

제주산 애기수영 추출물의 항염증 효과

양은진¹, 현광희², 최해리³, 김승영^{3*}, 현창구^{1*}

Anti-inflammatory Activity of *Rumex acetosella* Extracts from Jeju Island

Eun-Jin Yang¹, Kwang Hee Hyun², HaeRi Choi³, Seung-Young Kim^{3*}, and Chang-Gu Hyun^{1*}

Received: 5 July 2018 / Revised: 10 August 2018 / Accepted: 16 August 2018

© 2018 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The anti-inflammatory activity and ignorable toxicity of *Rumex acetosella* extract (J9) were investigated and confirmed by measuring the expression level of NO, PGE₂, and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in lipopolysaccharide (LPS)- and J9-treated in RAW264.7 macrophages. Relative to a LPS-only-treated group, the inhibition effect of J9 on the production of NO, PGE₂, pro-inflammatory cytokines was increasing across J9-treated samples but the cell viabilities stayed constant. We also exhibited that the iNOS expression level in the J9-treated samples was dose-dependently decreased relative to its untreated control and the elevated expression level of COX-2 seemed to be equal across samples treated with LPS alone or in combination with J9.

Keywords: *Rumex acetosella*, anti-inflammatory, lipopolysaccharide, iNOS, COX-2

1. INTRODUCTION

피부의 질환은 유전적 요인과 환경적인 요인, 피부 장벽의 이상, 면역학적 이상, 식생활의 변화 등의 영향으로 급증하고 있으며 면역학적인 이상에 의한 알레르기성 염증 반응은 피부 장벽을 파괴시키고 면역, 염증 반응을 항진시킨다 [1,2]. 이에 따라 알레르기를 유발하는 물질인 히스타민 분비 억제나 염증성 cytokine들의 발현을 억제하는 등 기전의 차단을 통해서 질환을 예방할 수 있는 천연물 소재의 개발이 필요한 실정이다 [3]. 염증반응은 침입으로 인한 조직의 손상에 대해 구조나 기능을 회복시킬 수 있는 유익한 체내 방어기전이다. 그러나 반복되는 염증은 조직 손상의 원인이 되었고 이에 따라 염증을 일으키는 물질을 찾아 제거하고자 하는 많은 노력이 있었다 [4]. 염증과정은 다량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등 염증 인자가 Nitric Oxide Synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다. NO는 혈압조절 및 응고, 면역기능 등의 역할을 하며 NOS에 의해 형성되는데 NOS는 constitutive form (cNOS)과 inducible form (iNOS)로 나뉜다 [5,6]. cNOS는 정상적인 체내 생리기능을 담당하는 반면 iNOS는 다양한 조직에서 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide (LPS), 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ) 등에 유도돼 많은 양의 NO를 생성하고 세포독성이나 조직 손상과 같은 인체에 유해한 작용을 나타낸다고 보고되었다 [7]. 뿐만 아니라 NO가 염증반응의 원인이 되거나 COX의 활성을 촉진시켜서 prostaglandin의 합성을 촉진하고 염증반응을 심화시킨다고 알려져 있다 [8]. PGE₂는 염증 반응의 매개체로서 역할을 하며 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-12 등의 염증성 cytokine 생성을 억제하는 면역 반응의 조절자 역할을 한다는 것

¹제주대학교 화학·코스메틱스학과

¹Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243 Korea

Tel: +82-64-754-3542, Fax: +82-64-756-3561

e-mail: cghyun@jejunu.ac.kr

²(주)헬리오스

²Helios Co., Ltd., Sanchundan Dong-gil 16, Jeju 63243 Korea

³선문대학교 제약생명공학과

³Department of Pharmaceutical Engineering & Biotechnology, Sunmoon University, Chungnam 31460, Korea

Tel: +82-41-530-2390, Fax: +82-41-530-2939

e-mail: sykim01@sunmoon.ac.kr

이 많은 연구를 통해 입증되었다 [9]. PGE₂의 합성은 phospholipid A2의 효소작용을 통해 arachidonic acid가 생성되고 이 arachidonic acid는 효소에 의해서 prostaglandin G₂, 그리고 다시 prostaglandin H₂가 되는데 COX에 의해 촉진되는 과정이다. COX의 isoenzyme 중에서 COX-1은 혈소판 응집, 위점막 보호 등 생리적 기능을 담당하며 COX-2는 염증 등 자극에 의해서 발현되고 COX-2로 인해 만들어진 prostaglandin이 염증 반응에 관여한다고 보고되어진다 [10].

