

팔루경엽의 BV2 미세아교세포에서의 항염증 활성 성분

리소균^{1#} · 김관우^{1#} · 고원민¹ · 김동철¹ · 윤치수¹ · 유향전² · 김종수¹ · 장규관³ ·
강대길⁴ · 이호섭⁴ · 오현철^{1*} · 김윤철^{1*}

¹원광대학교 약학대학 약품연구소, ²후난중의약대학, ³원광대학교 자연식물원,
⁴원광대학교 한방체액조절센터

Anti-inflammatory Constituents of the Aerial Parts of *Trichosanthes kirilowii* in BV2 Microglial Cells

Xiao Jun Li^{1#}, Kwan-Woo Kim^{1#}, Wonmin Ko¹, Dong-Cheol Kim¹, Chi-Su Yoon¹, Xiang Qian Liu²,
Jong-Su Kim¹, Kyu-Kwan Jang³, Dae-Gil Kang⁴, Ho-Sub Lee⁴, Hyuncheol Oh^{1*}, and Youn-Chul Kim^{1*}

¹Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea
²School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, People's of China
³Natural Botanical Garden, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea
⁴Hanbang Body-Fluid Research Center, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Abstract – The aerial part of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. (Cucurbitaceae), has long been used in traditional Korean and Chinese medicines for the treatment of heatstroke. We isolated and identified three flavones, luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranoside(**1**), luteolin-4'-*O*- β -D-glucopyranoside(**2**), luteolin(**3**) from its methanolic extract. In the present study, we found that luteolin attenuates the lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammation in BV2 microglial cells. Luteolin significantly inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide(NO) and prostaglandin E₂(PGE₂) in BV2 microglia in a concentration-dependent manner without cytotoxic effect. Luteolin dose-dependently suppressed the protein expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2). In addition, luteolin also showed significant induction of heme oxygenase(HO)-1. These results suggest that both the aerial part of *T. kirilowii* and luteolin may be good candidates to regulate LPS-induced inflammatory response.

Key words – *Trichosanthes kirilowii*, Luteolin, Anti-inflammation, BV2 cells, Heme oxygenase-1

팔루경엽(栝樓莖葉)은 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)의 줄기와 잎으로서 본초강목에 수재되어 있는 약재이다.¹⁾ 팔루경엽은 한방에서 산(酸), 한(寒), 무독(無毒)의 성미(性味)를 가지며, 열사병에 쓰이는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 팔루경엽의 기원식물인 하늘타리의 뿌리의 생약명은 팔루근으로서 한방에서 해열, 지갈, 소종약으로, 종자는 팔루인이라 불리우며 마른기침과 변비치료에 상용되는 중요한 생약으로 알려져 있으나,²⁾ 팔루경엽은 이들 생약에 비하여 상대적으로 잘 알려져 있지 않으며, 저자들이 확인한 바로는 그 성분과 약리작용에 대한 연구가 없는 실정이다.

미세아교세포(microglia)는 뇌에 존재하는 대식세포(macrophage)의 일종으로서, 뇌 교질세포(glial cell)의 10-15%를 차지하고 있으며, 중추신경계에 있어서 일차적인 면역방어기능을 가지고 있다.³⁾ 이 세포는 뇌의 항상성을 유지하는 역할을 수행하며, 외인성 병원균의 침입, 신경세포 손상 등 미세한 병적 환경변화를 감지하였을 때는 빠르게 활성화되어 일산화질소(nitric oxide; NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등 다양한 전염증성 매개인자와 염증성 사이토카인을 생성시킴으로써 병적인자들을 제거한다.⁴⁾ 그러나, 활성화된 미세아교세포가 과잉의 전염증성물질들을 지속적으로 생성시킬 경우, 세포지질, 단백질 및 DNA 등에 대한 산화적 손상을 유발함으로써 신경세포사멸을 일으킨다.⁵⁾ 또한, 이러한 지속적으로 활성화된 미세아교세포에 의한 뇌세포 손상은 알츠하이머증후군, 파킨슨씨병, 다발성 경화증 등의

[#]These authors contributed equally to this work.
*교신저자(E-mail): yckim@wku.ac.kr, hoh@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6823

퇴행성신경병증의 발병원인 중의 하나로 알려져 있다.⁶⁾ 이처럼 염증성 사이토카인과 염증 매개 인자들은 퇴행성신경병증 발병에 있어서 주도적인 역할을 하기 때문에 이들의 비정상적인 생성을 효과적으로 조절하는 것이 이들 질환의 치료법 중의 하나로 제시되고 있다.

