

Raw 264.7 세포에서 섬바디나물 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과

이진영¹, 유단희¹, 주다혜¹, 채정우^{2*}

¹호서대학교 한방화장품과학과

²(재)경기도산림환경연구소

Received: October 27, 2016 / Revised: November 23, 2016 / Accepted: November 23, 2016

Inhibitory Efficacy of *Dystaenia takeshimana* Extract on iNOS, COX-2 Protein and mRNA Expression in Raw 264.7 Cell

Jin-Young Lee¹, Dan-Hee Yoo¹, Da-Hye Joo¹, and Jung-Woo Chae^{2*}

¹Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 31499, Republic of Korea

²Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Republic of Korea

In this study, the anti-inflammatory activities of the 80% ethanol extract of *Dystaenia takeshimana* (DT) were investigated using Raw 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS). The effect of DT extract on the production of pro-inflammatory factors (iNOS, COX-2) in LPS-stimulated Raw 264.7 macrophages was examined. The cytotoxic effect of DT extract on macrophage cells (Raw 264.7) was examined by the 3-[4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay. Treatment with DT extract showed 100% or more cell viability at the concentration 1,000 µg/ml. The inhibitory effect of DT extract on protein expression of inducible NOS (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) was measured by western blotting using the concentrations 50, 100, and 500 µg/ml, with β-actin used as the positive control. Consequently, the protein expression of iNOS, and COX-2 as observed by western blotting, was decreased by 56%, 61.6%, respectively with 500 µg/ml DT extract. Inhibition of iNOS and COX-2 mRNA expression was measured by reverse transcription- polymerase chain reaction (PCR) using DT extract concentrations 50, 100, and 500 µg/ml, with GAPDH used as a positive control. Consequently, the mRNA expression of iNOS and COX-2 as observed by reverse-transcription-PCR was decreased by 77.9% and 83.3%, respectively at 500 µg/ml concentration of DT extract. In conclusion, DT extract may affect inflammatory factors as a potential anti-inflammatory agent.

Keywords: *Dystaenia takeshimana* extract, anti-inflammatory, iNOS, COX-2

서 론

염증은 체내의 세포가 물리적 충격이나 세균 감염 등의 자극에 의한 피부 손상으로부터 인체를 보호하기 위해 반응하는 생체 방어기전이다[12]. 염증 반응은 면역계의 활성화를 통한 초기 단계로서 단기간 치료가 가능한 급성 염증(acute inflammation)과 지속적인 독성 요인에 부적절하게 반응하여 과도한 방어 반응으로 염증 반응이 지속되는 만성 염증(chronic

inflammation)으로 나눌 수 있다[20]. 최근 현대 사회의 산업 발달로 인해 환경 변화 및 그에 따른 스트레스 등 여러 가지 요인으로 인해 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속됨에 따라 아토피, 천식, 등의 만성 염증 질환이 증가하고 있다[4, 21]. 체내에서 염증 반응의 조절은 비정상적인 자극에 대하여 다양한 면역 세포가 관여하지만[17] 그 중 대식세포는 선천 면역뿐만 아니라 획득 면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 대식 세포는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 일산화질소(NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 해 광 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증 촉진 인자들을 생성한다[5]. 또한 그람 음성균의 세포벽에서

*Corresponding author

Tel: +82-31-8008-6658, Fax: +82-31-374-2492

E-mail: forest1004@korea.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

부터 분리한 내 독소이며, 염증 유도물질인 lipopolysaccharide (LPS)는 LPS binding protein (LBP)와 복합체를 이뤄 대식세포의 toll-like receptor 4 (TLR4)를 자극하여 MAPKs와 NF- κ B의 활성화를 유도하며[18], 활성화된 신호전달경로는 염증성 매개인자들의 발현을 유도하고, 그 염증 매개인자들은 인체에 여러 염증 질환을 발병시킨다[15]. 지금까지 스테로이드제 및 아스피린, 페닐부타존 등과 같은 비스테로이드성 항염제는 임상적으로 염증을 억제하는 약물로 널리 사용되어왔지만 간 손상, 성장 억제, 위장관 출혈 등의 많은 부작용을 초래하고 제한성이 있다[19]. 따라서 많은 연구자들은 계속해서 보다 안전하고 효과적으로 항염 효과를 지니는 천연 소재의 항염증 물질을 찾고자 노력하고 있다.

