

비단벌레(*Crysochroa fulgidissima*) 에탄올추출물의 NO 증강 및 염증인자억제활성

안미영* · 김순자 · 정혜경 · 서윤정 · 박해철 · 이영보 · 김미애

농진청 국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

NO and Cytokine Production due to *Crysochroa fulgidissima*

Mi Young Ahn*, Soon-Ja Kim, Hyekyoung Jeong, Yun Jung Seo, Hae Cheol Park, Young Bo Lee and Mi Aae Kim

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT: *Crysochroa fulgidissima* (Bidan-beole, Spanish fly) is traditionally used as a crude drug and insecticide in the East Asia and Korea, respectively. This study investigated the effect of ethanol extract of *C. fulgidissima* on the NO production activity. The *C. fulgidissima* extract was a potent inducer of NO production in CPAE cells and a stimulator of endothelial nitric oxide synthase in a dose-dependent manner. This study also evaluated the anti-inflammatory activity of this extract by determining the level of ICAM-1, VCAM-1, and prostaglandin E₂ from HUVEC cells. Although *C. fulgidissima* extract was a potent inducer of NO production in the CPAE cells, it showed weak inhibitory effects on vascular endothelial growth factor (VEGF) production in HUVEC cells. HPLC and GC-MS analysis of the ethanol extract of *C. fulgidissima* revealed the presence of cantharidin.

Key words: *Crysochroa fulgidissima* larvae extract, NO production, cantharidin

초 록: 비단벌레(*C. fulgidissima*)는 동아시아에서 중풍을 치료하는 약으로 한국에서는 살충, 지양제로서 사용한 기록이 있다. 본 연구는 비단벌레의 에탄올 추출물의 내피세포에서의 산화질소(NO) 증강효과와 내피성 산화질소 합성효소(eNOS)의 양적 증가를 조사하였다. 그 결과 비단벌레 에탄올 추출물은 양성대조약물 sodium nitroprusside에 비해 65.9%의 NO 증강 효과를 가지는 것을 확인하였다. 또한 eNOS에 대해서도 농도 의존적으로 증가시킴을 확인하였다. 염증성부착인자인 ICAM-1과 VCAM-1 수치와 염증매개인자 프로스타글란딘 E₂를 조사하여 비단벌레 에탄올 추출물의 염증억제 기전을 조사한 결과, HUVEC 세포에서 농도 의존적으로 염증매개인자와 염증성부착인자의 감소를 확인하였다. 아울러 혈관성 내피성장인자(VEGF)의 낮은 수치를 HUVEC 세포에서 관찰할 수 있었다. 에탄올 추출물을 HPLC로 부분정제 후 GC-MS와 MALDI-TOF 분석을 통하여 일부 칸다리딘 성분 함유함을 확인하였다

검색어: 비단벌레, 산화질소생성, 염증인자억제

비단벌레는 딱정벌레목(Coleoptera) 비단벌레과(Buprestidae) 비단벌레(*Crysochroa fulgidissima*, 吉丁蟲, 옥충)의 건조전체(乾燥全體)이다(Cui *et al.*, 2002). 곤충 중에 금속성인 동색(銅色) 줄무늬를 띠고 있으며 영롱한 초록색 날개를 가지고 그 화려함이 보석보다도 더한 광택을 가져 신라시대에 말안장의 장식으로 사용되었다고 전해 내려온다. 현재 우리나라에서는 개체 수가 감소하여 희귀종인 비단벌레는 멸종위기종(2급)으로 선정

되어 있으며 국가지정문화재의 일종인 천연기념물로 지정되어 있다. 일본에서는 참나무 등을 이용하여 비단벌레 대량사육에 성공하였다.

문헌에 의하면 채집한 비단벌레 에탄올추출물은 거풍(祛風), 살충(殺蟲), 지양(止痒)의 효능이 있으며, 개선(疥癬), 피부소양(皮膚癢癢), 풍진반괴(風疹半塊) 등의 치료에 응용한다(Cui *et al.*, 2002). 중세 유럽에서는 blister beetles로부터 최음성 발포성을 가지는 화학물질로서 칸다리딘을 성적자극제로서 천년간 사용했었다는 기록이 있다(Sandroni *et al.*, 2001). 작용기전으로는 포스포에스터라제 및 단백포스포타제 저해활성을 갖는 것으

*Corresponding author: amy@korea.kr

Received July 24 2011; Revised September 8 2011

Accepted September 21 2011

로 알려져 있는데, 남용이 심각하였고 중앙아시아에서는 딱정벌레(*Palembus dermestoides*), 멕시코에서 triatomids가 칸다리딘과 비슷한 기본골격구조를 가진다고 보고되어졌다(Sandroni *et al.*, 2001).

