



Original Article / 원저

NF- κ B 억제를 통한 大茴香의 항염증효능

금수연[#], 박상미[#], 제갈경환, 황보민, 조일제, 박정아, 김상찬, 지선영*

대구한의대학교 한의과대학

Anti-inflammatory Effects of *Illicium verum* Hook. f. via Suppression of NF κ B Pathway

Soo Yeon Keum[#], Sang Mi Park[#], Kyung Hwan Jegal, Min Hwangbo, Il Je Cho, Chung A Park, Sang Chan Kim, Seon Young Jee*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610,
Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : *Illicium verum* Hook. f. has been known to possess antimicrobial, antioxidant, antifungal, anti-inflammatory, insecticidal, analgesic, sedative, convulsive activities, it has been rarely conducted to evaluate the immuno-biological activity. The present study was examined to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Illicium verum* Hook. f. water extracts (IVE) *in vivo* and *in vitro*.

Methods : Cell viability was measured by MTT assay. The relative levels of NO were measured with Griess reagent. iNOS, COX-2, NF- κ B and target proteins were detected by immunoblot analysis, and levels of cytokines were analyzed by ELISA kit. Anti-edema effect was determined in the carrageenan (CA)-induced paw edema model in rats.

Results : All dosages of IVE used in MTT assay had no significant cytotoxicity. The increases of NO production and iNOS expression were detected in LPS-treated cells compared with control. However, these increases were attenuated by treatment with IVE. Also, IVE reduced the elevated production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by LPS. IVE inhibited the p-I κ B and translocation of NF- κ B to nuclear. Furthermore, IVE significantly inhibited the increases of hind paw swelling, skin thicknesses and inflammatory cell infiltrations induced by CA injection. Therefore, IVE will be

favorably inhibited the acute edematous inflammations.

Conclusion : These results provide evidences that anti-inflammatory effect of IVE is partly due to the reduction of some inflammatory mediators by suppression of NF- κ B pathway

Key Words : Phyllostachys Folium, Anti-inflammatory effects, NF- κ B.

I. 서론

大茴香 (*Illicium verum* Hook. f.)은 주로 아시아의 (아)열대에서 생산되는 상록수의 열매이며, 약재의 모양에 8각형임에 따라 八角香, 八角, 八角大茴, 茴香八角珠라고도 한다. 辛溫하고 脾腎經에 주로 작용하며, 溫陽, 散寒, 理氣하여 中寒嘔吐, 寒疝腹痛, 腎虛腰痛, 乾/濕脚氣를 치료한다¹⁾. 大茴香은 중국남서부 및 베트남북부에서 다량 생산되며 anethol과 같은 oil 및 flavonol (quercetin, kaempferol), anthocyanins, tanins, phenolics acids, gallic acid 등과 같은 polyphenol을 함유하고 있다^{2,3)}.

大茴香은 약용 및 향신료로서 뿐만 아니라 근래에는 항바이러스약인 Tamiflu (oseltamivir phosphate)를 만드는 기본 성분인 shikimic acid를 만드는 소재로 사용되고 있다. Tamiflu는 조류독감 바이러스인 H5N1 계열의 바이러스를 치료하는 것으로 여겨지고 있으며, 현재 oseltamivir는 조류독감의 심각성을 줄일 수 있는 유일한 약으로 평가받고 있다³⁾. 大茴香의 약리작용으로는 抗菌, 抗真菌, 抗酸化, 抗炎症, 殺蟲, 鎮痛, 鎮靜 등이 있는 것으로 밝혀져 있다⁴⁻¹²⁾.

그러나 大茴香의 항염증효과의 기전연구는 극히 제한적인 실정으로, 본 연구에서는 大茴香 추출물의 항염증기전 및 염증관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화된 Raw 264.7 cells모델에서, carrageenan (CA)으로 유도된 rat의 paw edema에 대한 항염증효과를 수행하였다.

LPS는 그람-음성 박테리아의 세포벽 외층의 절편 혼합물로서, 대식세포의 TLR4 (toll-like receptor 4)와 결합하여 MyD88을 통하여 IRAK의 인산화, TRAF6의 활성화를 통하여, I κ B kinase cascade를 통하여 다

양한 cytokine을 생성시키므로 염증반응 연구에서 빈용되는 연구모델¹³⁾이다.

홍조류 (red seaweed)에서 추출되는 CA는 음식의 질감을 제고하기 위한 식품첨가물, 緩下劑, 胃양성질환의 치료제 등 다양한 방면에서 이용되고 있다¹⁴⁾. CA로 유도되는 염증성 변화는 胃양성 장질환과의 유사성으로 1969년 이후 胃양성장질환의 연구모델로 사용되었으며¹⁵⁾, 또한 CA는 급성염증반응을 유도하므로, 약물의 항염증효과 평가와 염증매개물질의 조절에 관한 연구의 동물모델로 사용되고 있다.

이에 저자는 LPS를 이용한 *in vitro* 모델과, CA를 이용한 *in vivo* 모델에서 大茴香추출물(IVE; *Illicium verum* Hook. f. Extract)이 염증성병변을 억제할 수 있는지를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 (IVE)의 제조

大茴香은 대원약업사 (대구)에서 구입하였으며, 大茴香 300 g을 물 1.5 L에 넣고 약탕기(대웅, 한국)로 3시간 추출한 후, 거여즈로 1차 여과하고 3000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액을 취하여 0.2 μ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하여 28.9 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. IVE의 수율은 9.6%였으며 *in vitro*에서는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에 녹여 사용하였으며, *in vivo*에서는 생리식염수에 녹여 사용하였다.

Authors contributed equally

*Corresponding author: Seon Young Jee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-770-2272 Fax : +82-53-819-1860, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr

• Received : October 12, 2016 / Accepted : October 28, 2016



2. 세포배양

본 연구에 사용된 Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 cells은 한국세포주연구재단 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cells만 사용하였다.

3. 세포생존율의 측정

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 IVE를 농도별로 처치하여 24시간 배양 후, 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50 μ l 넣고 4시간 배양한 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 LPS와 IVE의 동시처리에 의한 세포생존율도 IVE를 10~300 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 처치하고, LPS를 후처치하여 24시간 배양한 후, 동일한 방법으로 세포생존율을 구하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

4. Nitric oxide (NO)생성량 측정

Raw 264.7 cells로부터 생성된 NO의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. IVE를 1시간 전처치한 후, LPS를 24시간 처치한 다음, 세포배양 상등액 50 μ l에 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 50 μ l를 96 well plate에 혼합하고 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)로 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 control 군에 대한 비율로 나타내었다.

5. Immunoblot analysis

IVE 및 LPS가 처치된 세포들을 20 mM Tris Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM

sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride 과 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 10,000 \times g로 10분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. Lysate을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하였다. 이 membrane에 각 단백질의 특이적 항체를 결합시키고, 비특이적 결합을 제거하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS 용액)로 1시간 blocking한 후, 2차 antibody는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit을 사용하였다. 단백질의 발현은 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 manufacturer's instruction에 따라 발색하였다. Actin과 lamin A/C band는 각 단백질의 loading control로 사용되었다.

