

## LPS 자극 RAW 264.7 대식세포에 있어서 아로니아 열매 열수 추출물의 항염증 효과

양 혜<sup>1</sup> · 오광훈<sup>2</sup> · 유영춘<sup>1</sup>

<sup>1</sup>건양대학교 의과대학 미생물학교실

<sup>2</sup>공주대학교 사범대학 체육교육과

### Anti-Inflammatory Effect of Hot Water Extract of Aronia Fruits in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages

Hui Yang<sup>1</sup>, Kwang-Hoon Oh<sup>2</sup>, and Yung Choon Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University

<sup>2</sup>Department of Physical Education, College of Education, Kongju National University

**ABSTRACT** In this study, anti-inflammatory activity of hot water extract of Aronia fruits (AF-H) was examined. Pre-treatment with AF-H significantly inhibited production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E-2 in a dose-dependent manner in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. The inhibitory effect of AF-H on LPS-induced inflammation was also confirmed by down-regulation of inducible NO synthase as well as cyclooxygenase-2 protein expression. Furthermore, treatment with AF-H significantly inhibited secretion of inflammatory cytokines such as tumor-necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6. Signal transduction pathway studies further indicated that AF-H inhibited LPS-induced activation of nuclear factor- $\kappa$ B, but not mitogen-activated protein kinase. Treatment with AF-H also partially protected against LPS-induced lethal shock in C57BL/6 mice, although its effect was not statistically significant. These results suggest that AF-H is a more promising nutraceutical or medicinal agent for inhibition of LPS-induced inflammation or inflammation-related diseases.

**Key words:** Aronia fruits, anti-inflammatory activity, nitric oxide, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B

## 서 론

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 black chokeberry로도 불리는 장미과의 낙엽 관목으로 주로 북아메리카에서 자생하며, 최근 국내에서도 재배농가가 증가하고 있다. 아로니아 열매는 폴리페놀류, 안토시아닌, 플라보노이드 및 탄닌과 같은 성분들을 다량 함유하고 있으며, 특히 안토시아닌 함량은 다른 식물들에 비해 훨씬 높은 것으로 알려져 있다(1,2). 아로니아 열매에 함유된 이러한 성분들은 대체로 항산화 효과를 지니고 있으며, 이러한 이유로 아로니아 열매는 천연 항산화제 성분이 많은 기능성 식품으로 인식되고 있다. 또한 아로니아 열매에 함유된 플라보노이드는 중앙세포의 증식을 억제하는 항암활성을 지니는 것으로 보고되었으며(3), 아로니아 열매의 폴리페놀은 면역세포에 대해 면역조절작용을 지니는 것으로 알려져 있다(4). 이외에도 아로니아 열매는 항산화 활성과 관련되어 위궤양에 대한 보호활성과 혈당

조절 활성 등 실로 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다(5,6). 하지만 아로니아 추출물의 항염증 활성에 대해서는 세균 내 독소에 의해 유발된 포도막염에 대한 억제 효과만이 보고되어 있을 뿐(7) 면역세포의 염증반응에 대한 아로니아 열매의 조절작용은 아직 잘 알려지지 않았다.

염증은 외부 병원체나 항원 혹은 생체 내 자극물질에 대한 생체 방어반응으로 cytokines, prostaglandin E2(PGE2), lysosomal enzymes, free radical 등 다양한 매개물질들이 관여한다(8,9). 염증반응에 관여하는 면역세포 중 하나인 대식세포는 외부자극에 반응하여 염증반응을 일으키는데 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin(IL)-6, IL-1 $\beta$ 와 같은 전염증성 cytokine을 생성한다. 또한 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 생성되는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 생성되는 PGE2 등의 염증유발인자들도 생성된다(9-13). 일반적인 iNOS에 의한 NO 생성은 세균이나 종양을 제거하는 역할을 하지만 과도한 생성은 염증을 유발하여 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(14,15).

한편 lipopolysaccharide(LPS) 자극에 의해 대식세포로부터 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 대식세포와 호중구를 활성화시켜 단백질 분해효소, 산화제, IL-1 및 IL-6의 분비를 촉진하며,

Received 16 September 2014; Accepted 20 November 2014

Corresponding author: Yung Choon Yoo, Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

E-mail: yc\_yoo@konyang.ac.kr, Phone: +82-42-600-6495

혈관내피세포의 투과성을 증가시켜 부종과 항응고 작용을 초래하는 것으로 알려져 있다(16-20).

