

Raw264.7 대식세포에서 국산 프로폴리스 추출물에 의한 항염증 효과

김성국 · 우순옥* · 한상미 · 김세건 · 방경원 · 장혜리 · 문효정 · 김현지

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Anti-inflammatory Effects of Korean Propolis Extracts on Raw264.7 Macrophage Cells

Sung-Kuk Kim, SoonOk Woo*, Sangmi Han, Se Gun Kim, Kyung Won Bang,
 Hye Ri Jang, Hyo Jung Moon and Hyun Ji Kim

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science,
 Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

(Received 30 August 2018; Revised 21 September 2018; Accepted 27 September 2018)

Abstract

We investigated the anti-inflammatory effects of propolis collected from Korea on Raw264.7 macrophage cells. Propolis extract was prepared by ethanol extraction method, the yield of the extract was about 39%. The cell cytotoxicity evaluation of propolis was determined by EZ-cytox cell viability assay. When the cells were treated with propolis concentration of 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ for cytotoxicity evaluation, the optimal concentration without cell death was 25 $\mu\text{g/ml}$. We evaluated the anti-inflammatory effect of propolis by nitric oxide (NO) production. To investigate the effect of propolis on the production of NO, a typical inflammatory reaction factor, propolis and lipopolysaccharide (LPS) were treated before, after, and simultaneously, as a result, increased NO production by LPS was shown to be reduced by propolis. The results also showed that the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-1 (IL-1 β) expressed by Western blotting were also consistent. It was confirmed that the expression level of iNOS, IL-1 β , increased by LPS was inhibited by propolis and was regulated at the intracellular level. This results show that propolis is controlled at the molecular level in the relief and prevention of the inflammatory reaction, this suggests that propolis is an excellent functional substance in the treatment and prevention of inflammation, also it may be related to the immunomodulation of LPS-stimulated Raw264.7 cells.

Key words: Ethanol extracted propolis, Anti-inflammation, Raw264.7, NO assay, iNOS, IL-1

*Corresponding author. E-mail: wooso1@korea.kr

서 론

염증 반응은 신체 외부에서 내부로 유입되는 박테리아 또는 바이러스 등에 의해 발생하는 것으로서, 외부 자극에 대한 체내 방어 기전 중의 하나이다 (Willoughby, 1975; Ismaki and Punnonen, 1997). 이 방어 기전에 있어서의 핵심은 체내에 존재하는 다양한 면역 세포로서, 외부 자극에 의한 면역 세포의 증식 및 분화는 방어 조절 기전의 중추적 역할을 한다. 이 중 대식세포(macrophage)는 체내 조직에 분포하며 정상적인 상태에서는 노화된 세포를 탐식하여 외부로 배출시키는 역할을 담당하지만 외부에서 염증 물질이 유입되면 이에 반응하여 염증 매개 물질을 분비함으로써 신체를 보호하고 유지할 수 있게 한다(Hamsa and Kuttan, 2011; Zhang *et al.*, 2007). 그러나 염증이 지속적으로 나타남으로 인해 대식세포의 반응이 과도하게 일어나게 되면 그에 따른 염증 매개 물질의 과발현이 일어나게 되어 세포의 종양화와 같은 병리적 작용이 발생하는 것으로 보고되고 있다(Nishida *et al.*, 2007; Cheon *et al.*, 2009; McDaniel *et al.*, 2009). 염증이 발생되면 세포 내 면역세포에서 다양한 cytokine 분자의 발현 및 분비가 활성화되고, 이와 같은 전 염증성 매개물질에 의해 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증 매개 물질의 분비를 촉진시킨다 (Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Nathan, 1992). 이들 분자들에 의해 통증 및 열을 수반하는 염증성 반응이 발생되고 이에 반응하여 면역 세포들의 면역 반응이 활발해진다(Ialenti *et al.*, 1992). 이 염증 매개 물질 중 특히 NO는 높은 반응성을 가진 물질로서 대식세포가 활성화되면 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. 생성된 NO는 체내로 유입된 박테리아 사멸이나 암세포에 독소로 작용하기도 하지만 과발현된 NO는 염증을 유발시켜 조직 손상, 유전자 변이 등을 일으키기도 한다(Geller *et al.*, 1993; Sunyer *et al.*, 1996; Bogdan, 2001). 염증 반응 유발에 있어 또 다른 원인으로는 흡연과 같은 외부 독소 물질에 의한 세포 스트레스 반응이 있다(Ryu *et al.*, 2003). 이 염증 반응에는 산화적 스트레스 증가가 원인으로 작용하는데 이 문제에 대해서는 항산화 물질

섭취에 의한 산화적 스트레스 감소에 의해 염증이 감소되기도 한다(Uttara *et al.*, 2009).