지다당류(lipopolysaccharide; LPS)는 그람음성세균 외세포막을 구성하는 주성분으로서 지질(脂質)과 다당이 공유결합된 물질이다. LPS는 염증반응에 의한 발병원자로서 중요한 역할을 하고 있기 때문에 미세아교세포를 비롯한 다양한 염증관련 세포를 이용한 항염증 연구에 널리 이용되고 있다.⁷⁾

본 저자 등은 팔루경엽이 한(寒)의 성미(性味)를 가지며, 열사병 치료에 이용되고 있는 점과 아직까지 성분연구가 이루어지지 않은 점에 착안하여 LPS로 염증반응을 유발시킨 BV2 미세아교세포에 있어서 항염증 활성물질의 분리 및 작용기전 연구를 수행하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 팔루경엽은 2015년 7월 전북 익산시 원광대학교에서 채집하였으며, 원광대학교 자연식물원 장규관 박사에게 의한 형태학적 평가를 통하여 동정하였고 표본시료(NNMB-2015-013)는 원광대학교 천연물신약표준화소재은행에 보관하였다.

시약 및 기기 - DMEM 배지, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), fetal bovine serum(FBS)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS)와 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. Cobalt protoporphyrin (CoPP)은 Porphyrin Products(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 96-Well tissue culture plates와 기타 tissue culture dishes는 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader 를 이용하여 측정하였다. NMR 스펙트럼은 JEOL JNM ECP-400 spectrometer(400MHz for ¹H and 100MHz for ¹³C)기기로 DMSO-d₆ 용매를 이용하여 측정하였다.

추출 및 분리 - 건조시킨 팔루경엽 170 g을 메탄올 1 l로 2회 반복 각 3시간 동안 초음파추출한 다음 여과하고 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물 8.2 g을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수 500 ml에 현탁 시킨 후 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc 순으로 분획한 후 각 분획들을 감압 농축하여 *n*-hexane(3.3 g), CHCl₃(0.9 g), EtOAc 분획물(1.4 g)을 얻었다. 활성을 나타낸 EtOAc 분획물은 역상 C-18 컬럼크로마토그래피를 이용하여 30% 수성 메탄올에서 60% 수성 MeOH의 용매 조건으로 순차적으로 용출하여 13개의 소분획(Fr. 1-13)을 얻었다. Fr. 3(102 mg)을 메탄올로 재결정하여 화합

물 **1**(70 mg, 0.041 w/w%)을 분리하였다. TLC상에서 비슷한 양상을 나타낸 Fr. 4(203 mg)와 Fr. 5(205 mg)을 합한 후 40% 수성 메탄올을 용출용매로 사용하여 역상 C-18 컬럼 크로마토그래피를 실시한 결과, 화합물 **2**(20 mg, 0.012 w/w%)을 얻었다. 위와 유사한 방법으로 TLC상에서 비슷한 양상을 나타낸 Fr. 7(35 mg)와 Fr. 8(31 mg)을 합한 후 45% 수성 메탄올을 용출용매로 하는 역상 C-18 컬럼크로마토그래피를 실시하여 화합물 **3**(15 mg, 0.009 w/w%)을 얻었다.

화합물 1: ¹H NMR data (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.17~3.73 (6 H, m, 2''~6''-H), 5.09 (1 H, d, *J*=7.5 Hz, 1''-H), 6.45 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 6-H), 6.76 (1 H, s, 3-H), 6.80 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 8-H), 6.91 (1H, d, *J*=8.5 Hz, 5'-H), 7.43 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 2'-H), 7.46 (1 H, dd, *J*=2.0, 8.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 61.2 (C-6''), 70.1 (C-4''), 73.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 77.7 (C-5''), 95.3 (C-8), 100.1 (C-6), 100.4 (C-1''), 103.7 (C-3), 105.9 (C-10), 114.1 (C-2'), 116.5 (C-5'), 119.7 (C-6'), 121.9 (C-1'), 146.3 (C-3'), 150.5 (C-4'), 157.5 (C-5), 161.7 (C-9), 163.5 (C-7), 165.0 (C-2), 182.4 (C-4).