6. 핵분획의 준비

처치된 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, PBS 1 ml을 가하여, 세포들을 조심스럽게 수거한 후 2,000 \times g로 3분간 원심분리하여, 상등액인 PBS는 버리고, 침전된 세포에 10 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 4 μ g/ml leupeptin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 함유하는 hypotonic buffer 100 μ l를 가하여 vortex하고, 얼음 위에서 10분간 배양하였다. 이를 4°C에서 7,800 \times g로 10분간 원심분리하고, pellet에 10 mM HEPES (pH 7.6), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 25% glycerol, 4 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF을 함유하는 extraction buffer를 50 μ l을 가하여, vortex한 후 얼음위에서 1시간 동안 방치하였다. 이를 다시 14,000 \times g로 15분간 원심분리하여, 핵분획을 포함하고 있는 상등액을 취하였으며, 사용시까지 -70 °C에 보관하였다.

7. Cytokine 및 Prostaglandin E2 (PGE₂)의 측정

Cytokine 및 PGE₂를 측정하기 위하여 6 well plate에 cells (5×10^5 /ml)을 분주하고 IVE를 농도별로 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 각 cytokine 및 PGE₂마다 특정 시간에 배지를 수거하여 측정하였다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α),

interleukin (IL)-1 β 와 IL-6, PGE₂는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

8. 실험동물 및 처치

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (130-160 g)를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험은 아무런 처치를 하지 않은 군을 Control군으로 하고 기염제인 carrageenan (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; 100 μ l/rat)만을 피하주사한 군을 CA군으로 하였으며, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, p.o.)을 투여한 DEXA군, carrageenan과 0.3 g/kg의 IVE를 투여한 0.3 g/kg IVE군, carrageenan과 1.0 g/kg의 IVE를 투여한 1.0 g/kg IVE군으로 나누었으며, 각 군당수는 5마리로 하였다. Dexamethasone과 IVE는 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 100 μ l/rat로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하였다.

9. Paw edema의 유도 및 측정

4일째 약물을 투여하고 1시간 후 CA를 주입하여 paw edema를 유발시켰다. Paw edema의 측정은 CA 주입후 0, 1, 2, 3, 4시간에 부종측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 부종 정도를 측정하였다.

10. 조직처리

CA를 주입한 rat의 오른쪽 발목아래를 절단하여 조직을 채취하여, 後肢의 발등 (dorsum pedis) 및 발바닥 (ventrum pedis)의 피부 실질조직을 분리하여 10% 중성포르말린에 6시간 이상 고정시킨 다음 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μ m의 longitudinal 절편을 제작하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하고, 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

11. 조직학적 평가

Kim 등¹⁶⁾의 방법을 변형시켜, 발등 및 발바닥 피부 (상피에서 진피)의 두께를 μ m 단위로 40배 현미경 시

야에서 자동영상분석장치 (iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Canada)를 이용하여 측정하였으며, 각각 mm²의 발등 및 발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수 역시 자동영상분석장치를 이용하여, 200배 현미경 시야에서 측정하였다.

12. 통계적 검증

실험 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

III. 실험결과

1. IVE가 Raw 264.7 cells의 세포생존율에 미치는 영향

Raw 264.7 cells에서 IVE의 세포독성을 MTT assay로 조사하였다. Raw 264.7 cells에 IVE를 10~1000 μ g/ml의 농도로 처치하고 24시간 후에 세포생존율을 측정하였다. 아무런 처치를 하지 않은 Control군을 100.00 \pm 1.61%로 하였을 때, IVE 10 μ g/ml은 101.62 \pm 1.21%, 30 μ g/ml은 103.64 \pm 1.36%, 100 μ g/ml은 105.53 \pm 1.78%, 300 μ g/ml은 106.67 \pm 0.80%, 1000 μ g/ml은 97.54 \pm 1.25%의 세포생존율을 보여 IVE는 10~1000 μ g/ml의 농도에서는 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

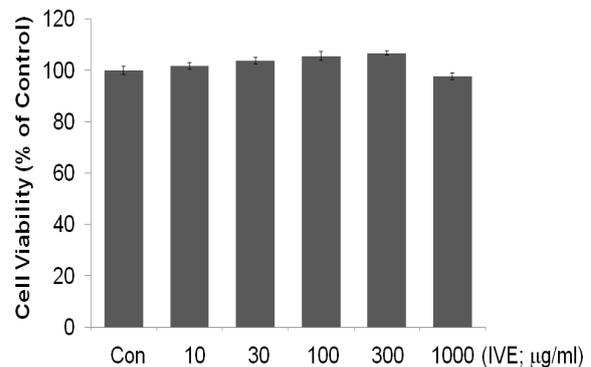


Fig. 1. The effect of IVE on the cell viability on Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 10~1000 μ g/ml of IVE dissolved in DMEM for 24 h, and the cells were treated with MTT solution for 4 h. The MTT assay was described in the materials and methods section. Data represent the mean \pm SD.

2. IVE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 NO 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 cells에서 IVE의 NO 생성억제정도를 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. IVE를 10~300 μg/ml의 농도로 24시간 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS군에서는 Control군에 비교하여 NO의 생성량이 2.56 ± 0.21배로 유의하게 증가하였다. IVE는 10과 30 μg/ml의 농도에서는 각각 2.38 ± 0.13, 2.39 ± 0.15배로 감소하는 경향을 보였으나, 유의한 감소를 나타내지 않았다. 그러나 IVE 100과 300 μg/ml의 농도에서는 각각 1.99 ± 0.07, 1.47 ± 0.12배로 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

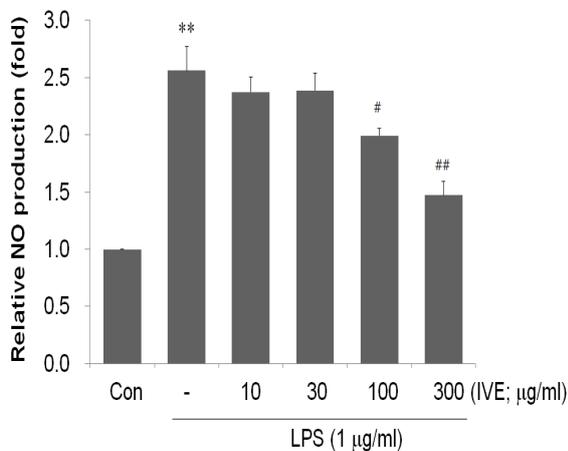


Fig. 2. The effect of IVE on the production of Nitric Oxide by LPS.

Raw 264.7 cells were treated with 10, 30, 100 and 300 μg/ml of IVE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Data represent the mean ± SD. (*, significant as compared to control. **P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P<0.05, ##P<0.01)

3. IVE가 세포생존율에 따른 NO 생성에 미치는 영향

IVE가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 cells에서 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, IVE와 LPS의 세포독성으로 세포수의 감소에서 기인한 것인지를 관찰하기 위하여, IVE + LPS의 세포독성을 MTT assay로 측정하였다. Control군을 100.00 ± 3.64 %으로 하였을 때, LPS군

은 71.93 ± 0.60 %이었으며, IVE처리군은 10, 30, 100 and 300 μg/ml의 농도에서 각각 73.85 ± 0.42, 79.24 ± 3.06, 81.90 ± 0.46, 89.04 ± 6.52 (%)를 나타내어 LPS단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 3A) 또한 세포생존율 대비 NO를 비교하였을 때에도 IVE는 10, 30, 100 및 300 μg/ml의 농도에서 LPS 단독처리군에 비교하여 각각 321.35 ± 19.23, 301.08 ± 9.14, 243.02 ± 6.81, 165.00 ± 2.72 (%)로 NO의 생성을 억제하였다 (Fig. 3B).

