

고량강으로부터 분리된 galangin의 RAW 264.7 세포주에서 LPS로 유도된 nitric oxide 생성 저해활성

이 화 진*

세명대학교 자연약재과학과

Inhibitory Effect of Galangin from *Alpinia officinarum* on Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Synthesis in RAW 264.7 macrophages

Hwa Jin Lee*

Department of Natural Medicine Resources, Semyung University

Abstract In a screen for plant-derived inhibitors of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW 264.7 macrophage cells, a flavonol isolated from the chloroform extract of *Alpinia officinarum* was isolated. The structure of the flavonol was found to be 3,5,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one (galangin, GLG) by using spectroscopy. GLG exhibited an inhibitory effect (IC_{50} value: 26.8 μ M) on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. Moreover, GLG suppressed expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein and mRNA in a dose-dependent manner.

Keywords: *Alpinia officinarum*; Zingiberaceae; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; flavonol

서 론

Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 여러 조직과 세포에서 L-arginine으로부터 Nitric Oxide Synthase (NOS)에 의해 생성된다(1). NO를 생성하는 NOS는 세포질 내에 항상 미량으로 존재하는 constitutive form (cNOS)와 면역학적 변화에 의해 유도되는 inducible form (iNOS)으로 나눌 수 있으며, cNOS는 Ca^{++} /calmodulin 의존적이며 단시간 동안 소량의 NO를 생성하여 신경 전달 물질로서 작용하거나 혈관 근육세포의 이완을 통해 혈압강하 작용을 하는 등 정상적인 생리기능을 담당하며, 신경세포에 존재하는 neuronal NOS (nNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial NOS (eNOS)로 구분할 수 있다(2). 반면 iNOS는 Ca^{++} /calmodulin 비의존적이며 혈관 내피세포, 근육세포를 포함한 다양한 조직에서 lipopolysaccharide (LPS), interleukine 1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) 등에 의해 유도되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성하여 병리학적 혈관확장, 세포독성, 조직 손상 등 유해 작용을 나타내고, 패혈증 환자에게서 septic shock을 일으키는 것으로 보고되고 있다(3). 또한 NO가 혈관 투과성 증가, 부종 등 염증반응을 야기하거나 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 생합성을 촉진하여 염증반응

을 심화시키는 것으로 나타난다(3-6).

고량강(高良薑, *Alpinia officinarum* Hance)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본의 뿌리줄기로서 양강(良薑), 신강(身薑), 소신강(小身薑), 고신강(高身薑)이라고도 일컫고, 주요성분으로는 1,8-cineol, methyl cinnamate, α -cadinene 등의 정유성분과 galangol 등의 신미성분이 알려져 있다(7). 예부터 방향성 건위, 진통, 진토약으로서 소화불량, 구토, 복통, 하리에 응용하고, 중국에서는 전통적으로 비장과 위관련 질환에 대해 탁월한 치료효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(8). German Commission E Monograph에는 식욕감퇴와 소화 불량에 사용되는 것으로 기재되어 있으며, 미국의 FDA에서는 'generally regarded as safe (21CFR section 182.10, 182.20)'로 규정하고 있다(9). 한편, 고량강의 약리활성에 대한 연구는 항산화, 항암, 혈관이완 및 항염증 작용 등이 보고되어 있다(10-13).

본 연구에서는 고량강 추출물과 고량강으로부터 분리한 단일 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서의 NO 생성에 미치는 효과와, 고량강으로부터 분리된 NO 생성 저해제가 iNOS의 발현에 미치는 영향에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 활성성분의 분리

고량강(4.5 kg)을 환류냉각하면서 메탄올로 3번 추출한 것을 실험재료로 사용하였다. 고량강 메탄올 추출물로부터 극성에 따른 용매분획을 얻기 위하여 메탄올 추출물(400 g)을 물에 분산하고 헥산(47.5 g), 클로로포름(25.5 g), 에틸 아세테이트(18.1 g) 순서로 각각의 가용분획을 얻었다. 클로로포름 가용 분획(2.24 g)을 hexane:ethylacetate (30:1→10:1)의 조건으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하여 용출물을 크게 6개의 분획으로 나누고 각 분

*Corresponding author: Hwa Jin Lee, Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon, Chungbuk 390-711, Korea