그러나 사육비단벌레의 민간 강정약작용의 비단벌레의 과학적 활성검증을 위하여 NO생성증강에 관여한다는 기존의 정확한 보고가 없어 혈관내피세포에서 산화질소생성량과 산화질소합성효소유형을 확인하게 되었다. 일반적으로 산화질소는 염증 종류 중 일부에서는 높은 수준으로 합성되어져서 염증유발인자로 작용할 수 있다. 반대로, 적은 양의 NO는 세포의 저해효과를 통한 면역조절에 관여하는 항염증제로서 작용하기도 한다(Moilanen and Vapaatalo, 2001). 중국에서는 같은 딱정벌레목에 속하는 반묘(*Mylabris phalerata* Pall.)의 칸다리딘과 그 유도체인 노르칸다리딘이 항암제로 개발되어 임상에서 사용되고 있으며 특히 전이억제인자로 보고(Chen *et al.*, 2009)된 바 비단벌레 추출물에서도 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 저해하여 혈관신생에 기여하는 지를 세포수준에서 일차적으로 조사하게 되었다(Ahn *et al.*, 2006). 실험에 사용된 비단벌레추출물 중에 문헌에 발표된 기존 딱정벌레목의 항암성분의 하나인 칸다리딘 성분 및 유도체가 존재하는지 여부도 확인하게 되었다. 또한, 혈관내피세포의 성장의 저해와 더불어 혈관내피세포의 면역글로블린, 림프구 부착을 매개하는 단백질자인 ICAM-1(Intercellular adhesion molecule, Rothelin *et al.*, 1988)의 침착과 각종혈액세포의 내피성 침윤부착인자인 VCAM-1(Vascular cell adhesion molecule-1, Cybulsky *et al.*, 1991)을 동시에 저해하여 염증을 완화하고 염증매개인자인 프로스타글란딘 E₂를 억제하여 암의 초기화를 예방하는 지 조사하였다. 즉, 비단벌레의 신규소재개발의 기초자료 축적을 위하여 본 연구자들은 일본에서 복원에 성공한 비단벌레 알콜추출물이 혈관 내피세포수준에서 산화질소를 생성시키고 세포저해를 유발하여 염증매개인자(PGE₂)를 감소시키고 항염증작용을 촉진하고 cytokine 중의 하나인 VEGF 활성을 억제하여 항암효과를 가진다는 가설을 확인하고자 본 연구에 착수하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 추출

2005년 일본에서 인공사육 후 죽은 비단벌레(*Chrysochroa fulgidissima*) 건조전체 1.28 g을 울산 MBC PD로부터 활성 확인 시험용으로 제공받아, -70°C에서 동결 건조한 후 미세하게 시료를 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 70% 에탄올 55 ml에 담가 초음파로 각각 60분간 3회 추출하여 성분을 용출시켰다. 즉, 70%

에탄올로 60±5°C에서 5시간 동안 환류냉각 추출하여 여과시킨 추출물을 진공 농축한 다음 동결 건조한 것을 냉장 보관하면서 시료(수율 21.9%)로 사용하였다.

에탄올추출물 부분정제 및 칸다리딘 성분 함유 조사

에탄올 추출물을 HPLC (Spectra system UV3000, Thermo Spectra Products)을 이용하여 분석하였으며, 사용한 컬럼은 Luna C₁₈ column (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex, USA)이었고 30% methanol을 A용매로 70% methanol을 용매 B로 30분간 A에서 B로 gradient를 주었다. 2.5 mg 에탄올추출물을 A용매에 녹여 1 ml를 HPLC에 주입하고, 분획 I, II, III 얻었다. 각 분획층을 농축건조하고 MALDI-TOF (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, Germany)를 활용하여 분자량을 측정하였다.

혈관내피세포에 대한 XTT 세포독성 조사

비단벌레 에탄올 추출물의 세포독성은 소의 폐혈관내피세포주, CPAE (ATCC CCL-209, Manassas, VA, USA)에 대해 XTT {sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4,-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-~nitro) benzene sulfonic acid hydrate} kit solution (Boehringer Mannheim)을 사용하여 3회 반복 처리하여 측정하였다(Geldof *et al.*, 1999). 세포독성치는 IC₅₀ (50% inhibitory concentration; mg/ml)으로 대조군에 대하여 50% 저해하는 추출분획의 농도로 표시하였다.

혈관내피세포에 대한 NO 산생능 조사

NO 산생은 Griess 시약(Cayman, MI, USA)을 사용하여 세포 배지내로 아질산이온의 축적량을 측정하였다. 즉, 비단벌레 에탄올추출물을 소의 폐혈관내피세포(CPAE)에 0.2 mg을 기준으로 10배씩 희석해가면서 CPAE 세포에 처리하여 24시간 배양하고 VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 아질산나트륨량을 흡광도를 측정하여 계산하였다(Nims *et al.*, 1995). 대조약물로는 생체 내에서 NO를 산생하여 혈관이완에 관여하는 sodium nitroprusside dihydrate (SNP)를 사용하였다.