본 연구에서는 아로니아의 항염증 활성을 조사하기 위하여 열수에 의해 추출한 아로니아 열매 추출물(AF-H)을 이용하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 유도한 염증반응에 대해 AF-H가 미치는 억제 효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 아로니아 열매 열수 추출물(AF-H)의 제조

본 연구에 사용한 아로니아 열매는 피노키오 농원(Yeongcheon, Korea)으로부터 구입하였다. 아로니아 열매를 세척하고 건조한 후 건조된 열매 50 g에 3차 증류수 500 mL를 넣어 70~72°C에서 stirring 하면서 12시간 추출하였다. 추출액을 여과(Whatman filter paper No.1, GE Healthcare, Leuven, Belgium)한 후 동결건조 하여 5.9 g의 분말을 얻었다. 실험에 사용할 아로니아 열매 열수 추출물(AF-H)은 3차 증류수로 100 mg/mL의 농도로 녹인 후 pore size 0.4 mm의 filter로 여과한 후 -20°C에 보관하였다.

### 세포배양

실험에 사용된 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)을 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포배양배지는 세포가 80% 이상 자란 시점에서 2~3일마다 교환하였다.

### 동물실험

본 연구에 사용한 C57BL/6 마우스는 라온바이오(Yongin, Korea)에서 구입하였으며 건양대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 규정에 따라 사육, 관리하며 실험에 사용하였다.

### 세포독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 AF-H의 세포독성은 MTT법을 이용한 cell viability assay를 통해 측정하였다. AF-H를 0~500 µg/mL의 농도가 되도록 세포배양배지로 희석하여 RAW 264.7 세포( $5 \times 10^4$  cells/well)에 첨가하고 12시간 전처리 하였다. 그 후 LPS(*E. coli* serotype 055:B5; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 1 µg/mL로 세포에 첨가하여 24시간 동안 염증반응을 유도하였다. 배양 후 MTT 용액(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하고 2시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 대조군에 대한 흡광도의 차를 백분율로 표시하여 비교 분석하였다.

### NO, PGE2 및 cytokine 정량

RAW 264.7 세포를 LPS로 24시간 자극한 후 배양액 중에 분비된 NO의 농도는 NO 정량키트(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 정량하였다. 또한 세포배양액 중에 분비된 PGE2 및 사이토카인은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였다.

### Western blot

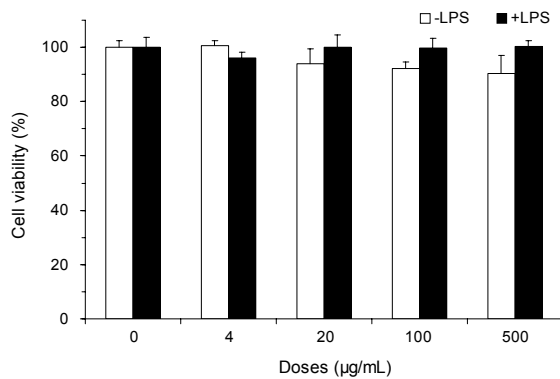
iNOS와 COX-2의 세포 내 발현은 Western blot에 의해 분석하였다. AF-H를 전처리 한 RAW 264.7 세포( $1 \times 10^6$ )를 LPS(1 µg/mL)로 자극한 후 세포를 회수하여 RIPA buffer(protease and phosphatase inhibitor cocktail; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 4°C에서 30분간 처리하였다. LPS 자극은 iNOS 및 COX-2 분석에는 6시간, mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 nuclear factor-κB(NF-κB) 분석에는 15분간 수행하였다. 원심분리 한 후 상층액을 얻고 BCA protein assay(Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 그 후 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) gel에 각 lane당 30 µg의 세포 단백질을 넣어 전기영동 하고, gel 내의 단백질을 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 transfer 하였다. PVDF 막을 5% skim milk(Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 blocking 하고, IκB, p38, extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun-N-terminal kinase(JNK), phosphorylated IκB(p-IκB), phosphorylated p38(p-p38), phosphorylated ERK(p-ERK), phosphorylated JNK(p-JNK) 각각에 대한 항체(R&D Systems)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 각 항체에 대한 2차 항체인 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated antibody(R&D Systems)를 반응시킨 후 ECL kit을 이용하여 각 band를 발현시켜 관찰하였다. 각 band의 발현은 densitometer를 이용하여 분석하였다.