프로폴리스는 꿀벌이 서식지인 벌집을 보호하기 위해 다양한 수목에서 채취한 수지상 물질에 꿀벌 자신의 타액을 혼합하여 만든 수지성 물질이다 (Burdock, 1998). 프로폴리스에는 플라보노이드류, 카페인산 등 폴리페놀류와 밀납과 같은 많은 성분이 혼합되어 있으며, 기원전 300년경부터 민간에서는 상처 치료 등에 사용되어 왔다. 다양한 생리활성 물질이 포함된 프로폴리스는 항균(Sforzin, 2000; Schnitzler *et al.*, 2010), 항산화(Jeong, 2004), 항염증(Khayyal, 1993; Ledon *et al.*, 1997) 및 항암(Bazo *et al.*, 2002; Orsolich *et al.*, 2005; Kunimasa *et al.*, 2010)에 있어 활성을 나타내고 있음이 보고되고 있다. 다양한 반응에서 프로폴리스의 효능은 보고되었지만, 이와 관련된 구체적인 분자 조절 기전은 아직 미비한 상태이다. 특히 프로폴리스의 항균력 연구나 항산화 활성 측정 정도가 보고되었을 뿐, 면역 조절과 관련된 프로폴리스의 분자 기전은 아직 미비한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 마우스 대식세포인 Raw264.7 세포에 대한 프로폴리스 추출물의 세포 독성을 확인하고, 이를 바탕으로 Raw264.7 세포에 lipopolysaccharide (LPS)로 염증을 활성화시킨 후, 프로폴리스 추출물을 세포에 처리하여 면역 반응에 있어 대표적 반응 물질인 NO 생성을 확인하고 이와 관련된 염증 관련 단백질인 iNOS와 대표적 cytokine 인 interleukin-1 (IL-1)의 발현을 확인하여 염증 반응의 분자 조절 기전에 있어 프로폴리스 추출물의 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

프로폴리스 추출

실험에 이용된 프로폴리스는 대한민국 충주 지역 양봉농가에서 제공받은 2015년산 원괴 200g에 2L의 80% 에탄올을 첨가하여 48시간 동안 실온에서 추출하였다. 추출물은 미라클로스로 1차 여과한 다음, Whatman No. 2 필터로 2차 여과하여 불필요한 잔여물

을 제거하였다. 이 추출물을 감압농축 장치에서 완전히 농축시켜 실험재료로 사용하였다.

대식세포 배양 및 Western blot 시약

Raw264.7 대식세포는 한국세포주은행(서울)에서 보관 중인 세포를 분양 받아 계대 배양하여 사용하였으며, 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin 항생제 용액과 10%의 소태아혈청(FBS(Fetal Bovine Serum), GenDEPOT, Korea)을 첨가한 dulbecco's modified eagle's 배지(DMEM, Gibco)를 세포 배양에 사용하였다. FBS는 56°C에서 50분간 불활성화한 뒤 배지에 첨가하였다. 계대 배양 시에는 트립신 용액을 사용하지 않고 cell scraper로 세포를 떼어내었고, 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

염증 반응의 양성 대조군으로 Lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)를 사용하였으며, NO assay는 NO assay kit (Abcam, USA)를 사용하였으며, Western blotting에 사용된 iNOS, -IL-1는 Cell Signaling사에서 구입하였으며 -actin은 Santa cruz에서 판매하는 항체를 구입하여 사용하였다.

프로폴리스의 세포 독성 측정

세포 생존에 있어 프로폴리스 추출물의 세포 독성을 측정하기 위해 다인바이오에서 제공하는 EZ-cytox MTT 평가법을 이용하였다. Raw264.7 세포를 96-well plate에 2×10^3 cells/well로 분주한 뒤, 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 세포에 프로폴리스 추출물을 농도 의존적(5, 10, 25, 50, 100, 200 그리고 500 µg/ml)으로 세포에 처리하여 0, 1, 2, 4 그리고 7일 동안 배양시켰다. 프로폴리스 추출물은 세포에 처리하기 전 0.20µm syringe filter로 여과하여 무균 상태로 준비하였으며, 대조군으로는 DMEM 배지만 처리한 것과 용매 대조군은 에탄올만 처리한 것으로 비교하였다. 이후 EZ-cytox 용액을 최종 배지 부피의 1/10로 처리한 다음 2시간 동안 반응 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소(NO) 함량 측정