Cytokine은 T세포, β세포, 대식세포 등 면역세포로부터 분비되는 단백질로서 세포간 신호전달, 행동조절, 면역 반응 조절에 관여하며 [11], 이 면역세포들은 분비된 cytokine의 종류에 따라 증가나 감소를 인식하며 면역 기능을 수행한다 [12]. 또한 표적이 되는 세포로 신호를 전달하며 면역 반응을 활성화하는데 중요한 역할을 알려져 있다 [13]. T 림프구로부터 분비되는 cytokine 중 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 전염증성 cytokine은 과다하게 분비되면 항염증성 cytokine들과의 불균형이 초래되고 이로 인해 숙주의 면역기능이 떨어지게 된다고 보고된 바 있다 [14].

애기수영 (*Rumex acetosella*)은 유럽이 원산인 마디풀과에 속하는 자웅이주 식물이며, 종자로 번식할 뿐만 아니라 지하 뿌리로도 번식한다. 한방에서는 애기수영의 뿌리를 소산모라고 하며, 청열양혈 작용과 항암, 폐결핵, 객혈 등에 사용했으며, 현재는 암치료를 위한 대체 약품인 ESSIAC의 한 성분으로 사용되고 있다 [15]. 애기수영은 주로 언덕이 많은 초원이나 계곡에서 자라며 다양한 플라보노이드, 페놀 화합물 및 테르페노이드가 포함되어 전통적으로 간, 소화 기능, 장 기능 및 신장 질환을 치료하는데 사용되었다 [16]. 그러나 이러한 효능에도 불구하고 아직까지 애기수영의 항염증 효능에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 애기수영 추출물을 이용하여 RAW 264.7 cell에서 발생하는 염증 반응에 대한 억제 효과 및 기능성 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. *Rumex acetosella* 추출물 제조

애기수영은 제주도에서 2016년에 채집하였으며, 애기수영의 잎과 가지를 70% EtOH에서 24시간 동안 실온 추출하여 사용되었다. 애기수영 추출액 (9)은 필터로 여과한 뒤에 evaporator를 사용해서 농축하였고, 농축한 추출물은 -20°C에서 동결 건조하여 PBS (phosphate buffer saline)에 용해하였으며 이를 이용해 실험을 진행하였다.

2.2. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Grand

Island, NY, USA) 배지를 사용해서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3일 주기로 계대 배양하여 사용하였다.

2.3. 세포 독성 측정

MTT assay는 염증 세포인 RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 3.0×10⁵ cell/mL로 well plate에 분주하고 24시간, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 전 배양하였다. 이후 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하고 24시간 배양하였다. 다음으로 MTT 용액을 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 다음 MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 첨가하여 살아있는 세포와의 반응으로 생긴 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate로 옮겨 ELISA reader를 사용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

2.4. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 3.0×10⁵ cell/mL로 24시간 전 배양하였다. 이후 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하고, 세포 배양 상등액 100 uL와 Griess 시약 100 uL를 혼합하여 10 분간 실온암소에서 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. standard 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution하여 얻었다.

2.5. Prostaglandin E₂(PGE₂)생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell (3.0×10⁵ cell/mL)에 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻어진 상층액의 PGE₂ 함량을 측정하였다.

모든 시료는 정량하기 전까지 냉동보관하였다(-20°C). PGE₂는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 정량하였고 standard에 대한 표준곡선의 r²값은 0.99 이상이었다.

2.6. 전염증성 cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β) 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cells은 3.0×10⁵ cell/mL로 조절한 후 전 배양하고 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻어진 상층액의 전염증성 cytokine 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관하였다 (-20°C). 전염증성 cytokine은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 정량하였다.