혈관내피세포에 대한 내피성산화질소합성효소 (eNOS) 활성 조사

내피성 산화질소합성효소의 활성조사는 비단벌레 에탄올 추

출물을 1 mg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml을 처리하여 24시간 배양한 내피세포인 HUVEC (ATCC CCL-2519, Manassas, VA, USA)를 R&D systems (Minneapolis, USA)의 매뉴얼에 따라 lysis buffer로 세포막을 터트려 나오는 세포액 중의 내피성 산화질소 합성효소를 항원항체반응인 enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) kit로 결정하였다.

혈관내피세포로부터 Cytokine의 분비 측정

HUVEC 및 CPAE 세포(1.0×10^7 cells/ml) 비단벌레 에탄올 추출물 각각의 농도와 함께 96-well plate에서 37 °C, 5% CO₂ 및 가습 조건으로 24시간 배양하였다. 이들 상등액 중에서 분비된 cytokine류 중 염증 부착인자억제능을 측정하기 위해 TNF-α를 30 ng/ml씩 96 well에 가해 미리 분주해 놓았던 혈관내피세포 (HUVEC)에 손상을 준 후, 준비된 각 well에 비단벌레 에탄올 추출물 각 1, 10, 100, 1000 µg/ml씩 첨가하여 48시간 배양 후 염증 매개인자인 Prostaglandin E₂는 프로스타글란딘 측정 키트 (Cayman, MI, USA) 매뉴얼에 따라 실험하였고 혈관내피염증 억제능에 관계하는 내피부착단백인자인 ICAM-1과 혈관세포 부착인자 VCAM-1 (ICAM-1, VCAM-1. Millipore, USA)도 같은 세포처리 방법으로 조사하였다. 또한 혈관내피성장인자로서 암 전이인자의 하나인 VEGF를 ELISA assay kit (R&D systems, Minneapolis, USA)으로 측정하였다(Ahn *et al.*, 2006).

MALDI-TOF mass spectrometry

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-TOF) 질량분석기로는 Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Germany)를 사용하였으며 여기에 고자장 Tandem Mass spectrometer (Micromass Autospec OA-TOF, Manchester, UK) electron 70eV DIP (Direct Inlet Probe) mode를 부착한 기기로 분자량을 측정하였다. 모든 질량분석 자료는 webbook program (NIST, Gaithersburg, MD) mass database (version 98)로 통하여 비교하였다(Ahn *et al.*, 2008).

GC-MS 구조분석

GC-MS 분석은 Agilent 5973N mass selective detector를 가진 Agilent 6890 GC에 HP 5 MS capillary column (5% PH ME siloxane, 30m X 0.25 mm, 0.25 µm, USA)으로 수행하였으며 분석정성정량과정은 HP 3365 Chem Station software (HP, Palo Alto, CA, USA)로 행하였다. 오븐은 60 °C에서 3 min 후 100 °C



Fig. 1. *Chrysochroa fulgidissima*.

/min 비율로 5분 간격을 유지하면서 300분까지 증가시켰다. 2 µl 시료를 주입하고 split ratio는 10 : 1으로 하였고, mass spectrometry (Nikbakhtzadeh *et al.*, 2007)는 ion source 온도는 230 °C, quadrupole 온도는 150 °C, filament 방출전류(emission current) 34.6 µA, 이온화 볼트(ionization volt) 70eV로, 캐리어 가스로 수소흐름은 1.0 ml/min로 하여 가스-질량분석을 실시하였다.

결과

혈관내피세포에 대한 XTT 세포독성 조사

비단벌레 에탄올추출물의 소 폐혈관내피세포(CPAE)에 대한 세포독성은 50% 저해농도 (IC₅₀)가 3.2 mg/ml (Fig. 2A)로 산출되어서 일반적인 곤충생약 알칼추출물의 세포독성이 µg/ml 수준인 것에 비해 세포독성이 비교적 크지는 않았다(Ahn *et al.*, 2000).

혈관내피세포에 대한 NO 산생능 조사

소의 폐혈관내피세포(CPAE)에 비단벌레에탄올 추출물을 처리하고 24시간 배양하여 NO 산생을 조사한 결과, 혈관내피세포(CPAE)에 대한 산화질소(NO)의 산생은 비단벌레에탄올 추출물 1 mg/ml 투여시 현저한 증가를 보였다(Fig. 2B). 비단벌레 에탄올추출물은 1 mg당 8.45 µM NO 산생하였고 양성대조약물인 SNP의 100 µM에서 12.83 µM NO 산생을 보여주었다.

