

홍삼추출물이 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 염증반응에 미치는 효과

장영아* · 김한나¹ · 김보애^{1†}

*대구한의대학교 바이오산업융합학부 화장품약리학과

¹목원대학교 생의약화장품학부 화장품전공

(2019년 12월 4일 접수: 2019년 12월 26일 수정: 2019년 12월 28일 채택)

Effect of Red Ginseng Extract on the Inflammatory Response of LPS-Induced RAW 264.7 cell

Young-Ah Jang* · Han-Na Kim¹ · Bo-Ae Kim^{1†}

*Daegu Haany University, Faculty of Bio Industry Department of Cosmeceutical

¹Mokwon University, College of Science & Technology, Division of Biomedicinal & Cosmetics

(Received December 4, 2019; Revised December 26, 2019; Accepted December 28, 2019)

요약 : 본 연구는 홍삼추출물의 화장품소재로서의 항염증 효과의 가능성을 확인하는 것을 목적으로 한다. 본 연구에서는 홍삼 추출물을 사용하여 항염증에 대한 생물학적 활성평가를 수행하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 시료의 항염증 효과를 평가하기 위해 MTT assay를 이용한 홍삼 추출물의 독성평가와 nitric oxide 생성 저해 활성 및 염증관련 단백질 및 유전자의 발현량을 확인하였다. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포 내에서 시료의 nitric oxide 저해활성은 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 71.2 %의 우수한 효능을 나타내었으며, western blot 시험결과 iNOS, COX-2 단백질의 발현은 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인하였다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 홍삼추출물이 항염 효과를 가진 화장품 소재로서의 가치를 제안할 수 있다.

주제어 : 홍삼추출물, 항염, 천연, 화장품소재

Abstract : We conducted this study to investigate anti-inflammatory possibilities of applying cosmetic material about extracts from red ginseng. For this we carried out biological active evaluation about anti-inflammatory by using extracts of red ginseng. In order to evaluate the anti-inflammatory effects of the samples in macrophages (RAW 264.7 cells), MTT assay was used to evaluate the toxicity of red ginseng extracts and the inhibitory activity of nitric oxide production and the expression levels of inflammation-related proteins and genes. The inhibitory activity of nitric oxide in the LPS-induced RAW 264.7 cells was 71.2% at 25 $\mu\text{g/ml}$ concentration and western blot analysis

[†]Corresponding author

(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

showed that the expression of iNOS and COX-2 protein decreased in a concentration-dependent manner. These results suggest that extracts from red ginseng may have value as the potential cosmetic materials.

Keywords : Red ginseng extracts, Anti-inflammatory activity, Natural, Cosmetics materials

1. 서론

생활수준의 향상에 따라 삶의 질을 높이고자 하는 욕구가 증가하는 추세이며, 사람들은 더 젊고 건강하게 사는 것에 대한 관심이 증가하였다. 이에 국내·외 화장품의 시장규모는 지속적으로 증가하는 추세이며, 특히, 기능성 원료 및 화장품에 대한 관심이 높아짐에 따라 효능이 우수하며 안전한 소재에 대한 생산 비중이 꾸준히 증가하고 있다[1].

여러 자료들에 의하면 천연물로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명한 연구에는 피부노화 억제에 대한 연구가 가장 많은 부분을 차지하고 그 외 기미, 주근깨와 같은 색소침착, 피부질환과 문제성 피부, 염증성 여드름 등의 피부트러블을 개선시키는 소재에 대한 연구가 활발하게 진행되어 지고 있다[2,3]. 피부는 외부에서 유입되는 여러 가지 요인들로부터 인체를 보호한다. 다양한 생리적, 환경적 요인들로 인해 피부는 여드름, 색소침착, 지루성 피부염, 아토피성 피부염, 두피의 비듬 등의 피부 문제 또는 다양한 질환들이 발생한다[4]. 이러한 피부질환의 생리학적 기전은 때때로 염증반응의 과정을 거치며, 다양한 염증 반응의 경로를 통해 피부 표피층과 진피층의 결합조직에 영향을 끼치는 효소들인 hyaluronidase, elastase, collagenase 등의 발현을 증가시킨다. 이에 따라 피부 염증의 원인이 되는 활성산소 (ROS, 'reactive oxygen species')는 다양한 자극에 의해 산화질소 (NO, nitric oxide), 프로스타글란딘 (PG, prostaglandin), 사이토카인 (cytokain) 등을 매개하며 면역과 염증에 관련된 사이토카인 중 interleukin(IL)-1 β , IL-6 및 tumor necrosis factor (TNF)- α 는 대식세포에서 생성되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다[5,6]. 그람 음성균의 내독소로 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 대표적인 염증 매개인자 (Inflammatory

