

Ellagic acid가 대식세포의 면역조절작용에 미치는 영향과 Toll-like receptor 4 관련 작용기전 연구

남궁승, 김예진¹, 김태성¹, 손은화^{1*}

강원대학교 물리치료학과, ¹강원대학교 생약자원개발학과

Study on the Immunomodulatory Effects of Ellagic Acid and their Mechanisms Related to Toll-like Receptor 4 in Macrophages

Seung Namkoong, Ye-Jin Kim¹, Taeseong Kim¹ and Eun-Hwa Sohn^{1*}

Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea

¹Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-907, Korea

Abstract - Ellagic acid (EA) is a phenolic compound in fruits and nuts including raspberries, strawberries, grapes and walnuts. Previous studies have indicated that EA possesses antioxidant activity, growth-inhibition and apoptosis-promoting activity in cancer cells. However, macrophage mediated cytotoxicity and immunomodulating effects on cancer cells have not been clarified. In the present study, we show that EA increased effects on macrophage mediated tumoricidal activity and NO production without direct tumor cell cytotoxicity. To further determine whether TLR4 (toll like receptor 4) is involved in anti-tumor activity, cells were treated TLR4 signaling inhibitor, CLI-095 in the presence of EA. CLI-095 treatment partially reduced macrophage-mediated tumoricidal activity. EA also has inhibitory effects of NO production induced by LPS, whereas phagocytic activity was not changed. These results suggest that EA induces macrophage mediated tumoricidal activity which is partially related to TLR4 signaling and has a potential adjuvant in cancer therapy.

Key words - Anti-tumor activity, Ellagic acid, Macrophage, Nitric oxide, Toll like receptor 4

서 언

Ellagic acid(EA)는 딸기(630 µg), 석류, 라즈베리(1.5 mg), 블랙베리(1.5 mg), 호두(590 µg/g dry wt) 등과 같은 과일, 채소 및 견과류에 함유되어 있는 천연폴리페놀 화합물(natural polyphenolic compound)이며(Daniel *et al.*, 1989) 미국의 경우 일년의 과일과 견과류 2.5 kg의 섭취량 중 343 mg이 EA인 것으로 보고되었다(USDA economic research service, 1988)(Fig. 1). EA에 가장 대표적인 효능으로는 항산화 및 항암작용이 알려져 있다(Mukhtar *et al.*, 1988; Thresiamma and Kuttan, 1996; Osawa *et al.*, 1987; Stoner and Gupta, 2001). 또한 EA는 노화된 피부에서 피부 엘라스틴화(elastogenesis)에 대한 단백질 분해를 억제함으로써 항섬유화 및 주름개선에 기능을 나타내는

것으로 보고된 바 있다(Jimenez *et al.*, 2006). EA의 항암 작용은 주로 암세포 증식 억제, 세포사멸(apoptosis) 유발 및 세포주기를 조절하는 것으로 보고되었다(Stoner and

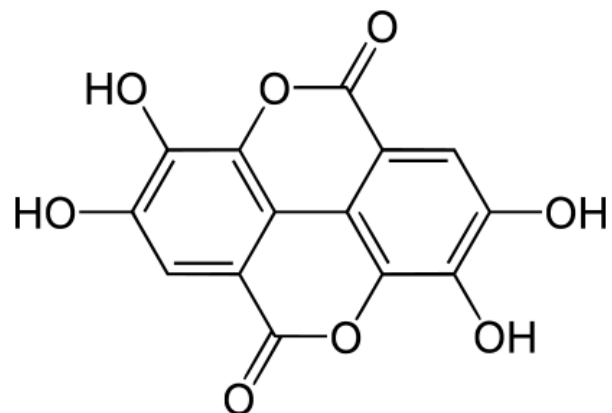


Fig. 1. Ellagic acid structure.