혈관내피세포에 대한 내피성산화질소합성효소 (eNOS) 활성 조사

비단벌레 에탄올 추출물을 HUVEC 세포에 처리하여 24시간

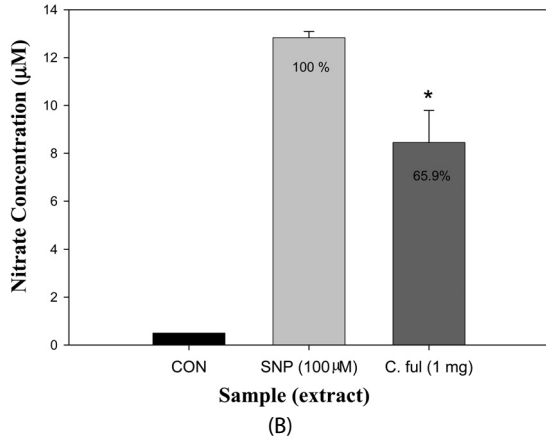
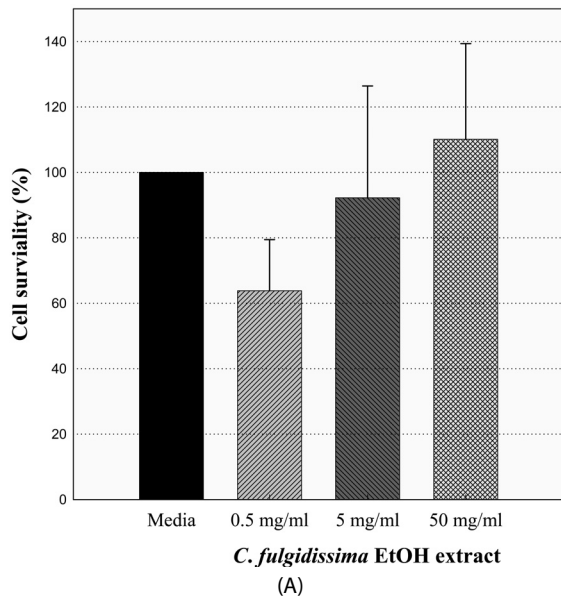


Fig. 2. (A) Measurement of cytotoxicity of *C. fulgidissima* ethanol extract, 1, Control (media); 2, 3, 4, *C. fulgidissima* ethanol extract, 10 mg, 1 mg, 0.1 mg, respectively, in CPAE cells, (B)

배양한 결과 내피성 산화질소합성효소가 농도의존적으로 증가됨을 알 수 있었다. eNOS 효소량을 살펴보면 비단벌레 에탄올 추출물 1,000 µg/ml에서 796.50 pg/ml, 100 및 10 µg/ml로 감량 처리하면 농도의존적으로 591.87 및 444.63 pg/ml로 줄어들었다(Fig. 3).

혈관내피세포로부터 Cytokine의 분비 측정

HUVEC 및 CPAE 세포에 비단벌레 에탄올 추출물 첨가하여 혈관내피염증억제능(ICAM-1, VCAM-1, Millipore, USA)을 확인한 결과, 농도 의존적으로 유의성 있는 염증부착인자인 ICAM-1의 양을 농도의존적으로 감소시켰다. 즉, TNF-알파 30 ng/ml 처리로 혈관내피세포에 염증이 유발된 ICAM-1이 76.74

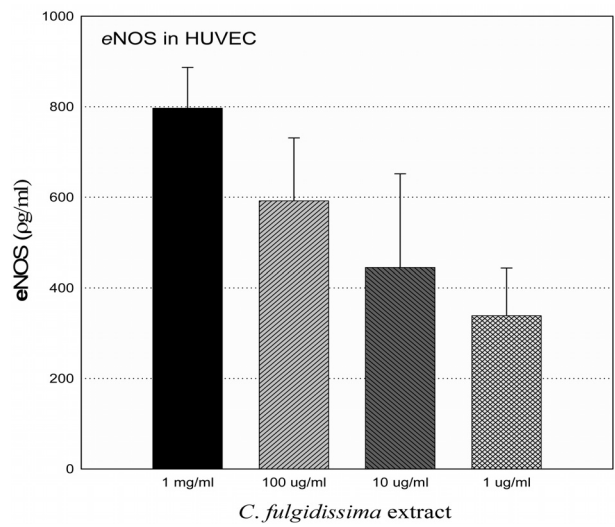


Fig. 3. Effects of *C. fulgidissima* ethanol extract on endothelial nitric oxide synthase modulation in HUVEC cells.

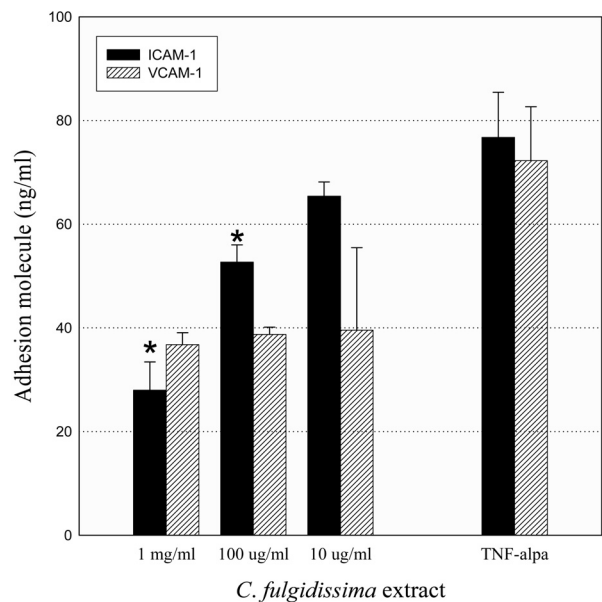


Fig. 4. Effects of *C. fulgidissima* ethanol extract on ICAM-1 and VCAM-1 cytokine production modulation in HUVEC cells. Statistically significant from control (TNF-α group) (*p<0.05)