mediators)인 NO, PGE₂ (Prostaglandin E₂)를 유발하여 염증 반응을 촉매한다[7,8]. 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 바뀌는 과정 및 NO 형성 과정으로 이어지게 된다[9,10]. 염증을 가진 피부상태에서 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 생성된 NO는 염증반응을 촉진시켜 피부 염증을 심화시킬 수 있는 원인이 될 수도 있다[11,12]. PGE₂를 생성하는 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 cyclooxygenase-2 (COX-2)로 나뉘며 COX-1은 정상적인 생체 기능에 작용하지만 COX-2는 염증반응 부위에서 발현된다[13]. 이러한 내용을 바탕으로 NO를 생성하는 효소인 iNOS와 PGE₂의 생합성을 매개하는 효소인 COX-2가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로서 유용한 항염증제로 사용되어지고 있다[14].

인삼 (Panax ginseng C.A. Meyer, 人蔘)은 오가피과 (Araliaceae) 파낙스 (Pannax)속에 속하는 다년생 초본으로 뿌리뿐만 아니라 잎, 줄기를 수천년 전부터 약용해 온 국내 대표 약용작물이다. 인삼은 크게 자연상태의 수삼과 가공방법에 따라 백삼, 홍삼, 흑삼 등으로 분류되고, 홍삼은 천삼, 지삼, 및 양삼으로 구분되며 생인삼 즉 수삼을 껍질을 유지한 상태로 증기 및 다양한 방법으로 찌낸 후 말린 인삼을 뜻한다[15]. 주요 약리성분으로 알려진 사포닌의 효능은 항피로, 항산화, 항스트레스, 면역 기능 조절, 항암 효과 등이 보고되었다[16-20]. 본 연구에서는 다양한 방법으로 구현할 수 있는 인삼의 한 종류인 홍삼을 이용하여 추출물에 대한 세포독성, 항염증 효과를 측정하여 천연 화장품 소재로서의 가능성을 확인해보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 홍삼은 수삼을 증기로 찌고 건조, 압착한 6년근의 인삼을 경북 영주시 풍기읍 풍기농협으로부터 구입하여 사용하였다. 홍삼 중량의 10배 양의 70 % 에탄올을 침지하여 상온에서 24시간 방치하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 각 추출물은 (Whatman No2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 여과한 후 농축·동결 건조하여 시험에 사용할 추출물을 얻었으며 4 °C에서 냉장 보관하면서 실험에 사용되었다.

2.1.1 실험 세포 및 시약

세포독성실험을 위한 시약은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 0.4 % trypan blue stain은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질정량 시약 Lysis buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, 1차 항체 mouse anti-iNOS, mouse anti-COX-2, mouse anti-TNF- α , mouse anti-IL-1 β , mouse anti-PGE₂와 2차항체 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

2.2. 세포의 배양

Mouse 유래 macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10 % fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1 % Penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 unit/ml가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

2.3 세포 생존율

세포 생존율 측정에는 Mosmann[21]의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 96-well plate에 2×10⁴ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도별로 조제한 후 0.02 ml 첨가하여 5 % CO₂

incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.02 ml 첨가하여 4 시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well당 0.1 ml의 DMSO 용액을 가한 후 ELISA reader (PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4 Nitric oxide (NO) 저해능 측정

RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO의 양은 Green등[22]의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 6-well plate에 1×10⁵ cells/ml가 되게 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 confluence가 80 % 일 때 PBS로 2번 세척한 다음, 무혈청 배지를 사용하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 4시간 후 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Co.) 1 μg/ml을 대조군 (Nor)을 뺀 모든 well에 넣어서 4시간 동안 자극시킨 다음 상층액을 모아 동량의 Griess reagent로 10분간 반응시킨 후 NO의 생성량은 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO생성량을 확인하였다.