*교신저자(E-mail) : ehson@kangwon.ac.kr

Gupta, 2001; Larrosa *et al.*, 2006; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Edderkaoui *et al.*, 2008). EA는 암세포 분열주기에서 G1을 저지해서 분열을 중단시키며(González-Sarrías *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2005), 암세포가 p53의 종양억제유전자를 파괴하는 것을 방지한다고 보고된 바 있다(Mertens-Talcott *et al.*, 2005). 이와 같은 EA의 항암 작용에 대한 연구 결과는 대부분 암세포에 대한 직접적인 작용에 대한 효과가 알려져 있으며, 면역세포의 활성을 매개하여 일어나는 항암효과에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

인체의 면역조절작용에서 대식세포(macrophage)는 체내의 모든 조직에 분포하면서 1차적으로 세균(bacteria), 바이러스 등의 감염성 병원체뿐만 아니라 노화된 정상세포, 암세포 등에 대해 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 인체 불필요한 요소를 제거하는 방어능력을 가지고 있다. 뿐만 아니라 대식세포는 항원제시작용 및 여러 가지 cytokine과 생리활성물질을 분비하여 2차 면역반응을 극대화시키는 중요 매개체 역할을 나타낸다. 활성화된 대식세포에서 분비하는 cytokine 및 생리활성물질에는 IL-1 β , IL-6, nitric oxide(NO), TNF- α 등이 알려져 있는데, 이는 암세포에 대한 직접적인 독성을 나타내기도 한다(Zhang *et al.*, 2007; Kang and Sohn, 2010; Hamsa and Kuttan, 2011). 이와 같이 대식세포는 자연살해세포(NK cell), T림프구와 같이 암에 대한 면역을 담당하는 주된 세포로 알려져 있어서 신규 물질의 대식세포 활성조절에 대한 연구는 각종 감염성 질환을 포함한 암치료 보조요법에 사용될 수 있는 천연물을 탐색하고 개발하는데 매우 유용한 단계로 인식되고 있다(Shen *et al.*, 2008; Jofre-Monseny *et al.*, 2007).

TLR(toll like receptor)는 세포막에 존재하는 단백질 수용체로써 박테리아/바이러스의 특정 분자패턴을 인식하거나 조직 손상시 유리되는 생체인자에 의하여 활성화되어 숙주의 방어반응에 중요한 역할을 하는 1차적 면역반응(innate immune response)에 중요한 조절자이다. 현재까지 13개의 TLR이 밝혀져 있으며(Shi *et al.*, 2011), 세포나 장기 내 특징적인 발현 분포양상을 나타내며 각각 특이적인 리간드를 인식하고 세포 내부의 신호전달기작을 활성화시켜 일련의 kinase들을 활성화시킴으로써 다양한 전사인자들을 활성화시킨다. 그 결과 여러 가지 cytokine, chemokine, interferon을 생성함으로써 가장 효과적인 1차적 및 2차적 면역반응을 유도하여 개체를 감염으로부터 보호하거나 조직복구에 기여한다.

TLR4는 그람 음성 세균의 LPS를 인식하는 수용체로서 미생물 감염에 대한 염증 반응을 매개한다. TLR-4의 신호전달경로는 MyD88 의존성 경로와 비의존성 경로로 구별되며 대개는 MyD88 의존성 경로를 통해 염증반응을 야기하는데, NF- κ B를 조기에 활성화시켜서 염증성 cytokine을 생성하게 한다(Akira., 2003). 최근 난소암 세포와 조직에서 TLR4가 광범위하게 발현된다고 보고되었다. 난소암에서 TLR4/MyD88/NF- κ B 경로가 기능적으로 존재함이 알려졌으며 그 결과로 염증성 cytokine을 생성한다고 보고되었다. 이와 같은 염증성 cytokine은 대식세포 등의 면역세포를 유인하여 염증성 미세환경을 형성하고 또한 주변 간질세포나 종양세포에 직접적으로 작용하여 암화과정과 종양의 진행에 영향을 미친다(Kelly *et al.*, 2006). 또한 항 유사분열(mitosis) 물질로 항암제로도 사용되는 주목나무에서 추출한 탁솔 (Taxol[®], paclitaxel)도 TLR4의 리간드로서 작용을 나타낸다고 알려져 있으며, paclitaxel의 작용은 TLR4가 없는 세포에서는 나타나지 않으므로 TLR4 신호전달작용이 Taxol을 인식하는데 관여하는 것으로 예측되고 있다(Kawasaki *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008). 이와 같이 TLR4에 결합하여 면역세포를 자극하는 새로운 TLR4 길항제의 발견은 만성염증이나 암을 치료하기 위한 면역조절제로의 적용이 가능한 것으로 보고되어 있다. 이에 본 연구에서는 EA에 의한 대식세포의 면역조절 작용을 통하여 대식세포의 활성화에 의한 항암 효과를 다양한 각도에서 확인하고자 하였으며, EA에 의한 항암효과가 TLR4 신호전달경로에 관련되어 있는지를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 재료