Tel: 82-43-649-1682

Fax: 82-43-649-1729

E-mail: hwalee@semyung.ac.kr

Received May 26, 2013; revised June 3, 2014;

accepted June 4, 2014

획에 대해 NO 생성 저해활성을 검정하였다. NO 생성 저해활성이 좋은 6번 분획(786 mg)에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(chloroform:methanol, 7:1→2:1)와 역상(C₁₈) 컬럼 크로마토그래피(55% acetonitrile→80% acetonitrile) 등을 행하여 강한 활성을 나타내는 단일화합물(7.5 mg)을 분리하였으며, 순도는 역상 컬럼을 이용한 high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu HPLC system with UV monitor, Kyoto, Japan)로 확인하였다.

세포주 배양과 시료의 처리

RAW 264.7 대식세포주(ATCC, Rockville, MD, USA)를 10% FBS (fetal bovine serum), 2 mM L-arginine과 100 µg/mL의 penicillin, streptomycin (Life technologies, Frederick, MD, USA)이 포함된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 1.5×10⁵ cells/mL 하여 48 well plate에 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 LPS를 1 µg/mL이 되도록 가하였다. 시료는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켜 보관하고, 세포에 처리시 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 일정시간 배양하여 각 well의 배양액으로 유리된 NO 생성 정도를 측정하였다. 시료의 세포에 대한 독성은 MTT 시험법으로 측정하고 세포에 대해 독성이 없는 농도에서 활성을 검정하였다.

MTT 시험법을 이용한 시료의 세포독성 평가

RAW 264.7 세포를 1.5×10⁵ cells/mL 로 하여 96 well plate에 100 µL씩 분주하여 12시간 동안 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 LPS를 1 µg/mL이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well의 배양액을 제거 후 PBS로 한 번 세척한 후 methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA)용액을 가하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양한 후 solubilization용액을 가하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Griess reagent를 이용한 배양액 중의 NO 생성량의 측정

NO는 2-3초의 짧은 life time을 가진 불안정한 물질로 대부분 NO₂⁻ 형태로 전환되므로 생성된 NO의 양은 NO₂⁻의 형태로 정량하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamin·2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O) 150 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시키고 발색정도를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량선 작성을 위해 NaNO₂를 표준품으로 사용하였다.

Westernblot analysis

RAW 264.7 세포를 대조군, LPS처리군, LPS+시료처리군으로 나누어 처리한 후 20시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 세포를 lysis buffer (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA)를 이용하여 lysis 시키고, Bradford 방법을 사용하여 단백질을 정량한 후, 8% SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, PVDF membrane에 transfer하였다. iNOS 항체(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 결합시키고 horseradish peroxidase linked type의 2차 항체를 결합시킨 후, ECL detection reagents를 이용한 형광 항체법으로 iNOS단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)법

RAW 264.7 세포를 대조군, LPS처리군, LPS+시료처리군으로 나누어 처리한 후 6시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 신속히 Trizol (Life technologies)을 가하여 세포를 lysis 시킨 뒤, 제품설명서에 따라 RNA를 분리하였다. 얻어진 RNA에 reverse transcriptase (Life technologies)와 hexamer (Cosmo, Seoul, Korea)를 가한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA로 전환하였다. 얻어진 cDNA의 일정량과 primer (iNOS; sense 5'-ATGTC-GAAGCAAACATACA-3', antisense 5'-TAAGGTCCAGGAAG-TAGGTG-3', β-actin; sense 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3', antisense 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'), polymerase (Promega, Madison, WI, USA)를 가하여 iNOS mRNA의 발현 정도를 관찰하였다.

자료의 통계적 처리

실험결과에서 얻은 모든 값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균±표준편차로 표시하였다. 각 실험군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 student's t-test를 이용하여 p<0.05인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

결과 및 고찰

고량강 추출물의 NO 생성 저해활성

고량강(*Alpinia officinarum* Hance, Zingiberaceae) 메탄올 추출물에 대해 극성에 따른 각 용매 분획을 얻고, 활성을 가진 용매 분획으로부터 활성 검정을 병행한 각종 컬럼 크로마토그래피법으로 활성 성분을 추적하였다. 활성 검정은 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 저해 정도로 평가하였다. 메탄올 추출물 및 용매분획에 의한 NO 생성 저해활성 실험 결과, LPS 단독 처리군에 비해 메탄올 추출물은 16%, 클로로포름 가용 분획은 70%의 NO 생성 저해활성을 나타내었다. 추출물 및 용매분획의 세포처리농도는 10 µg/mL이었고, 이때 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서, 클로로포름층에 대해 활성성분 추적을 위한 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다.