2.5 PGE₂, TNF- α , IL-1 β 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1×10⁵ cells/ml로 24시간 배양 후 LPS 1 μg/ml와 농도별 (6.25, 12.50, 25.0 μg/ml)로 제조한 홍삼추출물을 처리한 후 18시간 뒤 세포 배양액을 취하여 염증성 cytokine인 PGE₂, TNF- α , IL-1 β 를 측정하였다. PGE₂, TNF- α , IL-1 β 의 함량은 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였으며, 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

2.5 Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

iNOS와 COX-2의 발현을 보기 위하여 RAW 264.7 세포를 96-well culture plate에 1×10⁶ cells/ml로 cell seeding 후 24시간동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 홍삼추출물을 농도별 (6.25, 12.50, 25.0 μg/ml)로 30분 동안 전처리 한 후 LPS를 1 μg/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 배양한 후에 상층액을 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. 그 후 cell

harvest하여 Radio-immuno-precipitation assay (RIPA) lysis buffer 200 μ l에 세포를 용출시켜 단백질을 수확·원심분리 (12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min)하여 얻은 단백질은 Bradford assay로 정량하였다. 10 μ L의 단백질을 10 %의 sodium dodecyl sulfate polyacryamide gel electrophoresis를 이용하여 전기영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane (Sigma-Aldrich Co.) 에 옮긴 후 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5 % skim milk에 1~2시간 방치하여 background를 제거시켰다. 1차 antibody를 1:1,000으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하고 나서 TBST(Tris-buffered saline plus 0.1% Tween-20)로 30분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 2차 antibody를 1:1,000으로 희석하여 2시간 반응한 후, ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit, Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan) 기기를 이용하여 밴드를 확인 및 정량하였다.

2.6 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 23. (IBM SPSS Inc., New York, NY, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석 (analysis of

variance, ANOVA)을 이용하여 유의성 ($P < 0.05$, 0.01 0.001)을 확인한 후 Tukey's test로 다중비교를 실시하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 홍삼추출물의 세포 생존율 측정

홍삼추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 대식세포인 RAW 264.7 세포의 홍삼추출물에 의한 세포독성을 MTT assay 방법으로 생존율을 평가하였다. (Fig 1.) 추출물의 세포 생존율과 시험에 사용할 유효농도 범위를 선정하기 위해 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml의 농도로 추출물을 처리한 결과 RAW 264.7 세포에서 25 μ g/ml 이하 농도에서 세포생존율이 90 % 이상으로 나타났으며 50 μ g/ml 농도에서는 낮은 세포생존율을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 세포의 NO소거능 시험은 추출물 자체의 세포독성으로 인한 독성 가능성을 배제할 수 있도록 추출물의 농도를 안전한 농도인 25 μ g/ml 이내의 범위에서 진행하였다.

3.2. 홍삼추출물의 Nitric oxide (NO) 저해능

RAW 264.7 세포에 세균 유래의 LPS를 처리하여 자극하였을 때, 홍삼 추출물의 첨가로 NO의 생성을 저해하는지 알아보려고 하였으며, 그

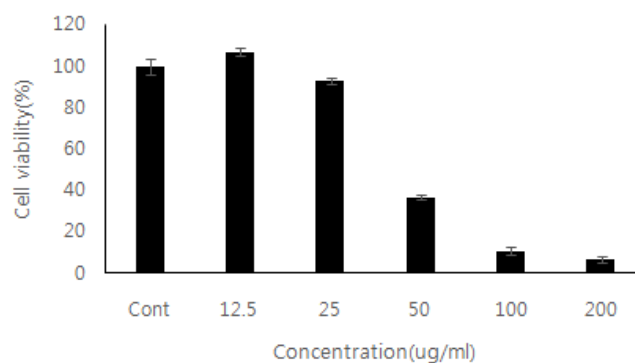


Fig 1. Cell viability of red ginseng extracts on treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (12.5 - 200 μ g/ml) of red ginseng extracts. Cell viability was measured using the MTT assay. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate.