RAW264.7(murine macrophage cells), B16/F1(murine melanoma) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin(penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 μ g/mL)을 첨가한 RPMI 1640(GIBCO BRL, Grand Island, NY) 배지에 부착 배양하였으며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다. EA를 포함하여 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma-Aldrich Co.(St Louis, MO)에서 구입하였다. TLR-4 signaling inhibitor로는 CLI-095

(Invivogen, San Diego, SF)를 사용하였다.

Peritoneal macrophage의 분리

Peritoneal macrophage는 thiolycollate(Difco Lab, Detroit, MI)를 이용하여 외부자극에 대한 항암작용을 쉽게 알아볼 수 있도록 inflammatory macrophage 상태로 만들어 실험하였다. 생쥐에 4.05%의 thioglycollate 1.5 mL를 복강주사하고 4일 후에 멸균된 D-PBS로 복강을 세척하여 복강세포를 취하고 부착세포를 분리하였다. 분리과정을 간단히 설명하면, 복강세포를 취하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포를 10% FBS, RPMI1640 media에 현탁한 후 petri dish에 1×10^5 cell/mL으로 분주하여 macrophage가 바닥에 부착하도록 하였다. 2시간 이후 petri dish에 부착하지 않은 세포를 D-PBS로 wash하여 제거하였다.

Macrophage-mediated tumoricidal activity

상기에 설명된 방법으로 분리된 peritoneal macrophage를 이용한 항암효과는 생쥐에서 분리한 peritoneal macrophage를 96-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주하고 다양한 농도의 EA를 처리하여 effector 세포로 사용하고, target 세포로는 B16/F1 암세포를 이용하여 10:1의 비율로 20 시간동안 함께 배양한 후에 MTT assay를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. RAW264.7세포주를 이용한 항암효과도 같은 방법을 이용하였다. EA 처리에 의해 활성화된 대식세포의 항암작용은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Tumoricidal activity (\%)} = 100 - \left\{ \frac{[\text{O.D. (Effector cells + Tumor cells)} - \text{O.D. (Effector cells)}]}{\text{O.D. (Tumor cells)} \times 100} \right\}$$

Macrophage의 NO 분비

RAW264.7 세포(1×10^5 cell/mL)를 96-well microplate에 100 μ L씩 부착시킨 후 EA를 농도별로 처리하였다. 24 시간 후에 배양 상등액 100 μ L를 취하여 96 well microplate로 옮긴 후 100 μ L Griess Reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4)를 넣고 10 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. LPS에 의해

유도된 염증환경에서의 RAW264.7 세포의 NO 생성 억제 작용을 확인하기 위하여 위와 같은 방법으로 실험하였다. Sodium nitrite 표준검량선으로부터 대식세포가 분비하는 NO를 계산하였다.