고량강으로부터 활성성분의 분리과 단일 활성성분의 NO 생성 저해활성

클로로포름층에 대해 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 실리카겔 및 역상 컬럼 크로마토그래피를 행하여 강한 활성을 나타내는 단일 화합물을 분리하였으며, 순도는 역상 컬럼을 이용한 HPLC로 확인하였다. 분리된 화합물은 분자량 270.05의 황갈색 결정상으로 실리카겔 TLC 상에서 10% 황산에 의해 주황색으로 발색되었으며, 분광학적 분석자료를 통해 그 구조를 3,5,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one (galangin, GLG, Fig. 2A)으로 규명하였고, 보고된 문헌의 자료와도 일치하였다(14). 강력한 NO 생성 저해활성을 나타내는 클로로포름층으로부터 분리한 단일 화합물 GLG에 대해 LPS로 활성화한 RAW 264.7 세포로부터 유도된 NO 생성 저해능력을 평가하였다(Fig. 2B). 그 결과, LPS 단독 처리군에서 NO가 과량 생산되는 것을 확인할 수 있었으나, 화합물 GLG 처리군에서는 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하는 것을 확인하였으며, NO 생성 저해활성에 대한 IC₅₀값은 26.8 µM이었다. 또한, GLG의 NO 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 MTT assay 결과로 확인하였다(Fig. 2B).

GLG는 항암(15), 혈압강하(16), 항알러지(17), 항비만(18), 항염증(19) 등의 다양한 약리활성을 보이는 것으로 보고된 바 있으

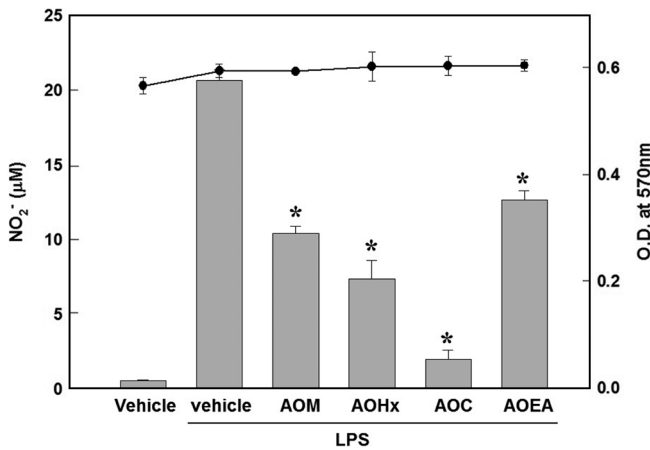


Fig. 1. Effect of solvent fractions of *Alpinia officinarum* on LPS-induced NO production. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 µg/mL) and/or solvent fractions of *A. officinarum* (10 µg/mL) for 20 h, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent (bar). Cell viability assay was performed with MTT colorimetric assay (●). AOM: methanol extract, AOHx: hexane layer, AOC: CHCl₃ layer, AOEa: EtOAc layer.

며, 또한 합성품 GLG 혹은 천연물로부터 유래한 GLG가 J774A.1 대식세포주, 복막대식세포 모델에서 염증 억제효능을 나타내는 것으로도 알려져 있어, 본 연구의 결과와도 일치하는 것으로 생각된다(20-21).

고량강 추출물로부터 분리한 단일화합물의 iNOS 발현저해활성

iNOS의 발현을 저해하여 과도한 NO 생성을 저해하는 것으로 알려져 있는 천연 iNOS 저해제로는 luecolin(22), kazinol B(23), quercetin(24), kaempferol(25)과 같은 flavonoid, liganan(26,27),

