

連翹 에탄올 추출물의 대식세포의 염증성 사이토카인 합성과 신호전달에 대한 조절

남정범¹, 이미화², 최호영², 손낙원¹, 강희^{1*}

1 : 경희대학교 동서의학대학원 동서외과학과

2 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실

Effect of Forsythiae Fructus ethanol extract on inflammatory cytokine production and cellular signaling pathways in mouse macrophages

Jung-Bum Nam¹, Mi-Hwa Lee², Ho-Young Choi², Nak-Won Sohn¹, Hee Kang^{1*}

1 : Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, KyungHee University, Yongin

2 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, Seoul.

ABSTRACT

Objective : This study was performed to evaluate the effect of Forsythiae Fructus (FF) ethanol extract on inflammatory cytokine production and its underlying mechanisms in mouse macrophages.

Methods : Peritoneal macrophages from thioglycollate medium-injected mice were cultured and stimulated with lipopolysaccharide(LPS) or LPS/interferon(IFN)- γ for cytokine measurement and cellular signaling molecule analysis.

Results : FF ethanol extract decreased the levels of secreted tumor necrosis factor(TNF)- α and interleukin(IL)-6 in IFN- γ /LPS-stimulated cells in a concentration-dependent manner. FF extract reduced IFN- γ /LPS-induced STAT1 phosphorylation and LPS-induced p38 and JNK activation, but not ERK1/2 activity. The extract also inhibited LPS-induced I κ B α degradation through suppression of I κ B α kinase.

Conclusions : These results suggest that FF ethanol extract affects the production of TNF- α and IL-6 through inhibition of activation of STAT-1, I κ B α , p38, and JNK.

Key words : Forsythiae Fructus ; inflammation ; macrophages ; cytokine ; signaling

서론

連翹(Forsythiae Fructus)는 물푸레나무과(木犀科, Oleaceae)에 속하는 개나리(*Forsythia koreana* Nakai)와 의성개나리(*Forsythia viridissima* Lindley)의 열매로서 약성이 평(平)하고苦味를 가지고 있으며 淸熱解毒, 消腫散結하는 효능으로 알려져 있으며 여러 염증성 질환에 응용된다.¹⁾ 성숙한 열매나 성숙된 열미를 충분히 찌서 햇볕에 말리는데 아직 녹색을 띠고 있는 것을 靑翹라 하고, 황색으로 충분히 성숙된 것을 老翹 또는 黃連翹라 한다.

대식세포는 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 작동 세포

로써 세포 조직 파편이나 병원균 등을 식작용(phagocytosis)으로 분해하고, 특이면역계를 활성화시킬 수 있는 능력을 가지고 있다. 또한 자극을 받은 대식세포는 cytokines, eicosanoids, reactive oxygen species(ROS), nitric oxide(NO), proteolytic enzymes와 같은 염증 매개 물질을 만들어내며, 이러한 염증성 물질의 발현은 signal transducers and activators of transcription(STAT) protein, NF- κ B, mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 같은 단백질들이 조절한다.²⁻³⁾

連翹에 대한 항염연구로써 알려진 것으로는 連翹 에탄올 추출물이 BV-2 microglia cell line에서 lipopolysaccharide

*교신저자 : 강희, 경기도 용인시 서천동1, 경희대학교 국제캠퍼스 동서의학대학원 동서외과학과.
· Tel : 031-201-3854, · E-mail : shehee@khu.ac.kr
· 접수 : 2011년 12월 14일 · 수정 : 2012년 1월 6일 · 채택 : 2012년 1월 13일

(LPS)에 의해 유도되는 NO, inducible nitric oxide synthase(iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)- 1β , IL-6의 유전자 발현 및 diphenyl-icryl hydrazyl(DHHP) 자유기를 억제한다고 보고되었다.⁴⁾ 본 연구에서는 염증성 사이토카인 분비와 여기에 관여하는 전사인자의 변화를 규명하기 위해 마우스 복강 대식세포를 이용하여 LPS/interferon(IFN)- γ 로 유도된 TNF- α 와 IL-6의 분비 및 STAT1, NF- κ B의 조절 단백질인 I κ B α , MAPK의 변화에 連翹 에탄올 추출물이 미치는 영향을 살펴 본 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고한다.

