

LPS로 유도한 염증반응에서 해죽순의 항염증 효과

배기상^{1,2}, 박성주^{1,2}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 한방체액조절연구센터

The Anti-inflammatory Effect of *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory response on RAW 264.7 cells

Gi-Sang Bae^{1,2}, Sung-Joo Park^{1,2}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

2 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University

ABSTRACT

Objective : *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit (NF) has been used as a conventional medicine to treat inflammatory periodontal diseases in Myanmar and Eastern Asia. However, the anti-inflammatory effect of NF aqueous extract on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses was not well-investigated. Therefore, this study was aimed to investigate the anti-inflammatory effect of NF on LPS-induced inflammatory responses on RAW 264.7 cells.

Methods : To induce inflammation on the macrophage cell line, RAW 264.7 cells were treated with 500 ng/mL of LPS. Water extracts of NF was treated 1 h prior to treatment of LPS. Cell viability was measured by MTT assay. Production of nitrite was measured with Griess assay and pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (PCR). In addition, we examined the inhibitory mechanisms of NF by western blot and immunocytochemistry.

Result : Water Extract from NF itself did not have any cytotoxic effect at the concentration of 200 μ g/ml in RAW 264.7 cells. Treatment of NF inhibited the production of nitrite, and pro-inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6 and TNF- α in a dose dependant. In addition, NF treatment inhibited the LPS-induced activation and translocation of nuclear factor (NF)- κ B.

Conclusion : In summary, our result suggest that treatment of NF could reduce the LPS-induced inflammatory responses via deactivation of NF- κ B. This study could suggest that NF could be a beneficial drug or agent to prevent inflammation.

Key words : *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit (NF), lipopolysaccharide (LPS), RAW264.7 cells, inflammation, cytokines

I. 서 론

대식세포가 Lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 염증반응

이 일어나게 되면, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인 및 nitric oxide (NO)등의 염증매개물질을 분비한다^{1,2)}. 따라

*Corresponding author : Sung-Joo Park, Department of Herbology, School of Oriental medicines, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 540-479, South Korea.

· Tel : +82-63-850-6450 · E-mail : parksj08@wku.ac.kr

#First author : Gi-Sang Bae, Department of Herbology, School of Oriental medicines, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 540-479, South Korea.

· Tel : +82-63-850-6837 · E-mail : baegs888@daum.net

· Received : 10 August 2016 · Revised : 29 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

서 이러한 염증성 사이토카인 및 염증성 매개물질을 억제하는 것은 염증질환 조절에 매우 중요한 방법 중에 하나이다. 만약 염증 반응 시 분비되는 전염증성 사이토카인 및 염증성 매개물질이 조절되지 않는다면, 추후 패혈증, 췌장염, 관절염 등 다양한 염증 질환을 일으킨다^{3,4}. 대식세포에서 전염증성 사이토카인의 분비는 신호전달경로에서 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 주로 조절된다. LPS에 의하여 NF- κ B가 활성화되면 결합해 있던 inhibitory kappa Ba (Ik-B α)가 분해되고, 그에 따라 NF- κ B가 세포질에서 핵 내로 이동하여 사이토카인의 생성을 촉진한다^{5,6}.

염증을 조절하기 위하여, 최근 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있다⁷. 항산화 약물들은 주로 페놀산과 플라보노이드 등을 함유하고 있고, 이들을 많이 가지고 있는 약물 혹은 약재는 뛰어난 항산화 능력을 보인다^{8,9}. 본 연구에서 사용한 해죽순(*Nypa fruticans* Wurmb, Fruit, NF)은 전남성과에 속한 식물로서, 미얀마, 인도네시아, 필리핀 등 동남아시아에서 재배되고, 전통적으로 치아 염증에 쓰던 식물로서, 최근에 한국에 수입되고 있다^{10,11}. 기존의 연구에 따르면 다량의 페놀산과 플라보노이드를 함유하고 있고, 그에 따라 항산화 효과 및 콜레스테롤 억제 효과 등이 탁월하다고 보고되고 있다^{12,13}. 해죽순에는 주요하게 chlorogenic acid, protocatechuic acid, 및 kaempferol이 포함되어 있다고 보고되어 있어¹², 염증 조절효과가 탁월할 것으로 추측되나 아직 구체적인 효과 및 기전에 대한 연구가 이루어지지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 세포에서 해죽순 물 추출물을 이용하여 항염증 효과 및 항염증 기전을 연구하고자 한다. RAW264.7 세포에 LPS로 염증을 유도하여 염증 매개물질인 nitrite 및 전염증성 사이토카인의 발현을 조사하였고, 항염증 기전을 조사하기 위하여 NF- κ B의 활성화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 준비