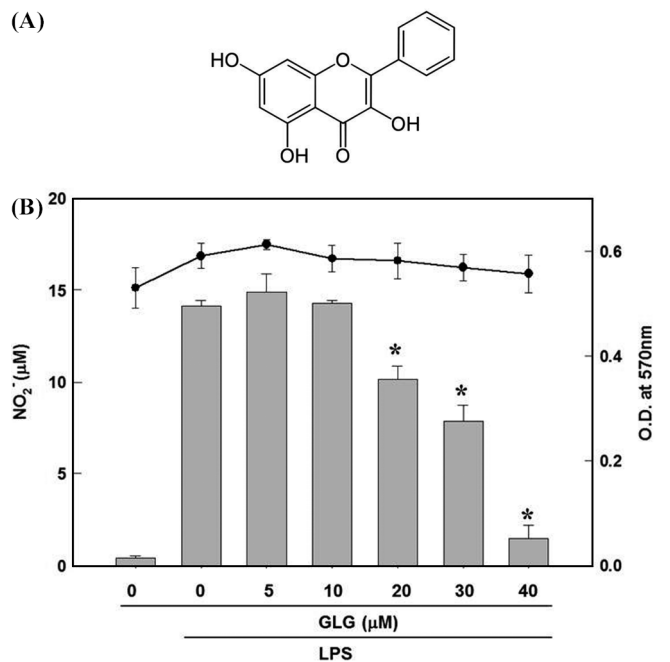


Fig. 2. The structure of GLG from *Alpinia officinarum* (A) and the effect of GLG on LPS-induced NO production (B). RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 µg/mL) and/or various concentrations of GLG for 20 h, and the amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent (bar). Cell viability was performed using MTT colorimetric assay (●). The values are expressed as the means±SD of three individual experiments. **p*<0.05.

terpenes(28,29) 및 alkaloids(30,31) 등 다양한 구조의 화합물들이 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서도 고량강으로부터 분리한

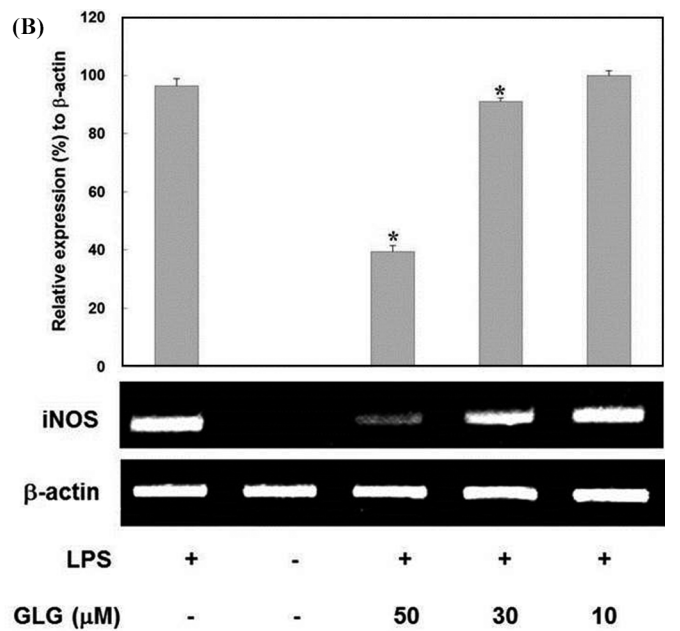
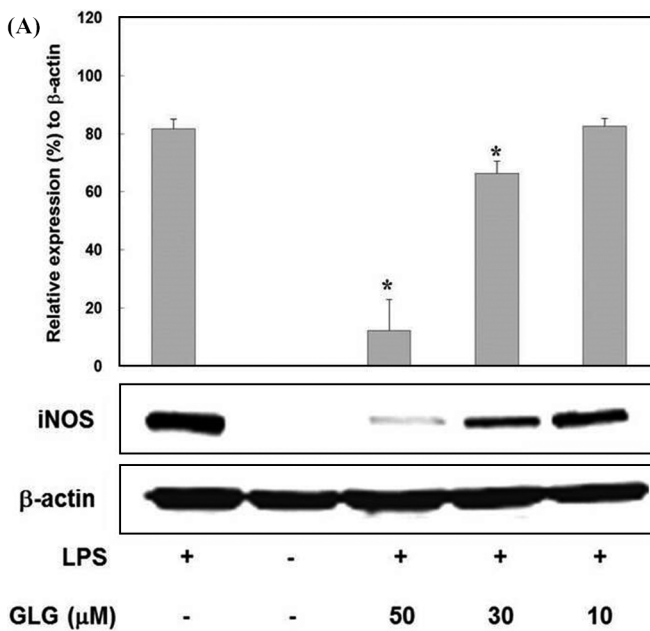


