



국화꽃 물 추출물의 항염 효과

박범진¹ · 길기정^{2†}

Anti-inflammatory Effects of Chrysanthmi Flos Extract

Beom Jin Park¹ and Ki Jung Kil^{2†}

ABSTRACT

Received: 2022 August 24
1st Revised: 2022 September 14
2nd Revised: 2022 September 27
3rd Revised: 2022 October 4
Accepted: 2022 October 4

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Background: The anti-inflammatory effect of Chrysanthmi Flos (CF), primarily produced in the wild and recently being cultivated in Korea was investigated for using it as an anti-inflammatory material.

Methods and Results: For measuring anti-inflammatory activity, CF was freeze-dried (CFEFD) after water extraction. The production of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and pro-inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6] via ELISA, and expression of inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, extracellular-signal-regulated kinase (ERK)1/2, p38, phosphorylated inhibitor of the transcriptional factor NF- κ B (I κ B α), p65 (a subunit of nuclear factor- κ B) protein were determined using Western blot. The production of NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 reduced in a concentration-dependent manner by CFEFD treatment (100 μ g/ml - 400 μ g/ml) than that by lipopolysaccharide treatment. iNOS and COX-2 protein expressions were inhibited at a concentration of 100 μ g/ml - 400 μ g/ml and 100 μ g/ml - 200 μ g/ml, respectively, by the CFEFD treatment. JNK1/2, ERK1/2, p38 and phosphorylated I κ B α protein expressions were inhibited in a concentration-dependent manner by the CFEFD treatment. The expression of p65 protein increased in the cytoplasm and was inhibited in the cell nucleus in a concentration-dependent manner.

Conclusions: Water extract of CF exhibited high anti-inflammatory activity, thus having high value as an anti-inflammatory material.

Key Words: Chrysanthmi Flos, Anti-Inflammatory Activity, Water Extract

서 언

국화 (菊花, Chrysanthmi Flos)는 다년생 초본인 국화과 (Compositae)의 국화 (*Chrysanthemum morifolium* Ramatulle) 꽃으로 전국의 산야에 자생하는 것으로 국내 이외 일본, 중국 저지대의 산야이나 바닷가에 자라며 (Yook, 1989; Lee, 2003), 높이 1.0 m - 1.5 m이고 가지가 많이 갈라지며 백색 털이 많고, 잎은 호생하고 긴 타원상의 난형이며 꽃은 9월에서 11월에 황색으로 피는데 지름 1.5 cm로서 가지 끝과 원줄기 끝에 산형 비슷하게 달리고 설상화관은 길이 5 mm - 7 mm로서 통상화관은 끝이 5 개로 갈라지는 이 꽃 부위는 야국이라고도 불리어 진다 (Yook, 1989).

한방에서는 청열 해독약의 범주에 속하며, 약성은 微寒, 無毒하고 맛은 쓰고 매우며 주로 간, 심경에 선택적으로 작용하며 청열 해독의 효능이 있어서 疔瘡癰腫, 目赤腫痛, 頭痛眩暈을 치료하는데 사용한다 (Compilation Committee of Research on Teaching Materials of the Colleges of Oriental Medicine, 2007).

일반적으로 국화는 야국과 감국으로 나뉘어 연구가 이루어지고 있지만 같은 국화과 식물로 감국이 야국에 비하여 꽃이 약간 크다는 차이점은 있지만 생육 시기나 식물의 형태가 유사하고 한방이나 민간처방으로도 강심, 중추신경 억제, 혈압강하, 빈혈, 현기증 및 두통 완화를 목적으로 사용되고 있다 (You, 2009; Kim, 1996; Jang *et al.*, 1999).

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-750-6225 (E-mail) kildosa@joongbu.ac.kr

¹놀피인삼 대표 / CEO, NOLMAE INSAM Co., Ltd., Nonsan 32917, Korea.

²중부대학교 한방보건계약학과 교수 / Professor, Department of Oriental Medicine and Pharmaceutical Science, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea.

Uchio (1978) 및 Uchio 등(1981)에 의하면 감국 및 감국을 포함한 4 종의 국화속 식물에서 정유 성분을 분석한 결과 sesquiterpenoid계 화합물이 전체 60% 이상을 차지하고 있고 그 중 borneol, bornyl acetate, chamazulene 등을 대표적으로 함유하고 있다고 보고하였다 (Shin and Choi, 1982). 또한, 감국에 비하여 산국에는 camphor, cis-chrysanthenol, α -thujone, 1,8-cineol 및 umbellulone의 함유 높은 비율로 나타나는 특징을 가지고 있으며 (Hong, 2002; Kim, 2003), 이 외에 α -penene, β -caryophyllene, germacrene, camphene, β -pinene 등이 포함되어 있다고 보고되어 있다 (Hong, 2002).

국화의 성장 기간 동안 terpene류의 함량을 조사한 결과 sesquiterpene류가 monoterpene류 보다 약 2 배 - 3 배 더 높은 수준으로 함유되어 있음을 보고하기도 하였다 (Kim, 1997).

국화의 약리 성분에 대한 연구로 tetracosane과 같은 몇 가지 정유 성분 (Yook, 1989) 및 배당체인 acacetin-7-rhamnogalactoside가 확인되었으며 (Dan and Andrew, 1986), guaianolide계 sesquiterpene lactone인 cumambrin A의 성분이 분리, 보고된 바 있으며 (Yang *et al.*, 1996), germacranolide계 sesquiterpene lactone인 tulipinolide와 costunolide가 분리되었다 (Jang *et al.*, 1998).

국화의 효능에 관한 연구로 수종의 국화과 식물에서 nitric oxide 방출 및 acyl-CoA:cholesterol AT (ACAT)의 저해 활성을 비교하여 본 결과 산국에서 강한 저해 활성을 나타내었다고 보고한 바 있으며 (Jang *et al.*, 1999), Lee와 Park (2017)에 의하면 산국의 잎과 줄기에서 sesquiterpene lactone의 일종인 8-o-acetyl-2-methoxy-10 hydroxy-3,11(13)-guaidiene-12,6-olide이란 물질이 높은 ACAT 저해 활성 ($IC_{50} = 38 \mu\text{g/ml}$) 나타내어 고지혈증 치료에 효과적으로 사용할 수 있음을 제시한 바 있다. 또한, 야국의 메탄올 추출물, 메탄올 추출물의 각 용매별 분획의 항염활성을 검정한 결과 클로로포름 분획층에서 강한 항염활성 효과를 나타냈다고 보고하기도 하였다 (You, 2009).

Spörel 등 (1991)은 야국 추출물에서 중추신경계의 진정 작용, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제 효과가 있다고 하였으며 Jang 등 (1998; 1999)은 수종의 국화과 식물 추출물에서 *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 및 *Staphylococcus aureus*군에 강한 항균 활성을 나타냄을 보고하였다.

국화과 식물의 항암효과에 있어서 Dan과 Andrew (1986)는 국화과 식물 추출물이 폐암과 간암에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였고, 국화과 식물에 포함된 sesquiterpene lactone 계열의 화합물은 항종양 효과가 있으며 (Mew *et al.*, 1982), 산국꽃 중에 함유되어있는 germacranolides 성분이 폐암 세포에 대한 특이적인 항종양 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다 (Woerdenbag *et al.*, 1986; Jang *et al.*, 1998).