해죽순은 토디팜코리아(서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 해죽순은 미얀마에서 수입되어 건조된 것을 원광대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선한 후 사용하였다. 해죽순 물 추출물을 얻기 위하여 증류수 1l 에 해죽순 100 g을 넣고 150분 동안 전탕한 액을 여과한 후, 여과액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말 가루는 15.6 g으로 수율은 15.6 %였다.

2) 시약

Fetal bovine serum, RPMI 1640 media, antibiotics 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, chloroform, sodium dodesyl sulfate, sodium chloride, acrylamide, Tris-HCL, LPS, acetic acid 등은 SIGMA (St.Louis, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 항체인 Ik-B α , NF- κ B p65, β -actin은 Santa Cruz

(CA, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상을 사용하였다.

2. 방법

1) MTT 분석

대식세포에 해죽순을 처리한 후 24시간동안 배양한 뒤 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. Formazan 생성물은 DMSO로 용해했다. Formazan 용해액을 96-well plate에 loading한 후, spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540 nm에 흡수되는 양을 측정하였다. 세포의 생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 naive cell과의 비율로 나타내었다.

2) Nitrite 측정

세포 상층액을 획득하여 96-well plate에 loading하였다. 96-well plate에 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 spectrophotometer (MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

3) 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 측정

전염증성 사이토카인의 염증매개물질은 세포 상층액에서 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen (CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 구입하여 시행하였다.

4) RNA 추출

세포를 획득한 후, Easy Blue (intron biotechnology, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

5) 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응 (real time RT-PCR)

mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, Real time PCR master mix 4 μ l (ABI), primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. PCR 조건은 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 그 후에 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 35 cycle로 하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 custom taqman probe (Cat.#4331182) 및 TaqMan master mix는 ABI (CA, USA)에서 구입하였다.

6) Western blot analysis

세포를 획득하여 RIPA lysis buffer를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 pellet을 가라

앞히고 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 전기영동 한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2 시간 blocking 하였다. $\text{I}\kappa\text{-B}\alpha$ 와 $\beta\text{-actin}$ 은 ECL detection 용액 (Amersham) 으로 확인하였다.

7) Immunocytochemistry

4% paraformaldehyde로 세포를 고정 한 후, 0.1% Triton-100으로 permeabilization을 하고, 1% FBS로 2 시간 blocking 하였다. NF- κB p65항체를 overnight 반응 후, Alexa 488 goat anti-mouse 항체를 2시간 반응 시켰다. 세포의 핵은 DAPI (Sigma, MO, USA) (5 mg/ml) 사용하여 5분간 염색 하고, prolong gold anti-fading mount solution (invitrogen, CA, USA)를 이용하여 mounting하였다. 그 후 Flourescence microscopy (Olympus X 70, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.E. 로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램의 one way ANOVA에 준하였고, p-value 가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 해죽순 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

해죽순 물 추출물이 세포의 생존율을 억제하여 연구 결과에 영향을 주는지를 조사하기 위해서 RAW 264.7 세포에 해죽순 물 추출물을 처리하여 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 해죽순은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 유의성있는 세포 독성을 보이지 않았고, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터는 큰 독성을 보였다. 이에 본 연구에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도 사용하였다 (Fig. 1).