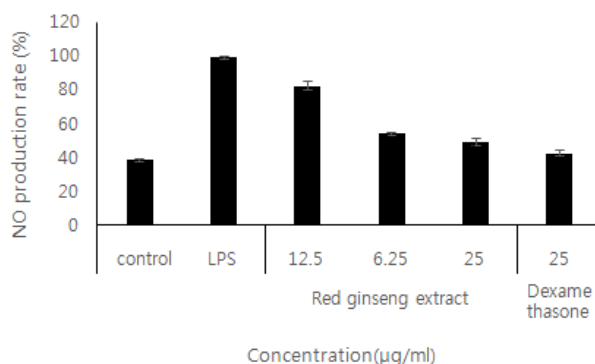


Fig 2. Inhibitory effects of red ginseng extracts on NO production. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/ml) were treated with $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 2 h, except Nor group. red ginseng extracts were then added to sample groups with the indicated concentrations. Control: LPS not induced group, LPS: LPS induced group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate.

결과는 Fig 2.에 나타내었다. LPS 단독 처리군 (control)은 LPS 무처리군에 비하여 약 3배에 가까운 NO발현 증가를 나타내었으며, 추출물을 처리하였을 때 각 농도 의존적으로 NO의 생성량이 유의성 있게 감소함을 Fig 2.를 통해 확인할 수 있었다. 이에 홍삼추출물을 이용하여 다양한 분야에서 염증과 관련한 내용을 적용시킬 수 있는 유효성분의 가능성이 충분하다고 판단된다.

3.3. 홍삼추출물의 PGE₂, TNF- α , 1L-1 β 생성량 측정

PGE₂, TNF- α , 1L-1 β 는 pro-inflammatory cytokine으로써 염증 반응의 매개체로 작용한다. PGE₂는 COX-2에 의하여 생성되며 염증성 질환 및 다양한 생체반응에 있어서 세포분열과 증식에 영향을 끼쳐 각종 질병과 피부질환을 유발시키는 요인으로 관여한다[23, 24]. 이를 바탕으로 본 연구에서는 홍삼추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 LPS에 의해 활성화 된 RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine을 측정하였다. 그 결과 홍삼 추출물은 6.25, 12.5, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 cytokine인 PGE₂, TNF- α , 1L-1 β 생성량이 저해됨을 확인할 수 있었다. 홍삼 추출물의 PGE₂, TNF- α , 1L-1 β 생성량의 결과는 아래 Fig 3과 같다. 기존 연구에

의하면 홍삼이 포함 되어진 추출물에서 항염 효과를 나타낸 것으로 보고된 바 있으며, 본 연구의 실험결과와 항염 효능 측면에서 유의한 관련성을 나타내는 것으로 사료된다[15].

3.4. 홍삼 추출물의 염증 관련 단백질 발현에 미치는 영향

염증 관련 단백질은 iNOS, COX-2에 대한 홍삼 추출물의 저해능을 확인하기 위하여 추출물을 각 농도별 6.25, 12.5, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 30분 뒤 LPS 처리하여 western blot을 통해 단백질의 발현량을 확인하였다. 그 결과 LPS로 유도된 단독 처리군에 비하여 iNOS와 COX-2 농도가 증가함에 따라 유의적으로 발현양이 감소됨을 확인하였다. 특히 iNOS는 외부자극이나 염증성 cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 hepatocytes, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산한다고 보고되고 있다[25-28]. 이를 통해 홍삼 추출물은 염증 관련 단백질 발현을 농도의존적으로 저해하는 것으로 나타났으며 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 Fig 4.에 나타냈다.