An (2010)은 NC/Nga 마우스에 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (DNCB)를 처리하여 면역질환의 일종인 아토피 피부염을 유발시키고 야국의 메탄올 추출물을 처리한 결과 아토피 증상이 억제되는 효과가 있음을 보고하였고, 장 등(1998)은 산국꽃에 tulipinolide이라고 하는 높은 항균 활성을 가진 물질이 함유되어 있음을 보고한 바 있으며, Nam과 Yang (1995)은 60 종의 생약을 대상으로 메탄올 추출물을 제조하고 이들의 암세포에 대한 독성을 확인한 결과, 여러 가지 생약 중 산국 전초 추출물이 L1210, K562 및 A549 등의 암세포주에 강한 세포독성을 나타내었다고 보고하였다.

뿐만 아니라 감국꽃의 acetylcholinesterase inhibitor로서의 약리 효과는 감국꽃에 포함된 높은 항산화 효과를 나타내는 플라보노이드인 acaciin, acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside 및 luteolin-7-O-glucuronide 등에 함량에 기인하며 감국꽃에 포함되어진 다양한 생리활성물질 중 주요 성분이 flavonoid 계열의 화합물임을 보고하기도 하였다 (Lim *et al.*, 2007; Middleton *et al.*, 2000).

본 연구에서는 국내에서 생산 재배되고 있는 국화꽃 (*Chrysanthemi Flos*)의 물 추출물을 제조하고 이들의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성, nuclear factor (NF)-B와 같은 염증성 사이토키닌의 분비에 미치는 효과를 검정하고, 염증 발현과 연관된 단백질 발현에 미치는 효과를 검정함으로써 국화꽃 물 추출물의 항염증 활성을 평가하였다. 또한 국화꽃 물 추출물의 염증 발현에 대한 억제 기작을 확인함으로써 효과적인 항염증 소재로서 활용될 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험 재료

본 실험에서 사용한 국화(菊花, *Chrysanthemum morifolium* Ramatue)의 노란색 꽃인 국화꽃 (*Chrysanthemi Flos*, CF)은 경북 영천에서 2020년도에 재배된 것을 10월 중하순에 채취·건조하여 제조한 제품인 국화 (제품명 : Human *Chrysanthemi Flos*, K1521031, Humanherb, Daegu, Korea)를 구입하여 사용하였고, 중부대학교 본초학 연구실험실에서 대한민국약전 및 본초학에 개재된 기원에 따라 확인·검증한 후 실험에 사용하였다.

시료는 이물질을 제거한 후 유통 및 저장 중 흡습된 상태로 된 제품을 최대한 탈 수분하기 위하여 50°C의 온도에서 재 건조한 후 $2 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 냉장 보관하면서 추출 및 분석용 시료로 사용하였다.

2. 국화꽃 물 추출물 조제

국화꽃 (CF) 물 추출물을 제조하기 위하여 국화꽃 중량 대

비 20 배의 증류수로 하여 80°C에서 8 시간 동안 추출한 후 거저로 1차 여과하여 상등액을 회수하였다. 같은 과정을 3 회 반복하여 얻은 모든 상등액을 합한 후 여과지(Whatman No. 2, Whatman Co., Kent, England)를 사용하여 부호너 여과기 (PBF110, LK Labkorea, Namyangju, Korea)로 여과하였다. 다시 여과액을 40±1°C 수욕상에서 감압농축기 (Rocket evaporator, Genevac Ltd., Ipswich, UK)를 이용하여 농축한 후 동결 건조기 (PVTFD10R, ilSinLab Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 건조하였다.

동결 건조한 시료 (freezing dried material of Chrysanthemi Flos' extract, CFEFD)는 초저온 냉동고 (MDF-192AT, SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 -20±1°C의 온도로 저장하면서 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

마우스 대식세포인 RAW264.7 (KTCC, Seoul, Korea) 세포를 2×10⁵ cells/well의 수준으로 현탁하여 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA), 2 mM의 glutamine, 100 µg/ml의 penicillin-streptomycin (SAFC, Brooklyn, Australia)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 배지가 포함된 100 mm 직경의 배양 접시에 접종하고 80%-90%의 균락 집합이 형성될 때까지 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Forma Series 3 WJ CO₂, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

RAW264.7 대식세포를 96 well plate에 2×10⁴ cells/well씩 분주한 후 CO₂ 배양기 (Forma Series 3 WJ CO₂, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 37°C, 5%의 CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다.

배양 후 상등액을 제거하고, 배양된 세포 표면을 PBS로 1 회 세척한 후 CFEFD를 50, 100, 200, 400 및 800 µg/ml 농도 수준으로 처리한 다음 lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* O55: B5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 1 µg/ml 농도로 처리한 후 24 시간 동안 추가 배양을 실시하였다.

24 시간 동안 배양된 세포를 Cell Counting Kit 8 (CCK-8 kit, Dogindo Molecular Technologies Inc., Rockville, MD, USA)를 이용하여 각 well에 10 µl 씩 분주하였고, 1 시간 동안 배양시킨 후 그 배양액을 파장 450 nm에 고정된 ELISA reader (SpectraMax ABS/ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율 측정은 3 회 반복 측정한 흡광도 값의 평균 흡광도 값을 얻은 다음 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광

도에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

5. Nitric oxide(NO) 생성 측정

RAW264.7 대식세포를 2×10⁴ cells/well의 농도로 분주한 후 CO₂ 배양기 (Forma Series 3 WJ CO₂, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 37°C 및 5%의 CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고, PBS로 1 회 세척한 다음 CFEFD를 각각 100, 200 및 400 µg/ml 농도 수준으로 처리하여 1 시간 동안 배양하였고 다시 LPS를 1 µg/ml의 수준으로 처리한 뒤 20 시간 동안 추가 배양하였다.

NO 분석키트 (Thermo Fisher Scientific Inc., Eugene, OR, USA)를 사용하여 각 well에 분석용 시약 키트 N1 용액 50 µl를 처리하고 10 분간 상온에서 반응시킨 후 분석용 시약키트 N2 용액 50 µl를 첨가하여 10 분간 다시 상온에서 반응시켰다.

반응 이후 ELISA reader (SpectraMax ABS/ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로 nitrite를 사용하여 작성된 검량곡선을 이용하여 nitrite 생성량을 측정하였다.

6. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 측정

RAW264.7 대식세포를 well 당 5×10⁵ cell 씩 분주한 다음 37°C, 5%의 CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 24 시간 후에 상등액을 제거하고, PBS로 1 회 세척한 후 CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도 수준으로 처리한 후 1 시간 동안 배양하였다. 여기에 다시 LPS를 1 µg/ml의 수준으로 처리한 후 20 시간 동안 추가 배양을 실시하였고 배양이 완료된 각 시료가 처리된 세포를 원심분리기 (Sorvall Legend XTR, Osterode, Germany)를 사용 (3,000×g, 5 분)하여 상등액을 회수하였다.

회수한 상등액을 대상으로 하여 사용자 매뉴얼에 의거 PGE₂ ELISA Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)를 이용하여 PGE₂ 생성량을 측정하였다.

7. 세포 배양액 내 염증성 cytokine 생성 측정

RAW264.7 대식세포를 well 당 2×10⁴ cell 씩 분주한 후 37°C로 조절된 CO₂ 배양기에서 24 시간동안 배양하였다. 이후 상등액을 버리고 PBS로 1 회 세척하여 CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리하여 1 시간 배양하였다. 그런 다음 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 20 시간 동안 배양한 후 원심분리 (3,000×g, 5 분, Sorvall Legend XTR, Osterode, Germany)하여 세포 배양액인 세포 상등액을 회수하였다.