Raw264.7 대식세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 24-

well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤, 프로폴리스 추출물을 농도별(0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 µg/ml)로 24시간 동안 세포에 처리하여 배양하였다. NO 생성량 비교를 위해 음성 대조군으로서 배양액만을 처리한 것과 에탄올만을 처리한 것을 사용하였고, 양성 대조군으로 LPS를 1µg/ml를 세포에 처리한 후 비교하였다. 세포 상층액을 회수하고 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 잔재물이 없는 배양액만을 NO assay에 사용하였다. NO assay는 NO assay Kit (Abcam, USA)를 이용하였으며, 실험 방법은 kit내 실험법에 따라 진행되었다. 반응이 끝난 후 microplate reader(Spectramax M2, BioSurplus, USA)를 이용하여 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고, 표준 곡선에 따라 NO 함량을 산출하였다. 또한 LPS에 의한 염증 진행 과정에서 프로폴리스의 효과를 확인하였는데, LPS를 24시간 동안 전처리한 후 프로폴리스를 24시간 처리한 것, 프로폴리스를 24시간 동안 전처리한 후 LPS를 처리하여 24시간 동안 반응시킨 것, LPS와 프로폴리스를 동시에 처리하여 48시간 동안 반응시켜 NO 생성량 변화를 확인하였다. 실험은 위에서 기술한 것과 동일하게 진행하였다. 사용된 LPS는 1µg/ml의 농도로 처리하였으며, 프로폴리스 추출물은 1, 5, 25 그리고 50µg/ml의 농도로 처리하였다.

Western blot

NO assay를 위한 상층액을 회수한 후 남은 세포로부터 단백질을 추출하였다. Phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세포를 세척한 후, 200µl의 RIPA lysis buffer (GenDEPOT, USA)를 첨가하고 cell scraper를 이용하여 세포 내 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액만을 회수하였다. 회수된 lysates는 bicinchronic acid (BCA) 단백질 정량법으로 농도를 측정하였고, 이 중 20µg의 단백질을 Western blot에 사용하였다. 4X lamini sample buffer(GenDEPOT, USA)와 lysates를 혼합한 뒤, 100°C에서 5분간 denaturation시켰으며, 이를 10% polyacrylamide gel에 loading하여 단백질을 전기영동하였다. 분리된 단백질은 PVDF

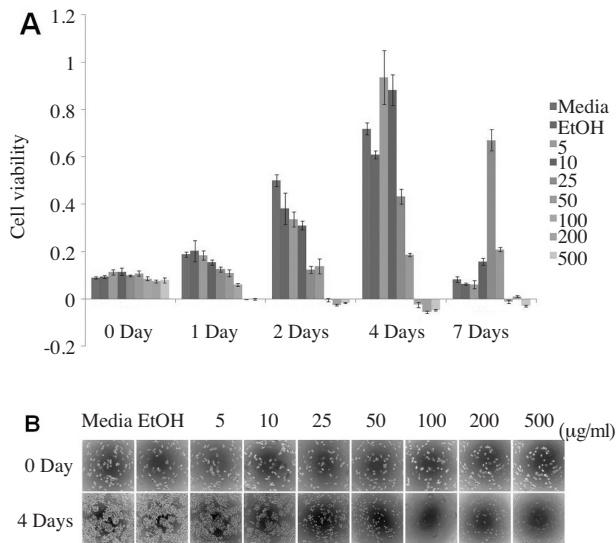


Fig. 1. Effect of propolis extracts on cell viability on Raw264.7 cells. (A) Raw264.7 cells (2×10^3 cells/well) were incubated with complete medium or propolis extracts. Propolis extracts were treated with dose-dependent on Raw264.7 cells for 0 to 7 days. Optical density value was measured by EZ-cytox. (B) Morphology of Raw264.7 cells treated with propolis ($\times 100$).

membrane에 transfer한 다음, 2% non-fat dry milk로 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 반응을 차단하였다. iNOS, IL-1 항체는 1:1,000으로 -actin은 1:2,000으로 2% non-fat dry milk에 희석하여 실온에서 overnight으로 항원-항체 반응을 실시하였다. 항체 반응 후 1X tris-buffered saline Tween-20 (TBS-T) 용액으로 10분간 3회 washing하였으며, secondary antibody로 goat anti-mouse-HRP와 goat anti-rabbit-HRP를 1:2,000으로 5% non-fat dry milk에 각각 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBS-T buffer로 10분간 3회 washing한 뒤, ECL pico detection (GenDEPOT, USA)을 처리하여 GelDoc으로 단백질 발현을 확인하였다.