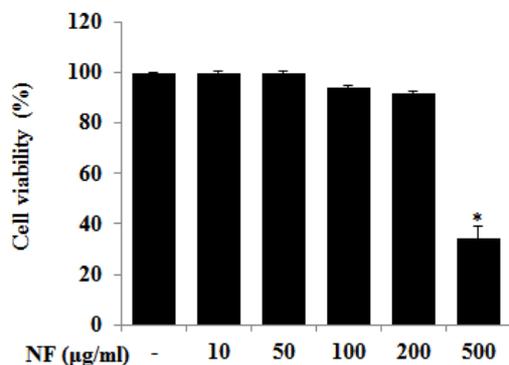


Fig. 1. Effect of NF water extract on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with NF water extract as indicated concentration for 24 h. MTT assay was performed as described in materials and methods. The similar results were obtained from three additional experiments. *P < 0.05 : significant as compared to saline.

2. LPS로 유도한 대식세포 염증에서 해죽순 추출물이 nitrite 생성에 미치는 영향

해죽순 물 추출물이 염증에서의 nitrite의 생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여, 해죽순을 대식세포에 1시간 전처리한 후, LPS로 염증을 유도하였다. Griess 반응을 통한 nitrite 생성을 측정한 결과 해죽순 전 처리군에서 LPS로 유도한 nitrite 생성을 억제하였다 (Fig. 2).

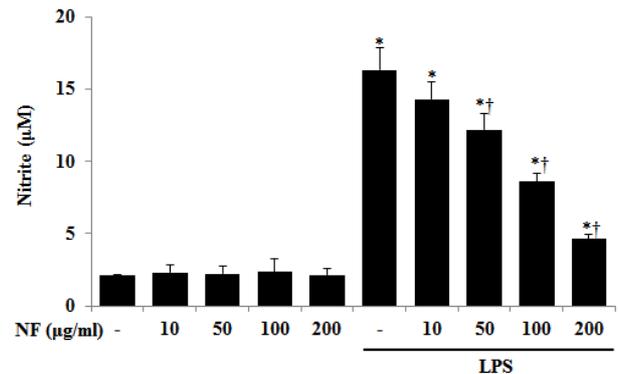


Fig. 2. Effect of NF water extracts on LPS-induced nitrite production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with NF water extract and LPS (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. The amount of nitrite in supernatant was measured using Griess reagent. *P < 0.05 : significant as compared to saline alone, +P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. LPS로 유도한 해죽순 추출물이 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성에 미치는 영향

LPS로 유도한 대식세포에서 염증 발생 시, 해죽순이 전 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ELISA 방법을 이용해 전 염증성 사이토카인의 단백질 수준을 측정하였다. 해죽순 물 추출물을 1시간 전 처리한 후 RAW 264.7 cell을 24시간 동안 LPS로 자극 하였다. 그 후 전 염증성 사이토카인의 발현을 측정한 결과, 해죽순 처리군에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성을 유의성있게 억제하는 것을 관찰 하였다 (Fig. 3).

4. 해죽순 추출물이 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α mRNA 수준에서 미치는 영향

해죽순 물 추출물이 RAW 264.7 cell에서 전 염증성 사이토카인들을 단백질 수준에서 억제하였음을 착안하여 mRNA 수준에서도 전 염증성 cytokine의 활성을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 해죽순 물 추출물을 1시간 전 처리 한 후 RAW 264.7 cell을 24시간 동안 LPS로 자극 하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현을 정량적 중합 효소 반응 방법으로 측정하였다. 그 결과 해죽순 물 추출물을 전 처리한 군에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 4).