화합물 2: ¹H NMR data (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.16~3.74 (6 H, m, 2''~6''-H), 4.90 (1 H, d, *J*=7.5 Hz, 1''-H), 6.20 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 6-H), 6.50 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 8-H), 6.83 (1 H, s, 3-H), 7.25 (1H, d, *J*=8.5 Hz, 5'-H), 7.50 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 2'-H), 7.53 (1 H, dd, *J*=2.0, 8.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 61.2 (C-6''), 70.3 (C-4''), 73.8 (C-2''), 76.4 (C-3''), 77.8 (C-5''), 94.7 (C-8), 99.6 (C-6), 101.7 (C-1''), 104.0 (C-3), 104.5 (C-10), 114.1 (C-2'), 116.5 (C-5'), 119.0 (C-6'), 125.3 (C-1'), 147.5 (C-3'), 149.1 (C-4'), 157.9 (C-5), 161.9 (C-9), 163.6 (C-7), 165.5 (C-2), 182.2 (C-4).

화합물 3: ¹H NMR data (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.18 (1 H, brs, 6-H), 6.44 (1 H, brs, 8-H), 6.67 (1 H, s, 3-H), 6.88 (1H, d, *J*=7.6 Hz, 5'-H), 7.40 (1 H, d, *J*=2.0 Hz, 2'-H), 7.42 (1 H, dd, *J*=2.0, 7.6 Hz, H-6'); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 94.4 (C-8), 99.4 (C-6), 103.3 (C-3), 104.1 (C-10), 113.9 (C-2'), 116.5 (C-5'), 119.5 (C-6'), 121.9 (C-1'), 146.3 (C-3'), 150.4 (C-4'), 157.8 (C-5), 162.0 (C-9), 164.4 (C-2), 164.9 (C-7), 182.2 (C-4).

세포 배양 - BV2 미세아교세포(5×10⁵ cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G(100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine(2 mM)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37°C의 온도로 배양하였다.

세포 독성 - 연구시료의 실험 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 이용하여 BV2 미세아교세포에 대한 독성을 확인하였으며, 자세한 방법은 저자 등이 보고한 논문⁸⁾에 따라 실시하였다.

Nitrite Assay – 배양된 BV2세포에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정 하였으며, 자세한 방법은 저자 등이 보고한 논문⁸⁾에 따라 실시하였다.

PGE₂ 측정 – PGE₂의 측정은 prostglandin E2 enzyme immunoassay system(EIA, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 측정하였으며, 자세한 방법은 저자 등이 보고한 논문⁸⁾에 따라 실시하였다.

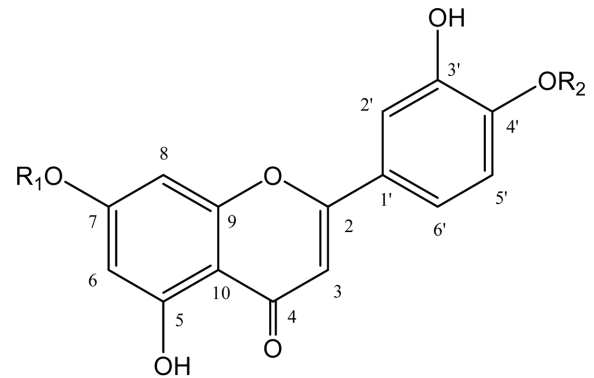
Western Blot Analysis – 배양된 BV2세포에서 생성된 iNOS와 COX-2 단백질은 Western blot analysis를 이용하여 측정하였으며, 자세한 방법은 저자 등이 보고한 논문⁸⁾에 따라 실시하였다.

통계처리 – 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 각 실험군 간의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 하늘타리의 약용부위 중 상대적으로 이용빈도가 낮아 아직까지 성분 및 효능연구가 이루어지지 않은 지상부에 대하여 LPS로 유발시킨 BV2 미세아교세포에 있어서의 항염증 활성물질을 탐색하고, 분리된 화합물에 대한 항염증 활성과 그 작용기전을 밝히고자 하였다. 팔루경엽 메탄올 추출물에 대하여 용매분배법을 적용하여 분획물을 제조하고, 각각의 분획물에 대한 NO생성억제 효과를 검토한 결과 EtOAc 분획물이 유의한 항염증효과를 나타냄을 확인하였다(자세한 결과는 생략함). EtOAc 분획물에 대하여 역상 C-18 컬럼크로마토그래피를 반복 실시하여 3개의 화합물(화합물 1~3)을 분리하였다. 분리된 물질들의 구조는 NMR spectra의 결과를 문헌과 비교하여 동정하였으며, 화합물 1~3의 구조는 각각 luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside (1),⁹⁾ luteolin-4'-O-β-D-glucopyranoside(2),¹⁰⁾ luteolin(3)¹¹⁾으로 확인되었으며(Fig. 1), 이들 flavone계 화합물 중 luteolin-4'-O-β-D-glucopyranoside는 이전에 하늘타리에서 보고된 바가 없다.