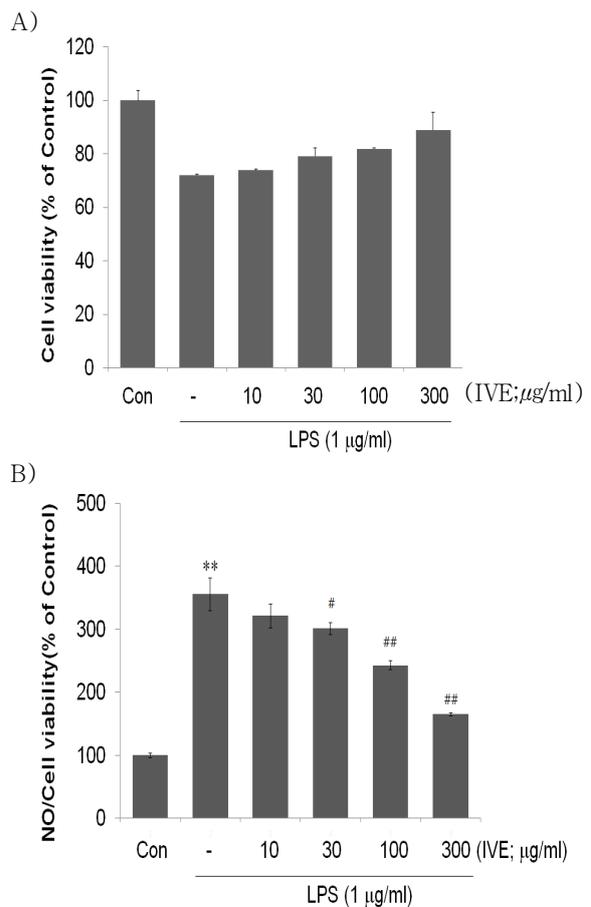


Fig. 3. The effect of IVE on the cell viability (A) and NO/cell viability (B) in LPS stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 10, 30, 100 and 300 μg/ml of IVE dissolved in DMEM for 1 h prior to the addition of LPS (1 μg/ml), and the cells were further incubated for 24 h. Data represent the mean ± SD. (*, significant as compared to control. **P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, #P<0.05, ##P<0.01)

4. IVE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 전염증성 단백질의 발현에 미치는 영향

IVE의 NO생성 억제에 관련되는 iNOS의 발현을 세포질 내에서의 평가하였다. LPS 처치시에는 iNOS 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS에 IVE를 처치한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 감소하였다 (Fig. 4A). 세포질에서 p-IκBα는 LPS처치에 의하여 뚜렷하게 증가하였으나, IVE의 전처치에 의하여 증가된 p-IκBα가 현저하게 감소되었으며 (Fig. 4B), 핵분획에서의 NFκB는 LPS 처치에 의해 증가하였으나, IVE의 전처치에 의하여 NFκB량이 감소하였다 (Fig. 4C).

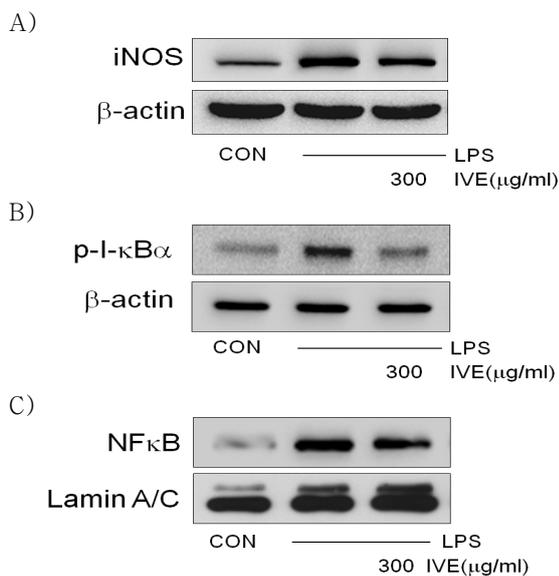


Fig. 4. The effect of IVE on the induction of pro-inflammatory protein expression by LPS.

The levels of pro-inflammatory protein, iNOS (A), p-IκBα (B) and NFκB (C) were monitored 24 h, 15 min, and 60 min after treatment of cells with LPS (1 μg/ml) with or without IVE pretreatment (i.e. 1 h before LPS). The actin was used as a loading control in total cell lysate, and lamin A/C was in nuclear fraction. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE.

5. IVE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 Cytokine에 미치는 영향

LPS는 TNF-α의 분비를 110.56 ± 0.60 배로 유의하게 증가시켰으며, IVE는 100, 300 μg/ml의 농도에서 TNF-α의 생성량을 각각 77.30 ± 0.14 배, $66.12 \pm$

7.57 배로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 5A). IL-1β는 LPS에 의해 2.17 ± 0.20 배로 유의하게 증가하였으며, IVE는 100, 300 (μg/ml)의 농도에서 1.48 ± 0.07 , 0.69 ± 0.04 배로 모두 유의하게 IL-1β의 생성량을 줄였다 (Fig. 5B). 또한 LPS는 IL-6의 생성을 121.91 ± 2.94 배로 유의하게 증가시켰으며, IVE는 100, 300 μg/ml의 농도에서 각각 57.27 ± 1.44 , 34.00 ± 1.52 배로 LPS로 유도된 IL-6를 유의하게 감소시켰다 (Fig. 5C).