2.7. Western blot analysis

RAW 264.7 cell (1.0×10^6 cell/mL)을 18시간 전 배양 후 시료와 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 PBS를 사용하여 cell을 2회 washing하고 lysis buffer [$1 \times$ RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY, USA), 1 mM pheylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatin, and 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin]를 이용하여 1시간 동안 lysis시킨 다음 원심분리하여 (15,000 rpm, 15 min) 단백질을 상등액을 분리하였다. 단백질의 농도는 BSA kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8-12%의 polyacrylamide gel에 전기영동하고 Poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질 전이가 된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 첨가하고 상온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:5000, Calbiochem, USA), COX-2 antibody (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, USA), β -actin antibody (1:10,000, Sigma, USA)를 이용하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 이후 T/TBS 용액을 사용해 4회 세척한 다음 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:5,000 또는 1:10,000으로 희석하여 상온 1시간 반응 후 T/TBS 용액으로 3회 세척하였다. 단백질은 ECL kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad, USA)를 통해 측정하였다.

2.8. 통계처리

결과는 mean \pm S.D.으로 나타냈으며 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 애기수염 (J9) 추출물의 세포 독성 측정

RAW 264.7 cell에 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 단독 또는 J9 추출물 (각각 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)과 동시 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 이용하여 세포 독성을 확인하였다 (Fig. 1). 그 결과 J9 추출물은 모든 농도에서 무처리군과 비교 시 유의적인 차이를 보이지 않아 세포의 생존율에 영향을 주지 않음을 확인 하였다. 따라서 이 결과를 바탕으로 동일한 농도 범위에서 다음 실험을 진행하였다.

3.2. Rumex acetosella 추출물의 Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성

Lipopolysaccharide (LPS)는 면역세포에 작용하여 L-arginine 으로부터 iNOS의 작용에 의하여 NO 생성을 증가시킨다. NO의 생성이 과도하게 많아지면 만성염증에 관여하기 때문에 만성염증을 조절하기 위한 NO 생합성 억제제의 개발에 관심이 높아지고 있다 [17]. 염증을 유발하는데 원인이 되는 활성 산소 Nitric oxide (NO)의 생성에 J9 추출물이 어떠한 영향을

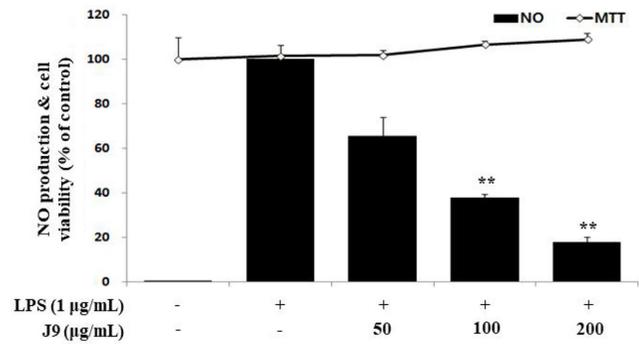


Fig. 1. Effect of J9 on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only or with LPS plus various concentrations (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) of J9 for 24 h. Nitric oxide production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined from the 24h culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of J9. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$ versus LPS alone. $\text{IC}_{50} = 84.7$ $\mu\text{g/mL}$.

미치는지에 대해서 조사하였다 (Fig. 1). RAW 264.7 cell에 J9 추출물 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)과 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양하였고, NO의 생성된 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO_2^- 의 형태를 측정하였다. 측정 결과, LPS를 단독으로 처리한 군은 NO 생성을 유도하였고, J9 추출물은 LPS 단독 처리군과 비교했을 시 농도의존적으로 NO의 생성량이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 80% 이상으로 NO의 생성량을 억제하는 것으로 확인 되었다. 따라서 J9 추출물은 대식세포의 NO의 생성을 감소시킴으로써 염증 발생에 의한 질환 유발을 제어할 수 있는 것으로 생각된다.

