

LPS로 유도된 마우스 대식세포주인 RAW264.7에서 MAPK 조절에 의한 백미 물추출물의 항염증 활성

이상호^{1#}, 유지현^{2#}, 길기정^{2*}

1 : (주)뉴트렉스테크놀로지, 2 : 중부대학교 한방보건제약학과

Anti-inflammatory Activity of Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma Water Extracts via Regulation of MAPK in LPS-induced Murine Macrophage Cell Line, RAW 264.7

Sang-Ho Lee^{1#}, Ji-Hyun Yoo^{2#}, Ki-Jung Kil^{2*}

1 : Nutrex Technology Co., Ltd., Seongnam, 13494, Republic of Korea

2 : Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan, 32713, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : To develop natural ingredients that help prevent or treat anti-inflammatory-related diseases and use them as basic data, we investigated anti-inflammatory activity of Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma water extracts(CWE) in lipopolysaccharide(LPS)-induced murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells.

Methods : The cell viabilities were evaluated with RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2), pro-inflammatory cytokines such tumor necrotic factor(TNF)- α and interleukin(IL)-6 were assessed in LPS-induced RAW 264.7 cell treated with CWE. Furthermore, the protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), and mitogen-activated protein kinase(MAPK) were assessed by western blotting.

Results : In RAW 264.7 cell, the cell viability by CWE treatment was more than 98.4% at a concentration of 100-400 μ g/mL. At a concentration of 800 μ g/ml of CWE, the cell viability was as low as 86%. At doses of 100, 200 and 400 μ g/mL, CWE inhibited the production of NO, PGE2, TNF- α and IL-6 in a dose-dependent manner and also decreased the expression of iNOS and COX-2 from LPS-induced RAW 264.7 cells. In addition, CWE significantly inhibited the MAPK pathway including decreased the phosphorylation of the p38, c-Jun N-terminal kinase(JNK) and extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2).

Conclusions : Our study provides evidence that CWE inhibits the production of main pro-inflammatory molecules in LPS-induced RAW 264.7 cells via expression of p38, JNK, and ERK1/2 MAPK signaling pathways. Therefore, CWE is expected to be widely used as a natural ingredient for anti-inflammatory functional foods or pharmaceuticals in the future.

Key words : Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma, Anti-inflammatory, MAPK, RAW 264.7, lipopolysaccharide(LPS)

*Corresponding author : Ki-Jung Kil, Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan, 32713, Republic of Korea.

· Tel : +82-41-750-6225 · FAX : +82-41-750-6396 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

First author : Sang-Ho Lee, Nutrex Technology Co., Ltd., Seongnam, 13494, Republic of Korea.

· Tel : +82-31-628-6190 · FAX : +82-31-628-6191 · E-mail : top2235@naver.com

Ji-Hyun Yoo, Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University, Geumsan, 32713, Republic of Korea

· Tel : +82-41-750-6394 · FAX : +82-41-750-6396 · E-mail : jhyoo@joongbu.ac.kr

· Received : 12 October 2022

· Revised : 07 November 2022

· Accepted : 25 November 2022

I. 서론

백미(白薇, *Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma*)는 박주 가리과에 속하는 백미꽃 *Cynanchum atratum* Bunge 또는 만생백미 *Cynanchum versicolor* Bge.의 뿌리 및 뿌리줄기를 말하며, 다년생 초본으로 우리나라 전역에 자생하며, 일본과 중국 등에 분포한다. 전체에 부드러운 잔털이 많고, 줄기는 곧추서며, 가지가 거의 갈라지지 않는다. 상처를 내면 흰 즙액이 나온다. 잎은 마주나며, 두껍고, 둥근 난형 또는 타원형으로 가장자리는 밋밋하거나 물결 모양으로 잎 양면에 흰 털이 많이 난다^{1,2)}. 꽃은 진한 보라색으로 5~7월에 피는데 위쪽 잎겨드랑이에서 여러 개가 산형으로 모여 달린다. 꽃받침과 꽃부리는 5갈래로 갈라지고, 겉에 털이 나며, 열매는 골돌과(蓇葖果)로서 8~9월에 결실한다^{1,2)}. 백미의 다른 이름으로는 芒硝, 白幕, 薇草, 骨美, 春草, 巴子根, 白龍鬚 등이 있다³⁾. 백미는 해열 및 이뇨약으로 사용되고 있고, 한방에서 백미환의 주약으로 이용되는 약물이며, 민간에서는 잎을 강장제로 사용하여 왔다²⁾. 백미에 주요 함유된 성분은 palmitic acid, 2,4-dihydroxyacetophenone, 2,6-dihydroxy-acetophenone, 4-hydroxybenzenemethanol, beta-daucosterol, beta-amyrin acetate, beta-sitosterol 및 benzoic acid 등으로 보고되어 있다⁴⁾. 또한, 백미는 Jin 등⁵⁾의 보고에 의하면 글리코사이드로부터 멜라닌 생성을 억제하는 활성을 가지고 있으며, Lee 등⁶⁾에 의하면 아세틸콜린 에스테라아제 억제한다고 보고하였고, Yang 등⁷⁾은 Concanavalin A로 유도된 마우스로부터 간 손상보호 효과를 나타내는 것에 대하여 보고하였다. 또한, Lee 등⁸⁾은 신경 보호 활성효과, Hu 등⁹⁾은 유방염에서의 항염증효과, Mukudai 등¹⁰⁾은 항골다공증효과, Yan 등¹¹⁾은 항-담배모자이크바이러스에 대한 효과 및 Kim 등¹²⁾은 비만세포로부터 염증반응 조절한다고 보고한 바 있다.