Fig. 3. Effects of GLG from *A. officinarum* on the expression of LPS induced iNOS protein (A) and mRNA (B). (A) RAW 264.7 cells were treated with GLG (10, 30 and 50 µM) and/or LPS (1 µg/mL) for 20 h. Cell lysates were prepared and the iNOS, COX-2, and β-actin protein levels were determined by Western blot. (B) RAW 264.7 cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) with or without GLG (10, 30 and 50 µM) for 6 h. The mRNA levels for iNOS and β-actin were determined by RT-PCR from total RNA extracts. β-Actin was used as an internal control. Images are the representative of three independent experiments that shows similar results. The values are expressed as the means±SD of three individual experiments. **p*<0.05.

flavonol 구조의 화합물 GLG가 iNOS 발현에 저해활성을 나타내는지 확인하고자 하였다. 화합물 GLG가 iNOS의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, iNOS항체를 이용하는 Western blot 실험을 수행한 결과, 화합물 GLG가 농도 의존적으로 iNOS 단백질 발현을 억제하는 것을 관찰하였다(Fig. 3A). 또한 화합물 GLG의 iNOS 단백질 발현억제가 mRNA발현 저해에 의한 것인지를 확인하기 위해 iNOS primer를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행한 결과, 화합물 GLG에 의해 iNOS mRNA의 발현이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 이로써 고량강으로부터 분리한 flavonol 구조의 화합물 GLG의 NO 생성저해활성은 iNOS mRNA의 발현 억제를 통한 iNOS 효소단백질의 생성저해에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

요 약

각종 염증성 질환 및 패혈증으로 인한 치명적인 저혈압을 예방치료하는 약물 개발을 위한 기초 연구로서 유도성 NOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 에 의한 NO의 과다 생성을 저해하는 성분을 천연물로부터 찾아내고자 본 연구를 수행하였다. NO 생성 저해활성의 검정은 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화한 후, 유도되는 iNOS에 의해 생성되는 NO를 Griess 시약을 이용해 NO₂의 형태로 정량하였다. 또한 Western blot 실험 및 RT-PCR 실험을 시행하여 iNOS의 mRNA의 발현 및 단백질 함성에 대한 영향을 조사하였다. 고량강(*Alpinia officinarum* Hance, Zingiberaceae)의 메탄올 추출물로부터 극성에 따른 용매 분획을 시행하여 활성성분을 분리하고 분광학적 분석법을 이용하여 분리한 단일성분이 flavonol 구조인 3,5,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one (galangin, GLG)임을 확인하였다. 작용기전을 알아보기 위해, Western blot 및 RT-PCR 실험결과, 분리한 flavonol 성분 (GLG)의 NO 생성저해 활성은 iNOS mRNA발현을 저해하여 iNOS 효소 단백질의 생성이 억제됨에 기인하는 것으로 확인하였다. 따라서, 고량강 추출물로부터 분리한 flavonol 화합물(GLG)이 iNOS 발현의 억제를 통해 다량의 NO 생산을 저해함으로써, 고량강(*Alpinia officinarum*)의 NO 과량생성과 관련된 염증성 질환에 대한 응용 가능성이 클 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 세명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