재료와 방법

1. 약재 추출물 제조

본 실험에서 사용된 連翹는 靑翹이며 (주)동우당제약(경북 영천시)에서 중국산으로 구입하였다. 약재의 일부는 경희대학교 동서의학대학원 한의과학실험실에 보관되어 있다(Voucher Number : 2011-01FF). 약재 500 g을 48시간 80% 에탄올에 냉침한 후 sonicator(Elmasonic, Germany)를 이용하여 1시간씩 2회 물리적 자극을 가하였다. 상등액을 여과지로 여과하고 rotary evaporator로 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 51.2 g의 고형 추출물을 얻어 수율은 약 10.22 %였다. 실험에 사용된 連翹 추출물인 100 mg/ml stock은 30% dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 녹인 후 0.45 μ m sterile syringe filter(Corning, Germany)를 이용하여 여과한 후 사용하였다.

2. 실험동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 생후 8주령의 Balb/c 수컷 마우스(Samtako, Korea)이며 항온항습 상태에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육하였다.

3. 복강대식세포 배양

Balb/c 마우스의 복강에 2 ml의 thioglycollate medium (BD, USA)를 주사하고 3일 후에 마우스를 경추탈골한 후 복강에서 8 ml의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, Korea)을 주사하여 세포를 수집하였다. 원심분리 후 10% fetal bovine serum (FBS)(Welgene)와 1% penicillin-streptomycin (Welgene)가 함유된 DMEM에 suspension한 후 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에 배양하였다. Non-adherent cell은 제거한 후 실험에 사용하였다.

4. 세포독성 검사

連翹 에탄올 추출물에 대한 대식세포의 생존율을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoli-

um, inner salt (MTS)를 formazan으로 환원하는 세포내 효소활성을 통해 간접적으로 측정하였다. 세포를 4 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 96 well plate에 0.1 ml 접종하고 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후에 약재추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후 CellTiter96 One Solution reagent (Promega, USA) 20 μ l를 첨가하였으며 96 well microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm 흡광도를 측정하였다. 각 농도별 흡광도에서 약재추출물의 백그라운드 흡광도를 제거한 후 데이터로 표시하였다.

5. Cytokine 측정

사이토카인 농도를 측정하기 위해서 세포를 5 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 1 ml을 24 well plate에 접종하여 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후 1 ng/ml recombinant IFN- γ (R&D Systems, USA)으로 2시간 sensitization한 후 약물추출물과 100 ng/ml LPS(Sigma)을 처리하여 24 시간 배양하였다. 상등액을 취하여 제조사 (BD Pharmingen)의 protocol에 따라 ELISA 방법으로 사이토카인 농도를 측정하였다. 각각의 capture antibody를 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석하여 96 well immunoplate에 0.1 ml 씩 분주한 후 상온에서 overnight 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액 (0.5% Tween/PBS)으로 세척한 후 blocking buffer (10% FBS/PBS)를 well 당 200 μ l씩 넣고 1시간 동안 상온에 두어 반응하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 3회 세척한 후 시료 및 스탠더드를 적당량 희석하여 0.1 ml 씩 분주하였다. 2 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 3회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 blocking buffer에 희석하여 well 당 0.1 ml씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척 후에 Streptavidin-RP 용액으로 20분간 상온에서 반응시킨 후 세척하였다. TMB(BD) 용액을 well 당 0.1 ml 씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응하였다. 2 N H₂SO₄ 용액을 well 당 0.05 ml 씩 첨가함으로써 완료하였으며, 570 nm에서 96 well microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot

세포를 1.5 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 2 ml을 6 well plate에 접종하여 세포가 well plate에 부착된 것을 확인한 후 배지를 갈아주었다. phospho-STAT1을 측정하기 위해서는 먼저 1 ng/ml IFN- γ 으로 2시간 sensitization하였고 그 후에 약물추출물과 100 ng/ml LPS를 함께 3시간 처리하였다. I κ B α 나 phospho-mitogen-activated protein kinase MAPK)를 측정하기 위해서는 약물추출물을 한 시간 먼저 처리한 후에 LPS로 15분간 자극하였다. 세포를 cold PBS로 2회 세척하고 complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Germany)와 phosphatase inhibitor (Sigma)을 첨가한 lysis solution (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100)으로 파괴하였다. Bradford 방법에 준하여 단백질 농도를 정량한 후 sodium dodecyl

sulfate (SDS) loading buffer를 넣고 3분간 boiling하였다. 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 단백질을 분리한 후에 젤을 polyvinylidene fluoride membrane으로 transfer하였다. Transfer가 제대로 되었는지 확인하기 위해 ponseau S staining을 실시하였다. 5% skim milk를 0.1% Tween이 함유된 Tris-buffered saline (TBST)에 녹인 blocking buffer를 만든 후 여기에 membrane을 상온에서 한 시간 blocking하였다. 1 : 1000으로 희석한 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, I kappa B kinase(IKK), β -tubulin (모두 Santa Cruz, USA), STAT1, phospho-STAT1, phospho-IKK α/β , phospho-JNK/stress-activated protein kinase(SAPK), JNK/SAPK, phospho-p38, p38, phospho-ERK1/2, ERK1/2 (모두 Cell Signaling, USA) 로 4°C에 overnight 반응시켰다. Internal control로써 β -tubulin을 사용하였다. TBST로 세척 후 1 : 5000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit antibody로 상온에서 한 시간 반응하였다. TBST로 세척 후 chemiluminescent substrate (ECL, GE healthcare, UK)로 밴드를 확인하였다.

7. 통계분석

모든 결과는 SPSS 12.0 버전을 이용하여 분석하였으며, 평균의 차이는 non-paired Student's t-test로 분석하였다. P 값이 0.05 미만의 것만을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 連翹 에탄올 추출물의 세포 독성

마우스 복강에서 분리한 대식세포를 이용하여 80% 에탄올로 추출한 連翹를 농도별로 처리한 후 24시간 후에 MTS assay를 이용하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 실험 결과 連翹 에탄올 추출물은 최고 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 별다른 세포독성을 나타내지 않았다 (Figure 1).

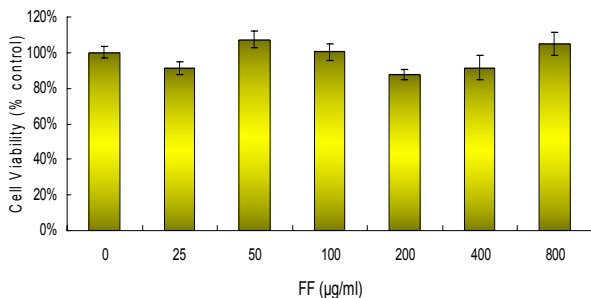


Figure 1. Effect of FF ethanol extract on cell viability. Mouse peritoneal macrophages were cultured with various concentrations of FF extract for 24 h. The number of live cells was determined using the MTS method. Data are mean \pm SD of four independent assays. 0 $\mu\text{g/ml}$: control cells

2. 連翹 에탄올 추출물이 대식세포의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향

IFN- γ 은 대식세포의 주요 활성화인자(macrophage activating factor)이며 LPS는 Gram (-) 균의 세포벽을 구성하며 이들 물질 모두 대식세포의 수용체를 통해 염증성 물질의 분비를 유도한다⁵⁾. 대식세포를 먼저 IFN- γ 로 sensitization을 한 후에 LPS로 자극하고 동시에 連翹 에탄올 추출물을 농도별로 처리하였다. ELISA 방법을 이용하여 상등액의 TNF- α 를 측정된 결과 25, 100, 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 11%, 18%, 35% 감소하였으며(Figure 2A), IL-6는 11%, 30%, 70% 감소하여 모두 농도의존적인 억제경향을 나타내었다(Figure 2B).