염증반응이란 외부 자극이나 다양한 유해인자에 저항하기 위한 일련의 생체방어 기전이다. 그러나, 과도한 염증반응은 세포 손상 등의 병리적 상태에 이르게 하기 때문에 염증반응을 유발하는 사이토카인이나 염증 매개체들을 조절하는 것이 염증성 질환의 치료법으로 제시되고 있다.¹²⁾ 팔루경엽으로부터 분리된 화합물들이 미세아교세포에서 항염증 효과를 나타내는 지 확인하기 위하여 LPS로 유발되는 염증관련 인자들의 억제여부를 검토하였다. 먼저 MTT assay를 이용하여 분리된 화합물들의 BV2 미세아교세포에서의



1 : R₁ = β-D-glc, R₂ = H

2 : R₁ = H, R₂ = β-D-glc

3 : R₁ = R₂ = H

Fig. 1. Chemical structures of compounds 1~3.

독성을 확인하여 세포독성을 나타내지 않는 농도를 산출하였다(자세한 결과는 생략함). LPS를 BV2 세포에서의 염증유도물질로 처리하여 전염증매개체의 생성량을 측정하였고, NO생성량은 nitrite assay를, PGE₂의 생성량은 EIA실험으로 확인하였다. 즉, BV2 미세아교세포에 화합물 1과 2를 20~80 μM, 화합물 3을 10~40 μM의 농도로 각각 처리한 후, 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하고 LPS(1 μg/ml)를 처리하였을 때, 3개의 화합물 모두 농도의존적으로 NO의 생성을 감소시켰으며, 화합물 3(luteolin)이 가장 우수한 감소효과를 나타내었다(Fig. 2). 한편, PGE₂의 생성억제효과 실험에서는 luteolin이 농도의존적으로 유의한 효과를 나타낸 반면, 화합물 1과 2는 생성억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 3).

NO가 지속적이고 과도하게 생성될 경우 해당 조직에서 염증성 손상을 유발하며, 이 물질은 iNOS에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 또한, COX에 의해 합성되는 prostaglandin류 역시 염증반응의 매개역할을 수행하는 중요한 물질이며, COX-2는 염증과정 동안 전염증매개체인 PGE₂를 다량으로 생성시키는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁾ 따라서, 저자들은 분리된 화합물들이 이들 단백질의 조절에 관여하는 지를 확인하고자 하였다. BV2 미세아교세포에 화합물과 LPS를 처리하고 24시간 후에 iNOS와 COX-2의 단백질발현을 western blot analysis를 통하여 관찰하였다. 3개의 화합물 중 luteolin이 NO와 PGE₂ 생성억제와 유사한 양상으로 농도의존적인 iNOS와 COX-2의 단백질발현을 감소시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

Heme oxygenase(HO)는 heme의 이화작용을 가지는 효소로서 세포의 항산화계에 있어서 중요한 역할을 한다. 지금까지 HO는 3가지 동질효소가 존재하는 것으로 알려져 있

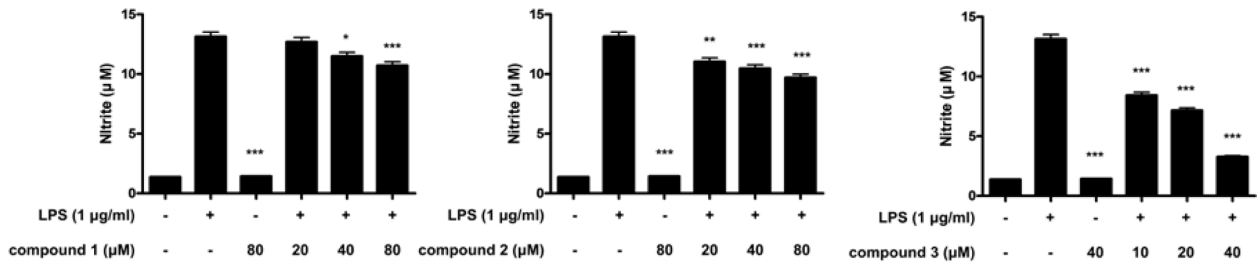


Fig. 2. Effects of compounds 1~3 on nitrite production in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 hr with indicated concentrations of compounds 1~3, and stimulated 24 hr with LPS (1 µg/ml). The concentration of nitrite was determined as described under Materials and methods. Data represent the mean values of three experiments±SD. **p*< 0.05, ***p*< 0.01, ****p*< 0.001 compared to the group treated with LPS.