회수한 상등액은 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin

(IL)-1 β , 및 IL-6의 생성량을 사용자 매뉴얼에 명시된 방법으로 ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 항체가 코팅되어있는 96 well plate에 100 μ l씩 배양액을 분주하여 4°C에서 하루 동안 반응시킨 뒤 세척 완충 용액을 사용하여 3 회 세척하였다. 검출 항체를 100 μ l씩 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 뒤 세척 완충 용액으로 3 회 세척하였다. Streptavidin-HRP 항체 (Cell Signaling Technology, Danvers, CO, USA)를 1:1,000의 비율로 희석한 액을 100 μ l씩 첨가한 후 차광하여 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, 세척 완충 용액을 사용하여 3 회 세척하였다.

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 기질로 실온에서 30 분간 교반하여 반응시킨 다음 2 N H₂SO₄으로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (SpectraMax ABS/ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450 nm 에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성량을 측정하였다.

8. Western blot 분석을 통한 단백질 발현 수준 측정

RAW264.7 대식세포를 5 × 10⁵ cells/well 씩을 100 mm 배양 접시에 분주하여 37°C, 5%의 CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고 1 회 PBS로 세척하여 CFEFD를 100, 200 및 400 μ g/ml 의 농도로 처리한 뒤 1 시간 배양하였고 1 μ g/ml의 농도의 LPS를 처리한 후 다시 20 시간 동안 추가 배양하였다.

배양이 끝난 세포를 iNOS 및 COX-2, Jun N-terminal kinase (JNK), p38, extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 및 I κ B 분석을 위한 시료로 사용하였고, 20 시간 배양 후 CFEFD 100, 200 및 400 μ g/ml 의 농도로 처리하고 배양한 뒤 LPS를 1 μ g/ml 농도로 처리하고 30 분간 배양하여 NF- κ B 65, p-JNK, p-ERK, p-p38 및 p-I κ B 분석을 수행하였다.

iNOS, COX-2, I κ B α , p-I κ B α , JNK, p-JNK, ERK1/2, p-ERK 1/2, p38, p-p38 및 NF- κ B p65의 단백질 발현 수준을 검토하기 위하여 전 세포 추출액 및 핵 분획은 다음과 같은 방법에 따라 분리하였다. RAW264.7세포의 전 세포 추출액은 PBS를 이용하여 세척한 다음 스크래퍼로 회수하여 마이크로 튜브로 옮긴 후, 원심분리 (3,000 × g, 5 분)한 다음 상등액을 제거하였다. 여기에 lysis 버퍼인 NP-40을 100 μ l 첨가하여 vortex한 다음 4°C의 온도에서 1 시간 동안 반응시키고, 원심분리 (15,000 × g, 10 분)하였다.

핵 분획은 PBS를 이용하여 세포를 세척한 다음 스크래퍼로 회수하여 마이크로 튜브에 옮긴 후, 원심분리기 (Sorvall Legend XTR, Osterode, Germany)를 통하여 3,000 × g에서 5 분 행한 후 상등액을 제거하였고 lysis buffer [10 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF]를 100 μ l 넣고 vortex하여 세포를 완전히 용해 시킨

다음, 10 분 동안 ice bath 위에서 반응시켰다. 5 분 동안 4°C에서 15,000 × g의 속도로 원심 분리 (Sorvall Legend XTR, Osterode, Germany)하여 상등액을 제거한 다음, 마이크로 튜브 하단에 남은 핵 pellet에 50 μ l의 추출 완충액 [(20 mM HEPES(pH 7.9), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1 mM PMSF)]을 넣고 vortex하였다. 1 시간 동안 ice bath 위에서 용해 시킨 다음, 원심분리 (15,000 × g, 4°C, 15 분, Sorvall Legend XTR, Osterode, Germany)하였다.

전 세포 추출액 및 핵 분획의 단백질을 정량하여 SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였고, PVDF membrane (West-Q PVDF Membrane, GenDEPOT, Baker, TX, USA)으로 단백질을 전이시켰다. 각각의 membrane에 iNOS, COX-2, I κ B α , p-I κ B α , JNK, p-JNK, ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, NF- κ B p65, Lamin B 및 β -actin의 1 차 항체와 반응시킨 후, 다시 2차 항체와 반응시켜 ECL용액 (D-Plus™ ECL Femto system, Dongin LS, Seoul, Korea)으로 각 단백질의 발현 정도를 평가하였다. Western blot imaging system을 이용하여 상대적인 단백질의 발현을 정량하였다.

9. 통계분석

본 실험에서 얻어진 모든 결과는 최소 3 반복 수행하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 통계 처리는 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 유의수준 5% 수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 국화꽃 추출 건조물이 세포 생존율 및 nitric oxide 생성에 미치는 효과

RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리한 후 국화꽃 추출 건조물 (CFEFD)을 50, 100, 200, 400 및 800 μ g/ml 의 농도로 처리한 다음, CCK-8 kit를 이용하여 세포 생존율을 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

RAW264.7 대식세포를 배양한 대조군 (100%)을 기준으로 하였을 때, LPS 단독 처리구에서의 세포 생존율은 101.37 ± 1.15%로 확인되었다. CFEFD를 50, 100, 200, 400 및 800 μ g/ml 의 농도로 처리한 결과, 세포 생존율은 각각 113.54 ± 1.21%, 108.32 ± 2.97%, 99.53 ± 2.42%, 96.25 ± 1.50%, 85.05 ± 1.63%로 나타났다. CFEFD 400 μ g/ml 이하의 농도에서는 96.25% 이상의 세포 생존율을 가지며 800 μ g/ml에서는 85.05%로 약간의 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1A).

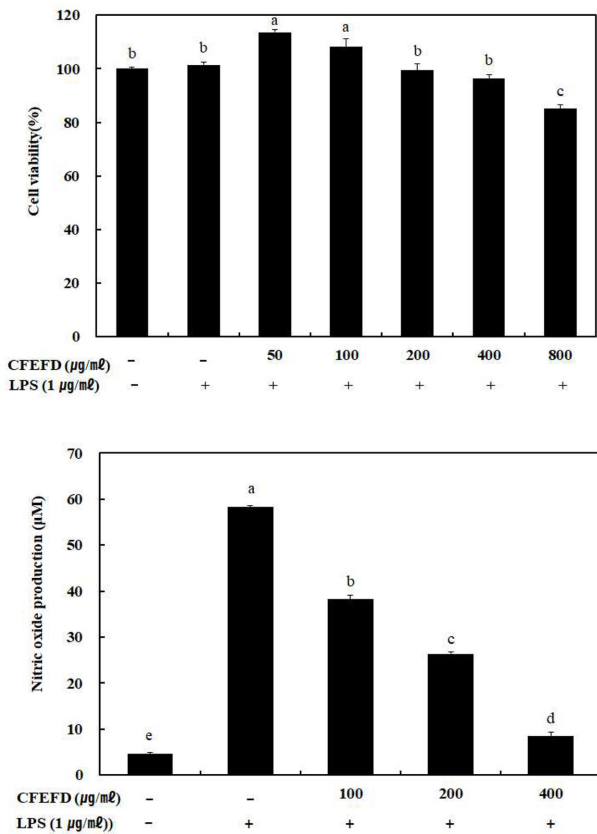


Fig. 1. Effect of CFEFD on cell viability (A) and nitric oxide production (B) in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells were treated with 50, 100, 200, 400 and 800 µg/ml of CFEFD for 1 hr before being treated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr. After 24 hr incubation, cell viability (%) was determined by CCK-8 assay. All values are means ± SD from triplicate separated experiments. Means with different superscripts (a - c) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

Choi 등(2009)은 야국 추출물의 항염 활성을 검정한 결과, BV-2 소교세포에서 1.0 µg/ml - 100.0 µg/ml 범위에서 야국 추출물을 단독 처리한 군이나 LPS로 면역유도 처리를 한 이후 야국 추출물을 처리한 군 모두에서 대조군에 비하여 세포 생존에는 아무런 영향을 주지 않았으며 고농도에서도 독성을 나타내지 않았다고 보고한 바 있으며 본 연구결과에서도 유사한 결과를 나타내었다.

NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, 정상적인 상태에서는 혈관 확장, 면역반응, 신경 전달 등의 생리적인 기능을 조절하는 중요한 역할을 한다 (Szabo, 2006; Soe et al., 2009). 또한 NO는 다양한 조직에서 필요 이상으로 생성될 경우 세포독성, 혈관 확장 및 조직 손상 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다고 보고되고 있다 (Nathan, 1992; Guzik et al., 2003).

LPS가 처리된 대식세포 RAW264.7 세포에 국화꽃 추출 건조물을 세포독성의 영향이 나타나지 않는 처리 농도인 100 µg/ml - 400 µg/ml의 수준으로 처리한 후 NO의 생성량을 측정하였다.

대조구에서는 $4.71 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 의 NO가 생성되었고, LPS 처리구에서는 $58.25 \pm 0.34 \mu\text{M}$ 로 NO 생성량이 크게 증가되었다. 반면, CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도 수준으로 처리하였을 때 NO 생성량은 각각 38.27 ± 0.86 , 26.33 ± 0.54 , $8.45 \pm 0.87 \mu\text{M}$ 로 나타나 LPS 처리구 $58.25 \pm 0.34 \mu\text{M}$ 보다 모두 농도 의존적으로 NO 생성이 감소되는 것을 확인하였다. 특히 CFEFD를 100 µg/ml의 농도 처리에서는 약 34%를 감소시켰으며, 400 µg/ml 처리에서는 약 85%를 감소시키는 결과를 보여주었다 (Fig. 1B).

You (2009)는 야국을 용매별로 분획한 후 각 분획의 NO 생성 억제율을 확인한 결과, chloroform 분획물과 물 분획물을 5 µg/ml의 수준으로 처리한 경우 각각 대조구에 대하여 78% 및 53%의 수준으로 NO 생성을 감소시켰다고 보고한 바 있다. 야국을 용매별 분획은 본 연구에서 적용한 국화꽃 추출 건조물의 농도보다 상대적으로 낮은 농도의 수준임에도 NO 생성을 높은 수준으로 감소시켰는 바 국화꽃 추출 건조물은 야국의 용매별 분획보다 더 높은 NO 생성의 억제 활성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

2. 국화꽃 추출 건조물의 prostaglandin E2 (PGE2) 생성 억제 효과

Prostaglandin (PG)는 모든 세포막에 존재하는 인지질에서 나오는 20 개의 탄소로 구성된 불포화지방산인 arachidonic acid 으로부터 cyclooxygenase 경로를 거쳐 생성되는 물질의 총칭으로, 광범위한 생리과정을 매개하는 강력한 물질로서 염증 반응을 유도하는 중요한 인자 중에 하나이다 (Yun et al., 2008).

Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 임신 중 자궁 평활근의 수축을 유도하는 체내 호르몬이지만 외부 자극으로부터 염증 반응이 발생 시 면역제어가 되지 않을 경우 급성 또는 만성 염증을 야기하는 단계로 발전하게 되는데, 이 때 혈관 확장, 면역세포의 염증 부위로 이동, 발열 및 통증 전달에 대부분 관여하는 긴요한 염증 매개 물질로서, phospholipase A₂ 효소의 작용으로 세포막에 존재하는 인지질로부터 AA가 생성되는 것으로 시작되는 불포화지방산에 포함된 호르몬이다 (Harris et al., 2002; Jee et al., 2004; Jang et al., 2006).

PGE₂는 급성 및 만성 염증 과정에 중추적 기능을 하는 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α의 발현을 증가시키거나, 외부 자극으로 염증 반응이 촉발되어 전달되는 경로에서는 COX-2가 잠정적으로 발현 되어 염증이 발생한 곳에서 prostaglandin을 과량 배출시킴에 전염증성 인자로 인해 염증 반응을 증폭시킨다 (Vane et al., 1998; Ryu et al., 2000). 또한 PGE₂는 대식

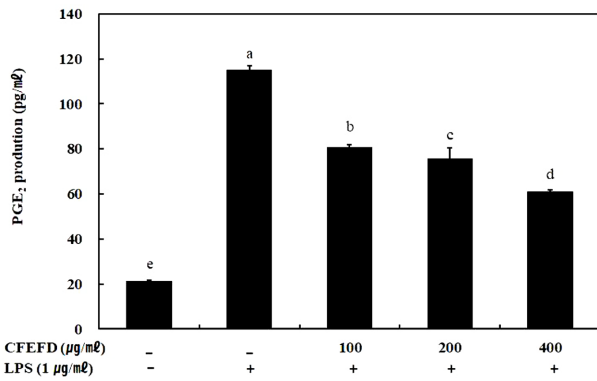


Fig. 2. Effect of CFEFD on PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells were treated with 100, 200 and 400 µg/ml of CFEFD for 1 hr before being treated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr. After 24 hr incubation, Production of PGE₂(pg/ml) was determined by the PGE₂ assay kit. All values are means ± SD from triplicate separated experiments. *Means with different superscripts (a - c) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

세포뿐만이 아니라 수지상세포 (dendritic cells), 자연 살해세포 (natural killer cells) 등 면역관련 세포의 활성을 유도하여 염증반응을 항진시킬 뿐만 아니라 helper T cells 중에서도 Th₂ 세포의 활성을 유도하여 염증성 사이토카인을 대량 생성하게 하는 물질이다 (Konturek *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2006).

국화꽃 추출 건조물이 염증의 주요 요소인 PGE₂ 생성량을 조절하고 이에 따른 항염증 효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위하여 LPS를 처리하여 면역반응이 유도된 RAW264.7 대식세포를 대상으로 CFEFD를 처리한 후 세포에서의 PGE₂ 생성량을 측정하였다.

LPS를 처리하여 면역반응이 유도된 대식세포에 100, 200, 400 µg/ml의 농도 수준으로 CFEFD를 처리한 구에서의 PGE₂ 생성은 각각 112.59 ± 1.60, 92.50 ± 3.53, 80.79 ± 2.93 pg/ml로 추출물의 농도가 증가함에 따라 생성량이 감소하는 경향이 있었다 (Fig. 2).

You (2009)는 야국 추출물의 용매 분획물이 PGE₂ 생성량에 미치는 영향을 확인한 바, 대조구의 경우 3603.9 ± 180.6 pg/ml의 PGE₂ 생성량이 나타난 반면, 야국의 메탄올 용매 분획물을 처리한 경우 2750.0 ± 130.9 pg/ml의 PGE₂ 생성량을 나타내어 약 23.7% 감소시켰으며 야국 추출물의 chloroform 용매 분획물을 처리한 경우 5 µg/ml의 농도에서 423.3 ± 86.3 pg/ml의 PGE₂ 생성량을 보여 88.25%의 감소율을 보여주었으나 물 층의 경우는 오히려 PGE₂ 생성량이 증가 (4192.3 ± 454.2 pg/ml) 하였다고 보고하였다.

