 유전독성 평가. 한본초학회지. 2007;22(4):287-300.
6. 송영림, 김희택, 노석선. 荊芥連翹湯加味가 알레르기성 비염에 미치는 效能에 대한 臨床報告. 한방안이비인후피부과학회지. 1995;8(1):163-76.
7. 강병수 외 11명. 본초학. 서울:영림사. 1995:127-9, 131, 149, 167, 178, 199, 351, 409, 460, 540, 578, 581.
8. 이해자, 박은정. 알레르기성 비염의 임상적 연구. 대한한방소아과학회지. 2001;15(2):167-75.
9. 김동일, 채병윤. 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 해열 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1986;9:411-22.
10. 박은정, 신소영. 荊芥連翹湯과 加味荊芥連翹湯이 소염, 진통 및 항알레르기에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지. 1997;11(1):249-73.
11. 오은영, 지선영, 서부일. 荊芥連翹湯 및 구성약물의 Klebsiella pneumoniae에 대한 항균효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2003;18(2):109-19.
12. 김민지, 이종록, 김상찬, 지선영. 형개연교탕이 lipopolysaccharide로 유도된 nitric oxide의 생성 및 iNOS와 COX-2의 발현, cytokine에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(2):491-7.
13. 안현주, 황순이, 이종록, 김상찬, 지선영. 荊芥

- 連翹湯 추출물의 SD Rats 에서 28일 경구반복투여 독성시험. 대한한의학방제학회지. 2008; 16(1):147-68.
14. 김은희, 황순이, 김상찬, 지선영. 荊芥連翹湯 추출물의 경구투여가 rat의 수태능 및 초기 배 발생에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2008;16(1):65-78.
 15. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10): 1346-55.
 16. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusc AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*. 2001;296 (5577):2391-4.
 17. Lim DG, Sweeney S, Bloodsworth A, White CR, Chumley PH, Krishna NR, Schopfer F, O'Donnell VB, Eiserich JP, Freeman BA. Nitrooleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(25): 15941-6.
 18. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD (P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000;86(9):85-90.
 19. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323(1):22-7.
 20. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3): 562-71.
 21. Muller MJ, Vollmar B, Friedl HP, Menger MD. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21(2):189-97.
 22. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987;235(4787):473-6.
 23. Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Lai, Ying-Jan Wang, Chi-Tang Ho. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TRA-induced tumor promotion in mice. *Biochem, Pharmacol*. 2006;72:1293-303.
 24. Min-Hsiung Pan, Shoei-Yn Lin-shiau, Jen-Kun Lin. Comparative Studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and Its Hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF- κ B activation in macrophages. *Biochem, Pharmacol*. 2000;60:1665-76.
 25. Ai-Hsiang LO, Yu-Chih Liang, Shoei-Yn Lin-Shiau, Chi-Tang Ho, Jen-Kun Lin. Carnosol, an antioxidant in rosemary,

- suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating NF- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 2002;23(6): 983-91.
26. Tan CM, Xenoyannis S, Feldman RD. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res*, 1995;77(4):710-7.
 27. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*, 1993;54(2):171-8.
 28. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985;82(22): 7738-42.
 29. Belvisi M, Barnes PJ, Larkin S, Yacoub M, Tadjkarimi S, Williams TJ, Mitchell JA. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *Eur J Pharmacol*, 1995;283(1-3):255-8.
 30. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*, 1992;267(2):54-61.
 31. Novotney M, Chang ZL, Uchiyama H, Suzuki T. Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry*, 1991;30(22):5597-604.
 32. Muroi M, Suzuki T. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal*, 1993;5(3): 289-98.
 33. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata , Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*, 1988;239(4839): 497-500.
 34. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90(20):9730-4.