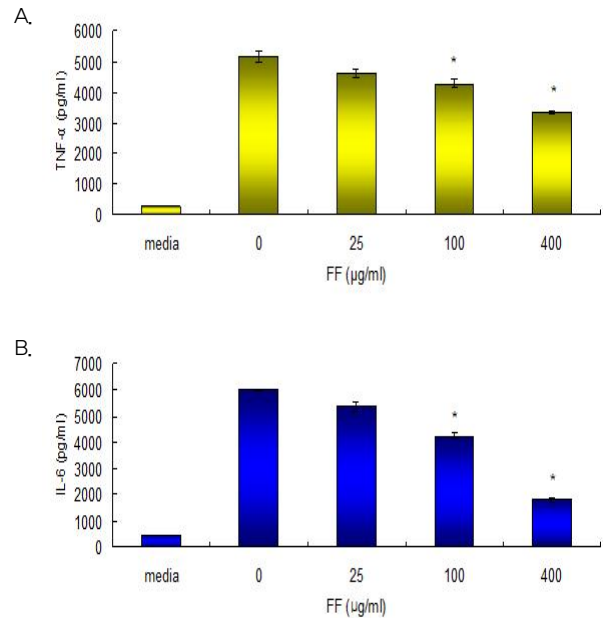


Figure 2. Effect of FF ethanol extract on cytokine production in LPS/IFN- γ stimulated macrophages. Cells were sensitized with 1 ng/ml IFN- γ for 2 h and then incubated with 100 ng/ml LPS and various concentrations of FF ethanol extract for 24 h. The levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) were determined by ELISA. Data represent the mean \pm SD of three independent assays. * p < 0.05 compared to control (0 $\mu\text{g/ml}$)

3. 連翹 에탄올 추출물이 STAT1 활성화에 미치는 영향

IFN- γ 의 대식세포 자극은 IFN- γ 수용체를 통하여 일어나며 세포질내의 STAT1이 인산화하면서 핵내로 이동하여 대식세포 활성화에 필요한 유전자의 발현을 촉진한다⁶⁾. 連翹 에탄올 추출물이 IFN- γ 에 의해 활성화된 STAT1에 영향을 미치는지 확인하기 위해 대식세포를 IFN- γ 로 sensitization한 후 連翹 에탄올 추출물과 LPS로 3시간 배양한 후에 western blotting으로 분석하였다. STAT1 활성화에 대한 連翹 에탄올 추출물의 효과를 확인한 결과 phospho-STAT1의 발현을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Figure 3).

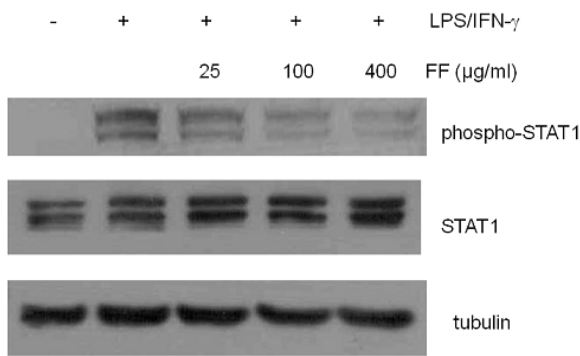


Figure 3. Effect of FF ethanol extract on STAT1 activation. Macrophages were sensitized with 1 ng/ml IFN- γ for 2 h and then incubated with 100 ng/ml LPS and various concentrations of FF ethanol extract for 3 h. The levels of phospho-STAT1 and STAT1 were determined by western blotting. Tubulin was loaded as internal controls. One of three independent assays was shown.

4. 連翹 에탄올 추출물이 I κ B α 분해 및 I κ B α kinase 활성화에 미치는 영향

I κ B α 는 염증성 물질의 발현을 조절하는 전사인자인 nuclear factor(NF)- κ B의 핵내이동을 억제하는 역할을 하지만 LPS를 처리하면 I κ B α kinase(IKK)에 의해 인산화가 되면서 ubiquitination이 되어 분해되므로 NF- κ B가 핵 내로 이동하게 된다⁷⁾. 대식세포를 LPS로 15분간 자극하였을 때 I κ B α 는 거의 분해되어 밴드에 거의 나타나지 않았으나 25 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 억제되기 시작하여 400 μ g/ml에서 강하게 억제하였다(Figure 4). IKK의 활성화는 100 μ g/ml, 400 μ g/ml에서 농도의존적으로 억제하였다(Figure 4). 따라서 連翹 에탄올 추출물은 IKK 인산화 조절을 통해 부분적으로 I κ B α 분해를 억제함을 본 실험으로 확인할 수 있었다.