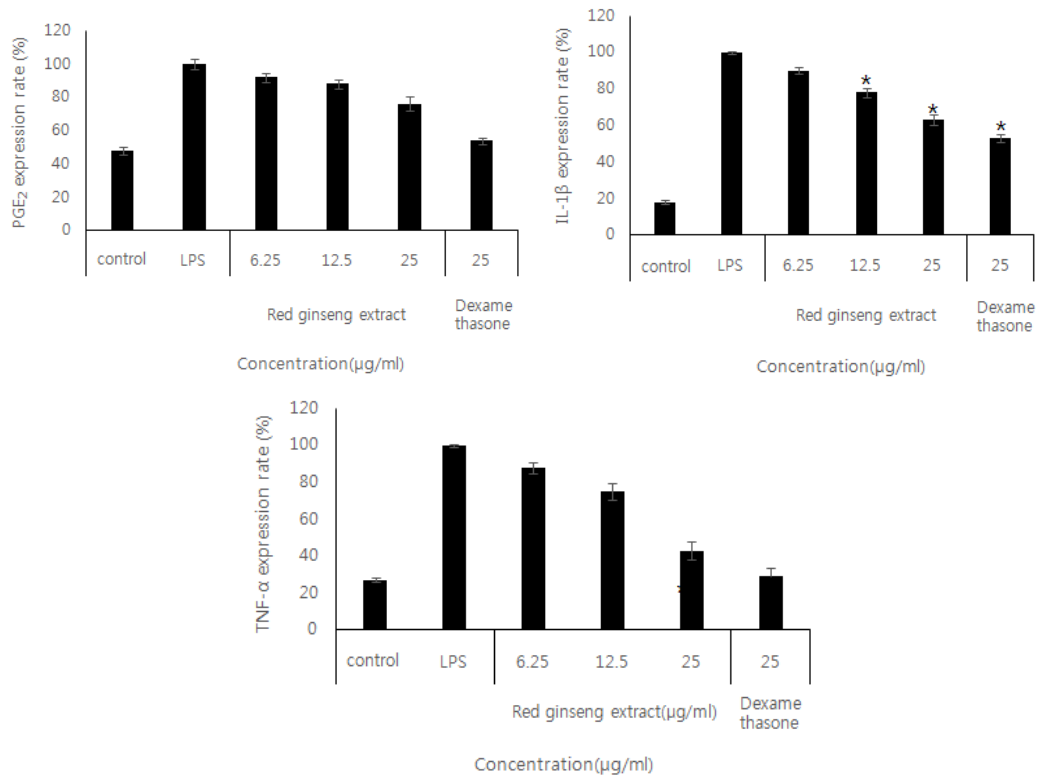


Fig 3. Inhibitory effects of red ginseng extracts on productions of pro-inflammatory cytokines. The expression levels of PGE₂, TNF- α , 1L-1 β in the protein was measured after treatment of LPS (1 μ g/ml) for 30 min and the indicated concentration of red ginseng extracts. Control: LPS not induced group, LPS: LPS induced group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate.

4. 결론

본 연구에서는 홍삼추출물이 천연화장품의 기능성 소재로서의 가능성을 평가하기 위해서 항염증 실험을 진행하였으며 결론은 다음과 같다. 홍삼추출물에 대한 항염효과를 확인하기 위하여 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포주에서 발현되는 염증인자인 NO 및 iNOS, COX-2의 억제효과를 확인하고자 하였다. 홍삼 추출물은 RAW 264.7 대식세포에 대하여 세포의 독성이 없는 농도 범위 안에서 NO생성 저해활성을 측정하였다. 그 결과, 홍삼 추출물을 6.25, 12.5, 25.0 μ g/ml 처리하였을 때, 농도가 증가할수록 NO 발현량이 저해됨을 확인하였다. 염증에는 많은 매개물질이