통계 처리

세포 독성, NO 생성에 대한 실험 데이터는 3회 반복 실험으로 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며, 평균값에 대한 검증은 SPSS 통계분석프로그램(SPSS statics 18, IBM, USA)을 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

프로폴리스 추출물의 수율

총 3회에 걸쳐 프로폴리스 원괴로부터 추출된 추출물을 분석한 결과, 프로폴리스 추출물은 36.9%(1차), 41.2%(2차), 그리고 39.6%(3차)의 수율을 나타냈으며, 평균 약 39.2%의 수율로 추출되었다.

프로폴리스 추출물의 세포 독성 평가

프로폴리스가 세포에 대해 나타내는 독성을 평가하기 위해 프로폴리스 추출물을 세포에 처리한 뒤, MTT assay를 응용한 EZ-cytox detection system으로 확인하였다. 프로폴리스 추출물은 농도별(0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 그리고 500 μ g/ml)로 세포에 처리하였으며, 처리 시간은 세포 접종 후 24시간 후를 0으로 기준하여 1, 2, 4 그리고 7일 째에 흡광도를 측정하였다. 처리한 결과, 50 μ g/ml 이상의 농도에서는 프로폴리스의 세포 독성으로 인해 사멸된 세포가 나타났으며, 25 μ g/ml의 농도에서는 세포의 사멸이 발생하지 않았음을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 세포의 사멸 효과를 보이지 않으면서 오랜 기간 세포를 관찰하며 세포의 면역 반응을 관찰하기 위해 25 μ g/ml의 농도를 선택하여 다음 실험에 이용하였다. 세포의 형태를 촬영한 결과에서도 마찬가지로 50 μ g/ml 이상의 농도에서는 사

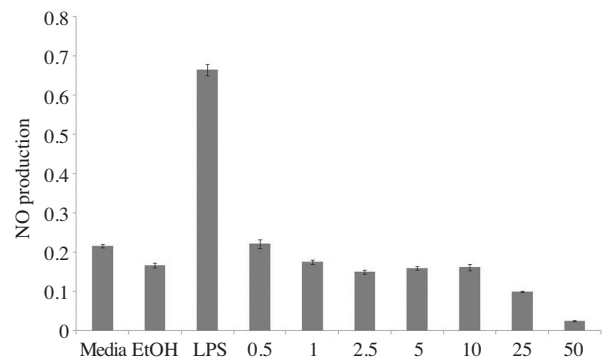


Fig. 2. Effect of propolis extracts on NO production on Raw264.7 cells. Raw264.7 cells (2×10^5 cells/well) were incubated with complete medium or LPS (1 μ g/ml) or propolis extracts. Propolis extracts were treated on dose-dependent (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 and 50 μ g/ml) for 24 hr. NO production level was evaluated NO assay kit. Values are expressed as the mean \pm SD of determination made in triplicate experiments.

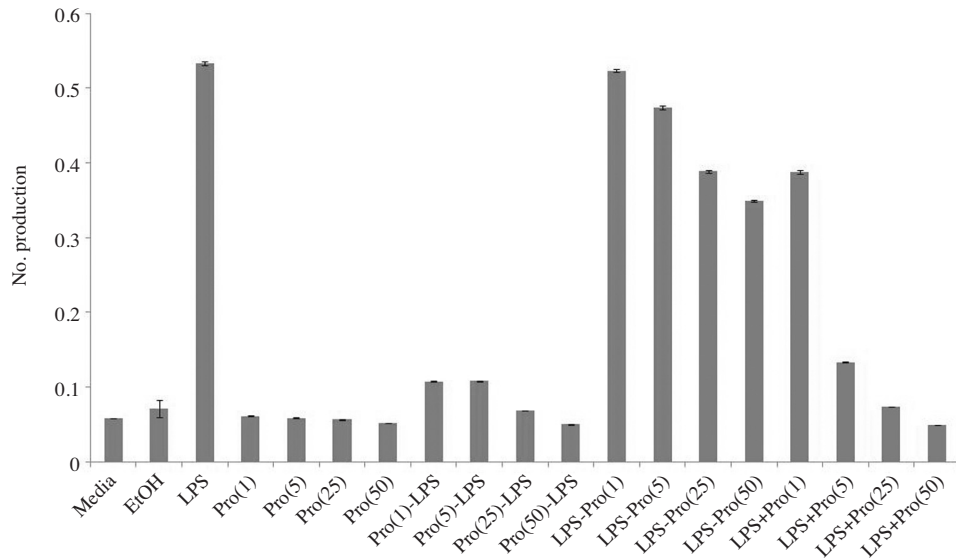


Fig. 3. Effect of propolis extracts on NO production on LPS-stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells (2×10^5 cells/well) were incubated with complete medium for 24 hr. Propolis (1, 5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$) or LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) were treated with complete medium. Experiments group was divided into three groups. (1: Propolis pretreatment then LPS treatment, 2: LPS pretreatment then propolis treatment, 3: Propolis and LPS simultaneously treatment).