Macrophage phagocytosis 능력은 zymosan particle 도입 방법과 NBT(nitro blue tetrazolium chloride) 환원법을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 하여 부착시켜 EA를 농도별로 처리하고 세척한 후, 탄소원인 5×10^5 particle/mL zymosan과 0.6 mg/mL NBT시약을 각각 첨가하여 zymosan과 함께 NBT 시약이 uptake 하도록 하였다. NBT 환원 물질인 청보라색 불용성 formazan의 생성량을 540 nm에서 측정함으로써 phagocytosis 능력을 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험결과를 평균 \pm 표준오차(mean \pm S.E.M)로 나타내었고, 유의수준은 * $p < 0.05$ 와 ** $p < 0.01$ 로 Student t -test를 실시한 결과를 표시하였다.

결과 및 고찰

Ellagic acid(EA)의 처리농도 설정

본 실험은 EA가 암세포에 직접적으로 독성을 나타내지 않는 범위에서 대식세포의 활성을 매개로한 암세포 독성 즉, 사멸능력을 측정하는데 목적이 있으므로, 본 실험에 사용된 EA 처리 농도 1, 10, 100 μ M와 배양 시간 범위 내에서는 B16/F1 세포에 대한 세포독성 및 생존률 증가에 변화가 없음을 사전 연구에서 확인하고 수행하였다(data not shown).

대식세포의 활성화에 의해 매개되는 항암효과와 TLR4의 연관성

EA에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에 의해 항암효과가 나타나는지 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 EA를 농도별로 처리하고 target 세포인 B16/F1에 넣고 20시간 후 암세포 사멸능을 측정하였다. 실험결과 EA 100 μ M 처리군에서 유의성 있는 항암효과를 볼 수 있었다(Fig. 2A). 또한, EA에 의한 RAW264.7 세포의 항암효과가 TLR4를 경유하는지를 확인하기 위하여 항암효과가 나타났던 EA의