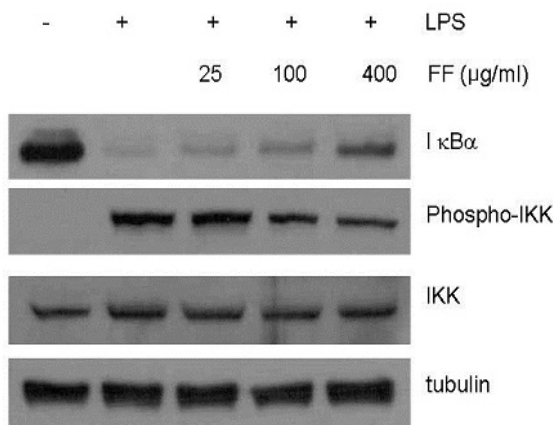


Figure 4. Effect of FF ethanol extract on I κ B α and IKK signaling. Macrophages were incubated with various concentrations of FF ethanol extract for 1 h and then stimulated with LPS for 15 min. The levels of I κ B α , phospho-IKK, and IKK were determined by western blotting. Tubulin was loaded as internal controls. One of three independent assays was shown.

5. 連翹 에탄올 추출물이 p38, JNK, ERK1/2 활성화에 미치는 영향

MAPK를 구성하는 중요한 단백질은 p38, Jun N-terminal protein kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2이며 이들은 세포의 자극을 받아 활성화된다. 連翹 에탄올 추출물이 이러한 MAPK의 활성화에 주는 영향을 확인하기 위해 대식세포에 連翹 에탄올 추출물을 전처리한 후 15분간 LPS로 자극하였다. 실험 결과 連翹 에탄올 추출물은 p38의 인산화를 25 μ g/ml부터 농도의존적으로 억제하였으며, JNK의 경우 100 μ g/ml, 400 μ g/ml에서 비슷하게 억제하였으나 ERK1/2의 인산화에는 변화를 주지 않았다(Figure 5).

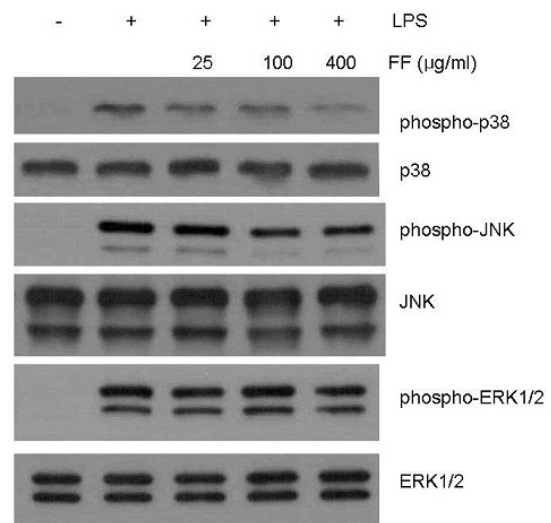


Figure 5. Effect of FF ethanol extract on p38, JNK, and ERK1/2 activation. Macrophages were incubated with various concentrations of FF ethanol extract for 1 h and then stimulated with LPS for 15 min. The levels of phospho-p38, p38, phospho-JNK, JNK, phospho-ERK1/2 and ERK were determined by western blotting. One of three independent assays was shown.

고찰

대식세포는 Toll-like receptors와 같은 pattern-recognition receptors을 통해 외인성 미생물의 pathogen-associated molecular pattern과 괴사성 세포 파편에 있는 내인성 위험 신호를 모두 인식한다⁸⁻⁹⁾. 이 기능을 통해 대식세포는 감염이나 조직손상으로 인한 다양한 자극에 대해 첫 번째 sensor의 역할을 수행한다¹⁰⁾. 대식세포는 사이토카인을 분비함으로써 염증성 반응을 유도하며 이중 TNF- α 와 IL-6는 면역 반응, 급성기 반응, 조절 작용을 조절하는 pleiotropic effect를 보인다¹¹⁾. TNF- α 은 다른 백혈구가 염증성 사이토카인을 분비하도록 자극할 뿐만 아니라 혈관내피 세포의 표면에 adhesion molecules의 발현을 유도하므로 순환중의 백혈구가 extravasation하도록 한다. 특히 TNF- α 의 영향이 전신으로 나타나면 열, 식욕 감퇴, C-reactive protein의 상승, anemia를 나타낸다¹²⁾. IL-6는 TNF- α 처럼 급성기 단백질 합성을 촉진하여 외상, 감염, 스트레스 등의