### LPS에 의한 *in vivo* 패혈증 실험

급성염증반응 모델로서 LPS 투여에 의한 마우스 패혈증 모델을 이용하여, AF-H의 *in vivo* 항염증 활성을 측정하였다. 패혈증은 C57BL/6 마우스(7주령, 암컷)에 LPS를 치사량인 20 mg/kg으로 정맥주사 하여 유도하였고, 12시간 간격으로 생존율을 관찰하였다. AF-H는 LPS를 투여하기 48시간, 24시간 그리고 4시간 전에 마우스당 1 혹은 2 mg씩 경구투여 하였다. AF-H에 의한 패혈증 억제 효과는 LPS 투여 후 60시간까지의 생존율을 비교하여 판정하였다.

### 통계분석

본 연구에서 얻어진 실험결과의 통계분석은 Student's two-tailed t test에 의해 대조군에 대한 통계학적 유의차를



**Fig. 1.** Cytotoxicity of AF-H (hot water extract of Aronia fruits) in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells ( $5 \times 10^4$ /well) were treated with the indicated doses of AF-H for 12 h prior to 24 h incubation with LPS (1 µg/mL). Cytotoxicity of the cells was measured by MTT assay.

통해 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### AF-H의 세포독성

AF-H의 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 MTT법에 의해 측정된 결과 AF-H는 0~500 µg/mL의 농도까지 RAW 264.7 세포에 대해 세포독성을 유발하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이후의 실험은 AF-H의 안전한 농도인 500 µg/mL 이하에서 수행하였다.

### AF-H의 NO 및 PGE2 생성 억제

AF-H의 항염증 활성을 측정하기 위하여 먼저 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 있어서 AF-H 처리가 대표적인 염증매개인자인 NO와 PGE2 분비를 억제하는가를 조사하였다. 그 결과 AF-H를 세포독성을 나타내지 않는 안전한 농도에서 처리한 경우 LPS 자극에 의해 유발된 NO 및 PGE2의 생성을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 또한 LPS 자극에 의해 NO와 PGE2가 생성될 때에 이들

염증매개인자를 생합성하는 효소인 iNOS와 COX-2의 세포 내 발현을 Western blot에 의해 조사한 결과, AF-H(100 µg/mL) 처리에 의해 이들 생합성 효소의 발현이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과로부터 AF-H에 의한 NO 및 PGE2 생성 억제효과는 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 의한 것으로 추정되었다.

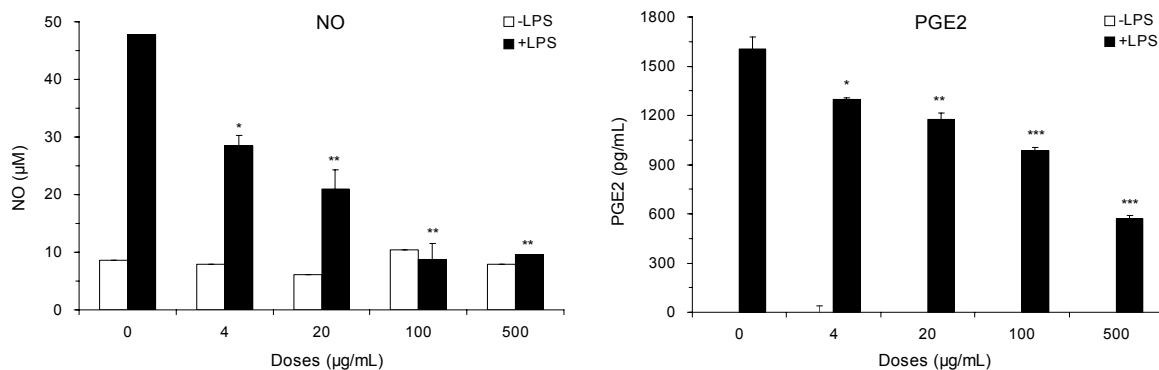
### TNF- $\alpha$ 및 IL-6 측정

대식세포가 LPS 자극에 의해 염증을 유발할 때에 TNF- $\alpha$  및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 분비하며, 이들 사이토카인은 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(16). 본 연구에서는 AF-H 처리가 이들 염증성 사이토카인의 분비를 억제하는지를 조사하였다. 그 결과 AF-H는 적어도 4 µg/mL의 농도로부터 처리 농도에 의존하여 이들 사이토카인의 생성을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되어(Fig. 4), 염증성 사이토카인 분비에 있어서 높은 억제활성을 지니는 것으로 나타났다. Fig. 3과 Fig. 4의 결과로부터 AF-H는 NO, PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 염증매개인자의 생성을 억제하여 항염증 활성을 유도하는 것으로 사료되었다.