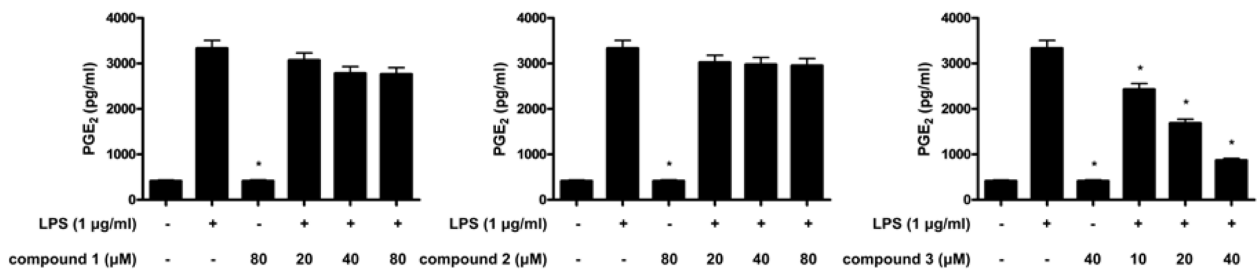


Fig. 3. Effects of compounds 1~3 on PGE₂ production in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 hr with indicated concentrations of compounds 1~3, and stimulated 24 hr with LPS (1 µg/ml). The concentration of PGE₂ was determined as described under Materials and methods. Data represent the mean values of three experiments±SD. **p*< 0.001 compared to the group treated with LPS.

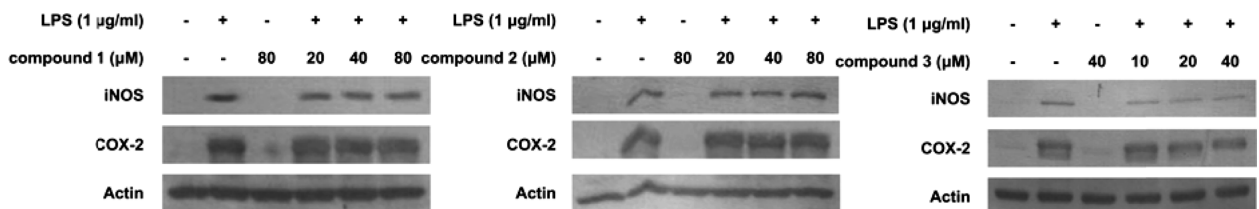


Fig. 4. Effects of compounds 1~3 on proteins iNOS (A) and COX-2 (B) expression in BV2 microglia stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 hr with indicated concentrations of compounds 1~3, and 24 hr with LPS (1 µg/ml). Western blot analyses were performed as described in Materials and methods, and representative blots of three independent experiments are shown.

으며, 이 중 HO-1은 신경세포를 비롯한 다양한 세포에서 필요에 따라 발현하는 것으로 보고되어 있다.¹⁵⁾ 이와 같이 HO-1이 여러 가지 자극에 대응하기 위한 방어기작 중의 하나로 유도되기 때문에 세포손상을 억제시키기 위한 중요한 목표 인자로 인식되고 있다.¹⁶⁾ 저자들은 이러한 사실에 근거하여, BV2 미세아교세포에 LPS로 유발시킨 염증반응에 대하여 유의한 억제효과를 나타낸 luteolin이 HO-1의 발현을 유도하는 지를 검토하고자 하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 luteolin은 농도의존적으로 HO-1의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다. Luteolin의 항염증효과에 대해서는 잘 알려져 있으나,^{17,18)} 저자들이 아는 바로는 BV2 미세아교세포에서의 HO-1 발현효과는 처음이라고 생각된다.