3.3. Prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 억제 활성

COX-2 유래 PGE_2 는 면역 관련 세포의 활성을 유도해서 염증 반응을 일으키며 Th2 세포의 활성을 유도해 염증성 cytokine을 과도하게 생성하는 원인이 된다 [18]. J9 추출물을 다양한 농도로 처리하여 RAW264.7 세포의 PGE_2 생성 억제 활성을 측정한 결과, LPS를 처리하여 염증을 유발한 군과 비교했을 때 J9 추출물 각각의 처리 농도 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)에서 농도 의존적으로 PGE_2 의 생성 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 특히 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 시 J9 추출물의 활성이 95%로 PGE_2 생성을 억제 하는 것으로 나타났다. 따라서 J9 추출물은 LPS로 인해 증가된 PGE_2 생성을 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 확인하였다.

3.4. 전염증성 cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성 억제 활성

Cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로서 면역세포의 활성, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6는 염증반응을 조절하는 대표적 pro-

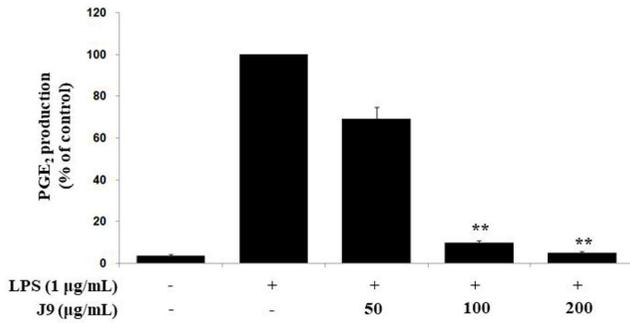


Fig. 2. Effect of J9 on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of J9 for 24 hr. PGE₂ production was determined by ELISA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.005, ***p*<0.001 versus LPS alone. IC₅₀=58 µg/mL.

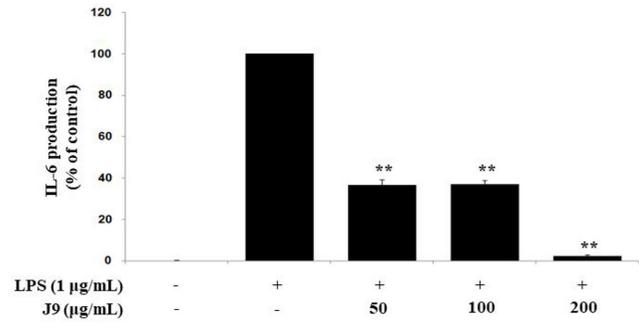


Fig. 4. Effect of J9 on IL-6 production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of J9 for 24 hr. IL-6 production was determined by ELISA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.005, ***p*<0.001 versus LPS alone. IC₅₀=16.3 µg/mL.

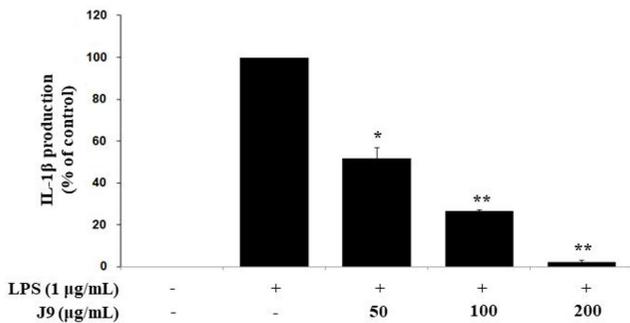


Fig. 3. Effect of J9 on IL-1β production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of J9 for 24 hr. IL-1β production was determined by ELISA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.005, ***p*<0.001 versus LPS alone. IC₅₀=43.7 µg/mL.

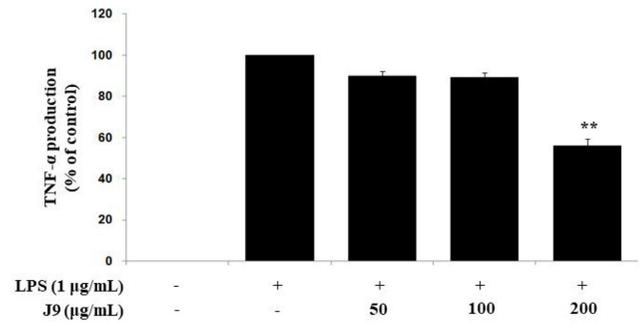


Fig. 5. Effect of J9 on TNF-α production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of J9 for 24 hr. TNF-α production was determined by ELISA method. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.005, ***p*<0.001 versus LPS alone.