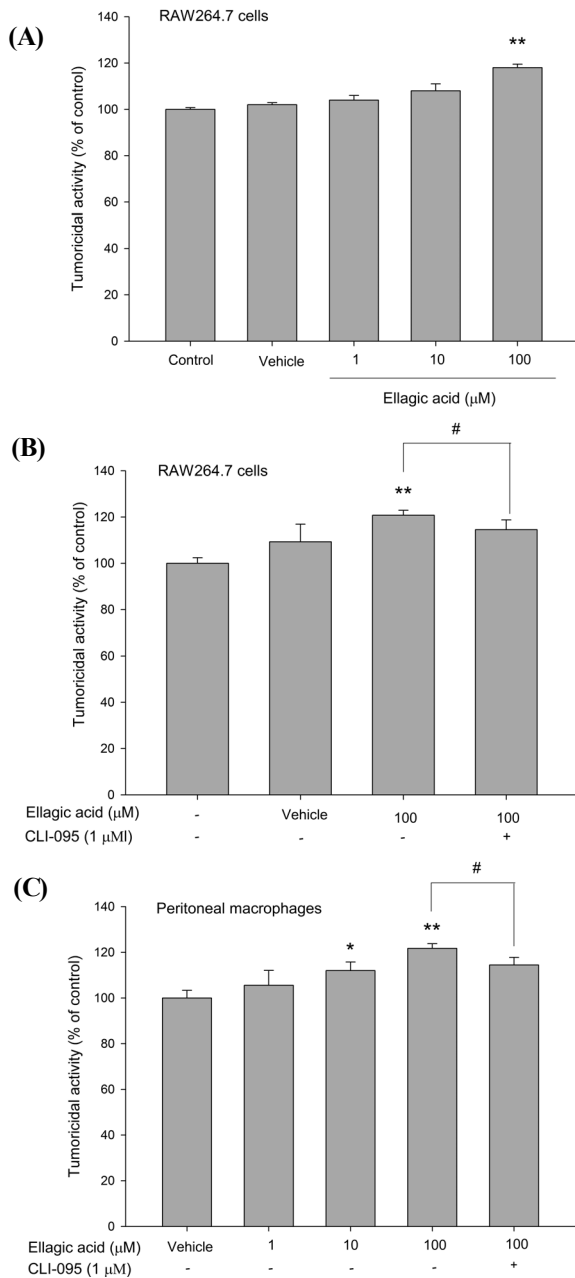


Fig. 2. (A) The effect of ellagic acid (EA) on RAW264.7 cells-mediated tumoricidal activity. (B) The effect of tumoricidal activity through TLR4 on RAW264.7 cells. (C) The effect of EA on macrophage-mediated tumoricidal activity. RAW264.7 cells were pretreated with various doses of EA, CLI-095 and co-cultured with B16/F1 target cells for 20 hrs. The macrophage-mediated tumoricidal activity of EA was assessed by MTT assay. Cell density was measured at 540 nm. The results are mean \pm S.E. of quintuplicate from a representative experiment. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from the vehicle, # $p < 0.05$; significantly different from the CLI-095 untreated group).

100 μM 처리군에 TLR4 signaling를 blocking하는 CLI-095(CLI)를 함께 처리하여 다시 항암효과를 측정하였다. Figure 2B에서 나타나는 바와 같이 RAW264.7 세포에서 EA 100 μM 처리군은 항암효과를 보인 반면 EA와 CLI를 함께 처리한 군에서는 항암효과가 나타나지 않았다. 이러한 효과를 재확인하기 위해서 생쥐에서 직접 분리한 peritoneal macrophage를 이용하여 암세포와 co-culture하여 EA의 처리에 의해 활성화된 대식세포의 항암효과를 확인하고, EA와 CLI-095를 함께 처리한 실험군을 디자인함으로써 같은 실험적 환경에서의 항암효과 조절변화를 확인하였다. Figure 2C에서 나타나는 바와 같이 peritoneal macrophage에서 EA는 10 μM 과 100 μM 에서 모두 항암효과를 나타내었으며, EA 100 μM 와 CLI를 함께 처리한 군에서는 EA 단독 처리군에서 나타난 항암효과가 억제되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 EA에 의하여 대식세포를 매개로한 항암 작용이 나타나며, EA에 의한 항암작용은 TLR4를 경유하는 신호전달 기전임을 직접적으로 보여준 것이다. 그러나 EA에 의해 나타난 항암효과가 CLI의 TLR4 signaling 차단에 의해 완전히 감소되지 않은 것(RAW264.7세포의 경우 39.4% 감소, peritoneal macrophage의 경우 60.9% 감소)으로 미루어 보아 EA의 항암 효과는 TLR4 signaling에 일부 관여하는 것으로 예측된다.

NO 생성 및 분비조절에 대한 효과

대식세포가 분비하는 암세포 독성물질의 하나인 NO 생성에 대한 EA의 영향을 알아보기 위하여 대식세포에 다양한 농도의 EA를 처리하여 NO 생성량을 확인하였다. 실험 결과 EA 처리에 의하여 NO 생성 및 분비가 증가하였으며, 오히려 1 μM 저농도에서 더욱 증가하였다. 이것은 EA가 macrophage의 NO 생성을 증가시켜 macrophage의 항암 작용에 기여할 것으로 예측되지만, 항암효과와 NO 생성효과에 대한 농도패턴이 일치하지 않는 것으로 보아 다른 항암효과기전이 존재하는 것으로 보인다(Fig. 3A).

NO는 주로 LPS 또는 TNF- α 등의 염증유발물질에 의해 자극된 세포가 염증을 유발할 때 분비하는 염증반응 매개물질로도 알려져 있다(Kwon *et al.*, 2001). 이와 같은 NO의 생성은 L-arginine의 guanidino nitrogen이 산화에 의해 L-citrulline로 변화하는 L-arginine-nitric oxide 경로를 통하여 생성된다(Marletta *et al.*, 1998). 대식세포, 호중구 등의 면역세포와 섬유모세포, 혈관의 평활근,

및 기도 상피세포에 있는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 효소의 활성화에 의해 NO가 다량 생성되며 갑자기 과도하게 생성된 NO는 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있다(Kwon *et al.*, 2001). 본 연구에서는 EA의 NO 생성조절에 대한 효과를 통하여 항염증효과를 예측하기 위하여