일반적으로 염증반응을 나타내는 대식세포 중에서도 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에 염증유발인자인 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하면, inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현으로 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E₂(PGE₂) 등 염증매개인자들이 생성되고, 이것들을 통해 tumor-necrosis (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 및 interleukin(IL)-6 등을 비롯한 염증성 사이토카인의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다^{13,14)}. 대표적인 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)의 일종인 톨 유사 수용체(toll-like receptor 4, TLR4)로부터 인식된 LPS는 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 인산화에 의해 활성화시켜 염증반응을 유발시킨다¹⁵⁾. TLR4는 대식세포 활성화를 시키기 위해 TNF- α , IL-6 및 iNOS에 의한 MAPK를 증가시켰다고 보고되었다¹⁶⁾. 또한, LPS로 유도된 iNOS의 단백질 발현과 관련된 MAPK 활성화는 RAW 264.7세포에서 p38, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2)의 단백질 발현을 조절한다고 보고되었다¹⁷⁾.

이러한 염증 매개인의 발생을 효과적으로 조절할 수 있는 물질들이 염증의 치료 및 예방을 위한 소재로서 주목받고 있으며, 항염증 활성을 바탕으로 유효성분으로부터 활성기전을 규명하여 안전하고 효과적인 천연유래기능성소재로서의 가능

성을 검토하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁸⁻²¹⁾. 따라서 본 연구에서는 백미를 이용하여 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 염증유발인자인 LPS를 처리하여 세포독성을 확인한 후, NO와 PGE₂의 생성, 염증성사이토카인 및 관련 단백질발현을 측정하여 그 염증발현 억제기작과 관련 있는 MAPK 신호전달경로를 조사하였다. 이러한 일련의 연구를 통하여 천연유래소재로부터 항염증과 연관된 질병의 예방 또는 치료에 도움이 될 수 있는 기초자료로 활용하고자 연구를 수행하였고 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 백미 물추출물 제조

본 실험에 사용한 백미는 중국에서 생산된 것을 (주)백제허브(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 실험 전 중부대학교 한방보건제약학과 본초학교실에서 대한민국약전외한약(생약)규격집에 맞게 관능검사를 하였으며, 대한민국약전규격에 적합한 것만 정선하여 사용하였다. 백미를 10배의 증류수로 혼합하여 80°C의 항온수조(Daihan Scientific Co., Ltd., Korea)에서 8시간 동안 진탕하며 3회 반복 추출하였고, 얻어진 추출물을 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 2회 여과하였다. 그 후 여과액을 회전 감압농축기(Büchi B-480, Switzerland)를 이용하여 50±1°C 수욕상에서 농축하였다. 이를 -70°C 초저온냉동고(Ilshin, Korea)에 동결 후 동결건조기에서 건조시켜 분말 형태의 백미 물추출물(CWE)을 얻었다. 실험 직전에 분말형태의 CWE를 증류수로 녹여 시험농도로 만든 후 0.45 μ m 시린지 필터(Advantec, Japan)로 여과하여 본 연구에 사용하였다.

2. 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 제공받아 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL, Paisley, Scotland), 2 mM glutamine, 100 μ g/mL penicillin-streptomycin(Gibco BRL, Paisley, Scotland)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지를 사용하여 배양하였다.

3. 세포 생존율 측정

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10⁴ cell/well씩 분주한 후 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 상등액을 제거하여 새로운 배지로 분주한 후 CWE를 농도별(50, 100, 200, 400, 800 μ g/mL)로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율을 측정을 위해 Cell Counting Kit 8(CCK-8; Dojindo, Japan)을 사용하여 각각의 well에 10 μ L씩 처리한 후 60분간

반응시켰다. 반응 후 450 nm의 파장에서 ELISA reader (Molecular devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 CWE를 처리하지 않은 대조군에 대한 흡광도를 백분율로 나타내었다.

4. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/well씩 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 상등액을 제거하여 새로운 배지로 분주한 후 CWE를 농도별(100, 200, 400 µg/mL)로 처리하여 60분간 배양하였다. 그 후 lipopolysaccharide(LPS; *Escherichia coli* O55 : B5, Sigma-Aldrich, USA)를 1 µg/mL 농도로 각각의 well에 처리한 후, 동일한 조건에서 다시 24시간 동안 배양하였다. NO 생성량의 측정은 NO 분석키트 (Intron, Korea)를 사용하여 매뉴얼에 명시된 방법대로 96 well plate에 세포 배양액을 분석용 시약키트 N1 용액을 각각의 well에 50 µL씩 분주하여 10분간 상온에서 반응시키고, 분석용 시약키트 N2 용액을 각각의 well에 50 µL를 분주하여 다시 10분간 상온에서 반응시켰다. 반응 이후 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여, NO 생성량을 분석하였다. NO 생성량은 표준물질로 nitrite를 사용하여 검량선을 작성한 후 농도 (µM)로 표시하였고, 측정된 시료의 흡광도를 대입하여 3회 반복 측정하여 나타내었다.

5. Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성량 측정

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/well씩 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 상등액을 제거하여 새로운 배지로 분주한 후 CWE를 농도별(100, 200, 400 µg/mL)로 처리하여 60분간 배양하였다. 그 후 LPS; *Escherichia coli* O55 : B5, Sigma-Aldrich, USA)를 1 µg/mL 농도로 각각의 well에 처리한 후, 동일한 조건에서 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 세포배양 상등액은 원심분리기(Sigma, USA)를 사용하여 1,500 rpm, 5분 원심분리하여 상등액을 회수하였다. PGE₂의 함량은 PGE₂ ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 명시된 방법대로 측정하였다.

6. 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6) 생성량 측정

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2×10^4 cell/well씩 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 상등액을 제거하여 새로운 배지로 분주한 후 CWE를 농도별(100, 200, 400 µg/mL)로 처리하여 60분간 배양하였다. 그 후 LPS; *Escherichia coli* O55 : B5, Sigma-Aldrich, USA)를 1 µg/mL 농도로 각각의 well에 처리한 후, 동일한 조건에서 다시 20시간 동안 배양하였다. 배양

종료 후 세포배양 상등액은 원심분리기(Sigma, USA)를 사용하여 1,500 rpm, 5분 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 전염증성 사이토카인의 함량을 Mouse TNF-α ELISA Kit 및 Mouse IL-6 ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 사용자 매뉴얼에 명시된 방법대로 측정하였다.