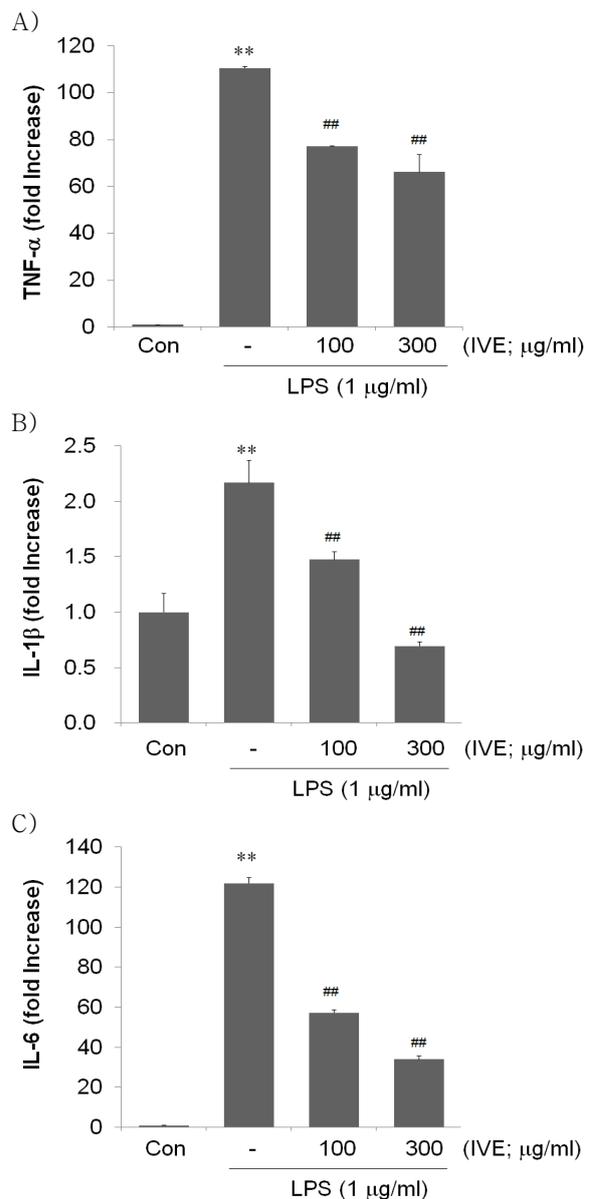


Fig. 5. The effect of IVE on LPS-stimulated Cytokine production.

Production of Cytokines were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of IVE for 12 h (A, B) and 6 h (C). The amount of Cytokines were measured by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean ± SD with three separate experiments. (*, significant as compared to control. **P<0.01; #, significant as compared to LPS alone, ##P<0.01)

6. IVE가 LPS로 유도된 Raw 264.7 cells의 PGE₂에 미치는 영향

PGE₂는 Control군에서 20.23 ± 8.60 pg/ml을 나타내었고, LPS는 3016.04 ± 34.98로 PGE₂를 유의하게 증가시켰으며, IVE는 100과 300 μg/ml에서 LPS로 증가된 PGE₂를 각각 1350.81 ± 59.56, 300.74 ± 77.66 (pg/ml)로 유의하게 농도의존적으로 감소시켰다 (Fig. 6).

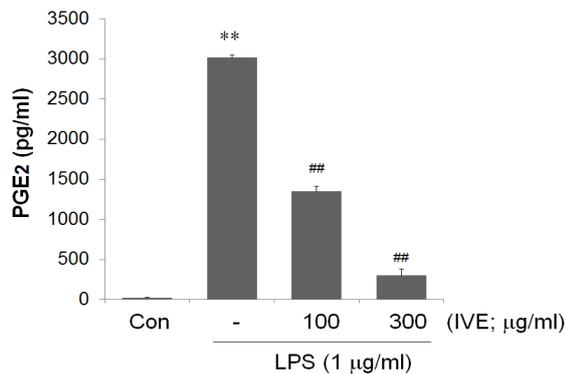


Fig. 6. The inhibition of LPS-activated PGE₂ production by IVE.

Raw 264.7 cells were cultured with LPS (1 ug/ml) in the presence or absence of IVE for 24 h to determine the level of PGE₂. The cultured medium was collected and directly assayed for PGE₂. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. (*: significant compared with the control, **P<0.01, #: significant compared with the LPS alone, ##P<0.01).

7. IVE가 carrageenan으로 유도된 Rat의 paw edema에 미치는 영향

IVE가 *in vitro*에서 염증매개물질을 억제함을 확인하고, *in vivo* 모델로서 CA로 유도된 paw edema를

측정한 결과, CA군에서는 1, 2, 3, 4 시간에 각각 1.44 ± 0.16, 1.63 ± 0.15, 1.71 ± 0.10, 1.65 ± 0.08배를 나타내어, 전시간 유의한 paw edema가 유발되었다. 그러나 paw edema 유도 후 dexamethasone을 처치한 DEXA군에서는 각각 1.10 ± 0.05, 1.11 ± 0.04, 1.16 ± 0.04, 1.08 ± 0.08배로 실험 전시간 동안 유의한 paw edema 억제를 나타내었다. IVE 0.3 g/kg 투여 군에서는 1~4 시간에 각각 1.18 ± 0.07, 1.55 ± 0.11, 1.58 ± 0.09, 1.45 ± 0.13배를 나타내어 1, 4 시간에 각각 paw edema를 유의하게 억제하였으며, IVE 1.0 g/kg 투여 군에서는 각각 1.14 ± 0.04, 1.50 ± 0.06, 1.52 ± 0.05, 1.38 ± 0.05배로 1, 3, 4 시간에 유의한 억제를 나타내었다 (Fig. 7).

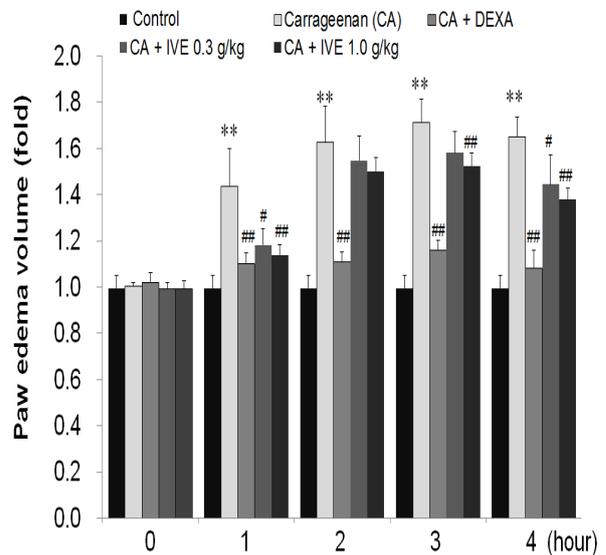


Fig. 7. The inhibition of carrageenan-induced paw edema by IVE.

IVE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 g/kg/day for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 1~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean ± SD of five animals. (*: significant compared with the Control, **P<0.01, #: significant compared with the carrageenan alone, #P<0.05 ##P<0.01)

8. IVE가 carrageenan으로 유도된 rat paw의 조직 변화에 미치는 영향

발등피부의 두께는 Control군에서 508.68 ± 81.93 , CA군이 1024.35 ± 107.16 로 유의하게 증가하였으며, 이러한 피부의 두께는 DEXA 군에서 502.59 ± 84.94 로 유의하게 감소하였고, IVE 0.3, 1.0 g/kg군에서 878.80 ± 52.95 , 776.80 ± 52.66 (μm)로 유의하게 감소하였다 (Table 1, Fig. 8). 발바닥 부위의 피부두께에 있어서도 Control군은 381.33 ± 42.19 이었으나, CA군에 있어서는 864.73 ± 37.75 로 유의하게 증가하였으며, 이러한 발바닥 피부의 두께 역시 DEXA군에서 496.88 ± 30.69 로 유의하게 감소하였고, IVE 0.3, 1.0 g/kg를 처치한 실험군에서 667.13 ± 45.06 , 623.31 ± 54.59 (μm)으로 유의하게 감소하였다 (Table 1, Fig. 9).