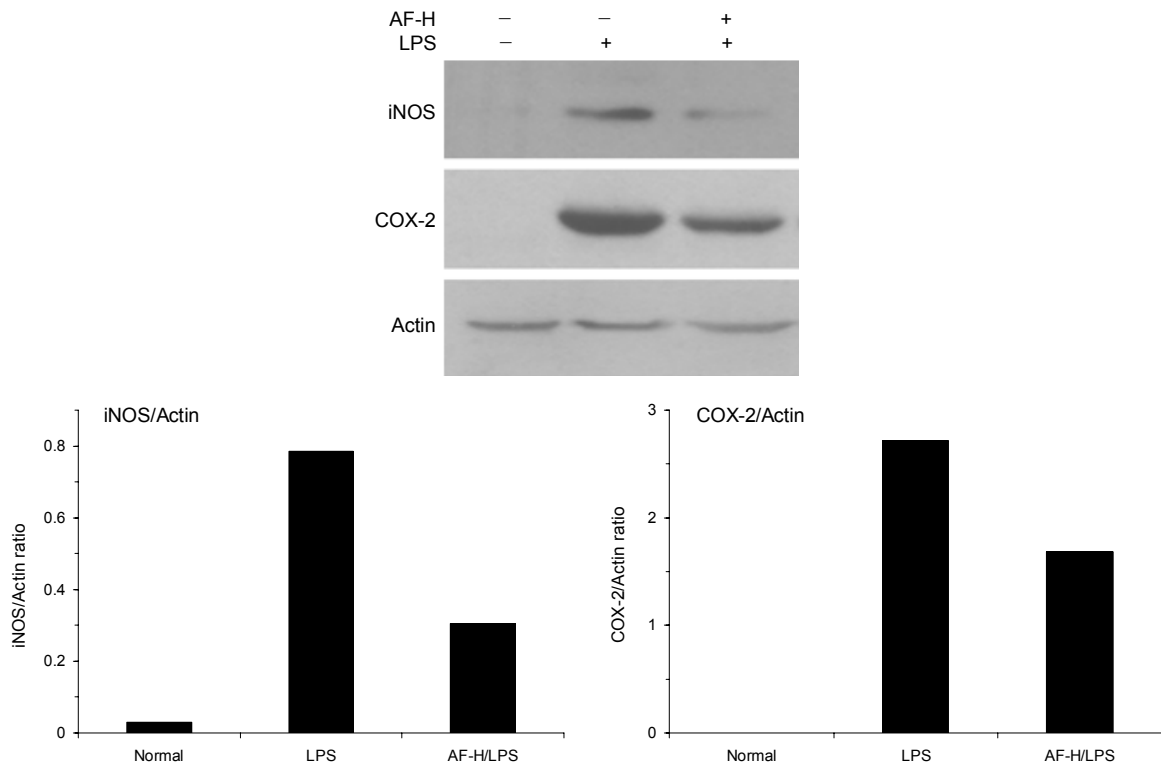
### MAPK 및 NF- $\kappa$ B 억제활성

MAPK는 세포의 성장, 분열, 스트레스나 사이토카인에 의한 세포반응의 조절 등에 중요한 역할을 하며(21), ERK, JNK, p38 등 최소한 3가지의 신호전달경로가 있는 것으로 알려져 있다(22). 이들 분자에 의한 신호전달은 LPS나 TNF- $\alpha$ 와 같은 면역 염증자극에 반응하여 세포 내에서 활성화되어 세포의 형태 변화와 사이토카인 전사 등을 초래한다(23). 본 연구에서는 AF-H에 의한 항염증 활성이 MAPK 조절과 관련 있는가를 조사하였다. 그 결과 LPS 자극에 의한 p38, ERK 및 JNK 등 MAPK의 활성화에 대해 AF-H는 유의한 억제 효과를 보이지는 않았다(Fig. 5).