7. Western blot 분석을 통한 MAPK 단백질 발현을 측정

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 100파이 배양 접시에 1×10^6 cell/well씩 37°C 및 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 상등액을 제거하여 새로운 배지로 분주한 후 CWE를 농도별(100, 200, 400 µg/mL)로 처리하여 60분간 배양하였다. 그 후 LPS를 1 µg/mL 농도로 각각의 well에 처리한 후, 동일한 조건에서 다시 30분 동안 배양하였다. 배양 종료 후 세포를 PBS를 이용하여 3회 세척한 뒤, lysis buffer[1× RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin, and 1 µg/mL leupeptin]를 처리하여 1시간 동안 lysis를 진행 하여 이후 10,000 rpm, 30분간 원심 분리 과정을 거쳐 상등액과 침전물을 분리하였다. BCA 키트(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 한 30 µg의 단백질을 10% polyacrylamide를 함유한 10% SDS PAGE에서 전기영동 한 뒤, poly-vinylidene difluoride membrane(PVDF; Milipore, Burlington, MA, USA)에 이전하였으며, 이전이 종료된 membrane은 5% skim milk가 함유된 tris-buffered saline tween- 20(TBST)에 넣고 상온에서 60분 동안 blocking을 시행하였다. 이후 TBST로 10분간 3회 세척한 뒤, 1차 항체 반응은 TBST로 희석된 β-actin antibody, iNOS antibody, COX-2 antibody, p38 antibody, SAPK/JNK (Thr180/Tyr185) antibody, ERK1/2 antibody, phospho-p38 antibody, phospho-SAPK/JNK(Thr180/Tyr185) antibody, phospho-ERK1/2 antibody(1:1,000, Cell signaling Tech, USA)에 넣은 후 4°C에서 하루 밤 동안 반응 하였다. 반응 후 TBST 용액으로 3회 세척한 membrane을 anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG가 결합된 2차 항체 (Cell signaling Tech, USA)를 1:1,000 비율로 희석하여 60 분 동안 반응한 뒤 TBST로 10분간 3회 세척하여 ECL kit (Bio-Rad, USA)로 반응시켰으며 Fusion solo S(Vilber, Collegien, France)를 통해 단백질 발현을 면적으로 수치화하여 그래프로 나타내었다.

8. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 측정한 다음 평균 ± 표준 편차로 표시하였다. 또한 통계처리는 SPSS(statistical package for the social science, version 18.0, Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 일원배치분산분석법으로 실시하였다.

각 처리구 간의 유의성검정은 Duncan의 다중범위 시험방법(Duncan's multiple range test)으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 차이의 유무를 판단하였다.

III. 결 과

1. CWE가 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

CWE 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 다음, CCK-8 키트를 이용하여 세포 생존율을 측정된 결과는 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 배양한 대조군의 세포 생존율을 기준(100%)으로 하였을 때, LPS 처리군에서의 세포 생존율은 $99.8 \pm 1.7\%$ 로 확인되었다. CWE 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 99.8 ± 0.4 , 99.2 ± 1.8 , $98.4 \pm 0.6\%$ 로 나타나 LPS 무처리군과 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, CWE 800 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 $86.03 \pm 3.50\%$ 로 세포독성이 나타내었다(Fig. 1.).

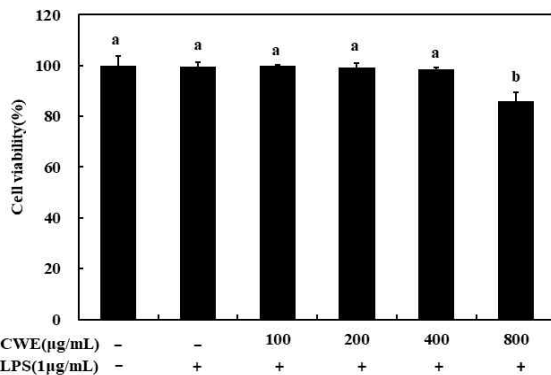


Fig. 1. Effect of CWE on cell viability in murine macrophage cell line, RAW 264.7 cell. Cell viabilities were measured with CCK-8 assay. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of CWE for 1 h, and then LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) was treated for 24 h. The concentration of CWE 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters(a-b) indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2. CWE가 Nitric oxide(NO) 생성량에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에 CWE를 처리한 다음 NO 생성량을 측정된 결과, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 27.6 ± 0.2 , 23.8 ± 0.9 , $19.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 로 농도 의존적으로 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2.).

3. CWE가 Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성량에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에 CWE를 처리한 다음 PGE₂ 생성량을 측정된 결과, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 80.8 ± 1.2 , 75.6 ± 5.0 , 61.1

$\pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ 으로 농도 의존적으로 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3.).

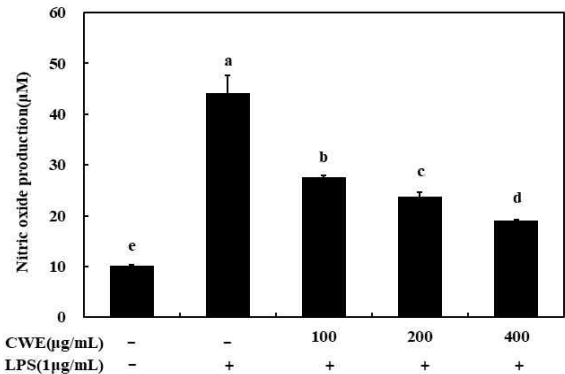


Fig. 2. Effect of CWE on NO in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of CWE for 1 h, and then LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) was treated for 24 h. The concentration of CWE was 100, 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters(a-e) indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