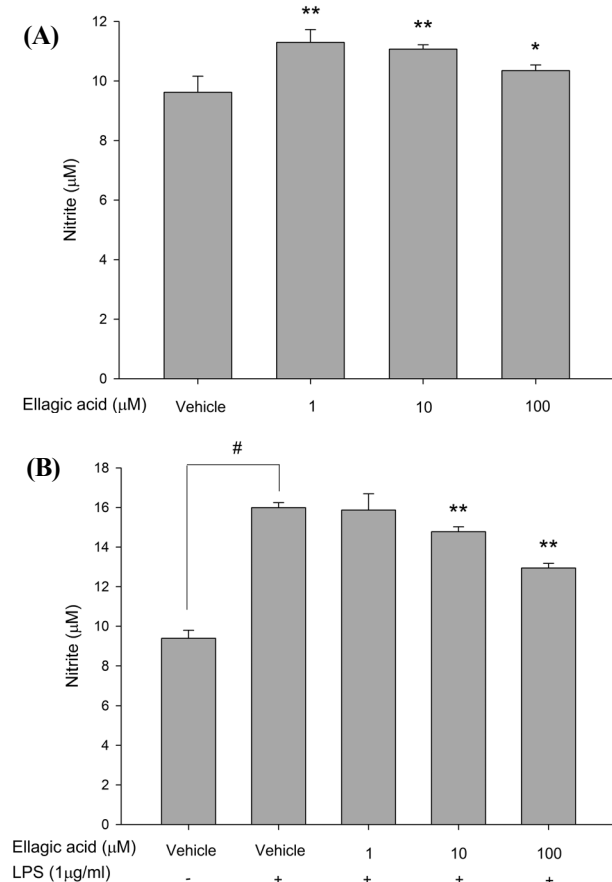


Fig. 3. (A) The effect of ellagic acid (EA) on the production of NO by RAW264.7 cells. It were treated with various doses of EA for 20 hrs. The 20 hrs-conditioned media were collected for NO₂⁻ assay. The results are mean ± S.E. of quintuplicate from a representative experiment. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01; significantly different from the vehicle group) (B) The effect of EA on the production of NO by RAW264.7 cells in the presence LPS. After RAW264.7 cells were pre-treated with LPS for 1hr, it were treated with various doses of EA for 20 hrs. The 20 hrs-conditioned media were collected for NO₂⁻ assay. The results are mean ± S.E. of quintuplicate from a representative experiment. (#*p* < 0.05; significantly different from LPS alone treated group, ***p* < 0.01; significantly different from the vehicle and LPS treated group).

LPS를 RAW264.7 대식세포에 인위적으로 처리하여 NO를 과량 생성하는 염증 환경을 만들고, EA를 처리하여 NO 생성이 억제 조절되는지 확인하였다(Fig. 3B). LPS 단독처리 군에 비하여 LPS에 EA를 함께 처리한 군에서 NO의 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과는 EA가 NO조절에 대하여 이중 효과(dual effect)가 있다는 것을 나타낸다. EA는 항암효과 등의 면역을 증강시키는 측면에서 NO의 생성을 증가시키고 있으며, LPS 및 IFN-γ에 의한 NO의 과잉생성에 대해서는 억제효과를 나타내어 항상성을 유지시키는 것이다. 이러한 NO 조절의 이중 효과는 세포내 p38 등과 같은 신호전달과정이 rest 상태 또는 활성화된 상태 등의 세포 상태에 따른 차별적인 조절에 의해 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Won *et al.*, 2004; Do *et al.*, 2010).