부종발의 발등조직에서 침윤 염증세포의 수는 Control군에서는 34.00 ± 13.10 이었으며, CA군은 221.40 ± 27.75 로 유의하게 증가하였으며, 이러한 염증세포의 증가는 DEXA군에서 54.80 ± 15.32 로 유의하게 감소하였고, IVE 0.3, 1.0 g/kg의 처치한 실험군에서는 118.60 ± 18.89 , 82.20 ± 7.40 (cells/mm²)을 나타내어 유의하게 감소되었다 (Table 1, Fig. 8). 부종발의 발바닥 조직에서의 침윤염증세포는 Control군이 24.40 ± 9.15 이었으며, CA군은 1779.40 ± 322.56 로 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 염증세포의 침윤은 발등조직에서와 마찬가지로 DEXA군에서 337.20 ± 94.52 로 유의하게 감소하였고, IVE 0.3, 1.0 g/kg의 처치에 의해 535.00 ± 119.19 , 426.80 ± 52.22 (cells/mm²)로 유의하게 염증세포의 침윤을 억제하였다 (Table 1, Fig. 9).

Table 1. Changes on the Histomorphometrical Analysis of Hind Paw Skins

Skins Index	Dorsum pedis skin		Ventrum pedis skin	
	Total thickness (μm)	IF cell numbers (cells/mm ²)	Total thickness (μm)	IF cell numbers (cells/mm ²)
Control	508.68 ± 81.93	34.00 ± 13.10	381.33 ± 42.19	24.40 ± 9.15
CA	$1024.35 \pm 107.16^{**}$	$221.40 \pm 27.75^{**}$	$864.73 \pm 37.75^{**}$	$1779.40 \pm 322.56^{**}$
DEXA	$502.59 \pm 84.94^{##}$	$54.80 \pm 15.32^{##}$	$496.88 \pm 30.69^{##}$	$337.20 \pm 94.52^{##}$
IVE 0.3	$878.80 \pm 52.95^{\#}$	$118.60 \pm 18.89^{\#}$	$667.13 \pm 45.06^{\#}$	$535.00 \pm 119.19^{\#}$
IVE 1.0	$776.80 \pm 52.66^{##}$	$82.20 \pm 7.40^{##}$	$623.31 \pm 54.59^{##}$	$426.80 \pm 52.22^{##}$

Values are expressed as mean \pm SD of five rat hind paws

CA; carrageenan, DEXA; Dexamethasone, IVE; *Illicium verum* Hook. f Extract, IF; infiltrated inflammatory cells (*: significant compared with the Control, **P<0.01, #: significant compared with the carrageenan alone, #P<0.05, ##P<0.01)

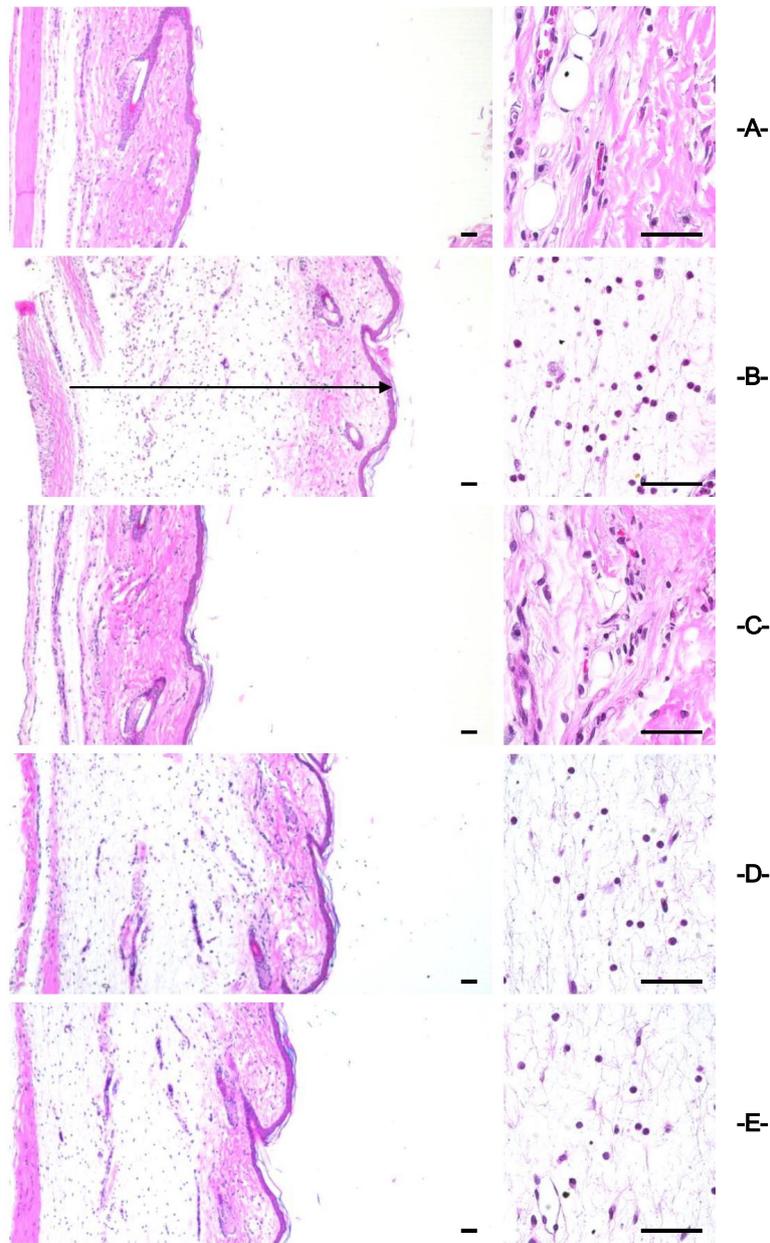


Fig. 8. Represent Histological Profiles of the *Dorsum Pedis* Skins.

Note that marked increases of skin thicknesses due to edematous changes were detected by CA treatment with increases of inflammatory cell infiltrations as compared with control. However, these CA-induced acute edematous inflammatory changes inhibited by treatment of DEXA, IVE 0.3 and 1.0g/kg, respectively. CA; carrageenan, DEXA; Dexamethasone, IVE; *Illicium verum* Hook. f Extract. Arrow indicated total thicknesses measured. Scale bars = 40 μ m.