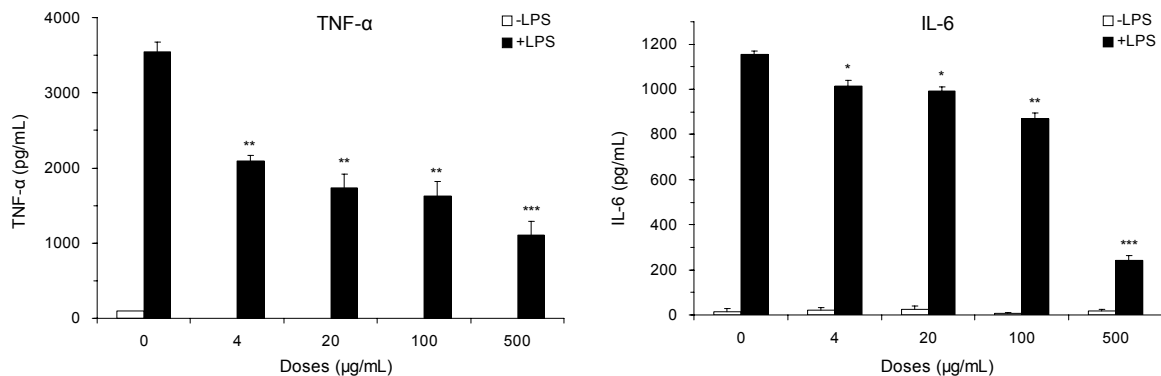
한편 NF- $\kappa$ B는 외부로부터의 자극에 의해 사이토카인, 케모카인, 성장인자 등 다양한 분자의 세포 내 합성을 조절하는 전사인자이다. NF- $\kappa$ B는 세포질에서 I $\kappa$ B와 결합되어 불활성화 상태로 존재하나, I $\kappa$ B가 LPS와 같은 자극원에 의



**Fig. 2.** Inhibitory effect of AF-H on NO and PGE2 production from LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The level of NO and PGE2 was determined by NO detection kit and ELISA kit respectively. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the control by Student's two-tailed t test.



**Fig. 3.** Effect of AF-H on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Total cellular proteins were obtained 6 h after LPS treatment for detection of iNOS and COX-2. The level of expression of iNOS and COX-2 was measured by Western blot. Actin was used as an internal control in a densitometric analysis. This result is the representative of almost same results from two independent experiments.



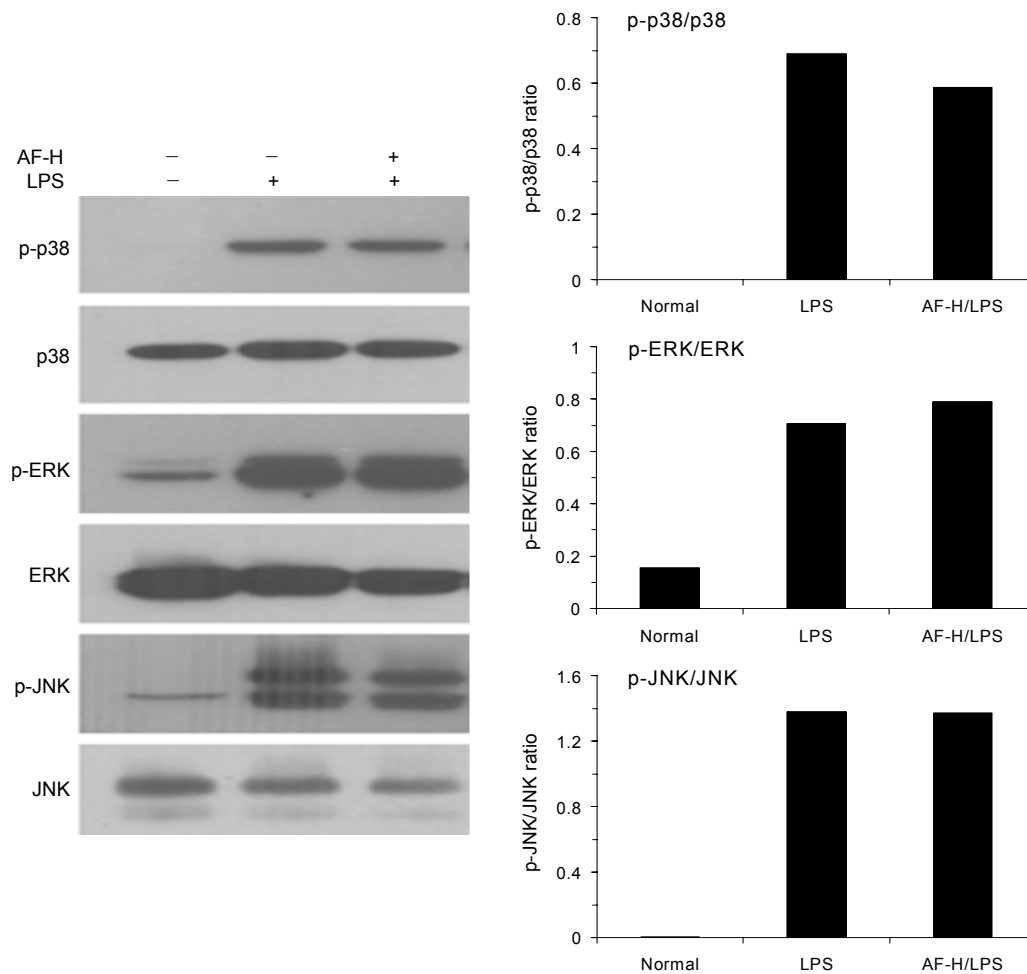
**Fig. 4.** Inhibitory effect of AF-H on TNF- $\alpha$  and IL-6 production from LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The level of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the supernatants of RAW 264.7 cells was determined by ELISA kits. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001; compared with the control by Student's two-tailed t test.