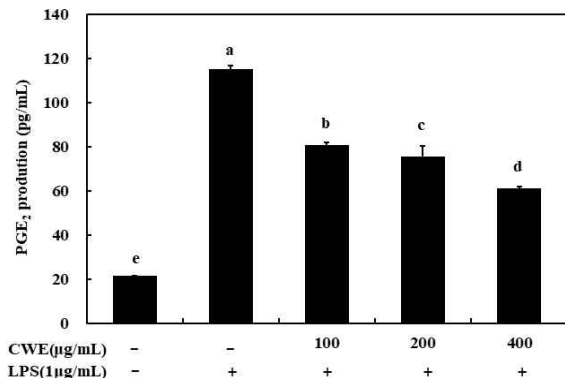


Fig. 3. Effect of CWE on NO in LPS-induced murine macrophage cell line, RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of CWE for 1 h, and then LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) was treated for 24 h. The concentration of CWE was 100, 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters(a-e) indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. CWE가 염증성 사이토카인 TNF- α 및 IL-6 생성량에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에 CWE를 처리한 다음 TNF- α 및 IL-6 생성량을 측정된 결과, TNF- α 생성량은 CWE 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 170.6 ± 16.5 , 157.3 ± 8.1 , $142.3 \pm 16.1 \mu\text{g/mL}$ 으로 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 4.). IL-6 생성량은 CWE 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 257.4 ± 2.6 , 235.0 ± 4.6 , $134.8 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 LPS 처리군에 비하여 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 4.).

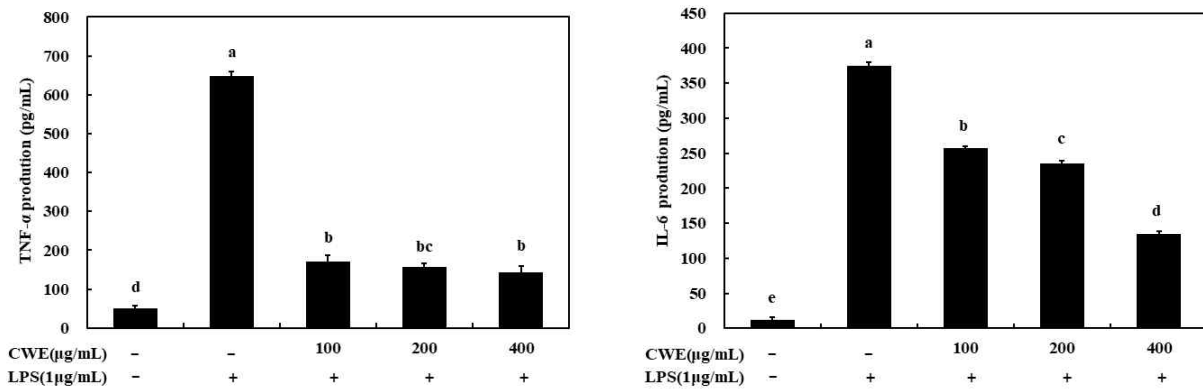


Fig. 4. Effects of CWE on TNF- α and IL-6 production in LPS-induced murine macrophage cell line, RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of CWE for 1 h, and then LPS(1 μ g/mL) was treated for 24 h. The concentration of CWE 100, 200 and 400 μ g/mL. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters(a-e) indicate significant difference($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

5. CWE가 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 CWE를 처리한 후 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot을 이용하여 분석한 결과, iNOS의 단백질 발현율은 CWE 100, 200, 400 μ g/mL 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 94.4 ± 0.8 , 87.9 ± 2.7 , $78.7 \pm 0.9\%$ 으로 농도

의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 5.). COX-2의 단백질 발현율은 CWE 100, 200, 400 μ g/mL 농도에서 LPS 처리군 대비 각각 96.9 ± 2.5 , 87.7 ± 2.0 , $84.0 \pm 1.4\%$ 으로 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 5.).

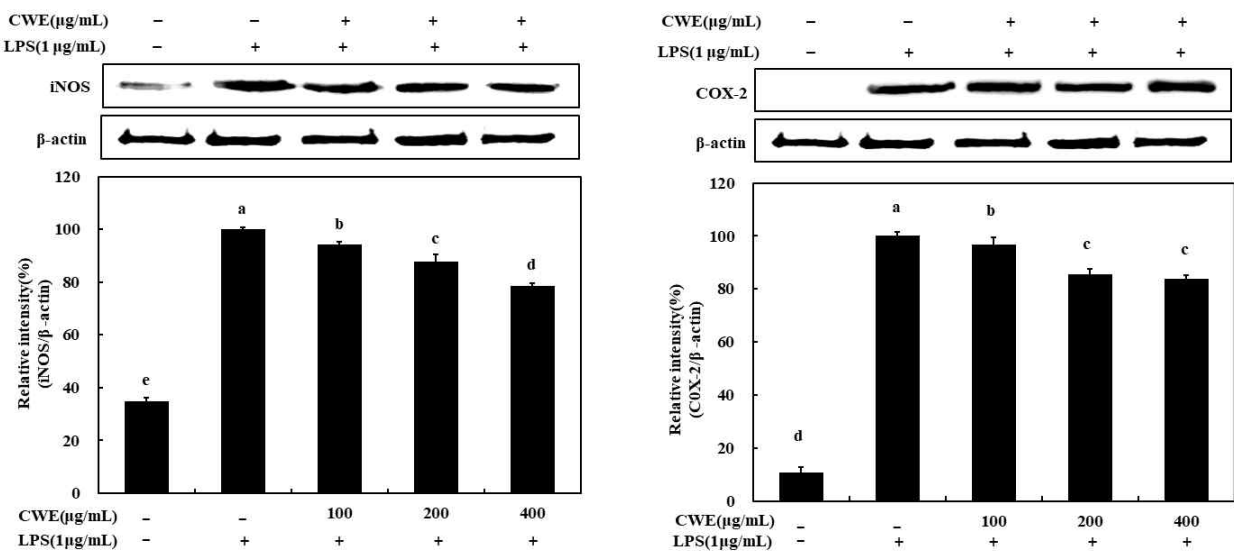


Fig. 5. Effect of CWE on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-induced murine macrophage cell line, RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were pre-treated with various concentrations of CWE for 1 h, and then LPS(1 μ g/mL) was treated for 24 h. The concentration of CWE was 100, 200 and 400 μ g/mL. β -actin was used as an internal control. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters(a-d) indicate significant difference($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