A = Control, B = CA, C = CA + DEXA, D = CA + IVE 0.3g/kg, E = CA + IVE 1.0g/kg

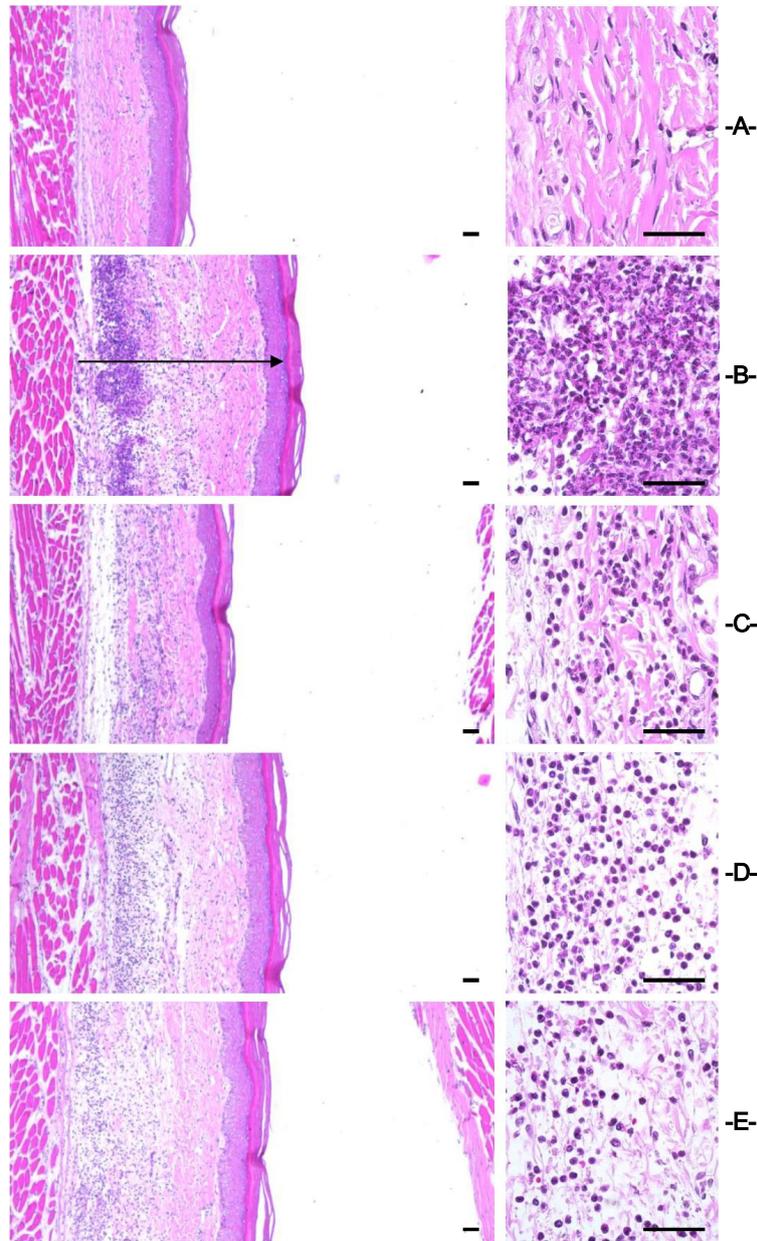


Fig. 9. Represent Histological Profiles of the *Ventrum Pedis* Skins.

Note that marked increases of *ventrum pedis* skin thicknesses due to edematous changes were detected by CA treatment with increases of inflammatory cell infiltrations as compared with control quite similar to those of *dorsum pedis* skin. However, these CA-induced acute edematous inflammatory changes inhibited by treatment of DEXA, IVE 0.3 and 1.0g/kg, respectively. CA; carrageenan, DEXA; Dexamethasone, IVE; *Illicium verum* Hook. f Extract. Arrow indicated total thicknesses measured. Scale bars = 40 μ m.

A = Control, B = CA, C = CA + DEXA, D = CA + IVE 0.3g/kg, E = CA + IVE 1.0g/kg



IV. 고찰

大茴香은 辛溫하며, 脾胃經에 주로 작용하고 溫陽, 散寒, 理氣의 작용이 있어 中寒嘔吐, 寒疝腹痛, 腎虛腰痛, 脚氣를 치료한다¹⁾. 동속식물로서 일본의 붓순나무 (*Illicium. anisatum* L.)가 있으나, 이는 neurotoxin으로 알려진 성분을 함유하고 있어 내복으로는 부적합하다³⁾. 大茴香은 抗菌作用, 抗真菌作用, 抗酸化作用, 殺蟲作用 鎮痛作用, 鎮靜作用, 抗炎症作用등이 있는 것으로 밝혀져 있으며⁴⁻¹²⁾, 특히 항(진)균작용에 대한 연구가 다수 이루어졌다. 大茴香의 향기성분의 훈증처리는 균주 *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* 등이 접종된 시험용 평판배지에서 진균류의 성장을 억제하였고⁶⁾, 또한 박 등⁴⁾은 大茴香 dichloromethane 추출물이 질칸디다증 환자들에게서 분리된 *Candida albicans* 15주와 *Candida albicans* 표준 균주 (ATCC 10231)에 대하여 뛰어난 항진균 활성이 있음을 확인하고, 항진균 효과의 주된 물질로서 1-methoxy-4-(2-propyrny) benzene을 제시하였다. 류 등⁵⁾은 大茴香 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* 등의 Gram (+) bacteria와 *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, 등의 Gram (-) bacteria 및 Fungi에 항균효과 있음을 보고하였다. 양 등¹⁷⁾은 大茴香의 초임계추출 및 에탄올추출물은 *Acinetobacter baumannii*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*를 포함하여 67종의 약물저항성균에 대하여 항균작용이 있음을 밝혔다. 또한 이 등¹⁸⁾은 大茴香 essential oil이 *Botrytis cinerea*와 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대하여 각각 100%, 93%의 성장억제능을 보여 항균효능이 우수함을 밝혔으며, 황 등⁷⁾은 大茴香의 essential oil과 *trans*-anethole이 11종의 식물병원균에 대하여 항균작용을 나타내어, 식물의 저장에 천연살균제 (natural fungicides)로서의 사용가능성을 제시하였다.

大茴香의 항산화작용에 대한 연구로는 정⁸⁾이 大茴香 메탄올추출물에서 우수한 DPPH radical scavenging activity를 나타내었으며, 또한 大茴香은 95.63%의 뛰어난 아질산염소거능 (nitrite scavenging ability)이 있음도 보고되었다¹⁹⁾.

한편 大茴香의 살충작용으로는, 大茴香 휘발성 추출물의 훈증처리가 흰개미, 쌀바구미, 넓적나뭇잠 등에 대한 살충효과를 보였으며, 활성물질로는 페놀성 화합

물인 anethole이 살균과 살충에 유효함이 밝혀져, 고전과 고가구, 고건물의 보존에 있어서 응용가능성이 보고되었다⁶⁾. 또한 안²⁰⁾은 大茴香 정유성분 중 (E)-anethole와 safrol이 모기 및 모기유충에 대하여 높은 살충 활성 확인하였으며, 조²¹⁾는 大茴香 메탄올 추출물 및 (E)-anethole이 닭진드기 (*Dermanyssus gallinae*)에 대하여 강한 살충효과를 나타냄을 밝혀, 화학합성 살비제를 대체할 수 있는 닭진드기의 제어 자원으로 응용가능성을 제시하였고, 윤 등²²⁾은 大茴香의 메탄올추출물이 설치류의 갉기 (gnawing)를 억제함을 보여 설치류 기피제로서의 응용가능성을 제시하였다.

본 연구에 사용된 LPS는 염증반응을 유발하는 유력한 인자로, TLR4와 결합하여 I κ B kinase cascade를 통하여 다양한 염증성 cytokine을 생성시키므로 염증반응 연구에 빈용되는 모델이며^{23,24)}, CA는 급성염증반응을 유도하므로, 항염증효과 평가와 염증매개물질의 조절에 관한 동물모델로 사용되고 있다^{25,26)}.