ng/ml인데 반해, 비단벌레 에탄올 추출물 1 mg/ml 100 µg/ml, 10 µg/ml로 처리하면 28.00 ng/ml, 52.68 ng/ml, 65.42 ng/ml로 나타나 염증부착인자 억제효과를 나타내었다(Fig. 4). 또한, VCAM-1도 동량의 TNF-알파 처리 시 72.25 ng/ml을 나타내고, 비단벌레 에탄올 추출물을 1 mg/ml 100 µg/ml, 10 µg/ml 처리 시 VCAM-1은 36.76 ng/ml, 38.73 ng/ml, 39.55 ng/ml 나타나어 마찬가지로 염증부착인자 억제효과를 나타내었다(Fig. 4). 또한 암 전이인자의 하나인 VEGF에 대해서도 용량의존적 조절

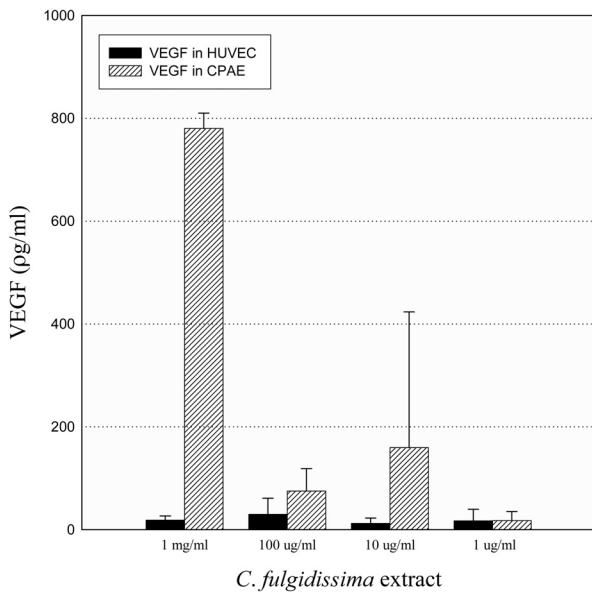


Fig. 5. Effects of *C. fulgidissima* ethanol extract on VEGF cytokine production modulation in HUVEC and CPAE cells, respectively.

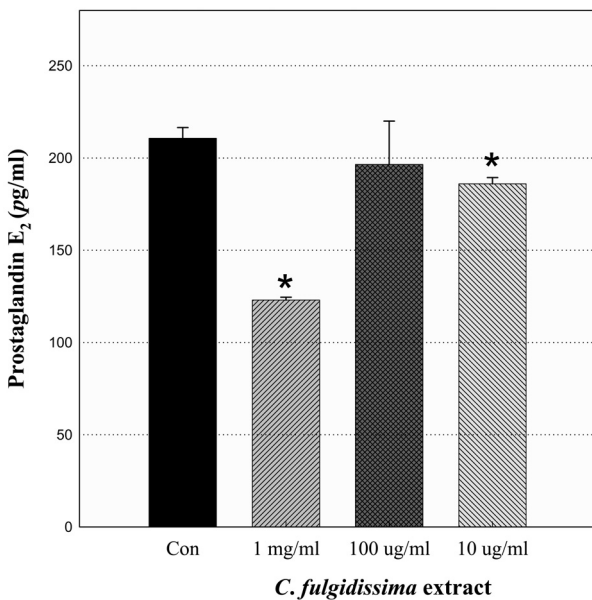


Fig. 6. Effects of *C. fulgidissima* ethanol extract on Prostaglandin E₂ inhibition in HUVEC cells. Statistically significant from control (TNF- α group) (* $p < 0.05$).

이 가능한 것을 CPAE 세포에서 확인할 수 있었으며, HUVEC 세포에서는 낮은 VEGF 양을 보여주었다(Fig. 5). 염증매개인자인 프로스타글란딘을 HUVEC 세포에 비단벌레 에탄올 추출물 1 mg/ml 100 μ g/ml, 10 μ g/ml로 처리하면 123.0 pg/ml, 196.5 pg/ml, 186.0 pg/ml로 나타나 용량 의존적으로 염증억제효과를 나타내었다(Fig. 6).

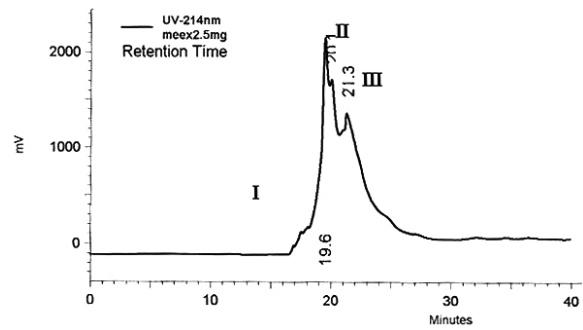


Fig. 7. Fractionation of *C. fulgidissima* ethanol extract. Chromatography using RPC-HPLC on Luna C¹⁸ column.