inflammatory cytokine으로 알려져 있다 [19]. 따라서 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 J9 추출물을 처리한 후 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정함으로써 J9 추출물에 의한 염증 매개성 cytokaine의 생성 억제 효과를 검토하였다 (Figs. 3, 4, 5). RAW264.7 세포는 LPS에 의해 IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량이 유의적으로 증가하였지만, J9 추출물 (50, 100, 200 µg/mL) 처리군에서는 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 특히, J9 추출물 처리군의 200 µg/mL 농도에서는 IL-1β와 IL-6 분비량이 각각 98%로 상당히 억제됨을 확인하였다 (Figs. 3, 4). J9 추출물에 대한 TNF-α의 분비량 또한 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였으며 200 µg/mL에서 약 54% 이상의 억제효과를 나타내었다 (Fig. 5). 따라서 J9 추출물은 염증성 cytokine의 분비 억제를 통해 항염증 효과를 나타내는 것임을 시사했다.

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

NF-kB는 LPS에 의해 자극을 받게 되면 핵 내로 이동하여 COX-2 및 iNOS와 같은 여러 염증 효소의 전사를 활성화한다. 또한 iNOS에서 유래한 NO와 COX-2에 의해 합성된 PGE₂는 급성 및 만성 염증의 발병 기전에 중추적인 역할을 한다 [20]. 따라서 본 실험에서는 J9 추출물에 의한 염증의 억제가 어떠한 경로에 의한 것인지 확인하기 위해 RAW264.7 세포를 LPS로 자극한 후 J9 추출물을 농도별로 처리하여 각 신호 전달물질의 발현 정도를 관찰하였다. 실험 결과, 무첨가군과 비교하여 LPS (1 µg/mL)에 의해 증가된 iNOS 단백질 발현양이 J9 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 6). 또한 LPS에 의해 증가된 COX-2의 발현양은 J9 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 7). 이로써 J9 추출물에 의한 염증 억제가 NF-kB의 신호 전달과정을 통해 이루어지고 있음을 확인하였으며, 이러한 결과는

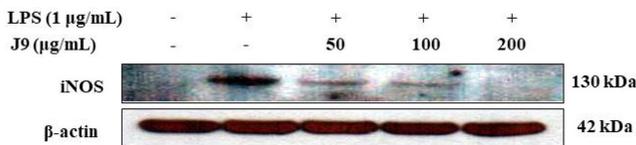


Fig. 6. Effect of J9 on the protein level of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (6.0×10^5 cell/mL) stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of J9 (50, 100, 200 ug/mL) for 24 hr. Whole-cell lysates (30 µg) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of iNOS and β-actin were determined by western blotting. The β-actin as a loading control.

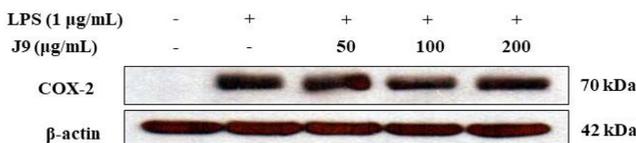


Fig. 7. Effect of J9 on the protein level of COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (6.0×10^5 cell/mL) stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of J9 (50, 100, 200 ug/mL) for 24 hr. Whole-cell lysates (30 µg) were prepared and the protein level was subjected to 10% SDS-PAGE, and expression of COX-2 and β-actin were determined by western blotting. The β-actin as a loading control.

염증성 cytokine, NO, COX-2, iNOS의 발현을 효과적으로 감소시켜 항염증 효과를 나타내는 것임을 시사하였다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 J9 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 Nitric oxide (NO) 저해 활성, Prostaglandin E₂ 생성 저해 활성과 전염증성 cytokines 생성 억제, iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 측정하였다. J9 추출물은 RAW264.7 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았고, LPS 자극에 의한 NO 생성을 농도 의존적으로 억제했다. 또한, PGE₂ 생성 억제 활성 측정 결과 LPS 자극으로 분비된 PGE₂ 생성을 억제하였으며 전염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α의 분비량을 농도 의존적으로 억제하였다. 대표적인 염증 관련 신호 전달 경로인 NF-κB 관련 유전자의 발현을 검토한 결과 J9 추출물에 의해 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제되었다. 따라서 J9 추출물은 천연 항염증제 후보물질로서의 가능성을 제시하는 결과로 사료된다.