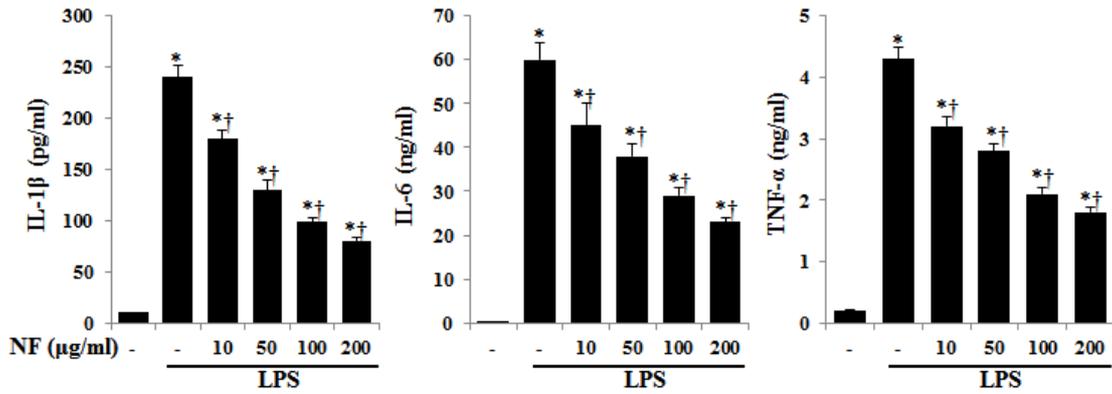


Fig. 3. Effect of NF water extract on the production of IL-1β, IL-6, and TNF-α in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with NF water extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. The level of cytokine was measured by ELISA. *P < 0.05 : significant as compared to saline alone, +P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

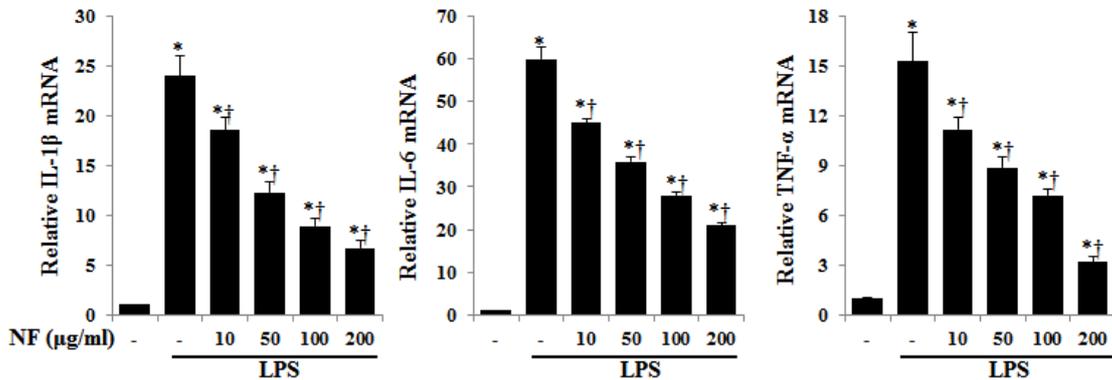


Fig. 4. Effect of NF water extract on the mRNA expression of IL-1β, IL-6, and TNF-α in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with NF water extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 h. IL-1β, IL-6, and TNF-α mRNA levels were measured by real time RT-PCR. *P < 0.05 : significant as compared to saline alone, +P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

5. 해죽순 추출물이 NF-κB기전 활성화에 미치는 영향

RAW 264.7 세포가 LPS에 의하여 염증이 일어나게 되면 다양한 신호 전달 기전에 의하여 염증성 매개물질들을 분비하게 되는데, 대표적인 경로로 NF-κB가 있다. 해죽순 물 추출물을 전 처리한 후 LPS로 대식세포를 30분간 자극하였다. 이를 분석한 결과 해죽순 물 추출물은 LPS에 의하여 염증이 활성화된 RAW 264.7 세포에서 Iκ-Bα의 분해를 억제하였다. 또한 NF-κB의 활성화 지표인 NF-κB의 핵 내로의 이동을 해죽순 물 추출물이 억제하였다 (Fig. 5).

IV. 고 찰

해죽순은 니파팜이라고 부르기도 하며, 미얀마 갯벌 등지에서 자란다¹²⁾. 솟아서 자라는 모습이 우리나라의 죽순을 닮았다고하여 해죽순으로 명명되었다. 현지에서는 민간요법으로 치통이 심할 때, 해죽순을 씹어먹으면 바로 낫는다고 하여 사용되고 있다. 국내에서는 생소한 소재이지만, 말레이시아 등지에서는 활발하게 연구가 되고 있는 소재이다. 해죽순을 이