해 인산화될 경우 I $\kappa$ B로부터 유리되어 핵 내로 이동하여 iNOS, COX-2 및 염증 사이토카인을 합성을 촉진하게 된다 (24). AF-H의 항염증 활성이 NF- $\kappa$ B 활성화 억제에 의한 것인가를 확인하기 위하여 AF-H(100 µg/mL)를 전처리 하고, LPS를 자극한 RAW 264.6 세포에서 I $\kappa$ B 인산화에 대한 AF-H의 영향을 조사하였다. 그 결과 AF-H 전처리에 의해 I $\kappa$ B의 인산화가 현저하게 억제되었으며 인산화되지 않은 I $\kappa$ B의 세포질 내 발현량은 정상치(대조군)에 가깝게 유지되는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이들 결과를 종합해 보면 아

로니아 열매 열수 추출물인 AF-H는 LPS 자극에 의해 유발 되는 대식세포 염증반응에 대해 MAPK 활성화에는 그다지 영향을 미치지 않지만 I $\kappa$ B의 인산화를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하고, 결과적으로 NO, PGE2, 염증성 사이토카인 등의 생성을 억제하여 항염증 활성을 나타내는 것으로 사료되었다.

**패혈증 억제 활성**

AF-H에 의한 항염증 활성을 *in vivo* 모델에서 확인하기



**Fig. 5.** Effect of AF-H on MAPK activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Total cellular proteins were harvested 15 min after LPS stimulation. Phosphorylation of p38, ERK, and JNK was determined by Western blot as described in Materials and Methods. Non-phosphorylated proteins were used as internal controls in a densitometric analysis. This result is the representative of almost same results from two independent experiments.

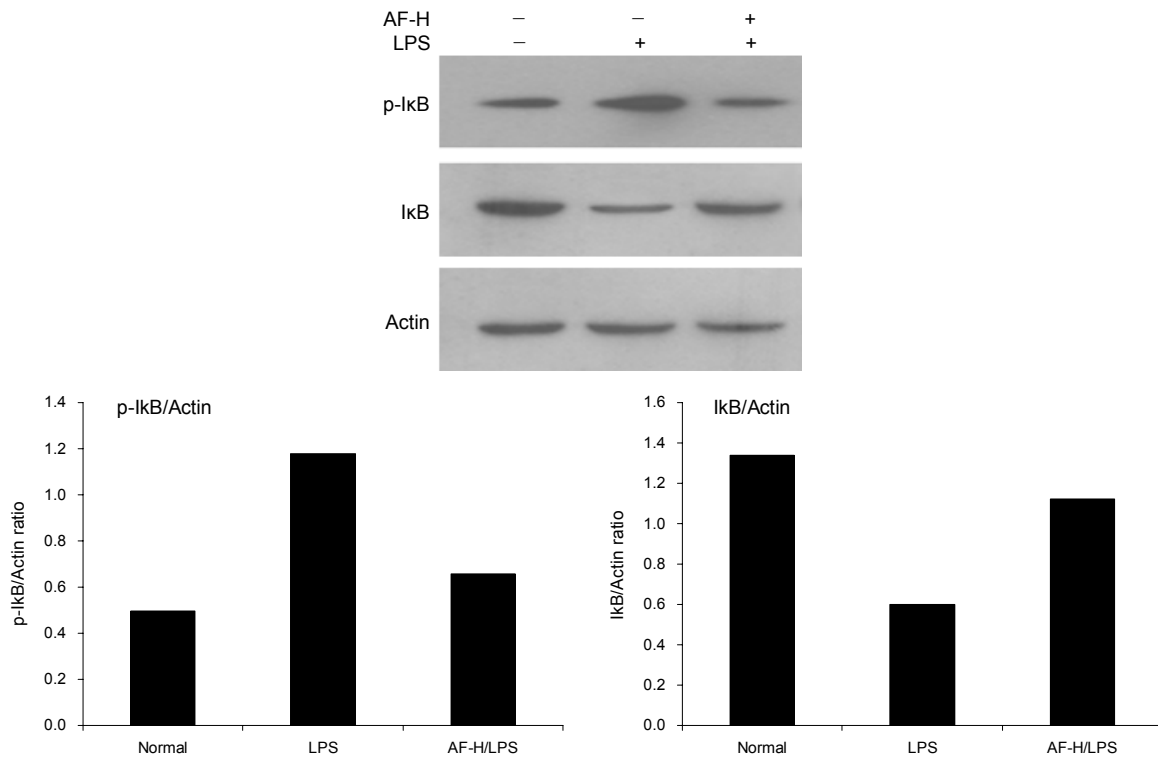
위하여 20 mg/kg의 LPS를 C57BL/6 마우스에 정맥주사하여 치명적인 중독증을 유발하는 패혈증 실험모델을 이용하였다. 이 모델에서 AF-H는 LPS 처리 전에 3회(LPS 투여 48, 24 및 4시간 전) 경구투여 하였다. 그 결과 LPS 투여군에서는 LPS 투여 36시간 후에 전례가 사망하였으나 AF-H를 경구투여 한 그룹에서 60시간 후까지 20%가 생존하였다. 하지만 이러한 생존율의 증가에서는 통계학적 유의차는 인정되지 않았다. 한편 50% 사망률을 나타낸 시간을 비교해보면 LPS 투여 대조군은 24시간, AF-H 1 mg 투여군은 50시간, AF-H 2 mg 투여군은 42시간으로 AF-H 투여에 의해 50% 사망률의 연장 효과가 관찰되었다(Fig. 7).