염증 (inflammation)은 전통적으로 “균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의되지만, 현재에는 염증을 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응으로 인식되고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

NO는 nitric oxide synthase (NOS)효소에 의해 만들어지며, 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관혈을 비롯한 각종 급만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion (O₂⁻)과 반응해 독성을 가진 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강한 독성물질로 변화되어 압 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다³⁰⁻³⁴⁾.

먼저, IVE가 Raw 264.7 cells에 미치는 세포생존율을 평가한 결과, IVE는 10~1000 μ g/ml의 농도의 24 시간 처치에서 유의한 세포독성을 나타내지 않았다. 세포독성을 나타내지 않은 IVE의 10~300 μ g/ml 농도에서 Raw 264.7 cells에서 생성되는 NO의 양을 평가하였다. IVE는 10과 30 μ g/ml의 농도에서는 감소하는 경향을 보였으나 유의한 감소를 나타내지 않았으며, 100과 300 μ g/ml의 농도에서는 각각 유의한 감소를

나타내었다. NO의 측정조건과 동일한 조건인 LPS (+/-) IVE에서의 세포독성은 LPS + IVE처리군은 전 농도에서 LPS 단독처리군에 비교하여 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, 전농도에서 LPS군에 비교하여 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 Sharifi 등³⁵⁾의 연구 결과인 납에 의한 PC-12 cell의 독성은 NO의 과다생성으로 유발되고, L-NAME에 의해 독성이 억제된 것처럼 본 연구결과는 LPS에 의해 증가된 NO의 Raw 264.7 cells에 대한 독성이 IVE의 전처치에 의해 NO가 억제되고, 이로 말미암아 세포독성이 유의하게 감소한 것으로 평가된다. 또한 세포생존율 대비 NO를 비교하였을 때에도 IVE는 LPS 단독처리군에 비교하여 유의하게 NO의 생성을 억제하였다. 이러한 결과는 IVE가 NO의 생성의 억제하며 항염증효과 있음을 의미한다.

IVE의 NO생성 억제에 관련되는 iNOS단백질의 발현을 평가한 결과 IVE를 처치한 실험군에서는 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현량이 감소하였다. 이는 NO의 생성 감소가 IVE의 iNOS억제에서 기인함을 의미한다. 또한, iNOS의 발현에는 전사인자 NFκB가 핵심적 역할을 하므로, 세포질에서 p-IκBα, 핵내에서의 NFκB의 발현을 평가하였다. NFκB는 비활성상태에서는 세포질에서 IκB와 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS에 의해 활성화되면 IκB가 인산화되면서 NFκB가 핵으로 전위하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다³⁶⁾. IVE의 전처치는 세포질에서 LPS에 의해 증가된 p-IκBα의 발현을 감소시켰으며, 핵분획에서의 NFκB는 IVE의 전처치에 의하여 NFκB량이 감소하였다. 이러한 결과는 IVE가 IκBα의 인산화를 억제하고, NFκB의 핵전위를 억제하여 iNOS를 억제함을 의미한다.

면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1β, IL-6, TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokines을 분비하여 대식세포의 유주, T세포의 활성화와 증식 억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있는데, 이들 cytokine 중 염증반응의 초기 단계에 작용하는 것으로는 IL-1β와 TNF-α가 가장 잘 알려져 있다. 이들은 arachidonic acid를 유주시키고, COX를 활성화시킴으로써 PG의 생성을 유발시키는 것으로 보고되고 있다³⁷⁻³⁹⁾.

본 연구에서 LPS는 TNF-α, IL-1β, IL-6의 분비를 유의성있게 증가시켰으며, IVE는 100, 300 μg/ml의 농도에서 각 cytokine의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 또한 arachidonic acid로부터 생성되는 PGE₂에 대하여서도 IVE는 유의하게 농도의존적으로 감소시켰다. 이러한 *in vitro*의 결과는 IVE가 LPS에 의해 활성화되는 p-IκBα의 인산화를 억제하여 NFκB pathway를 억제함으로써 다양한 염증매개물질을 억제함을 나타낸다.

IVE의 *in vitro*에서의 항염증작용을 확인하고, *in vivo*에서 carrageenan으로 유도된 rat의 paw edema에 대한 IVE의 효과를 평가하였다. CA는 염증세포의 침윤을 동반한 급성부종을 초래하므로, 현재 항염증물질의 급성 염증에 대한 평가에 다용되고 있는 모델이다⁴⁰⁻⁴²⁾. 본 연구에서도 CA는 1, 2, 3, 4 시간에 유의한 paw edema를 유발하였으며, IVE 0.3 g/kg를 투여한 군에서는 1, 4 시간에, IVE 1.0 g/kg를 투여한 군에서는 1, 3, 4시간에 유의한 억제를 나타내었다. 또한 CA의 국소적용은 염증세포 침윤을 동반한 급성부종을 초래하고, 조직학적으로는 투여부위에 국소적 염증세포 침윤을 동반한 피부 조직의 부종이 관찰되는 것으로 알려져 있다⁴³⁻⁴⁶⁾. 본 실험의 결과에서도 현저한 침윤 염증세포의 수적 증가 및 부종성 변화에 의한 발등 및 발바닥 피부 두께의 증가가 CA 처리에 의해 인정되었으나, dexamethasone 및 IVE 0.3과 1.0 mg/ml 투여에 의해 CA 유발 급성 부종성 소견 및 염증세포 침윤이 유의하게 억제되었다.

이상의 연구결과는 IVE가 *in vitro*에서 NFκB pathway를 억제함으로써 다양한 염증매개물질을 억제하며, *in vivo*에서도 투여용량 의존적으로 CA 유발 급성 부종성 염증을 효과적으로 억제하는 것으로 관찰되었으며, 이는 IVE의 항염증효과를 나타내는 직접적인 증거로 사료된다.

V. 결론

大茴香추출물 (IVE)의 항염증효능을 평가하기 위하여 *in vitro*에서 Raw 264.7 cells을 LPS로 활성화시킨 후 NO, iNOS, NFκB의 발현 및 cytokine, PGE₂에 미치는 영향을 관찰하고, *in vivo*에서는 CA로 유도된 rat의 paw edema에 미치는 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.



1. IVE는 세포독성을 나타내지 않았으며, LPS에 의해 증가된 NO의 생성량을 유의하게 억제하였다.
2. IVE는 LPS로 증가된 세포질에서의 p-IκBα의 발현을 억제하였으며, 핵분획에서의 NFκB의 발현을 억제하였다.
3. IVE는 LPS로 증가된 TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE₂의 생성량을 유의하게 감소시켰다.
4. IVE는 CA로 유도된 rat의 paw edema 및 이에 따른 급성 염증 소견을 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 大茴香이 그람 음성균의 감염이나, 과도한 NO 및 염증성사이토카인에 의한 염증성 질환의 치료에 활용될 수 있음을 의미하는 것으로 사료된다.