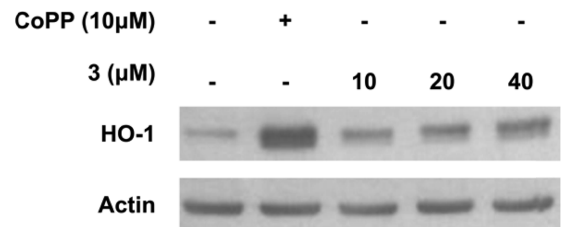


Fig. 5. Effects of compounds 3 on HO-1 expression in BV2 microglia. The cells were incubated for 12 h with the indicated concentrations of compounds 3. The positive control, the HO-1 inducer CoPP, increased the expression of HO-1 at 10 µM. Western blot analysis of HO-1 expression was performed as described in the Materials and methods and representative blots of three independent experiments are shown.

이상의 결과로부터 팔루경엽으로부터 분리된 flavone계 성분인 luteolin은 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 감소를 통하여 NO 및 PGE₂의 생성을 감소시키고, HO-1 발현을 억제함으로써 LPS로 유발한 미세아교세포의 염증을 억제하는 것으로 추정된다.

결 론

하늘타리의 지상부(팔루경엽)의 메탄올 추출물에 대하여 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 flavone계 물질인 luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside(1), luteolin-4'-O-β-D-glucopyranoside(2), luteolin(3)을 분리, 동정하였다. 이들 중 luteolin은 LPS로 자극한 BV2 미세아교세포에서 전염증매개체인 NO와 PGE₂의 생성을 각각 농도의존적으로 감소시켰으며, 이는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시키는 것에 의하여 기인되는 것으로 추정된다. 또한, luteolin은 체내 항산화계의 하나인 HO-1의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다. 따라서, 팔루경엽의 성분인 luteolin은 퇴행성 뇌질환의 원인 중의 하나인 과도한 염증반응을 억제할 수 있는 후보물질로 연구가치가 있다고 생각된다.

사 사

이 논문은 2016년도 정부 [미래창조과학부]의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2008-0062484).

인용문헌

1. 상해과학기술출판사편 (1985) 중약대사전, 제1권, 335, 소학관, 도쿄, 일본.
2. 생약학교재 편찬위원회 (2015) 생약학, 111-114, 동명사, 서울.
3. Lawson, L. J., Perry, V. H. and Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**: 405-415.
4. Gehrman, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G. W. (1995) Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* **20**: 269-287.
5. Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. (2008) Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem. Res.* **33**: 2416-2426.
6. Stoll, G. and Jander, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* **58**: 233-247.
7. Moreillon, P. and Majcherczyk, P. A. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**: 632-641.
8. Yoon, C. S., Kim, D. C., Ko, W., Kim, K. S., Lee, D. S., Kim, D. S., Cho, H. K., Seo, J., Kim, S. Y., Oh, H. and Kim, Y. C. (2014) Anti-inflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 17-22.
9. Kim, H. M., Lee, J. M., Lee, K. H., Ahn, Y. H. and Lee, S. H. (2011) Aldose reductase inhibition by luteolin derivatives from *Parasenecio pseudotaimingasa*. *Nat. Prod. Sci.* **17**: 367-371.
10. Guinot, P., Gargadennec, A., La Fisca, P., Fruchier, A., Andary, C. and Mondolot, L. (2009) *Serratula tinctoria*, a source of natural dye: Flavonoid pattern and histolocalization. *Ind. Crop. Prod.* **29**: 320-325.
11. Patora, J. and Klimek, B. (2002) Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta. Pol. Pharm.* **59**: 139-143.
12. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**: 347-373.
13. Hou, Y. C., Janczuk, A. and Wang, P. G. (1999) Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr. Pharm. Des.* **5**: 417-441.
14. Hammond, R. A., Hannon, R., Frean, S. P., Armstrong, S. J., Flower, R. J. and Bryant, C. E. (1999) Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages. *Am. J. Vet. Res.* **60**: 426-431.
15. Cabell, L., Ferguson, C., Luginbill, D., Kern, M., Weingart, A. and Audesirk, G. (2004) Differential induction of heme oxygenase and other stress proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**: 49-60.
16. Farombi, E. O. and Surh, Y. J. (2006) Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **39**: 479-491
17. Zhu, L. H., Bi, W., Qi, R. B., Wang, H. D., Wang, Z. G., Zeng, Q., Zhao, Y. R. and Lu, D. X. (2011) Luteolin reduces primary hippocampal neurons death induced by neuroinflammation. *Neurol. Res.* **33**: 927-934.
18. Zhu, L. H., Bi, W., Qi, R. B., Wang, H. D. and Lu, D. X. (2011) Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int. J. Neurosci.* **121**: 329-336.

(2016. 2. 16 접수; 2016. 3. 24 심사; 2016. 3. 28 게재확정)