이상의 결과를 종합해 보면 AF-H는 LPS 자극에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포의 염증반응에 대해 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제를 통해 염증매개인자의 mRNA 발현과 유전자산물의 분비를 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 AF-H는 비록 통계학적으로 유효하지는 않으나 *in vivo* 실험계에서 LPS에 의한 치명적 패혈증을 부분적으로 억제하는 활성을

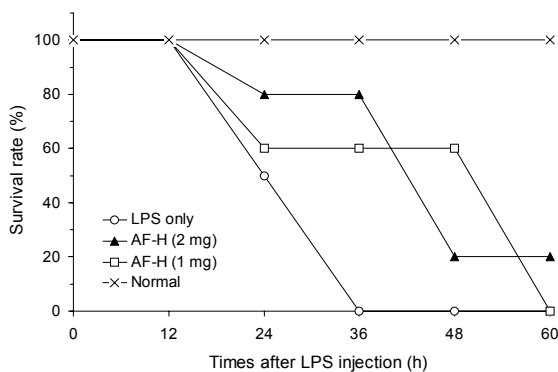
가지는 것으로 나타났다. 본 연구에 사용한 아로니아 추출물이 열수에 의한 추출임을 감안할 때 이러한 항염증 활성은 단백질 성분이 아닌 비단백 성분에 의한 가능성이 높으며, 현재 유기용매를 이용한 추출과 추출물의 분획화를 통해 활성분자를 동정하기 위한 연구를 진행 중이다.

## 요 약

본 연구에서는 아로니아 열매 추출물(AF-H)의 항염증 활성을 조사하기 위하여 LPS 자극에 의해 유도된 RAW 264.7 macrophage의 염증반응에서 AF-H의 염증매개인자 및 염증성 사이토카인 분비 억제활성과 이에 관련된 세포 내 작용기전 해석을 수행하였다. LPS(1  $\mu$ g/mL)로 RAW 264.7 세포를 24시간 자극하는 염증모델에서 세포독성을 나타내지 않는 안전한 농도의 AF-H(0~500  $\mu$ g/mL)를 LPS 처리 12시간 전에 처리하여 NO 및 PGE2의 분비 억제활성을 측정하였다. 그 결과 AF-H 처리에 의해 NO와 PGE2의 생성이



**Fig. 6.** Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by AF-H in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. NF- $\kappa$ B activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells was measured by detecting I $\kappa$ B phosphorylation by Western blot 15 min after LPS stimulation. Actin was used as an internal control in a densitometric analysis. This result is the representative of almost same results from two independent experiments.



**Fig. 7.** Effect of AF-H on LPS-induced endotoxemia in mice. Five or six C57BL/6 mice per group were injected intravenously with LPS (20 mg/kg), and the survival rate of the mice was measured for up to 60 h after LPS injection. AF-H was administered orally 48, 24, and 4 h before LPS injection.