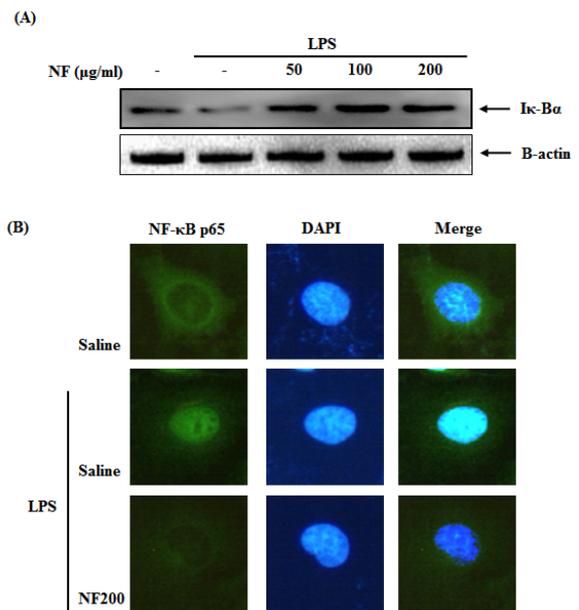


Fig. 5. Effect of NF water extract on (A) Iκ-Bα degradation and (B) translocation of NF-κB p65 in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with NF water for 1 h, and then incubated with LPS for 30 min. Representative photographs of at least three separate experiments are shown.

용하여, 항산화 효능을 보일 수 있는 폴리페놀 및 활성성분 연구도 활발하며¹²⁾, 해죽순을 직접적으로 염증질환에 응용한 연구도 소수지만 존재한다. 랫트에서 고혈당 억제 및 인지기 선효과가 탁월함을 보고한 논문^{13,14)}에 따르면, 해죽순 물 추출물 및 메탄올 추출물에서 모두 효과가 뛰어난 것을 볼 수 있었다. 항산화 성분이 다량 함유되어 있고, 항염증 효능이 좋은 약물을 연구하던 중, 해죽순을 접하게 되었고 본 연구에서는 국내에 수입된 해죽순을 이용하여 항염증 연구를 진행해 보았다. 연구를 진행한 결과, 해죽순은 대식세포 염증 시 발생하는 다량의 염증성 매개물질을 억제하였고, 또한 염증성 매개물질 조절하는 주요 기전인 NF- κ B를 억제하는 것을 발견할 수 있었다.

염증 발생 시, 대식세포에서는 세포를 보호하기 위하여 전염증성 사이토카인 및 다양한 염증성 매개물질을 분비한다¹⁵⁾. 하지만 이러한 사이토카인 및 염증성 매개물질을 조절하지 못하게 되면, 과도한 사이토카인 및 염증성 매개물질이 분비되게 되고, 그에 따라 염증이 심화되고, 그 정도가 심하면 패혈증과 같은 염증성 질환이 일어나게 된다¹⁶⁾. 따라서, 초기 염증 반응 시, 전염증성 사이토카인 및 염증성 매개물질의 조절 및 억제는 염증 반응 및 염증 질환에서 중요하다. 해죽순 물 추출물을 전 처리한 후 LPS로 대식세포를 자극하였을 때, 전염증성 사이토카인 및 염증성 매개물질이 농도의존적으로 개선되었으며, 이는 해죽순이 염증 반응 억제에 유효한 반응을 보였음을 보여준다 (Fig. 2-4).

NF- κ B는 염증에서 염증성 매개물질을 조절하는 중요 전사 인자이다¹⁷⁾. NF- κ B는 일반적으로 염증 반응이 없을 시, inhibitory kappaB (I κ -B) 단백질과 결합 되어있는데, LPS에 의하여 염증이 발생하여 NF- κ B가 활성화 되면, I κ -B가 분해되고, NF- κ B는 핵 내로 이동하여 여러 염증성 매개물질의 생성을 유도하게 된다¹⁸⁾. 본 연구에서는 해죽순 물 추출물이 I κ -B α 분해를 억제하였고, NF- κ B의 핵 내로의 이동을 억제하였다. 이는 NF- κ B활성을 해죽순이 억제하였고, 이를 통하여 염증성 매개물질을 억제하였음을 보여준다. (Fig. 5)

이상의 결과를 종합하면, 해죽순은 NF- κ B의 활성 억제를 통해 nitrite와 전염증성 사이토카인의 생성을 억제하였다. 많은 염증 질환의 치료약 개발이 더딘 지금, 저비용 고효율의 천연물 소재인 해죽순을 이용하여 항염증 효과를 처음 보고한 것은 큰 의의가 있다고 생각된다. 추후, 해죽순의 항염증효과는 염증성 질환 치료 및 예방에 있어서 응용가치가 높을 것으로 사료되며, 앞으로 동물실험 및 기타 염증 모델에 응용하여 해죽순의 잠재력을 추가적으로 연구할 가치가 있다고 사료된다.