섬바디(*Dystaenia takeshimana*)는 쌍떡잎식물 층층나무목 산형과에 속하는 다년생 초본으로 전남(무등산), 충남(안면도), 경기(용문산)를 비롯하여 주로 울릉도에 자생하고 있는 우리나라 특산식물의 하나로, 일본인 나카이(Nakai)가 처음 발견하여 일본 학회에 보고된 후 계속된 연구를 통해 우리나라 울릉도에서만 자생하는 특산 식물로 밝혀졌으며 울릉도에서는 돼지가 잘 먹는다고 돼지풀이라 하고 민간에서는 울릉강활이라 하여 강활과 같은 용도로 쓰이는 일도 있다[6, 14]. 높이가 2 m에 달하며 4-5개의 마디가 있으며 윗부분에서 가지가 갈라진다. 잎은 어긋나고 3개씩 2회 갈라지며 잎자루가 길고 밑부분이 넓어져 원줄기를 감싼다. 꽃은 7-8월에 피는데 3-4 mm로 꽃잎은 5장이고 산형화서를 형성하고, 열매는 8-9월에 익는다[2, 11, 13]. 울릉도에서는 어린 나물을 먹었으며, 지금까지도 즐겨먹는 산나물 중 하나이다. 섬바디는 청열, 해독, 산풍, 소담 등에 효능이 있으며, 뿌리를 약초로써 풍열두통, 담열천, 구역, 홍경만민을 치료하는데 사용하였다[9, 16]. 이에 본 연구에서는 섬바디나물 추출물을 이용하여 LPS로 활성화된 대식세포에서 염증매개물질들의 생성 억제 효과를 확인함으로써, 항염증 활성을 갖는 천연 소재로의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 준비

실험에 사용된 섬바디나물은 울릉도에서 채취하였으며, 열풍건조 후 분쇄하였다. 분쇄한 시료에 시료 중량의 10배 양의 80% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결건조하여 -20°C 에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

세포 배양

세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C , 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael [1]의 방법에 따라 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포생존율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cell로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[3]에 따라 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2 의 형태로 측정하였다. 6 well plate에 Raw 264.7 cell을 1×10^5 cell/well로 분주하였다. 37°C CO_2 incubator에서 24시간 배양한 이후 1X phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척한다. LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 normal을 제외하고 처리한 후 2시간 이후 농도 별로 조제한 시료용액을 처리하여 24시간 배양한 후 상등액을 얻은 후, 동량의 griess 시약을 첨가하여 96 well plate에서 10분 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{No 억제능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

iNOS, COX-2의 활성을 확인하기 위하여 cell line Raw 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 2시간 처리해 준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한

후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. Complete mini 1 tab을 가한 100 μ l로 Radio-immuno-precipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 용해하여 4 $^{\circ}$ C 16,110 \times g에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit로 정량하였으며, 20 μ l의 단백질을 10% acrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기(BIORAD)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. iNOS, COX-2, β -actin의 1차 항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. iNOS와 COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit, β -actin의 2차 항체는 anti-mouse를 사용하고 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 washing한 후 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding하여 24시간 동안 배양한 후 LPS를 1 μ g/ml 농도로 2시간 처리해준 뒤 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 μ l를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 16,110 \times g에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μ l가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 16,110 \times g에서 20분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 16,110 \times g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조하였다.

DEPC를 처리한 증류수를 50 μ l씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μ l와 멸균수 195 μ l를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μ g/ml) 1 μ l, 추출한 RNA (2 μ g)와 nuclease free water로 10 μ l를 맞추고 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 5 \times reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green GoTaq

flexi buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. GAPDH, iNOS는 96 $^{\circ}$ C에서 2분, 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 64 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분(40 cycles), COX-2는 96 $^{\circ}$ C에서 2분, 94 $^{\circ}$ C에서 10초, 51 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분(40 cycles)을 실행하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 40분간 전기영동한 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

대식세포(Raw264.7)의 생존율 확인

섬바디나물 추출물에 의한 대식세포(Raw264.7)의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 섬바디나물 추출물이 LPS로 유도된 macrophage cell의 세포 독성을 측정된 결과 1,000 μ g/ml의 농도에서 100% 이상의 높은 세포 생존율을 나타낸 반면에 대조군인 Vit. C는 같은 농도인 1,000 μ g/ml의 농도에서 60%의 세포 생존율을 나타내었다.