* 이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2012R1A5A2A42671316)

References

1. Chung BS, Shin MK. Illustrated Traditional Herbology. Seoul:Younglimsa. 2003:466-7.
2. Benmalek Y, Yahia OA, Belkebir A, Fardeau ML. Anti-microbial and anti-oxidant activities of *Illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp monogyna and *Allium cepa* red and white varieties. *Bioengineered*. 2013;4(4):244-8.
3. Wang GW, Hu WT, Huang BK, Qin LP. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(1):10-20.
4. Park SH, Sung IH. Antifungal Effects of the Extracts and Essential Oils from *Foeniculum vulgare* and *Illicium verum* against *Candida albicans*. *Korean J Med Mycol*. 2010;15(4):157-64.
5. Ryu H, Ahn S, Shin Y, Sohn H. Antimicrobial and Hemolytic Activity of Oriental Medicinal Herbs. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. 2010;38(2):190-7.
6. Chung YJ, Lee KS, Han SH, Kang DI, Lee MH. The utilization of fungicide and insecticide from medicinal plants for conservation of cultural properties. *Bojonkwahaknyongu*. 2001;22:5-26.
7. Huang Y, Zhao J, Zhou L, Wang J, Gong Y, Chen X, Guo Z, Wang Q, Jiang W. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules*. 2010;15(11):7558-69.
8. Chung HJ. Evaluation of the Biological Activity of Extracts from Star-Anise (*Illicium verum*). *J Food Sci Nutr*. 2009;14:195-200.
9. Sung YY, Kim HK. *Illicium verum* extract suppresses IFN-γ-induced ICAM-1 expression via blockade of JAK/STAT pathway in HaCaT human keratinocytes. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):626-32.
10. Sung YY, Kim YS, Kim HK. *Illicium verum* extract inhibits TNF-α- and IFN-γ-induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. *J Ethnopharmacol*. 2012;144(1):182-9.
11. Sung YY, Yang WK, Lee AY, Kim DS, Nho KJ, Kim YS, Kim HK. Topical application of an ethanol extract prepared from *Illicium verum* suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol*. 2012;144(1):151-9.
12. Chouksey D, Upmanyu N, Pawar RS. Central nervous system activity of *Illicium verum* fruit extracts. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(11):869-75.
13. Kook Y. Effect of Hwangryunhaedok-tang on Blood Pressure and Renal Functions in Spontaneously Hypertensive Rats. *The Korean Journal of Oriental Medical Prescription*. 2002;10(1):113-29.
14. Tobacman JK. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ Health Perspect*. 2001;109(10):983-4.
15. Onderdonk AB. The carrageenan model for experimental ulcerative colitis. *Prog Clin Biol Res*. 1985;186:237-45.
16. Kim HD, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Park BR, Jang HJ, Lim LS, Lee HS, Ku SK. Effect of exopolymers from *Aureobasidium pullulans* on formalin-induced chronic paw inflammation in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2006;16:1954-60.

17. Yang JF, Yang CH, Chang HW, Yang CS, Wang SM, Hsieh MC, Chuang LY. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. *J Med Food*. 2010;13(5):1254-62.
18. Lee SO, Park IK, Choi GJ, Lim HK, Jang KS, Cho KY, Shin SC, Kim JC. Fumigant activity of essential oils and components of *Illicium verum* and *Schizonepeta tenuifolia* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2007;17(9):1568-72.
19. Moon J, Kim S, Park Y, Hwang I, Kim E, Park J, Park I, Kim S, Kang S, Park Y, Junf S. Activities of Antioxidation and Alcohol Dehydrogenase Inhibition of Methanol Extracts from Some Medicinal Herbs. *Korean Journal of Food Preservation*. 2004;11(2):201-6.
20. Ahn YJ. Development of pesticide-alternative control technologies for livestock pests. *Rural Development Administration*. 2011:48-51.
21. Jo H. Acaricidal Activity of (E) - Anethole Derived from *Illicium verum* and Its Analogues against *Dermanyssus gallinae* Adults. *Korean J. Appl. Entomol*. 2009;48(2):263-8.
22. Yun EJ, Lee SB, Lee HK, Lee HS, Ahn YJ. Antignawing Activity of Plant Extracts against Mice. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 1998;41(1):95-8.
23. Lee YS, Kim HS, Kim SK, Kim SD. IL-6 mRNA Expression in Mouse Peritoneal Macrophages and NIH3T3 Fibroblasts in Response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 2000;10:8-15.
24. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 1990;144:1425-31.
25. Di Rosa M. Review: Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol*. 1972;24:89-102.
26. Nicklin S, Miller K. Effect of orally administered foodgrade carrageenans on antibody-mediated and cellmediated immunity in the inbred rat. *Food Chem Toxicol*. 22 : 615-21 ; 1984.
27. Park KK. *Oral Biochemistry*. Seoul:Koonja. 1999:318-25.
28. Choi WY, Jo MJ, Zhao RJ, Byun SH, Kim MR, Kim SC. The pistil of *nelumbo nucifera* has anti-inflammatory effect in LPS-activated Raw 264.7 cells. *HFS*. 2010;18(1):169-79.
29. The Korean Society of Pathology. *Pathology*. Seoul:Komoonsa. 1995:71-104.
30. Kim R, Shin K, Chun S, Ji S, Seo S, Park H, Choi J, Lee K. In vitro Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells. *Yakhak Hoeji*. 2002;46(5):343-9.
31. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW and Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophage by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European J Pharmacol*. 2000;406:301-9.
32. Kim EJ, Jin HK, Kim K, Lee HY, Lee SY, Lee KR, Zee OP, Han JW and Lee HW. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:903-10.
33. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact*. 2001;137:43-58.
34. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A. Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages. *Pharm Res*. 2001;18:151-6.
35. Sharifi AM, Mousavi SH, Bakhshayesh M, Tehrani FK, Mahmoudian M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells. *Toxicol Lett*. 2005;160(1):43-8.
36. Sohn KH, Kim SH. Antitumor Activity of *Bupleuri Radix* and *Artemisiae capillaris Herba* and



- Synergistic Effect with Anticancer Drugs. K.O.M.S. 1995;16(2):414-32.
37. Chung HY. Molecular biology for life science and molecular medicine. Seoul:World Science. 2002: 73-85.
38. Feldman M, Taylor P, Paleolog E, Brennan FM, Maini RN. Anti-TNF- α therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease, analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. Transplant Proc. 1998;30:4126-7.
39. Noh M, Ha JY, Lee CH, Lee WY, Lee SH, Lee JJ. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. Yakhak Hoeji. 1998;42(6):558-66.
40. Lee JH, Choi YH, Choi BT. The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. Int J Mol Med. 2005;16:99-102.
41. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, Selvan VT. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. BMC Complement Altern Med. 2006. (E-pub)
42. Rao CV, Verma AR, Gupta PK, Vijayakumar M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. Acta Pharm. 2007;57(4): 491-8.
43. Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. Br J Pharmacol. 2005;146(3): 467-76.
44. Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q. Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. Zhong Yao Cai. 2005;28(11):1002-6.
45. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. Anesthesiology. 2006;105(1):128-38.
46. Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, Lee JR, Cho IJ, Yang CH, Kim SG, Kim SC. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. Br J Pharmacol. 2008;154(1):165-73.