이상의 결과를 보면 국화과 식물의 항염 활성 물질은 추출 용매나 종류별로 분획된 분획층에 서로 다른 농도의 수준으로

포함되어질 수 있으며 추출이나 분획에 사용되는 용매에 따라 활성의 차이를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

국화꽃 추출 건조물 (CFEFD)는 400 µg/ml 농도에서 NO 생성량을 약 85.5% 억제시켰고, PGE₂ 생성량도 동일 농도 수준에서 약 50% 이상 억제할 수 있음을 확인하였으며, 국화꽃 추출 건조물은 염증성 매개 산물인 NO 및 PGE₂ 생성을 억제함으로써 만성 염증 반응으로 진행되는 것을 억제할 수 있는 소재로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

3. 국화꽃 추출 건조물의 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성 억제 효과

국화꽃 추출 건조물이 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS를 처리하여 면역반응이 유도된 RAW264.7 대식세포를 대상으로 CFEFD를 처리한 후 세포에서의 각 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 함량을 측정하였다.

염증 초기에 급성염증 반응을 유발하는데 관련하는 TNF- α 생성량은 LPS 단독 처리구에서는 648.31 ± 10.56 pg/ml로 현저하게 증가하였으나 CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각 233.77 ± 2.29 pg/ml, 196.18 ± 1.47 pg/ml, 153.38 ± 4.88 pg/ml로 나타나 CFEFD의 농도별 처리에 따라 TNF- α 생성량이 농도 의존적으로 감소되어 각각 처리 농도에서 64.0%, 69.7% 및 76.3%의 생성억제효과를 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 3A).

IL-1 β 의 경우, LPS 단독 처리구에서는 103.23 ± 4.53 pg/ml로 현저하게 증가하였으나, CFEFD를 100, 200, 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우 IL-1 β 생성량은 각각 46.23 ± 1.33 pg/ml, 19.10 ± 2.89 pg/ml, 13.32 ± 3.80 pg/ml로 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 100 µg/ml 이상의 농도를 적용한 경우, LPS 단독 처리구 대비 50% 이상으로 IL-1 β 의 생성 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 3B).

IL-6의 경우에는 LPS 단독 처리구가 374.90 ± 5.10 pg/ml로 현저하게 증가한데 반하여 CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우 IL-6 생성량은 각각 172.15 ± 6.10 pg/ml, 143.93 ± 4.0 pg/ml, 및 53.54 ± 9.0 pg/ml로 나타나 LPS 단독 처리구에 비하여 농도 의존적인 생성 감소의 효과를 확인하였다 (Fig. 3C).

4. 국화꽃 추출 건조물의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과

국화꽃 추출 건조물이 nitric oxide 생성 억제 효과를 단백질 발현 수준에서 확인하기 위하여, L-arginine으로부터 NO를 생성하는 iNOS 단백질 발현율을 western blot으로 측정하였다.

LPS 단독 처리구 (100.00 ± 0.74%) 대비, LPS 무처리구의 iNOS 단백질은 35.66 ± 3.02%를 나타내었다. LPS 처리와 함

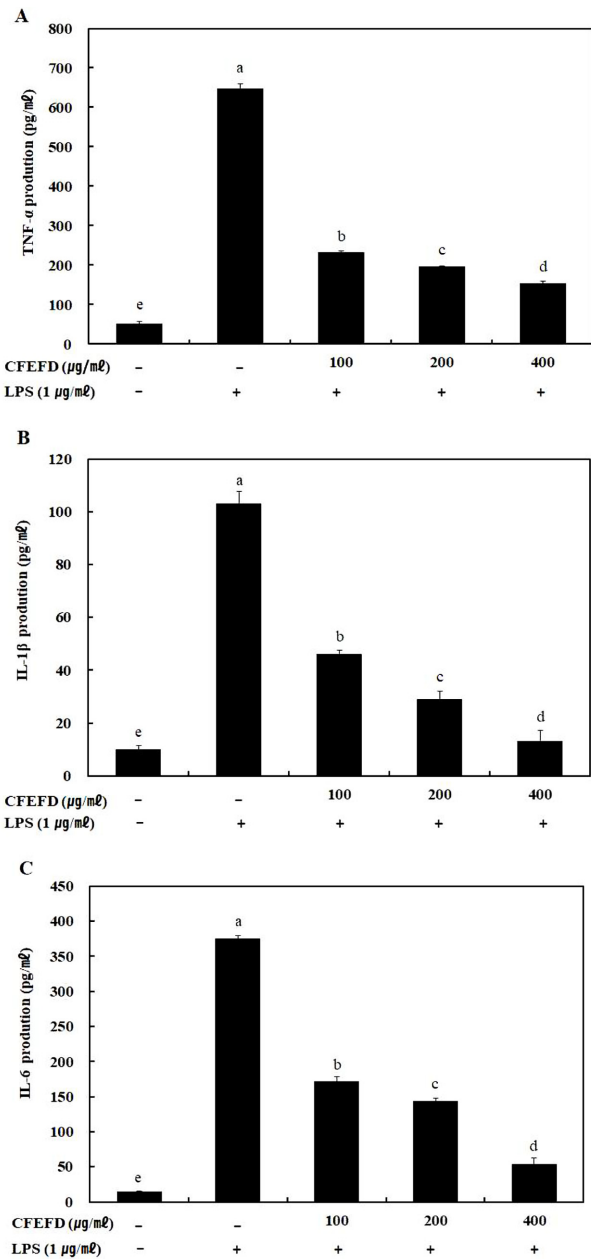


Fig. 3. Effect of CFEFD on TNF-α(A), IL-1β (B), IL-6 (C) production in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 cells were treated with 100, 200 and 400 μg/mL of CFEFD for 1 hour before being treated with 1 μg/mL of LPS for 24 hr. After 24 hr incubation, production of TNF-α (pg/mL), IL-1β (pg/mL) and IL-6 (pg/mL) was determined by the TNF-α, IL-1β and IL-6 ELISA kit. All values are means ± SD from triplicate separated experiments. *Means with different superscripts (a - e) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

게 CFEFD를 100, 200 및 400 μg/mL 농도로 처리하였을 경우, iNOS 발현율은 각각 $73.06 \pm 2.12\%$, $64.54 \pm 2.17\%$, $43.01 \pm$

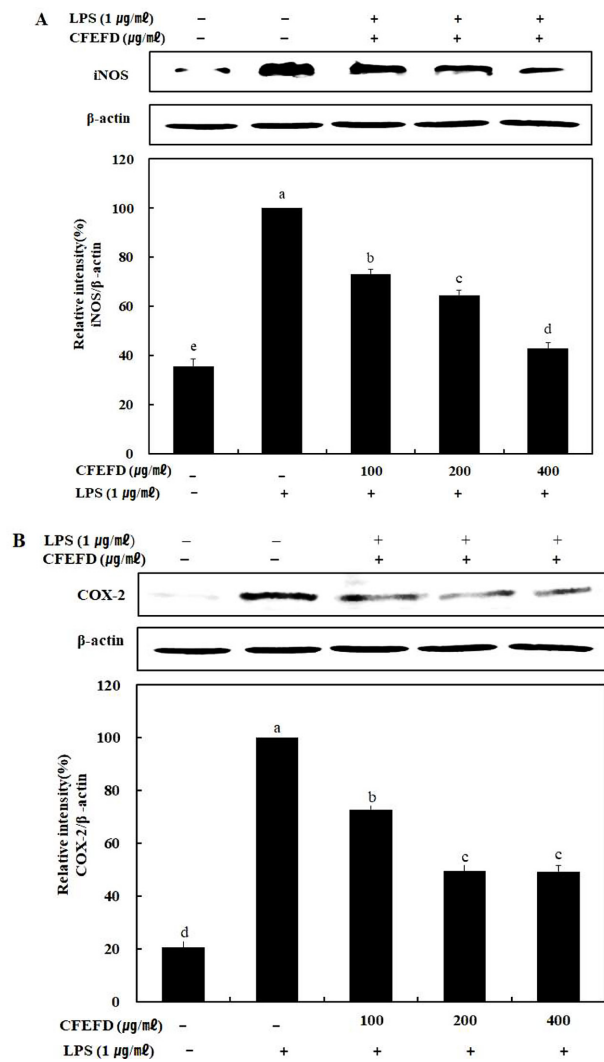


Fig. 4. Effect of CFEFD on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. RAW264.7 macrophage cells were pre-treated with 100, 200 and 400 μg/mL of CFEFD and then treated with 1 μg/mL of LPS. β-actin was used as an internal control. All values are means ± SD of triplicate determinations. *Means with different superscripts (a - e) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