따라서 이하의 western blot 및 RT-PCR을 이용한 단백질

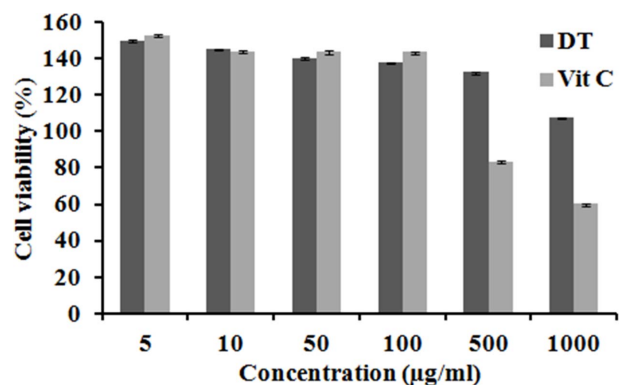


Fig. 1. Cell viability of extract from *Dystaenia takeshimana* on macrophage cell (Raw264.7). After Raw 264.7 cells (5×10^4 cells) were started in medium for 24 h the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 μ g/ml of extracted of *Dystaenia takeshimana* for 24 h. Results are means \pm S.D. of triplicate data.

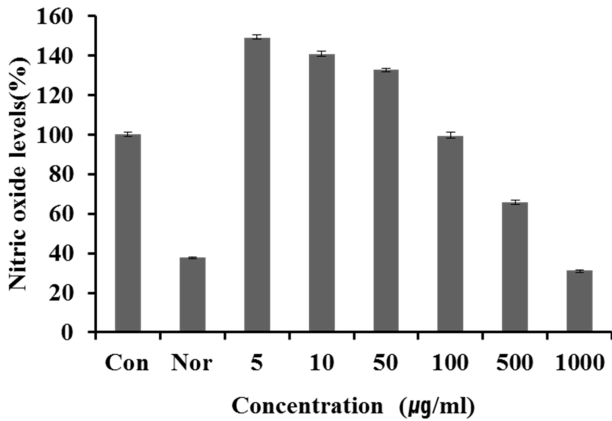


Fig. 2. Effect of *Dystaenia takeshimana* extract on production of nitric oxide in RAW 264.7 cell. Effect of 80% ethanol extracts of DT on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells) were treated with DT 80% ethanol extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h. NO production was determined in culture supernatant by griess reagent. Con: control, in Raw 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in Raw 264.7 cells not treated with LPS. Results are means \pm S.D. of triplicate data.

및 mRNA 발현 억제 실험은 대조군인 Vit. C의 세포 독성을 고려하여 Vit. C에서 80% 이상의 세포 생존율을 보인 50, 100, 500 µg/ml의 농도에서 실험을 진행하였다.

Nitric oxide (NO) 저해활성 측정 결과

본 연구에서는 활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 섬바디나물 추출물의 효과를 알아보았다. 그 결과 Fig. 2와 같이 LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현량을 나타내었으며, 섬바디나물 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 가장 높은 농도인 1,000 µg/ml에서 31.4%의 저해율을 나타낸 것을 확인하였으며, 대식 세포 주에서의 염증발현을 억제시키는 것에 섬바디나물 추출물이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과 측정

염증유발 인자인 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 western blot을 이용하여 실험하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β -actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 3, 4과 같이 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 대조군 Vit. C보다 섬바디

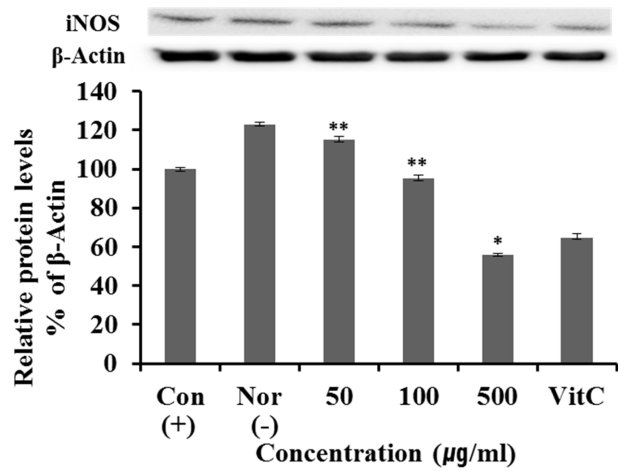


Fig. 3. iNOS protein expression rate of extract from *Dystaenia takeshimana* on macrophage cell (Raw264.7). After Raw 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 50, 100 and 500 µg/ml of extract from *Dystaenia takeshimana* for 24 h. Con: control, in Raw 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in Raw 264.7 cells not treated with LPS. Results are means \pm S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