Acknowledgements

이 논문은 2017년 교육부와 한국연구재단의 사회맞춤형 산

학협력 선도대학 (LINC+) 육성사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Lee, E. J., E. Y. Whang, K. Whang, I. S. Lee, and S. A. Yang (2009) Anti-allergic effect of *Zizania latifolia* Turcz extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 717-721.
- An, S. G. (2003) Atopic dermatitis and moisturizer. *Update in Dermatology for Dermatologists* 1: 21-25.
- Park, J. A. and M. O. Choi (2011) Antimicrobial activity and anti-inflammation effect to the human skin pathogens by the *Rumex crispus* L. root extracts. *Journal of Investigative Cosmetology* 9: 1-16.
- Ji, J. D., Y. H. Lee, and G. G. Song (2004) Prostaglandin E₂ (PGE₂): Roles in immune responses and inflammation. *Journal of Rheumatic Diseases* 11: 307-316.
- Garthwaite, J. (2010) New insight into the functioning of nitric oxide receptive guanylyl cyclase: Physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem.* 334: 221-232.
- Crane, B. R., A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, and J. A. Tainer (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279: 2121-2126.
- Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012) Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33: 829-837.
- Lee, H. J. (2014) Inhibitory effect of galangin from *Alpinia officinarum* on lipopolysaccharide induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 511-515.
- Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23: 144-150.
- Turini, M. E. and R. N. DuBois (2002) Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med.* 53: 35-57.
- Lee, S. B. (2014) Effects of middle-high intensity aerobic exercise on insulin resistance, immune function & inflammatory cytokine. *Journal of Leisure & Wellness* 9: 231-242.
- Dissing-Olesen, L., R. Ladeby, H. H. Nielsen, H. Toft-Hansen, I. Dalmau, and B. (2007) Finsen axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149: 112-122.
- Seo, M. J., B. W. Kang, J. U. Park, M. J. Kim, H. H. Lee, E. J. Ryu, W. H. Joo, K. H. Kim, and Y. K. Jeong (2013) Effect of black garlic extract on cytokine generation of mouse spleen cells. *Journal of Life Science* 23: 63-68.
- Park, H. G. and W. L. Lee (2013) Effects of aerobic exercise training and quercetin supplementation with low fat diet on inflammation and Th1, Th2 cytokine production in splenocytes in obese mice. *The Korea Journal of Sports Science* 22: 1223-1233.
- Choe, S. G., B. Y. Hwang, M. S. Kim, G. J. Oh, K. S. Lee, and J. S. Ro (1998) Chemical components of *Rumex acetosella* L. *Korean Journal of Pharmacognosy* 29: 209-216.
- Baig, H., D. Ahmed, S. Zara, M. I. Aujla, and M. N. Asghar (2011) In vitro evaluation of antioxidant properties of different solvent ext-

- tracts of *Rumex acetosella* Leaves. *Orient. J. Chem.* 27: 1509-1516.
17. Min, K. C. and J. W. Jhoo (2013) Antioxidant activity and inhibitory effect of *Taraxacum officinale* extracts on nitric oxide production. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 206-212.
 18. Jang, S. I., C. S. Jun, K. C. Kwak, M. S. Bae, J. H. Lee, K. Y. Kim, Y. G. Yun, and G. Y. Chai (2006) Evaluation of korean phyto-medical plants on inhibition of prostaglandin E₂ (PGE₂) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated U937 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 20: 455-459.
 19. Namkoong, S., S. A. Jang, E. H. Sohn, J. P. Bak, E. S. Sohn, H. J. Koo, W. J. Yoon, J. E. Kwon, Y. J. Jeong, X. Meng, H. S. Han, and S. C. Kang (2015) Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. *Korean J. Plant Res.* 28: 145-152.
 20. Baldwin, A. S. Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14: 649-683.