2.34%로 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 4A). 결과적으로, CFEFD 처리에 따른 iNOS 발현은 NO 생성 억제 효과와 유사한 결과를 나타내어 (Fig. 1B) CFEFD 처리에 따라 iNOS 단백질 발현이 저해되고 이에 따라 NO 생성과 합성이 억제되어지는 것을 확인하였다.

Han 등 (2009)은 본 연구의 대상인 국화꽃과 같은 종에 속하는 구절초의 꽃 추출물 처리에 따라 NO 생성과 연관된 iNOS의 mRNA 발현과 단백질 발현 정도를 확인한 결과, 구절초 꽃 추출물의 처리에 따라 iNOS의 mRNA와 단백질 수

준 모두에서 발현을 농도 의존적으로 저해하였으며 특히 mRNA 수준에서 유의성 있는 저해 효과를 나타내어 구절초 꽃 추출물이 전사 단계에서 NO 생성과 관련된 저해 활성을 나타낸다고 보고한 바 이는 본 연구에서 사용한 국화 추출물의 경우에서도 전사 단계는 물론 iNOS 단백질의 발현을 억제함으로써 NO 생성이 억제되어지며 이를 통해 항염 활성을 나타내는 것으로 판단되어진다.

국화꽃 추출 건조물이 prostagradin 생성 억제 효과를 연계하여 염증유발 인자인 COX-2 단백질 발현 억제 활성을 확인한 결과, LPS 비처리 대조구 ($20.56 \pm 0.51\%$)에 비교해 LPS 처리한 경우 ($100.00 \pm 0.00\%$)는 뚜렷하게 COX-2 단백질 발현이 증가한 반면, CFEFD를 100, 200 및 $400 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 $72.79 \pm 3.88\%$, $49.61 \pm 0.83\%$, $49.29 \pm 0.90\%$ 의 COX-2 단백질 발현이 억제됨을 확인하였으나 $200 \mu\text{g/ml}$ 이상 농도를 처리한 경우 COX-2 단백질 발현 이상 억제 활성은 더 이상 증가하지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 4B).

33종의 약용작물 추출물의 COX-2 단백질 발현에 미치는 효과를 검토한 결과 33종의 약용작물 추출물 모두가 COX-2 단백질 발현에 대한 억제 효과를 확인할 수 없었다는 보고 (Lee *et al.*, 2011), 구절초 꽃 추출물의 항염 효과를 확인한 연구 결과에서도 COX-2 단백질 발현 억제 효과는 확인되지 않는다는 보고 (Han *et al.*, 2009)에 반하여 본 연구 대상인 국화꽃 추출 건조물은 특정 농도 이하의 수준까지 COX-2 단백질 발현을 억제 활성을 나타냄을 확인할 수 있었으며 야국 추출물에서 용매 분획 중 chloroform 분획물을 처리한 경우 COX-2 단백질 발현을 37.1% 수준으로 억제할 수 있었다고 보고한 것을 (You, 2009) 고려하면 국화꽃 추출 건조물은 COX-2 단백질의 발현 억제 효과를 가지고 있으며 이에 따른 항염증 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

5. 국화꽃 추출 건조물의 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 활성 억제 효과

NO, PGE₂, iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 상위 신호인 MAPK cascade에 미치는 국화꽃 추출 건조물의 효과를 확인하고자 LPS로 면역 유도된 RAW264.7 대식세포에 CFEFD를 농도별로 처리하고 MAPK family인 JNK, p38와 ERK (1/2) 단백질의 발현을 조사하였다.

JNK 단백질의 발현에 있어 LPS를 처리한 경우 단백질 발현 수준이 LPS 무처리구 대비 $14.39 \pm 0.70\%$ 로 나타나 약 85.6% 감소되어졌으며, LPS를 처리하고 CFEFD를 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도 수준으로 처리한 경우에서도 약 88.6% 감소하여 LPS 단독 처리구와 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면, CFEFD를 200 및 $400 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 각각 단백질 발현 수준이 LPS 무처리구 대비 $47.09 \pm 1.37\%$ 및 54.06

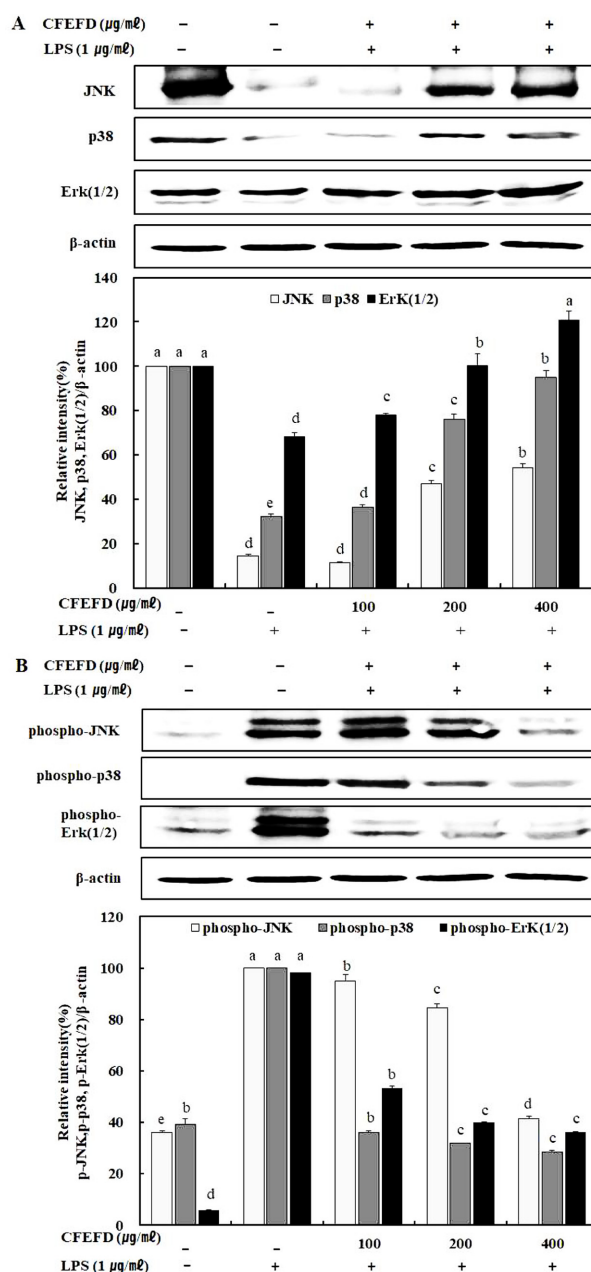


Fig. 5. Effect of CFEFD on MAPK signal expression in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. Cells were pre-incubated with 100, 200 and $400 \mu\text{g/ml}$ of CFEFD and then further incubated with $1 \mu\text{g/ml}$ of LPS for 30 minutes, and whole-cell lysates were analysed by western blotting using antibodies against P38, JNK, and ERK (1/2), and the respective phosphorylated forms. All values are means \pm SD from triplicate separated experiments. *Means with different superscripts (a - e) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

$\pm 1.87\%$ 로 나타나 LPS 처리구에서 $200 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에 서는 LPS 처리에 의해 감소한 JNK 단백질 발현이 다시 증가

되어지는 것을 확인하였다 (Fig. 5A).