관여하는데 활성화 된 림프구 및 대식세포 등의 여러 세포에서 분비되는 염증성 cytokaine인 PGE₂, TNF- α , 1L-1 β 의 발현량 또한 농도 의존적으로 감소하였고, iNOS, COX-2 염증성 단백질의 발현도 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과를 바탕으로 홍삼추출물이 독성이 없는 안전한 범위의 농도 내에서 염증 관련 인자들의 생성을 억제 또는 조절한다는 결과를 확인함에 따라 홍삼추출물은 세포 안정성과 항염기능의 유효성분을 포함하여 화장품 분야에 소재로서 유용한 항염증 기능성소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

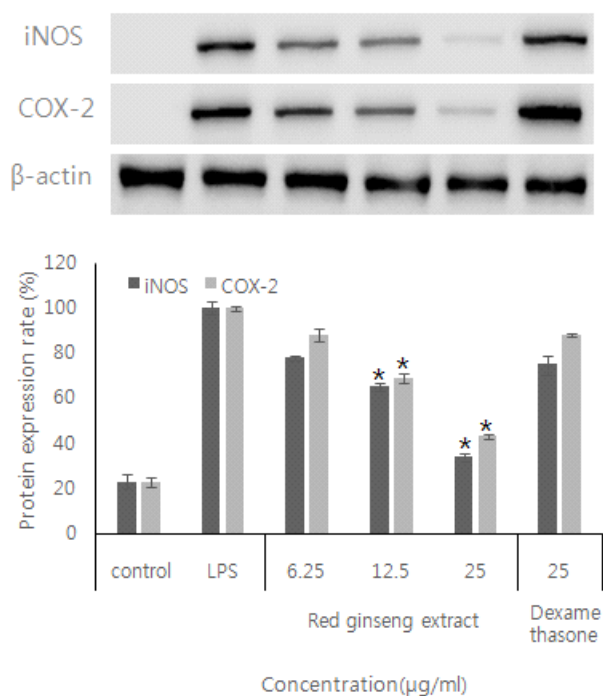


Fig 4. Effects of red ginseng extracts on LPS-induced iNOS, COX-2 protein expression. The expression levels of iNOS, COX-2 in the protein was measured after treatment of LPS (1 μ g/ml) for 30 min and the indicated concentration of red ginseng extracts. Control: LPS not induced group, LPS: LPS induced group. The data represent the mean \pm SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * p <0.05). The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate.

감사의 글

본 연구는 중소기업벤처기업부의 기술개발사업 [S2687105]의 지원에 관한 연구임.

References

1. Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K. "Solar UV irradiation and dermal photoaging", *J Photo chem Photobiol B*, Vol.63, No.1-3 pp. 41-51, (2001).
2. J. S. Chen, C. Wei, M. R. "Marshall. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.39, No.11 pp. 1897-1901, (1991).
3. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota H. Vincent J. "The inherent cytotoxicity of melanin precursors", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1221, No.3 pp. 272-278, (1994).
4. H. S. Lee and M. S. Shin, "Antimicrobial effects of Luffa cylindrica extract against 4 skin microorganisms", *J. Kor. Soc. Cosm.*, Vol.21, No.3 pp. 471-476, (2015).