- Garthwaite J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem.* 334: 221-232 (2010)
- Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279: 2121-2126 (1998)
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33: 829-837 (2012)
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357: 593-615 (2001)
- Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43: 521-531 (1999)
- De Cruz SJ, Kenyon NJ, Sandrock CE. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. *Expert Rev. Respir. Med.* 3: 511-521 (2009)
- Ly TN, Yamauchi R, Kato K. Volatile Components of the Essential Oils in Galanga (*Alpinia officinarum* Hance) from Vietnam. *Food Sci. Technol. Res.* 7: 303-306 (2001)
- Shin D, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K. Antiemetic principles of *Alpinia officinarum*. *J. Nat. Prod.* 65: 1315-1318 (2002)
- Yadav PN, Liu Z, Rafi MM. A diarylheptanoid from lesser galangal (*Alpinia officinarum*) inhibits proinflammatory mediators via inhibition of mitogen-activated protein kinase, p44/42, and transcription factor nuclear factor-kappa B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 30: 925-931 (2003)
- Ly TN, Shimoyamada M, Kato K, Yamauchi R. Isolation and characterization of some anti-oxidative compounds from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). *J. Agr. Food Chem.* 51: 4924-4929 (2003)
- Lee KH, Rhee KH. Anti-tumor activity of the extract of *Alpinia officinarum* using hollow fiber assay. *Korean J. Food Nutr.* 24: 496-500 (2011)
- Kim HJ, Yoo MY, Kim HK, Lee BH, Oh KS, Seo HW, Yon GH, Gendaram O, Kwon DY, Kim YS, Ryu SY. Vasorelaxation effect of the flavonoids from the rhizome extract of *Alpinia officinarum* on isolated rat thoracic aorta. *Kor. J. Pharmacogn.* 37: 56-59 (2006)
- Lee HJ, Kim JS, Ryu JH. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. *Planta Med.* 72: 68-71 (2006)
- Wawer I, Zielinska A. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. *Magn. Reson. Chem.* 39: 374-380 (2001)
- Su L, Chen X, Wu J, Lin B, Zhang H, Lan L, Luo H. Galangin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Food Chem. Toxicol.* 62: 810-816 (2013)
- Morello S, Vellecco V, Alfieri A, Mascolo N, Cicala C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 78: 825-830 (2006)
- Kim HH, Bae Y, Kim SH. Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 57: 209-216 (2013)
- Kumar S, Alagawadi KR. Anti-obesity effects of galangin, a pancreatic lipase inhibitor in cafeteria diet fed female rats. *Pharm. Biol.* 51: 607-613 (2013)
- Lotito SB, Frei B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J. Biol. Chem.* 281: 37102-37110 (2006)
- Suzuki R, Tanaka T, Yamamoto M, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Satoh K, Shirataki Y. In search of new biological activities of isolates from *Odontoglossum Harvengetense* 'Tutu'. *In Vivo.* 26: 993-999 (2012)
- Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorgan. Med. Chem.* 14: 138-142 (2006)
- Kim JS, Lee HJ, Lee MH, Kim J, Jin C, Ryu JH. Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells. *Planta Med.* 72: 65-68 (2006)
- Ryu JH, Ahn H, Lee HJ. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. *Fitoterapia* 74: 350-354 (2003)
- Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, Rhee MH. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF-κB-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology* 218: 1452-1467 (2013)
- Kim HK, Park HR, Lee JS, Chung TS, Chung HY, Chung J. Down-regulation of iNOS and TNF-alpha expression by kaempferol via NF-kappaB inactivation in aged rat gingival tissues. *Biogerontology* 8: 399-408 (2007)
- Lee HJ, Li H, Chang HR, Jung H, Lee DY, Ryu JH. (-)-Nyasol, isolated from *Anemarrhena asphodeloides* suppresses neuroin-

- flammatory response through the inhibition of I- κ B α degradation in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *J. Enzym Inhib. Med. Chem.* 28: 954-959 (2013)
27. Kim JS, Kim JY, Lee HJ, Lim HJ, Lee DY, Kim DH, Ryu JH. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by furfuran lignans from flower buds of *Magnolia fargesii* in BV-2 microglial cells. *Phytother. Res.* 24: 748-753 (2010)
28. Kim TH, Li H, Wu Q, Lee HJ, Ryu JH. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. *J. Ethnopharmacol.* 146: 760-767 (2013)
29. Li H, Kim JY, Hyeon J, Lee HJ, Ryu JH. *In vitro* antiinflammatory activity of a new sesquiterpene lactone isolated from *Siegesbeckia glabrescens*. *Phytother. Res.* 25: 1323-1327 (2011)
30. Zhao F, Gao Z, Jiao W, Chen L, Chen L, Yao X. *In vitro* anti-inflammatory effects of beta-carboline alkaloids, isolated from *Picrasma quassioides*, through inhibition of the iNOS pathway. *Planta Med.* 78: 1906-1911 (2012)
31. Luo Y, Liu M, Yao X, Xia Y, Dai Y, Chou G, Wang Z. Total alkaloids from Radix Linderae prevent the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing NF-kappaB and MAPKs activation. *Cytokine* 46: 104-110 (2009)