인산화된 JNK 단백질 발현에 있어서 무처리 (36.04 ± 0.70%)에 비해 LPS를 단독으로 처리한 경우 그 발현양이 증가되었으나 (100.00 ± 3.45%), CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우 94.90 ± 2.51, 84.56 ± 1.63 및 41.56 ± 0.80%로 LPS 처리에 의해 증가된 인산화된 JNK 단백질 발현이 CFEFD의 처리에 따라 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B).

ERK의 경우 LPS를 단독으로 처리한 경우 대조구에 비하여 발현양이 감소하였으며 CFEFD 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우 LPS 단독 처리구(100%)에 비해 각각 77.96 ± 0.94%, 100.39 ± 5.37%, 120.82 ± 4.17%로 그 발현 수준이 증가하였으며, 인산화된 ERK (1/2) 단백질 발현율은 LPS 단독 처리구 (100.00%)와 비교하여, CFEFD 100, 200 및 400 µg/ml의 농도 수준으로 처리한 경우 각각 53.36 ± 0.79%, 39.98 ± 0.24% 및 36.31 ± 0.17%를 나타냄으로서 LPS 단독 처리구에 비해 단백질 발현 수준이 농도 의존적으로 감소되어지는 것이 확인되었다.

이상과 같은 결과를 볼 때 국화꽃 추출 건조물은 인산화된 JNK, ERK, p38 등 MAPK 신호전달체계에 있는 단백질 발현 수준을 억제하며 억제된 MAPK의 활성화로 인해 NO, prostaglandin, 항염증성 사이토카인과 같은 여러 염증성 매개 인자들의 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단되어진다.

6. 국화꽃 추출 건조물의 nuclear factor kappa-B (NF-κB)의 활성화 억제 효과

국화꽃 추출 건조물의 NO 및 사이토카인 생성 억제 효과가 NF-κB 신호전달체계의 활성화 억제에 기인한 것인지 알아보기 위하여, 세포질에서의 IκBα, p-IκBα 단백질 발현 수준 및 핵분획에서의 NF-κB의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

IκBα 단백질 발현율은 무처리구에서 100.00 ± 1.01%였으나, LPS 단독 처리구에서는 25.44 ± 0.26%로 감소한 반면, CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우, IκBα 단백질 발현율은 각각 54.33 ± 0.19, 76.71 ± 0.77, 94.11 ± 0.35%로 LPS 처리에 의해 감소된 IκBα 단백질 발현을 다시 농도 의존적으로 증가시켰다. p-IκBα 단백질 발현율은 무처리구에 비해 LPS 단독 처리구의 경우 2.14 ± 0.62 배 증가하였으나, CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml의 농도로 처리한 경우, LPS 단독 처리구 (100%) 대비 91.88 ± 0.55, 84.64 ± 2.53, 71.17 ± 2.00의 수준으로 단백질 발현이 감소되었다 (Fig. 6A).

NF-κB p65 단백질 발현에 있어서 세포질에서 무처리구에 비하여 LPS 단독 처리구에서 NF-κB p65 단백질 발현 수준은 대조구 대비 81.04 ± 0.29%로 감소한 반면 CFEFD를 100, 200 및 400 µg/ml 농도로 처리한 경우 NF-κB p65 단백질

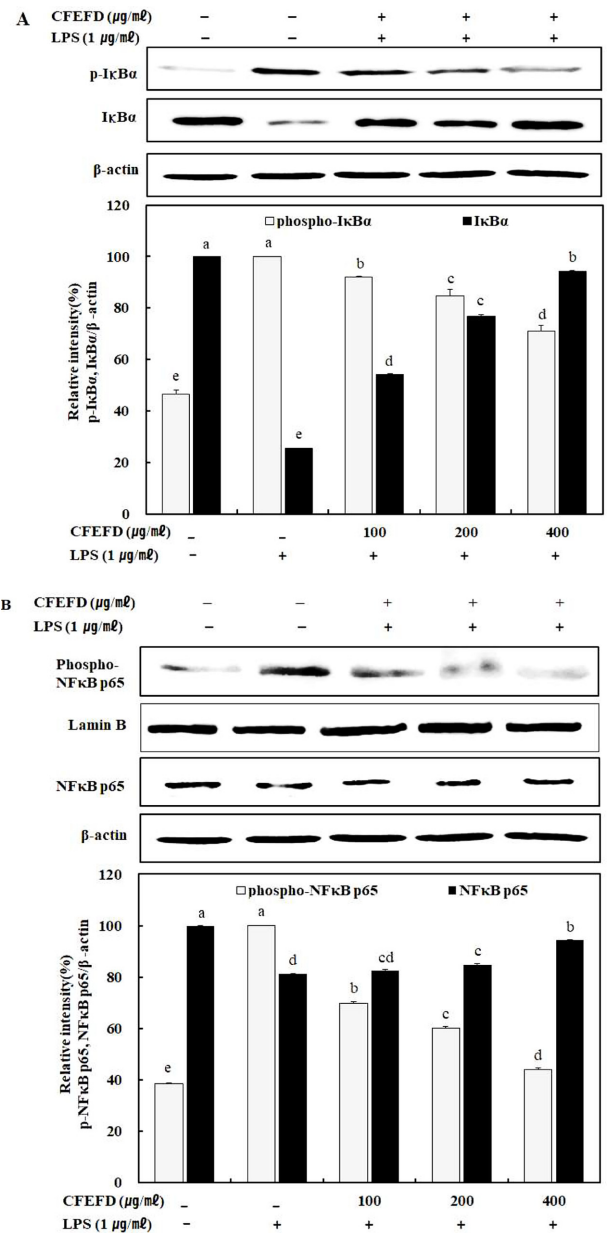


Fig. 6. Effects of CFEFD on NF-κB pathway in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. Cells were pre-treated with 100, 200 and 400 µg/ml of CFEFD for 1 hr, and then further incubated with 1 µg/ml of LPS for 30 minutes. (A) The relative levels of IκBα, p-IκBα protein and (B) NF-κB, p-NF-κB protein. All values are means ± SD from triplicate separated experiments. *Means with different superscripts (a - e) in the each column indicate significant difference by Duncan's Multiple Range Test at 5% (DMRT, $p < 0.05$).

발현율은 각각 82.56 ± 0.30, 84.83 ± 0.31, 94.34 ± 0.34%로 LPS 단독 처리구에 비해 증가되었다.

또한 NF-κB p65 단백질의 핵 내로 이동이 CFEFD에 의하

여 억제되어지는의 여부를 확인한 결과, 무처리구에 비해 LPS 단독 처리구에서 핵에서의 NF- κ B p65 단백질 발현은 증가되었으나, CFEFD를 100, 200 및 400 μ g/ml 농도로 처리하였을 때, NF- κ B p65 단백질 발현율은 LPS 단독 처리 (100%) 대비 69.73 \pm 0.82, 60.13 \pm 0.66, 44.04 \pm 0.53%로 LPS 단독 처리구에 비해 감소되어지는 것을 확인하였다 (Fig. 6B).