탐식 능력에 미치는 영향

탐식 능력은 대식세포가 외부 물질을 제거하기 위해 가장 먼저 일어나는 면역반응이다. 외부자극에 의하여 활성화되면 대식세포는 탐식 능력이 증가되어 외부물질을 제거하게 된다. 대식세포의 탐식 능력은 항암효과에 영향을 미칠 수 있기 때문에 그 관련성을 알아보기 위하여 EA가 탐식 능력에 미치는 영향을 측정하였다(Adams and Hamilton,

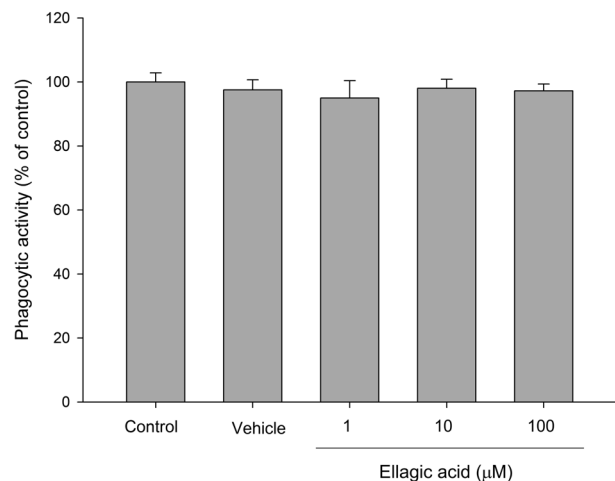


Fig. 4. The effect of ellagic acid (EA) on the phagocytosis of RAW264.7 cells. It were treated with various doses of EA for 20 hrs. RAW264.7 cells were then incubated with 5x10⁵ particles of zymosan and 0.6 mg/mL of NBT. Phagocytosis was measured at O.D. 540 nm. The results are mean ± S.E. of quintuplicate from a representative experiment.

1984; Choung and Sohn, 2011). EA를 처리한 대식세포에 탄소원 zymosan을 가하여 탐식 작용을 일으킨 결과 EA는 대식세포의 탐식 능력을 증가시키지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과로 EA를 처리한 대식세포의 탐식 능력은 항암 효과에 영향을 미치지 않았음을 의미한다.

적 요

본 연구는 EA에 의한 대식세포의 활성화를 매개로 한 항암 효과와 항암작용과 관련된 대식세포의 면역조절효과를 확인하였다. 연구 결과 EA에 의해 RAW264.7세포 및 peritoneal macrophage 모두에서 항암효과가 증가하였으며, 증가된 대식세포의 항암효과는 TLR4 signaling을 blocking하는 CLI-095을 함께 처리하였을 때 일부 감소되었다. 이는 EA에 의한 항암 효과가 부분적으로 TLR4를 경유하는 기전으로 나타나는 것을 의미한다. 또한, EA에 대한 대식세포의 NO 분비조절효과를 측정하였으며, EA는 대식세포의 NO 생성을 증가시켰으나, 인위적으로 염증을 유발시켜 NO를 과도하게 분비한 상태에서는 NO 분비를 오히려 억제시키는 결과를 나타내었다. 이와 같이 EA에 의한 NO조절에 대한 이중 효과는 인체에 면역증강과 항염증 효과라는 긍정적인 효과를 나타내는 방향으로 조절하고 있으므로 EA를 이용한 항암요법의 보조제 및 면역보조제로서의 활용에 유익할 것으로 사료된다. 향후 EA에 대한 항암 작용 및 NO 조절에서 세포내 신호전달 작용기전에 대한 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

인용문헌

Adams, D.O. and T.A. Hamilton. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2:283-318.

Akira, S. 2003. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278:38105-38108.

Chen, R., A.B. Alvero, D.A. Silasi, K.D. Steffensen and G. Mor. 2008. Cancers take their toll-the function and regulation of toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 27:225-233.

Choung, M.G. and E.H. Sohn. 2011. Anti-tumor activity of saponin fraction of *Platycodon gradiflourm* through immunomodulatory effects associated with NO production in RAW264.7 cells. *J. Korean Plant Res.* 24(5):557-563 (in Korean).

Daniel, E.M., A.S. Kropnick, Y.H. Heur, J.A. Blinzler, R.W.

Nims and G.D. Stoner. 1989. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J. Food Compos. Anal.* 2:338-349.