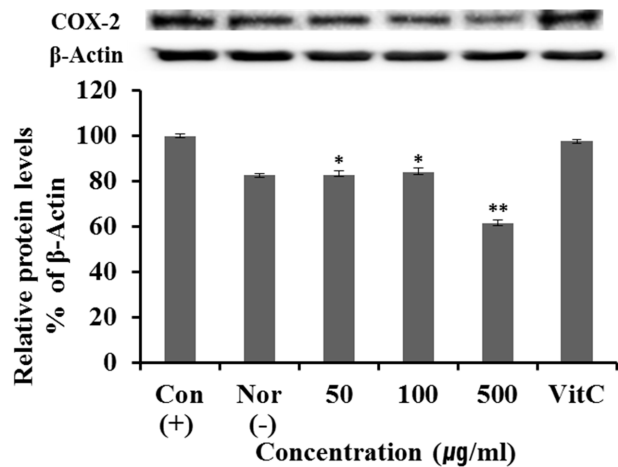


Fig. 4. COX-2 protein expression rate of extract from *Dystaenia takeshimana* on macrophage cell (Raw264.7). After Raw264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 50, 100 and 500 µg/ml of extract from *Dystaenia takeshimana* for 24 h. Con: control, in Raw 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in Raw 264.7 cells not treated with LPS. Results are means \pm S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

나물 추출물에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 더 억제되었음을 확인할 수 있었다.

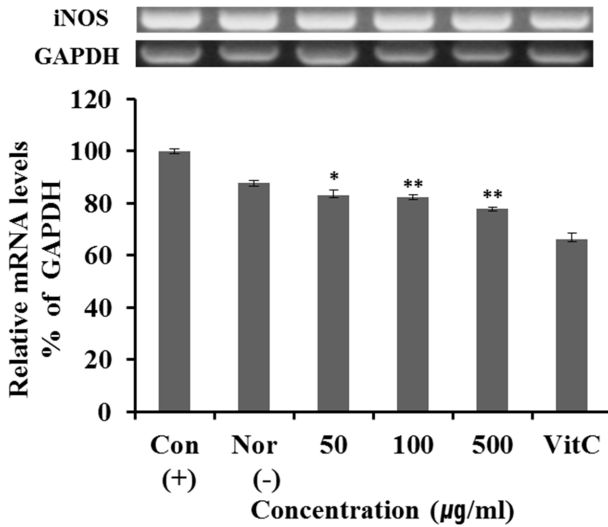


Fig. 5. iNOS mRNA expression rate of extract from *Dystaenia takeshimana* on macrophage cell (Raw264.7). After Raw264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 50, 100 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of extract from *Dystaenia takeshimana* for 24 h. Con: control, in Raw 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in Raw 264.7 cells not treated with LPS. Results are means \pm S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

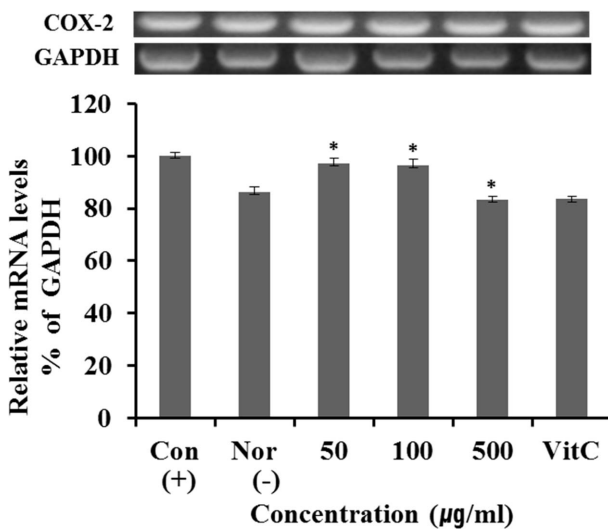


Fig. 6. COX-2 mRNA expression rate of extract from *Dystaenia takeshimana* on macrophage cell (Raw264.7). After Raw264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 50, 100 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of extract from *Dystaenia takeshimana* for 24 h. Con: control, in Raw 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in Raw 264.7 cells not treated with LPS. Results are means \pm S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 1. Sequence of the primers used for PCR.