이는 야국 추출물의 항염 활성 검정에 있어, 야국의 methanol 추출물, chloroform 및 ethylacetate 용매 분획물에서 I κ B α 의 인산화를 억제하여 NF- κ B p65 단백질의 세포핵 내로의 이동을 억제하는 효과가 확인되었다고 보고한 결과 (You, 2009)와 유사하였으며 다양한 천연물질의 항염증 활성이 NF- κ B 신호 전달체계를 억제함으로써 이루어진다는 보고와도 유사하였다 (Li *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). 결과적으로 CFEFD는 LPS에 의해 활성화된 I κ B- α 의 인산화 및 분해, NF- κ B의 핵 내 이동 억제를 통하여 NF- κ B 신호 네트워크를 억제할 수 있다는 것을 확인하였고 국화꽃 추출 건조물이 염증신호에 의해 활성화되는 NF- κ B 신호전달체계의 활성 조절을 통해 염증 매개 유전자의 발현을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합적으로 볼 때, 국화꽃 추출 건조물은 NF- κ B의 활성 억제와 관련하여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 억제 조절하고 결과적으로 NO와 PGE₂ 생성을 방지함으로써 항염효과를 나타내는 것으로 판단되어지며 국화꽃 추출물을 항염 관련 소재로 이용할 수 있는 가치가 충분히 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- An DG. (2010). Effect of *Chrysanthemi Borealis* Flos on atopy dermatitis induced by DNCB in NC/Nga mouse. MS Thesis. KyungHee University. p.1-57.
- Choi G, Yoon T, Cheon MS, Choo BK and Kim HK. (2009). Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 123:149-154.
- Compilation Committee of Research on Teaching Materials of the Colleges of Oriental Medicine. (2007). *Herbology*. Yeonglimsa. Seoul, Korea. p.232-233.
- Dan B and Andrew G. (1986). *Chinese herbal medicine*. Eastland Press. Seattle. WA, USA. p.59.
- Guzik TJ, Korb T and Admek-Guzik T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54:469-487.
- Han JY, Kim YH, Sung JH, Um Y, Lee Y and Lee JS. (2009). Suppressive effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* flower extracts on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 38:1165-1169.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D and Phipps RP. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunology*. 23: 144-150.
- Hong CU. (2002). Essential oil composition of *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 45:108-113.
- Jang DS, Park KH, Kim HM, Hong DH, Chun HK, Kho YH and Yang MS. (1998). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants. Part I Cytotoxicity against cancer lines. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 29:243-247.
- Jang DS, Park KH, Ko HL, Lee HS, Kwon BM and Yang MS. (1999). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants. Part 3. Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 30:74-78.
- Jang SI, Jun CS, Kwak KC, Bae MS, Lee JH, Kim KY, Yun YG and Chai GY. (2006). Evaluation of korean phyto medicinal plants on inhibition of prostaglandin E₂(PGE₂) production and cyclooxygenase-2(COX-2) in LPS-stimulated U937 cells. *Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine*. 20:455-459.
- Jee JD, Lee YH and Song GG. (2004). Prostaglandin E₂(PGE₂): Roles in immune responses and inflammation. *The Journal of the Korean Rheumatism Association*. 11:307-316.
- Kim JH, Kim MJ, Kim K, Park SH, Cho KS, Kim GE, Xu X, Lee DH, Park GR and Ahn DH. (2017). Anti-inflammatory effects of *Ishige sinicola* ethanol extract in LPS-induced RAW264.7 cell and mouse model. *Korean Journal of Food Preservation*. 24:1149-1157.
- Kim JH. (1997). Variation of concentration of terpenes in *Chrysanthemum boreale*. *Korean Journal of Ecology*. 20:397-403.
- Kim MB. (2003). Study on development of cultivation technique and processing product for *Chrysanthemum boreale* M. Research Performance Report. Rural Development Administration. Jeonju, Korea. p.11.
- Kim TJ. (1996). In *Korean resources plants IV*. Seoul National University Press. Seoul, Korea. p.259.
- Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG and Konturek SJ. (2005). Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 56:57-73.
- Lee CB. (2003). *Coloured flora of Korea*. II. Hyangmunsa. Seoul, Korea. p.379
- Lee JR and Park MK. (2017). Isolation of guaianolides with ACAT inhibitory activity from the leaves and stems of *Chrysanthemum boreale* Makino. *Journal of Environmental Science International*. 26:1275-1284.
- Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, Choi JH, Lee ES, Noh HJ and Kim SY. (2011). Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:217-226.
- Li Y, Wu Q, Deng Y, Lv H, Qiu J, Chi G and Feng H. (2015). D(-)-Salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells and mouse models. *International Immunopharmacology*. 26:286-294.
- Lim SS, Han SM, Kim SY, Bae YS and Kang IJ. (2007). Isolation of acetylcholinesterase inhibitors from the flowers of

- Chrysanthemum indicum* Linne. Food Science and Biotechnology. 16:265-269.
- Mew D, Balza F, Tower GHN and Levy JG.** (1982). Anti-tumour effects of the sesquiterpene lactone parthenin. *Planta Medicine*. 45:23-27.
- Middleton EJ, Kandaswami C and Theoharides TC.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52:673-751.
- Nam SH and Yang MS.** (1995). Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 38:273-277.
- Nathan C.** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. 6:3051-3064.
- Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwon HC and Oh KS.** (2000). High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecologic Oncology*. 76:320-325.
- Shin SH and Choi YI.** (1982). Analysis of essential oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the comparison with essential oils from some *Chrysanthemum* spp. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 13:153-156.
- Soe JS, Lee TH, Lee SM, Lee SE, Seong NS and Kim J.** (2009). Inhibitory effects of methanolic extracts of medicinal plants on nitric oxide production in activated macrophage RAW264.7 cells. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:173-178.
- Spörle J, Becker H, Allen NS and Gupta MP.** (1991). Spiroterpenoids from *Plagiochila moritziana*. *Phytochemistry*. 30:3043-3047.
- Szabo C.** (2006). Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 851:422-425.
- Uchio Y, Tomosue K, Nakayama M, Yamamura A and Waki T.** (1981). Constituents of the essential oils from three tetraploid species of *Chrysanthemums*. *Phytochemistry*. 26:2691-2693.
- Uchio Y.** (1978). Constituents of the essential oil of *Chrysanthemums japonense*. Nojigiku alcohol and its acetate. *Bulletin Chemistry Society of Japan*. 51:2342-2346.
- Vane JR, Bakhle YS and Botting RM.** (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38:97-120.
- Woerdenbag HJ, Merfort I, Mulder NH, Vrics EGE, Hendriks H and Malingre.** (1986). Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of some sesquiterpene lactones on a human lung carcinoma cell line the fast green dye exclusion assay. *Planta Medicine*. 51:112-114.
- Yang MS, Park KH, Jang DS, Choi SU, Nam SH and Shiro M.** (1996). Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* Makino preparation, X-ray crystal structure and ¹³C- and ¹H-NMR study of Cumambrin A. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 27:207-211.
- Yook CS.** (1989). Colored medicinal plants of Korea. Academic press. Seoul, Korea. p.536.
- You KS.** (2009). Anti-inflammatory effects of *Chrysanthemum boreale* Makino. extract and fractions. MS thesis. KyungHee University. p.1-42.
- Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K and Lee KT.** (2008). Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *International Immunopharmacology*. 8:431-441.
- Zhang Y, Liu D, Fang L, Zhao X, Zhou A and Xie J.** (2018). A galactomannoglucan derived from *agaricus brasiliensis*: Purification, characterization and macrophage activation via MAPK and IκB/NFκB pathways. *Food Chemistry*. 239:603-611.