5. H. Jung, Master's Thesis Dissertation, Chung-Ang Univ., Seoul, Korea, (2011).
6. T. J. Guzik, R. Korbut, and T. Adamek-guzik, "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation", *J. Physiol. Pharmacol.*, Vol.54, No.4 pp. 469-487, (2003).
7. M. J. Kim, K. R. Im, K. S. Yoon. "Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing Forsythia viridissima", *L., J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.35, No.4 pp. 277-285, (2009).
8. J. Frostegård, A. K. Ulfgrén, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson, G. K. Hansson. "Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines", *Atherosclerosis*, Vol.145, No.1 pp. 33-43, (1999).
9. D. Hwang, B. C. Jang, G. Yu, and B. Mary, "Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide", *Biochem. Pharmacol.*, Vol.54, No.1 pp. 87-96 (1997).
10. J. Y. Kim, K. S. Jung, and H. G. Jeong, "Suppressive effects of the kawool and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages", *FEBS Lett.*, Vol.569, No. 1-3 pp. 321-326, (2004).
11. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, "Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage", *Phytother. Res.*, Vol.17, No.5 pp. 485-486, (2003).
12. M. M. Mu, D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, I. Mori, T. Yoshida, and T. Yokochi, "The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells", *J. Endotoxin. Res.*, Vo.7, No.6 pp. 431-438, (2001).
13. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, K. Seibert. "Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol.91, No.8 pp. 3228-3232, (1994).
14. N. MaCartney-Francis, J. B. Allen, J. E. Albina, Q. W. Xie, C. F. Nathan, S. M. Wahl. "Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase", *J. Exp. Med.*, Vol.178, No.2 pp. 749-754, (1993).
15. K. Y. Nam, "The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (Panax ginseng C.A. Meyer)", *J. Ginseng Res.* Vol. 29, No.1 pp. 1-18, (2005).
16. B. X. Wang, J. C. Cui, A. J. Liu, S. K. Wu. "Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of Panax ginseng (SSLG)", *J. Tradit. Chin. Med.* Vol.3, No.2 pp 89-94, (1983).
17. H. Saito, Y. Yoshida, K. Takagi. "Effect of Panax ginseng root on exhaustive exercise in mice", *Jpn. J. Pharmacol.* Vol.24, No.1 pp. 119-127, (1974).
18. A. S. Attele, J. A. Wu, C. S. Yuan. "Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions", *Biochem. Pharmacol.* Vol.58, No.11 pp. 1685-1693, (1999).
19. B. Kenarova, H. Neychev, C. Hadjiivanova, V. D. Petkov VD. "Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from Panax ginseng", *Jpn. J. Pharmacol.* Vol.54, No.4 pp. 447-454, (1990).
20. K. S. Im, H. Y. Chung, S. H. Park, N. K. Je. "Anticancer effect of the hydrolyzed monogluco-ginsenoside of total saponin from ginseng leaf", *Korean J. Ginseng Sci.* Vo.19, No.3 pp. 291-294, (1995).
21. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods* Vol.65, No.1-2 pp. 55-63, (1983).
22. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. R.

- "Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids", *Anal Biochem* Vol.126, No.1, 131-138, (1982).
23. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, K. Seibert, "Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic", *J. Proc Natl Acad Sci*, Vol.91, No.8 pp. 3228-3232, (1994).
 24. M. S. Nanes, "Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology", *Gene*, Vo.321 pp. 1-15, (2003).
 25. J. H Nam, J. T. Seo, Y. H. Kim, *et al.*, "Inhibitory Effects of Extracts from *Arabis glabra* on Lipopolysaccharide Induced Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in RAW264.7 Macrophages", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol.28, No.5 pp. 568-573, (2015).
 26. H. A. Lee, E. K. Koh, J. E. Sung, *et al.*, "Ethyl acetate extract from *Asparagus cochinchinensis* exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells by regulating COX-2/iNOS, inflammatory cytokine expression, MAP kinase pathways, the cell cycle and anti-oxidant activity", *Molecular Medicine Reports*, Vol.15, No.4 pp. 1613-1623, (2017).
 27. N. Ding, C. Mao, Z. Cai, Meihu Ma, "Anti-inflammatory effect of preserved egg with simulated gastrointestinal digestion on LPS-stimulated RAW264.7 cells", *Poultry Science*, Vol.98, No.10 pp. 4401-4407, (2019).
 28. B. H. Han, Y. J. Lee, J. J. Yoon, E. S. Choi, *et al.*, "Hwangryunhaedoktang exerts anti-inflammation on LPS-induced NO production by suppressing MAPK and NF- κ B activation in RAW264.7 macrophages", *Journal of Integrative Medicine*, Vol.15, No.4 pp. 236-336, (2017).