Gene	Primer	Sequence (5' \rightarrow 3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
COX-2	Sense	GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT
	Anti-sense	ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA
iNOS	Sense	AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT
	Anti-sense	GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC

RT-PCR을 통한 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 억제 효과 측정

염증유발 인자인 iNOS, COX-2 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 5, 6과 같이 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 mRNA 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 대조군 Vit. C보다 섬바디나물 추출물에서 iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 유사하거나 억제되었음을 확인할 수 있었다.

iNOS 억제 활성을 가진 천연물질 탐색을 위한 과거 연구에서 섬바디나물 추출물은 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제하는 바 있으며[7, 10], Kim 등은 섬바디나물 뿌리 메탄올 추출물의 핵산 분획물과 에틸 아세테이트 분획물에서 분리한 쿠마린 및 플라보노이드가 COX-2와 5-lipoxygenase (5-LOX) 이중억제 활성을 가지며, 섬바디나물의 소염 작용은 eicosanoid의 생성 억제를 통해 부분적으로 일어날 수 있다고 보고한 바 있다[8]. 이러한 사실을 종합하였을 때 섬바디나물은 항염증 소재로서의 가능성이 있다고 판단된다.

요 약

본 연구에서는 섬바디 나물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증을 유도한 Raw 264.7 세포에 대한 섬바디나물 80% 에탄올 추출물의 효과를 살펴보았다. 섬바디나물 추출물을 LPS로 유도된 Raw 264.7 대식세포에서 전염증성 인자(iNOS, COX-2)들을 생성하여 측정하였다. 섬바디나물 추출물의 대식세포에서의 세포 독성 측정을 MTT를 수행하였다. 섬바디나물 추출물의 세포 독성을 측정된 결과, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 보였다. 섬바디나물 추출물의 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 western blot을 통해 측정하였고, 양성대조군으로는 β -actin을 사용하였다. 그 결과, 섬바디나물 추출물을 western blot을 통해 측정된 iNOS, COX-2의 단백질 발현 억제 효과는

500 µg/ml 농도에서 각각 56%, 61.6%로 감소하였다. 섬바디 나물 추출물의 50, 100, 500 µg/ml 농도에서 iNOS, COX-2의 mRNA의 발현억제 효과를 측정하기 위해 RT-PCR을 통해 측정하였으며, 양성 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과, 섬바디 나물 추출물을 RT-PCR을 통해 iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제 효과를 측정한 결과는 500 µg/ml에서 각각 77.9%, 83.3%로 감소하였다. 이를 통해, 섬바디 나물 추출물은 염증을 억제시켜 주는 가능성이 있는 항염증 물질로써의 효과가 있을 것으로 보여진다.

References

- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Editor of Ulleunggun. 2002. Wild plants of Ulleung Island, Ulleunggun.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
- Heinzemann A, Daser A. 2002. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **127**: 170-180.
- Higuchi MN, Hisgahi J, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**: 1425-1431.
- Jung TH. 1965. Hanguksikmuldogam, pp.897-898.
- Kim HJ, Lee DJ, Ku JJ, Choi K, Park KW, Kang SH, et al. 2013. Anti-inflammatory effect of extracts from folk plants in Ulleung island. *Korean J. Plant Res.* **26**: 169-177.
- Kim JS, Kim JC, Shim SH, Lee EJ, Jin WY, Bae KH, et al. 2006. Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 671-623.
- Kim MY. 2004. Endemic plants of Korea, Solgwahak.
- Kim Y, Min HY, Park HJ, Lee EJ, Park EJ, Hwang HJ, et al. 2004. Suppressive effects of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methaxl extract on lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Cancer Prev.* **13**: 419-424.
- Ko KS, Jeon ES. 2003. Wild plants of Korea. Iljinsa.
- Lebert DC, Huttenlocher A. 2014. Inflammation and wound repair. *Semin Immunol.* **26**: 315-320.
- Lee CB. 1980. Daehansikmuldogam 2, Hyangmunsa.
- Lee CN, An HS. 1963. Hanguksikmulmyunggam, pp.144. Bumhaksa.
- Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, et al. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-κB transactivation in LPS-activated raw264.7 cells. *Mol. Cells* **23**: 398-404.
- Lee YM. 2003. Wild flowers of Korea, Darumsaesang.
- Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn ES, Koo HJ, et al. 2015. Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. *Korean J. Plant Res.* **28**: 145-152.
- Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. *J. Clin. Invest.* **100**: 2417-2423.
- Rainsford KD. 2007. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Sub-cell Biochem.* **42**: 3-27.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal, BB. 2010. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1603-1616.
- Sung YY, Kim DS, Yang WK, Nho KJ, Seo HS, Kim YS, et al. 2012. Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extracts on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nca mice. *J. Ethnopharmacol.* **144**: 94-100.