MALDI-TOF mass spectrometry

이 비단벌레 추출물을 HPLC로 부분정제(Fig. 7)하여 그 피크별 분자량 fragmentation 등을 조사한 결과 MALDI-TOF (Fig. 8), GC-MS (Fig. 9)에서 칸다리딘의 존재를 확인하였다. 또한 MALDI-TOF 분석 그림에서 질량 194에서 수소이온 1이 더한 실제 분자량 195가 물질의 질량으로서 cantharidin imide 형태로 존재함을 추정하였으며 철을 가지는 광택성의 cantharidin 분자량 342에 peak가 존재함을 추정이 가능할 수 있었다(Fig. 8).

GC-MS 구조분석

일반적인 비단벌레와 같은 딱정벌레목에 속하는 반묘(*Mylabris impressa*)에서 cantharidin의 특징적 fragment로 m/z 96과 m/z 128를, 디메칠칸다리딘으로 m/z 82, 114의 fragment를, cantharidinimide의 특징적인 fragment로 m/z 70, 96과 127을 보고한 바 있다(Nikbakhtzadeh *et al.*, 2007). 그림 9의 비단벌레 에탄올 추출물의 GC-MS fragment는 MALDI-TOF와 달리 전체 분자량을 나타내기 보다는 분해된 fragment를 나타내는 경향이 있어 본 실험에서는 비단벌레의 산화질소증강 분획에서 cantharidin의 특징적 fragment로 m/z 96과 m/z 128를, 그 cantharidinimide의 특징적인 fragment로 m/z 70, 96과 128를 확인하였다(Fig. 9).

고찰

실험의 결과로부터 냉동 비단벌레(*Crysochroa fulgidissima*)의 에탄올 추출물에서 내피세포에서 산화질소의 산생을 촉진시키며 내피성 산화질소 합성효소량도 증가시키는 것을 확인하였다. 산화질소를 산생시켜 혈관 확장시키는 SNP 양성대조약물