6. CWE의 Mitogen activated protein kinases (MPAK) 인산화에 미치는 영향

CWE 처리에 의해 억제된 NO, PGE₂, iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 상위 신호인 MAPK의 인산화를 억제하는 지 여부를 확인하기 위해 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2)의 단백질 발현율을 조사하였다. LPS 처리로 증가된 인산화된 p38(p-p38) 단백질 발현율은 LPS 처리군에 비해 CWE 100, 200, 400 μ g/mL 처리하였을

때 각각 60.4 ± 2.2 , 56.3 ± 1.5 , $37.7 \pm 3.2\%$ 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다. LPS 처리로 증가된 인산화된 ERK1/2(p-ERK1/2) 단백질 발현율은 LPS 처리군에 비해 CWE 100, 200, 400 μ g/mL 처리하였을 때 각각 53.5 ± 0.7 , 47.7 ± 1.7 , $32.2 \pm 0.4\%$ 로 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다. 또한, LPS 처리군에 비해 CWE 100, 200, 400 μ g/mL

농도로 처리했을 경우 인산화된 JNK(p-JNK) 단백질 발현율은 각각 95.5 ± 1.5 , 63.2 ± 0.8 , $53.0 \pm 1.8\%$ 로 농도의

존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 6.).

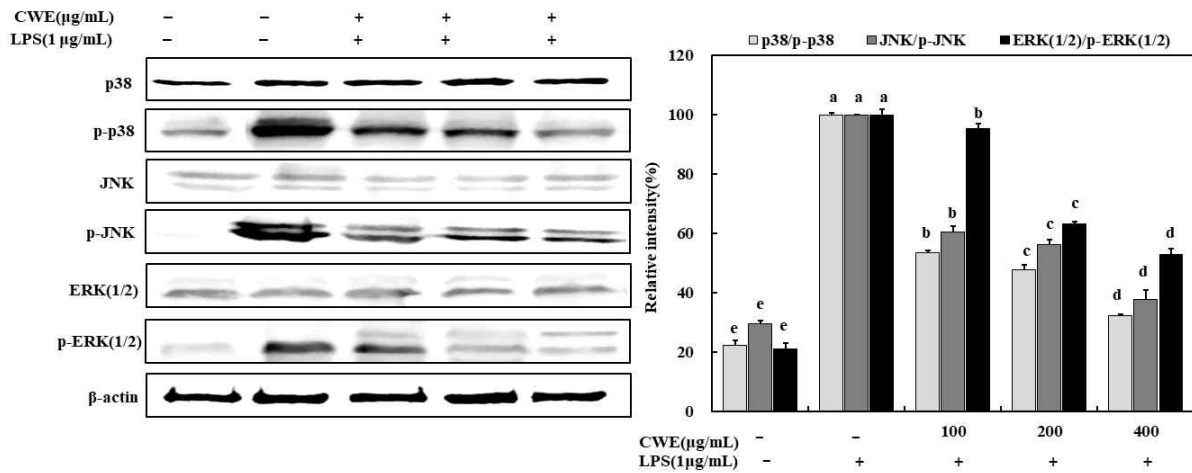


Fig. 6. Effect of CWE on MAPK signaling expression in LPS-induced murine macrophage cell line, RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were co-incubated with the indicated concentrations (100, 200 and 400 μg/mL) of CWE and LPS for 30 min and whole-cell lysates were analysed by western blotting using antibodies against p38, JNK, and ERK(1/2), and the respective phosphorylated forms. All values are means \pm standard deviations of triplicate determinations. Means with different letters (a-e) indicate significant difference ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

IV. 고찰

초기염증 반응에 관여하는 대식세포는 동물체내 모든 조직에 존재하며, 외부 이물질을 탐색하고 포식하여 죽은 세포 조직을 제거하는 포식 작용과 TNF- α , IL-1, IL-6과 같은 전염증성 사이토카인들을 비롯하여 NO 및 PGE₂ 등의 다양한 염증 매개 물질들을 생성 및 분비하여 염증 반응을 촉진한다²⁶⁻²⁶. 염증 매개 물질에 관한 활성 평가는 lipopolysaccharide(LPS)나 peptidoglycan(PGN) 등과 같은 세균 유래 염증 유발원을 대식세포주 또는 분리된 일차 대식세포에 처리하여 분비되는 염증 물질의 정량평가를 통해 실행되고 있다²⁷. 그러므로 LPS를 murine 대식세포인 RAW 264.7 세포주에 처리하고 그에 따른 NO와 각종의 염증성 사이토카인의 생성 증가를 조절할 수 있는 다양한 생약 및 한약추출물에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다²⁸⁻³⁰.

본 연구에서도 염증 반응에 핵심적인 작용을 하는 대식세포에서 항염 활성 확인하기 위해 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증매개인자의 과잉생성을 유도하고, 다양한 농도의 CWE를 함께 처리한 후 LPS 처리구와의 생성을 비교하여 CWE의 염증발현 억제작용과 관련된 MAPK 신호전달경로를 조사하였다.

CWE의 세포독성 여부를 알아보기 위하여 우선 RAW 264.7 세포에 대한 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 CWE 400 μg/mL이하의 농도에서는 세포 생존율이 98.43% 이상인 것으로 나타났으며, 800 μg/mL 농도에서는 86.03%로 약간의 세포독성이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1.).