Do, H., N.S. Kang, S. Pyo, T.R. Billiar and E.H. Sohn. 2010. Differential regulation by fucoidan of IFN- γ -induced NO production in glial cells and macrophages. *J. Cell Biochem.* 111:1337-1345.

Edderkaoui, M., I. Odinkova, I. Ohno, I. Gukovsky, V.L. Go, S.J. Pandol and A.S. Gukovskaya. 2008. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor κ B in pancreatic cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 14:3672-3680.

González-Sarriás, A., J.C. Espin, F.A. Tomás-Barberán and M.T. García-Conesa. 2009. Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:686-698.

Hamsa, T.P. and G. Kuttan. 2011. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of *ipomoea obscura* (L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation* 34:171-183.

Jimenez, F., T.F. Mitts, K. Liu, Y. Wang and A. Hinek. 2006. Ellagic and tannic acids protect newly synthesized elastic fibers from premature enzymatic degradation in dermal fibroblast cultures. *J. Invest. Dermatol.* 126:1272-1280.

Jofre-Monseny, L., S. de Pascual-Teresa, E. Plonka, P. Huebbe, C. Boesch-Saadatmandi, A.M. Minihane and G. Rimbach. 2007. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on markers of oxidative status in macrophages. *Br. J. Nutr.* 97:864-871.

Kang, N.S. and E.H. Sohn. 2010. Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *J. Korean Plant Res.* 23(5):399-405 (in Korean).

Kawasaki, K., S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake and M. Nishijima. 2000. Mouse toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem.* 275:2251-2254.

Kelly, M.G., A.B. Alvero, R. Chen, D.A. Silasi, V.M. Abrahams, S. Chan, I. Visintin, T. Rutherford and G. Mor. 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66:3859-3868.

Kwon, S., R.L. Newcomb and S.C. George. 2001. Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 5:534-546.

Larrosa, M., F.A. Tomas-Barberan and J.C. Espin. 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid

- that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nutr. Biochem.* 17:611-625.
- Li, T.M., G.W. Chen, C.C. Su, J.G. Lin, C.C. Yeh, K.C. Cheng and J.G. Chung. 2005. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res.* 25:971-979.
- Malrletta, M.A., Z. Chen and K.M. Rusche. 1998. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:656-663.
- Mertens-Talcott, S.U., J.A. Bomser, C. Romero, S.T. Talcott and S.S. Percival. 2005. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species *in vitro*. *J. Nutr.* 135:609-614.
- Mukhtar, H., M. Das, W.A. Khan, Z.Y. Wang, D.P. Bik and D.R. Bickers. 1988. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 48:2361-2365.
- Osawa, T., A. Ide, J.D. Su and M. Namiki. 1987. Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.* 35:808-812.
- Pacheco-Palencia, L.A., G. Noratto, L. Hingorani, S.T. Talcott and S.U. Mertens-Talcott. 2008. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 56:8434-8441.
- Shen, B., M. Hagiwara, Y.Y. Yao, L. Chao and J. Chao. 2008. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis *via* antioxidative stress. *Hypertension* 51:1358-1365.
- Shi, Z., Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu and D. Zhang. 2011. A novel toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J. Biol. Chem.* 286:4517-4524.
- Stoner, G.D. and A. Gupta. 2001. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 22:1737-1746.
- Thresiamma, K.C. and R. Kuttan. 1996. Inhibition of liver fibrosis by ellagic acid. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 40:363-366.
- USDA Economic Research Service. 1988. Fruits and tree nuts: Situation and outlook yearbook, U.S. Department of Agriculture, Hyattsville, M.D.
- Won, J.S., Y.B. Im, A.K. Singh and I. Singh. 2004. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic. Biol. Med.* 37:1834-1844.
- Zhang, L., H. Zhu, Y. Lun, D. Yan, L. Yu, B. Du and X. Zhu. 2007. Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. *Cell. Mol. Immunol.* 4:359-367.

(Received 3 May 2012 ; Revised 4 September 2012 ; Accepted 9 October 2012)