자극 시 혈청 내 수치가 급속히 증가하고 백혈구 증가, 혈소판 증가, 림프구 활성화, 피브리노겐, C-반응성 단백질, 아밀로이드 전구기 단백질 등을 만들어내며 그 외 B세포의 분화와 성장에 영향을 준다¹³⁾. 본 연구에서 連翹 에탄올 추출물은 LPS와 IFN- γ 로 자극한 대식세포가 분비하는 TNF- α , IL-6 양을 농도의존적으로 억제하였으며 특히 IL-6 억제가 더욱 뚜렷하였다.

LPS와 같은 외인성 자극에 의해 일어나는 경로에는 NF- κ B와 MAPK가 중요한 역할을 한다. NF- κ B는 I κ B α 에 의해 억제되지만 자극이 일어난 후 IKK로 인해 I κ B α 가 인산화되고 유비퀴틴화되어 분해되면 NF- κ B는 핵으로 이동해 많은 염증 유전자의 전사를 촉진시킨다⁷⁾. 본 연구에서 連翹 에탄올 추출물은 I κ B α 분해와 I κ B α kinase 활성을 농도의존적으로 억제하는 것을 관찰하였다. 따라서 連翹 에탄올 추출물이 I κ B α kinase 억제를 통한 I κ B α 분해를 감소시킴으로써 부분적으로 NF- κ B 신호전달에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

MAPK pathway는 염증성 자극에 의해 활성화되는 세포 내 신호 전달 경로 중 하나이다. MAPK 계층의 3가지 주요 그룹인 ERK1/2, JNK, p38은 세포의 신호에 반응하여 세포 골격 단백질, 핵내 전사인자의 활성을 조절하고 사이토카인 mRNA를 안정화시킨다¹⁴⁾. MAPK는 MAPK kinase에 의해 인산화되며 이러한 MAPK kinase는 upstream에 있는 MAPK kinase kinases에 의해 인산화된다¹⁴⁾. 본 연구를 통해 連翹 에탄올 추출물의 p38과 JNK의 인산화 억제는 MAPK kinases 억제나 보다 더 upstream 수준에서 일어났음을 알 수 있었고 이러한 조절이 사이토카인 합성의 감소에 관여하였을 것으로 사료된다.

IFN- γ 는 Janus kinase와 STAT1으로 연결되는 신호전달 경로에 의해 대식세포를 활성화한다. IFN- γ 와 해당되는 수용체가 결합하면 Janus kinase가 자가인산화 (autophosphorylation)되면서 IFN- γ 수용체의 인산화 및 STAT1의 인산화를 일으킨다⁶⁾. 이렇게 활성화된 STAT1은 핵내로 들어가 대식세포의 활성을 나타내는 다양한 유전자의 발현에 관여한다⁶⁾. 본 연구에서 확인된 連翹의 STAT1 활성 억제는 대식세포의 과잉반응을 차단하는데 기여했을 것으로 사료된다.

連翹에는 arctigenin, pinoselinol, rutin, acteoside 등이 항염 성분들이 함유되었다고 보고되었다⁴⁾. arctigenin는 JAK-STAT 신호 전달 경로를 억제하여 iNOS 발현을 저해하였으며¹⁵⁾, pinoselinol은 LPS로 자극된 rat cerebral cortex microglia에서 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현을 억제하였다¹⁶⁾. cisplatin으로 신장 염증을 유도한 쥐에게 rutin을 경구 투여한 결과 NF κ B, TNF- α , caspase-3의 발현이 감소되었으며 cisplatin에 의한 신장 조직의 병리적 변화를 예방해주었다¹⁷⁾. acteoside는 dextran sulphate sodium로 유도된 대장염 모형에서 대장의 점액 조직의 구조 손상을 감소시키고 IFN- γ 의 분비를 줄여 장의 염증을 개선하였다¹⁸⁾.