CWE의 항염증 활성을 확인하기 위하여 세포 독성이 나타나지 않는 400 μg/mL이하의 농도로 처리하였으며, LPS를 이용하여 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 인위적으로 염증반응을 일으켜 NO를 과량 생성하는 조건을 설정하

였다. CWE를 처리하여 NO 생성이 억제되는지 확인한 결과, CWE의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 2.). CWE 400 μg/mL이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않으면서 NO 생성이 감소시킴으로서 항염증 활성에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각되었다. Sung 등³¹은 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에 개망초꽃 메탄올추출물을 25~200 μg/mL 농도로 처리하였을 때 NO의 함량은 2.52~12.82 μM로 농도 의존적으로 감소되는 경향을 나타낸다고 하였으며, Lee³²는 계지, 도인, 망초 혼합물의 50~400 μg/mL 농도에서 NO 생성이 30~40% 억제되는 것으로 보고하였는데, 본 연구의 결과와 유사한 경향이 있다. 이 같은 결과는 NO와 상호작용을 하는 전사인자들의 발현 측정 여부를 통하여 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 염증반응 억제에 효과가 확인될 수 있을 것으로 기대되었다.

염증의 주요 요소인 PGE₂ 생성조절로 항염증효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위하여 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 CWE를 처리한 다음 PGE₂ 생성량을 측정된 결과, LPS 처리군은 LPS 무처리군과 비교하였을 때 PGE₂의 생성량이 약 5.37배 증가하였고, LPS 처리군 대비 CWE를 함께 처리한 구에서의 PGE₂ 생성은 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소되었다(Fig. 3.). 앞선 NO 생성량을 확인한 결과와 부합되게 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 염증성 매개산물인 NO 및 PGE₂ 생성량이 CWE 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다. Pang과 Hoult³³, Hinz 등³⁴은 비스테로이드 항염증제로서 아스피린과 시알산에 의해 LPS로 유도된 대식세포에서 PGE₂ 생성이 감소되는데, 이는 COX-2 효소의 발현억제를 거쳐서 이루어지는 것이며, 또한 NO 생성에 의해 조절되는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 CWE에 의한 PGE₂ 억제

효과가 NO 생성량을 감소시킴으로써 PGE₂의 생성량 억제에도 영향을 미치는 것으로 기 보고된 연구결과들과 같은 것으로 판단된다.

염증 초기에 급성염증반응을 유발하는데 중요한 역할을 하는 염증성 사이토카인의 생성에 대한 CWE의 영향을 알아보고자 하였다. LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 CWE를 처리한 다음 TNF- α 및 IL-6 생성량을 측정된 결과, 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포만 배양한 처리군과 비교하였을 때 LPS 처리군에서 현저하게 TNF- α 및 IL-6 생성량이 증가되었다. 또한 LPS 처리군에 대비 CWE를 함께 처리한 군에서의 TNF- α 및 IL-6 생성량은 처리농도가 증가함에 따라 유의하게 감소되었다(Fig. 4.).

LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 CWE 처리에 의해 NO생성이 억제되었으므로, L-arginine으로부터 NO를 생성하는 iNOS와 염증유발인자인 COX-2의 단백질 발현율을 western blot으로 조사하였고, 이 때 세포의 여러 전제조건에서도 그 발현정도의 격차가 대개 없는 하우스 키팅유전자인 β -actin을 양성대조군으로 사용하였다. iNOS와 COX-2의 단백질 발현율은 LPS 처리군 대비 LPS 무처리군에 각각 2.95배, 8배 증가되었다. LPS 처리군에 CWE를 100, 200, 400 μ g/mL 농도로 처리하였을 때, 농도가 증가함에 따라 의존적으로 억제되었다(Fig. 5.). iNOS는 평상시 세포조직 내에 존재하지 않으나 한번 활성화가 되면 장기간에 걸쳐 대량의 NO를 생성하거나 전염성바이러스를 비롯한 병원체에 반응하여 방어하는 작용을 하고, 염증반응을 촉진시키거나, 순환계통 질병 및 종양과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁵⁻³⁷. 이러한 결과는 NO 생성 억제와 비슷한 양상을 보이는데 CWE도 iNOS 단백질의 발현과 NO생성에 깊이 관련하고 있는 것으로 생각되었다. 따라서 CWE는 NO생성과 상호작용을 하는 iNOS단백질의 발현억제로 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 염증반응과 면역작용이 억제 활성이 있는 것으로 판단된다. 또한 COX-2는 산화촉진 물질이나 전염증성자극 때문에 MEKK-1, NF- κ B의 활성화를 거쳐 형성되며, prostaglandin 합성을 증가시키기 때문에 염증반응에 있어 핵심적인 기능을 보고하였는데³⁸, 이는 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 CWE의 처리로 염증 매개체인 PGE₂ 생성량의 감소와 더불어 COX-2 단백질 발현도 억제로 유사한 경향이 있는 것으로 나타내었다.

LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포의 염증반응에 있어서 CWE 처리에 의해 염증성 사이토카인(TNF- α 및 IL-6) 생성 억제, iNOS 그리고 COX-2 단백질의 발현이 억제됨으로써, CWE의 항염증 활성과 관련된 염증유발 신호전달체계를 좀 더 면밀하게 검토가 필요한 것으로 판단된다.

MAPK는 세포조직의 성장과 분화의 조절작용, 사이토카인과 스트레스에 대한 세포반응조절작용 등에 중요한 기능을 하는 신호전달체계로 3가지효소인 p38(p38 kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 등이 있다^{39,40}. 그리고 MAPK는 NF- κ B 등 다양한 과정을 통해 염증 유전인자인 TNF- α , iNOS 및 COX-2 등의 발현을 조절하는 것으로 밝혀져 있다^{41,42}. 이들은 세포조직의 신호를 받으면 세포질 내부를 통해 핵 내부의 전사인자활성을 조절하고 세포 내에서 인산화가 촉진되어 세

포조직의 형태변화와 사이토카인분비 등을 초래한다⁴³⁻⁴⁵. 활성화된 신호전달경로의 MAPK는 대식세포의 증가염증 반응에 있어서 여러 가지 염증성매개물질들의 발현을 유인하거나, 주요 염증 매개물질인 NO와 PGE₂를 각기 형성하는 iNOS와 COX-2 유전인자의 발현에 신호전달기능을 하므로 MAPK의 활성억제는 염증치료에 있어 중요한 타겟이 된다^{46,47}. 이들 MAPK는 전체 다양한 세포의 자극에 반응하여 MEK에 의해 tyrosine과 threonine을 인산화 함으로써 활성화되며, MAPK의 활성형은 나중에 다른 kinase나 전사요소들의 인산화를 촉진하여 표적유전자의 발현을 변화시킨다⁴⁸.