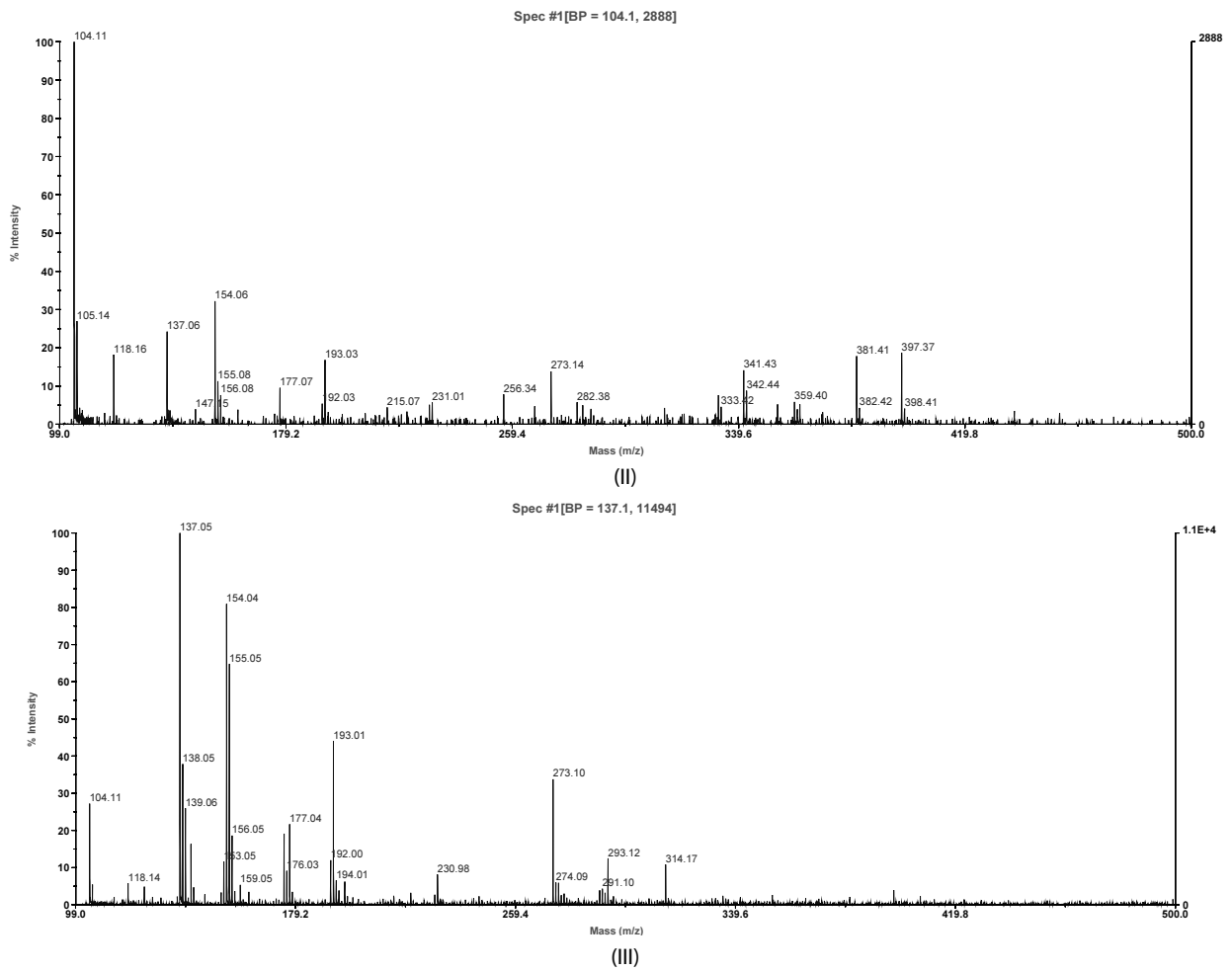


Fig. 8. Full mass spectrometric scan (MALDI-TOF, 100-500 amu) product, ion spectra of RPC Fr (II) and Fr (III).

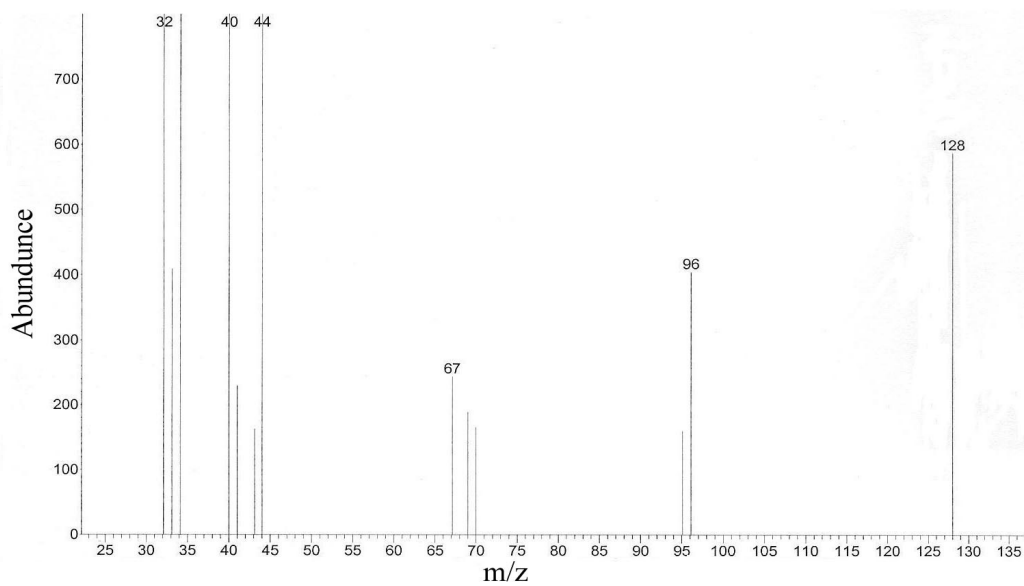


Fig. 9. GC-EI-MS spectra, the total ion current of RPC Fr (II), cantharidin fragment.