처리 농도에 의존하여 유의하게 억제되었으며, 이들 염증매개인자의 생합성 효소인 iNOS 및 COX-2의 세포 내 발현도 현저하게 억제되는 것으로 관찰되었다. 또한 AF-H의 처리에 의해 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비도 유의하게 억제되는 것으로 확인하였다. 이러한 AF-H에 의한 항염증 활성의 세포 내 기전을 해석하기 위하여 LPS 자극에 의해 유도되는 MAPK와 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화에 대한 억제 효과를 조사하였다. 그 결과 AF-H는 MAPK의 인산화

에는 별다른 영향을 미치지 않고 NF- $\kappa$ B의 활성화(I $\kappa$ B 인산화)를 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 한편 LPS에 의한 *in vivo* 패혈증 모델에서 AF-H에 의한 패혈증 억제활성을 측정된 결과 비록 통계학적으로 유의하지는 않으나 AF-H 투여에 의해 생존율과 50% 사망률의 연장 효과가 관찰되었다. 이들 결과를 종합해 보면 아로니아 열매 열수 추출물은 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제를 통해 NO, PGE2, TNF- $\alpha$  및 IL-6 등의 염증매개인자와 사이토카인의 생성을 억제하는 항염증 활성을 지니는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업(No. 112078-3)과 미래창조과학부 재원 한국연구재단 방사선기술개발사업(2012-M2A2A6011335)에 의해 수행되었습니다.

## REFERENCES

1. Tanaka T, Tanaka A. 2001. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 48: 606-610.
2. Hudec J, Bakosy D, Mravec D, Kobida L, Burdovna L, Turianica I, Hlusyck J. 2006. Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melano-*

- carpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators. 2006. *J Agric Food Chem* 54: 3625-3628.
3. Sueiro L, Yousef GG, Seigler D, DE Mejia EG, Grace MH, Lila MA. 2006. Chemopreventive potential of flavonoid extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) fruits. *J Food Sci* 71: C480-C488.
  4. Ho GT, Braunlich M, Austarheim I, Wangenstein H, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H. 2014. Immunomodulating activity of *Aronia melanocarpa* polyphenols. *Int J Mol Sci* 15: 11626-11636.
  5. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. 2010. Aronia plant: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food* 13: 255-269.
  6. Niedworok J, Jankowska B, Kowalczyk E, Charyk K, Kubat Z. 1997. Antiulcer activity of anthocyanin from *Aronia melanocarpa* Elliot. *Herba Polonica* 43: 222-227.
  7. Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S. 2005. Anti-inflammatory effect of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 275-281.
  8. Han S, Lee JH, Kim C, Nam D, Chung WS, Lee SG, Ahn KS, Cho SK, Cho M, Ahn KS. 2013. Capillarasin inhibits iNOS, COX-2 expression, and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 35: 34-42.
  9. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. 1994. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in *ex-vivo* xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int* 7 (Suppl 1): S647-S649.
  10. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
  11. Neuman MG, Nanau RM. 2011. *In vitro* anti-inflammatory effects of hyaluronic acid in ethanol-induced damage in skin cells. *J Pharm Pharm Sci* 14: 425-437.
  12. Shao DZ, Lin M. 2008. Platonin inhibits LPS-induced NF-kappaB by preventing activation of Akt and IKKbeta in human PBMC. *Inflamm Res* 57: 601-606.
  13. Song C, Zhang Y, Dong Y. 2013. Acute and subacute IL-1 $\beta$  administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 10: 59.
  14. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178: 749-754.
  15. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
  16. Tsai ML, Lin CC, Lin WC, Yang CH. 2011. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1977-1983.
  17. Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG. 2009. *Abies koreana* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. *Lipids* 44: 471-476.
  18. Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG. 2009. *Cryptomeria japonica* essential oil inhibits the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Pol J Microbiol* 58: 61-68.
  19. Lee DH, Sohn DS, Cho DY, Kim BJ, Lim YY, Kim YH. 2010. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of *Sophora flavescens* root extraction in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *Korean J Med Mycol* 15: 39-50.
  20. Kwak JH, Kim IH. 1974. Studies on the anti-inflammatory activity of *Caragana chamlagu* roots. *Kor J Pharmacogn* 5: 179-184.
  21. Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
  22. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.
  23. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK. 2005. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50: 235-246.
  24. Majdalawieh A, Ro HS. 2010. Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  function and NF- $\kappa$ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm* 2010: 823821.