요컨대 본 실험은 清熱解毒, 消腫散結의 기능을 가지는 連翹 에탄올 추출물이 LPS/IFN- γ 로 자극한 대식세포의 TNF- α 와 IL-6의 분비를 억제하고 염증성 물질 발현에 관여하는 STAT-1, I κ B α , p38, JNK의 활성을 조절할 수 있음을 분자적 수준에서 확인하였다.

결론

連翹는 清熱解毒, 消腫散結하는 효능이 있으며 여러 염증성 질환에 사용되었다. 본 연구에서는 마우스 복강 대식세포를 이용하여 LPS와 IFN γ 로 유도된 사이토카인 및 STAT1, I κ B α , p38, JNK, ERK1/2의 변화에 連翹 에탄올 추출물이 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대식세포를 이용한 세포 독성 실험 결과 連翹 에탄올 추출물은 최고 800 μ g/ml의 농도까지 독성이 나타나지 않았다.
2. IFN- γ 와 LPS로 자극한 대식세포의 TNF- α 와 IL-6의 분비에 대하여 連翹 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 억제하였다.
3. 連翹 에탄올 추출물은 IFN- γ 와 LPS에 의해 활성화된 STAT1에 대하여 連翹는 농도 의존적으로 억제하였다.
4. 連翹 에탄올 추출물은 LPS 자극에 의한 I κ B α 분해 및 I κ B α kinase 인산화 조절을 통해 NF- γ B 활성을 억제하며 p38과 JNK의 활성을 농도의존적으로 억제하였다.

요컨대 본 연구는 連翹 에탄올 추출물의 항염효과를 규명하기 위해 염증성 사이토카인 분비와 이것을 조절하는 대표적인 신호전달 단백질 조절에 미치는 영향을 확인하였다.

참고문헌

1. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine. Textbook of Herbology. Younglimsa, 1st ed, 1991 ; 199.
2. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 2008 ; 8 : 958-969.
3. Gasetel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. Nat Rev Drug Discov 2009 ; 8 : 480-499.
4. Kim SY, Park YK. Ethanol extract of Forsythia Fructus inhibits the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated BV-2 microglia cells. Kor J Herbology 2008 ; 23(3) : 93-102.
5. Amber IJ, Hibbs JB Jr, Parker CJ, Johnson BB, Taintor RR, Vavrin Z. Activated macrophages conditioned medium : identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism J Leukoc Biol 1991 ; 49 : 610-620.
6. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci 2004 ; 11

- 7 : 1281–1283.
7. D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B(NF- κ B) : An Emerging Theme in Anti-Inflammatory Therapies. *Mol Interv.* 2002 ; 2(1) : 22–35.
 8. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Rev. Immunol.* 2008 ; 8 : 279–289.
 9. Chen CJ, Kono H, Goldenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Med* 2007 ; 13 : 851–856.
 10. Gordon S. The macrophage : past, present and future. *Eur J Immunol* 2007 ; 37 : S9–S17.
 11. Ramadori G, Damme JV, Rieder H, Buschenfelde KH. Interleukin 6, the third mediator of acute phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 β and tumor necrosis factor α . *Eur J Immunol* 1988 ; 18 : 1259–1264.
 12. Aeberli D, Oertle S, Mauron H, Reichenbach S, Jordi B, Villiger PM. Inhibition of the TNF pathway : use of infliximab and etanercept as remission-inducing agents in cases of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med Wkly* 2002 ; 132 : 414–422.
 13. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 200 ; 51 : 245–270.
 14. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy – from molecular mechanisms th therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005 ; 1754 : 253–262.
 15. Kou X, Qi S, Dai W, Luo D, Yin Z. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. *Int Immunopharmacol.* 2011 ; 11(8) : 1095–1102.
 16. Jung HW, Mahesh R, Lee JG, Lee SH, Kim YS, Park YK. Pinoresinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neurosci Lett.* 2010 ; 480(3) : 215–20.
 17. Arjumand W, Seth A, Sultana S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2011 ; 49(9) : 2013–21.
 18. Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2007 ; 148(2) : 373–81.