(단일성분 정제물)의 NO 생성을 100%로 보면 비단벌레 에탄올 추출물은 정제물이 아니지만 정제물에 대한 비교 백분율 65.9% 수치를 나타내어 내피세포 NO 생성증가효과를 보여주었다. 비단벌레 에탄올 추출물을 감량처리하면 eNOS 효소량이 농도의 존적으로 줄어들어 비단벌레 에탄올추출물이 내피성 산화질소 합성효소 조절제에 관여함을 유추할 수 있었다. 또한, 내피성 염증부착인자인 ICAM-1과 VCAM-1에 대한 용량 의존적 저해성을 나타내었다. 이 현상들은 혈관내피세포확장에 의한 비아그라와 같은 혈관이완작용에 관여할 수 있음을 시사하였다. 즉, 민간에서 최음제로 비단벌레를 사용했던 과거 기록의 과학적 근거의 일부가 될 가능성을 시사한다. 비단벌레 에탄올 추출물의 HPLC 성의 분획성분을 GC-MS와 MALI-TOF로 분석결과 칸다리딘 표준품을 가지고 GC-MS 측정시 이전 보고된 Nikbakhtzadeh(2007) 논문과 같이 m/z 96, 128로 확인하여 칸다리딘을 모핵으로 하는 구조를 포함하는 것으로 유추할 수 있었다. 이전의 발표논문과 같이 칸다리딘 골격의 분자구조, $C_{10}H_{12}NO_3$, FAB-MS (m/z 194.0813 [M-H]⁻(Nakatani et al., 2007) fragment가 methylation되어 cantharimide를 형성해 감을 추정할 수 있었다. 일반적으로 Cantharidin ($C_{10}H_{12}O_4$)은 phosphatase A₂ 저해제로서 딱정벌레목(Coleoptera) 가뢰과(Meloidae)에 속하는 blister beetles(딱정벌레)에서 생산되는 모노테르펜 무수물(monoterpene anhydride)로서 대부분의 동물에 대해 독성을 나타낸다(Dettner et al., 1997). 이러한 세포저해 작용이 반묘에서는 항암제로서의 개발되었기에 비단벌레의 알콜 추출물의 세포수준에서 활성을 조사한 결과, 혈관내피세포에서 산화질소합성효소(eNOS)를 증가시켜 NO 생성을 하고 이 산화질소가 세포저해를 일으켜 염증매개인자(PGE₂)를 감소시킴으로써 항염증작용을 촉진하고 cytokine 중의 하나인 VEGF 활성을 억제하며 혈관내피세포에 임파구 및 혈액세포등 어리들의 부착(ICAM, VCAM)을 차단함으로써 차후 항암제나 항염증제 개발가능성의 소인을 가졌다고 사려 되어진다. 아쉽게도 비단벌레가 아직 국내에서는 복원에 성공하지 못한 관계로 시료가 귀해 소량추출 및 정제로 NMR동정 대신 database를 이용하여 GC-MS와 MALDI-TOF MS로 칸다리딘 함유를 확인 동정하여 비단벌레추출물의 칸다리딘의 작용을 유추할 수 있었다. 차후 비단벌레 국내 복원(인공사육)후 시료대량추출 분리정제에 의한 칸다리딘 유도체를 포함한 여러 활성분획의 구조 동정과 생리활성이 기대되어진다.

Literature Cited

Ahn, M.Y., S.R. Ryu, Y.W. Lee and Y.S. Kim. 2000. Cytotoxicity

- and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. Arch. Pharm. Res. 23: 477-481.
- Ahn, M.Y., H. Lee, H.J. Shon, Y.T. Yang, K.D. Kim, H.C. park, J.S. Hwang and S.J. Hwang. 2006. *In vitro* effects of water and methanol extracts of *Melittia inouei* on cytokine production. Kor. J. Pharmacogn. 37: 110-115.
- Ahn, M.Y., S.H. Shim, H.K. Jeong, K.S. Ryu. 2008. Purification of a dimethyladenosine compound from silkworm pupae as a vasorelaxation substance. J. Ethnopharm. 117: 115-122.
- Chen, Y.J., W.M. Chang, Y.W. Liu, C.Y. Lee, Y.H. Jang, C.D. Kuo and H.F. Liao. 2009. A small-molecule metastasis inhibitor, norcantharidin, downregulates matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting Sp1 transcriptional activity in colorectal cancer cells. Chemico-Biological interactions 181: 440-446.
- Cui, Z., M.Y. Ahn, Y.B. Lee and K.S. Ryu. 2002. Materia medica from insects. 137-145 pp. Shinilbooks, Seoul.
- Cybulsky, M.I., J.W. Fries, A.J. Williams, P. Sultan, V.A. Davis, Jr. Gimbrone and T. Collin. 1991. Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. Am. J. Pathol. 138: 815-820.
- Dettner, K. 1997. Inter and intraspecific transfer of toxic insect compound cantharidin. In Vertical Food Web Interactions. eds. by K. Dettner, G. Bauer, and W. Völkl. 115-145 pp. Springer, Berlin.
- Geldof, A.A., S.C. Mastbergen, R.E. Henrar and G.T. Faircloth. 1999. Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using *in vitro* assays. Cancer Chemother. Pharmacol. 44: 312-318.
- Moilanen, E and H. Vapaatalo. 1995. Nitric oxide in inflammation and immune response. Ann. Med. 27: 359-367.
- Nakatani, T., K. Jinpo and N. Noda. 2007. Cantharimide dimers from the Chinese blister beetle, *Mylabris phalerate* Pallas, Chem. Pharm. Bull. 55(1): 92-94.
- Nikbakhtzadeh, M.R. and B. Ebrahimi. 2007. Detection of cantharidin-related compounds in *Mylabris impressa* (Coleoptera: Meloidae). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 13: 686-693.
- Nikbakhtzadeh, M.R., K. Dettner, W. Boland, G. Gäde, S. Doötterl. 2007. Intraspecific transfer of cantharidin within selected members of the family Meloidae (Insecta: Coleoptera). J. Insect physiol. 53: 890-899.
- Nims, R.W., J.F. Darbyshire, J.E. Saavedra. 1995. Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. Methods 7: 48-54.
- Rothelin, R., M. Czajkowski, M. M. O'Neill, S. D. Marlin, E. Mainolfi and V.J. Merluzzi. 1988. Induction of intercellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. J. Immunol. 141: 1665-1669.
- Sandroni, P. 2001. Aphrodisiacs past and present: a historical review, Clin Auton Res. 11: 303-307.