본 연구에서 NO, PGE₂, iNOS, COX-2 및 염증성사이토카인의 상위신호인 MAPK cascade의 억제에 미치는 영향을 조사하였다. CWE 처리에 의해 MAPK의 인산화를 억제하는지 여부를 확인하기 위해 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2)의 단백질 발현율을 확인한 결과, LPS 무처리군 대비 LPS 처리군에서 인산화를 증가시켰다. CWE 100, 200, 400 μ g/mL의 농도에서는 LPS 처리군 대비 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2)의 단백질의 발현율이 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 6.). 따라서 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 CWE 처리에 의해 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2)의 MAPK 신호전달 경로가 억제되는 것을 확인하였다.

이러한 결과들을 종합해보면, CWE에 함유되어 있는 생리활성물질에 의해 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현이 억제될 뿐만 아니라 염증매개체와 염증성 사이토카인((TNF- α 및 IL-6)의 생성이 감소되어 특이적인 MAPK 신호전달경로에서 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2) 단백질 발현 억제를 통해 항염증 반응을 조절하는 것으로 추측된다. 향후 CWE의 항염증활성 핵심물질, 신호전달경로에 대한 자세한 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 백미(Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma Water Extract: CWE)로부터 LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 MAPK 신호경로 조절을 통한 항염증 활성을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 세포생존율을 조사한 결과 CWE 100, 200 및 400 μ g/mL농도에서는 98.4% 이상으로 대조군과 거의 차이가 없었으나, 800 μ g/mL 농도에서는 86.0%로 약간의 세포독성이 나타났다.
2. LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 CWE 100, 200 및 400 μ g/mL 처리 후 NO 및 PGE₂ 생성량은 LPS 처리군에 대비 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다.

3. LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 CWE 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 후 전염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6 생성량은 LPS 처리군보다 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다.
4. LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현율은 LPS 처리군보다 CWE 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 억제되었다.
5. LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2) 단백질 발현율은 LPS 처리군보다 CWE 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 억제되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 CWE는 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포에 세포독성이 나타내지 않으면서, LPS로 유도된 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7세포 내 인산화된 p38(p-p38), JNK(p-JNK) 및 ERK1/2(p-ERK1/2) 활성화와 관련된 MAPK 신호전달경로 억제하며, NO, PGE2, 염증성 사이토카인(TNF- α 및 IL-6) 생성 감소, iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 억제함으로써 염증반응을 촉발하는 전구 염증매개인자들을 감소시켜 항염 활성이 있는 것으로 확인하였다. 이는 CWE가 항염증과 연관된 질병으로부터 예방 또는 치료에 도움이 될 수 있는 천연유래소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 사료되는 바이다.

References

1. National Institute of Biological Resources, National Institute of Biological Information Management System, 2016.
2. Park JH, Encyclopedia of Herbal Medicine.(volume one), Seoul : Shinilbooks, 2002 ; 312.
3. Park MG, Park JU, Yang SW, Kim JJ, Preservative composition comprising *Cynanchum atratum* Bunge extract as active ingredient and method of manufacturing the same, Seoul : AJ Co., Ltd, 2017 ; 10-2017-0029518.
4. Yuan Y, Zhang WD, Zhang C, Liu RH and Jin HZ, Studies on chemical constituents from root of *Cynanchum atratum*, China J. Chin. Mater. Med, 2007 ; 32 : 1895-8.
5. Jin Q, Han XH, Yun CY, Lee C, Lee JW, Lee DH, Lee MY, Jung SH, Hong JT, Kim YS and Hwang BY, Melanogenesis inhibitory pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2018 ; 28 : 1252-6.
6. Lee KY, Sung SH, and Kim YC, New acetylcholinesterase-inhibitory pregnane glycosides of *Cynanchum atratum* Roots, Helvetica Chimica Acta, 2003 ; 86 : 474-83.
7. Yang J, Wang B, Zhang C, Xu X and Zhang M, A C21-steroidal glycoside from *Cynanchum atratum* attenuates Concanavalin A-induced liver injury in Mice, Molecules, 2019 ; 24 : 1-13.
8. Lee KY, Yoon JS, Kim ES, Kang SY and Kim YC, Anti-acetylcholinesterase and anti-amnesic activities of a pregnane glycoside, cynatroside B, from *Cynanchum atratum*, Planta Medica, 2005 ; 71 : 7-11.
9. Hu G, Hong D, Zhang T, Duan H, Wei P, Guo X and Xu X, Cynatroside-C from *Cynanchum atratum* displays anti-inflammatory effect via suppressing TLR4 mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice, Chemico-Biological Interactions, 2018 ; 279 : 187-95.
10. Mukudai Y, Kondo S, Koyama T, Li C, Banka S, Kogure A and Shintani S, Potential anti-osteoporotic effects of herbal extracts on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes *in vitro*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014 ; 29 : 1-14.
11. Yan Y, Zhang J, Liu K, Huang T, Yan C, Huang L and Hao X, Seco-pregnane steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum atratum* and their anti-TMV activity, Fitoterapia, 2014 ; 97 : 50-63.
12. Kim YY, Lee S, Jang HJ, Hur G, Lee SW, Jung KS, Lee SJ, KIM SH and Rho MC, *Cynanchum atratum* ameliorates airway inflammation via maintaining alveolar barrier and regulating mast cell-mediated inflammatory responses, The American Journal of Chinese Medicine, 2019 ; 47 : 1795-814.
13. Comalada M, Lloberas J and Celada A, MKP-1: a critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation, Eur J Immunol, 2012 ; 8 : 1938-48.
14. Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, Jin Y, Li Xian, Hwang SL, Kwon O, Chang YC, Park YG, Park SS, Son JK, Kim CH and Chang HW, Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW264,7 cells, Int. Immunopharmacol, 2012 ; 12 : 175-81.
15. Cheng BCY, Ma XO, Kwan HY, Tse KW, Cao HH, Su T, Shu X, Wu ZZ and Yu ZL, A herbal formula consisting of rosae multiflorae fructus and lonicerae japonicae flos inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, J. Ethnopharmacol, 2014 ; 153 : 922-7.
16. Nyati KK, Masuda K, Zaman MMU, Dubey PK, Millrine D, Chalise JP, Higa M, Li S, Standley DM,