V. 결 론

RAW 264.7 대식 세포를 LPS로 염증 반응을 일으켰을 때, 해죽순 물 추출물의 항염증 효과와 항염증 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 해죽순 추출물은 대식세포에서 200 μ g/ml이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 해죽순 추출물은 대식세포에서 농도 의존적으로 nitrite

의 생성을 억제하였다.

3. 해죽순 추출물은 대식세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 cytokine의 생성을 억제하였다.
4. 해죽순 추출물은 대식세포에서 I κ -B α 의 분해 및 NF- κ B의 핵 전이를 억제하였다.

이상의 결과는 해죽순 물 추출물이 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 활성 억제를 통하여 nitrite 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하였음을 보여준다. 해죽순은 추후 다양한 염증 질환에 응용하여 항염증 질환 및 질병 치료에 응용될 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc Soc Exp Biol Med. 1996 ; 211 : 24-32.
2. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. Antiinflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells. Kor J Herbol. 2009 ; 24 : 39-47.
3. Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? Autoimmunity Reviews. 2008 : 305-8.
4. Lopez-Bojorquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Teran G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. Arch Med Res. 2004 ; 35 : 465-79.
5. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. Curr Opin Microbiol. 2004 ; 7 : 25-32.
6. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. Biochem J. 2004 ; 382 : 393-409.
7. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. Crit Rev Food Sci. 1990 ; 29(4) : 273-300
8. Gordon A, Cruz AP, Cabral LM, de Freitas SC, Taxi CM, Donangelo CM, et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Acai fruits (Euterpe oleraceae Mart.) during ripening. Food Chem. 2012 ; 133 : 256-63.
9. Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical composition,

- antioxidant, and antimicrobial activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid-Based Compl Alt*, 2012 ; 2012 : 452431.
10. Tamunaidu P, Saka S. Chemical characterization of various parts of nipa palm (*Nypa fruticans*). *Ind Crop Prod*, 2011 ; 34 : 1423-28.
 11. Tang SY, Hara S, Melling L, Goh KJ, Hashidoko Y, Burkholderia vietnamiensis isolated from root tissues of nipa palm (*Nypa fruticans*) in Sarawak, Malaysia, proved to be its major endophytic nitrogen-fixing bacterium. *Biosci Biotech Bioch*, 2010 ; 74(9) : 1972-7.
 12. Prasad N, Yang B, Kong KW, Khoo HE, Sun J, Azlan A, et al. Phytochemicals and Antioxidant Capacity from *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit. *Evid-Based Compl Alt*, 2013 ; 2013 : 154606.
 13. Yusoff NA, Ahmad M, Al-Hindi B, Widyawati T, Yam MF, Mahmud R, et al. Aqueous Extract of *Nypa fruticans* Wurmb. Vinegar Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Normoglycemic Rats. *Nutrients*, 2015 ; 7(8) : 7012-26.
 14. Reza H, Haq WM, Das AK, Rahman S, Jahan R, Rahmatullah M. Anti-hyperglycemic and antinociceptive activity of methanol leaf and stem extract of *Nypa fruticans* Wurmb. *Pak J Pharm Sci*, 2011 ; 24(4) : 485-8.
 15. Ley K, Pramod AB, Croft M, Ravichandran KS, Ting JP. How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol*, 2016 ; 7 : 204.
 16. Luan YY, Yao YM, Xiao XZ, Sheng ZY. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*, 2015 ; 35(1) : 17-22.
 17. Majdalawieh A, Ro HS. Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm*, 2010 ; 2010 : 823821.
 18. Gang A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, 2002 ; 16(6) : 1053-68.