- Saito K, Hanieh H and Kishimoto T. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids, Res.* 2017 ; 45 : 2687-703.
17. Chan ED and Riches DW. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38mapk in a mouse macrophage cell line. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001 ; 280 : C441-50.
 18. Lee YH and Lim EM. Anti-Inflammatory effect of *Ligustri lucidi* fructus water extract in RAW 264.7 cells induced by LPS. *J Korean Obstet Gynecol.* 2013 ; 26 : 66-81.
 19. Li J, Zhang H, Huang W, Qian H and Li Y. TNF- α inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr. Top Med. Chem.* 2012 ; 12 : 1408-21.
 20. Saw CL, Wu Q, Su ZY, Wang H, Yang Y and Xu X. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis*(Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti- inflammation. *Biopharm. Drug Dispos.* 2013 ; 34 : 303-11.
 21. Lodovici M, Guglielmi F, Meoni M and Dolara P. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 2001 ; 39 : 1205-10.
 22. Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A and Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect. Immun.* 2004 ; 72 : 2312-20.
 23. Li Y, Wu Q, Deng Y, Lv H, Qiu J, Chi G and Feng H. D(-)-salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells and mouse models. *Int. Immunopharmacol.* 2015 ; 26 : 286-94.
 24. Bosca L, Zeini M, Traves PG and Hortelano S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 2005 ; 208 : 249-58.
 25. Nathan C and Xie QW. Nitric oxide synthases: role, tolls, and control. *Cell.* 1994 ; 78 : 915-8.
 26. Wei W, Li XY, Zhang HQ and Wu SG. Anti inflammatory and immuno pharmacology. 1sted. Beijing : Renmin weisheng chubanshe. 2004 ; 10-7.
 27. Kim JY and Chol JY. Anti-inflammatory effects of ginseng-derived active principles. *The Korean Ginseng Research and Industry.* 2007 ; 1 : 17-23.
 28. Park WS. Effect of water extract from artemisiae argi folium on mouse macrophage stimulated by LPS. *Kor. J. Herbology.* 2009 ; 24 : 151-7.
 29. Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS and Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 2009 ; 125 : 286-90.
 30. Lee JY, Lee YJ and Park WS. Anti-inflammatory Effects of Fermented *Houttuyniae Herba* Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. *Kor. J. Herbology.* 2010 ; 25 : 27-34
 31. Sung MS, Kim YH, Choi YM, Ham HM, Jeong HS and Lee JS. Anti-inflammatory effect of *Erigeron annuus* L. flower extract through heme oxygenase-1 induction in RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011 ; 40 : 1507-11.
 32. Lee JW. Antiarthritic and anti-inflammatory effects of the mixture of Cinnamon Cortex, Persica Semen and Mirabilite. Kyung Hee University. 2013.
 33. Pang L and Hoult JRS. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. *Biochem Parmacol.* 1997 ; 53 : 493-500.
 34. Hinz B, Kraus V, Pahl A and Brune K. Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin E2 synthesis in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 ; 274 : 197-202.
 35. Nathan C and Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 13725-8.
 36. Witthoht T, Eckmann L, Kim JM and Kagnoff MF. 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cell. *Am J Physiol. dlf.* 1998 ; 275 : 564-71.
 37. Ryu JH, Ahn H, Kim JY and Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS activated macrophages. *Phytotherapy Research.* 2003 ; 17 : 485-9.
 38. Kranzhöfer R, Browatzki M, Schmidt J and Kübler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor- κ B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 ; 257 : 826-8.
 39. Robinson MJ and Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997 ; 9 : 180-6.
 40. Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002 ; 298 : 1911-2.
 41. Sahu BD, Kumar JM and Sistla R. Baicalein, a bioflavonoid, prevents cisplatin-induced acute kidney injury by up-regulating antioxidant defense and down-regulating the MAPKs and NF- κ B

- pathways. *Plos One*. 2015 ; 10 : 1-19.
42. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jahng Y, Lee SH and Chang HW. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by prepenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 2004 ; 27 : 617-20.
 43. Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T and Hanisch UK. c-Jun N-terminal kinases(JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia*. 2005 ; 50 : 235-46.
 44. Nam JB, Lee MH, Choi HY, Sohn NW and Kang H. Effect of forsythiae fructus ethanol extract on inflammatory cytokine production and cellular signaling pathways in mouse macrophages. *Korean Journal of Herbology*. 2012 ; 27 : 59-64.
 45. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005 ; 1754 : 253-62.
 46. Lowenstein CJ and Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 1992 ; 70 : 705-7.
 47. Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO, Al Mussawir H and Abramson SB. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF- κ B subunits(p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *Journal of Immunology*. 2005 ; 175 : 6924-30.
 48. Kim JI, Jin CY, Seo MJ, Lim HS, Lee YC, Joo WH, Choi BT, Jeong YK and Choi YH. Genistein-induced growth inhibition was associated with inhibition of cyclooxygenase-2 and telomerase activity in human cancer cells. *J Life Sci*. 2008 ; 18 : 884-90.