멸되어 죽는 세포가 관찰되었다(Fig. 1B). 이에 25 $\mu\text{g/ml}$ 을 세포 독성이 없는 농도로 설정하고, 이 농도의 프로폴리스 추출물을 이용하여 다음의 실험에 사용하였다.

프로폴리스 추출물의 NO 생성 억제 효과

염증 발생에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 분자는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변화하는데 이 과정에서 inducible NOS (iNOS)가 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 박테리아 또는 바이러스와 같은 염증성 인자에 의해 세포가 자극을 받게 되면 iNOS가 생성되고, 이를 통해 생성된 NO 분자는 세포 독성, 조직 손상과 같은 염증성 반응을 심각하게 진행시킨다. 먼저 대식세포에 프로폴리스 추출물만을 처리하여 세포 내에서의 NO 생성을 확인하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 농도별(0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$)로 프로폴리스 추출물을 처리하였을 때, 다른 농도에서는 대조구와 차이를 보이지 않았지만, 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포의 사멸없이 프로폴

리스 추출물에 의한 NO 생성 감소가 나타났다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 나타난 NO 생성 감소는 세포의 사멸로 인해 나타난 결과이다.

LPS에 의해 발생하는 염증 유도로 증가된 NO가 프로폴리스 추출물 처리로 인해 변화가 나타나는지 다음 실험을 통해 확인하였다. 1실험군은 LPS를 전처리하여 염증 반응을 유도시킨 후 프로폴리스 추출물을 처리하고, 2실험군은 프로폴리스 추출물을 전처리한 후 LPS를 처리하였다. 마지막으로는 LPS와 프로폴리스 추출물을 동시에 처리하여 각각의 군에서 나타나는 NO 생성을 확인하였다. 이때 대조군으로서 LPS와 프로폴리스 추출물을 처리하지 않은 것과, 용매 대조군인 에탄올 처리군을 설정하였으며, LPS를 처리하지 않고 프로폴리스 추출물만을 처리한 것도 대조군으로 설정하였다. 양성 대조군으로서는 LPS 처리군으로 확인하였다. 그림 3에서 보는 것과 같이 LPS가 처리된 세포에서는 매우 높은 NO 생성을 나타낸 반면, 프로폴리스 추출물에서는 NO 생성 증가를 보이지 않았다. 그러나 LPS를 전처리하고 프로폴리스 추출물을 처리한 군에서는 프로폴리스 추출물의 농도

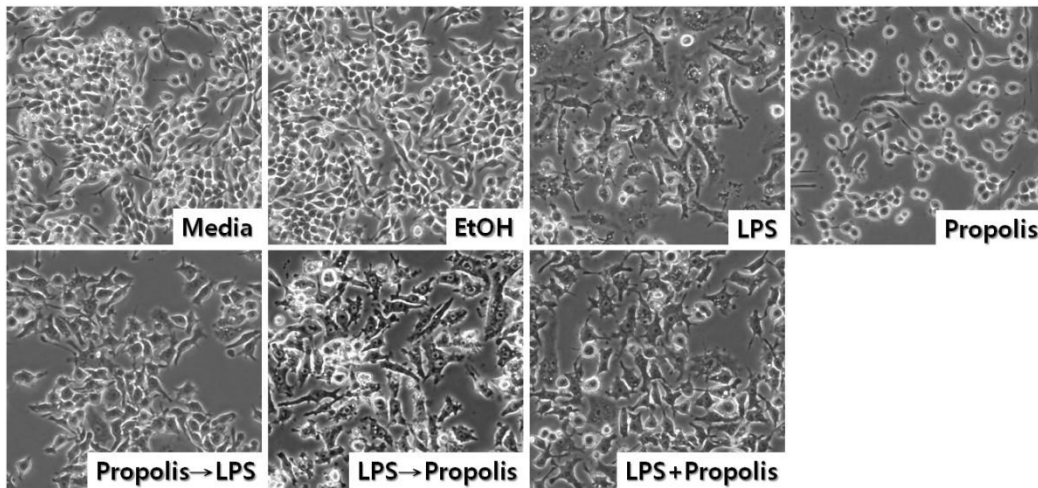


Fig. 4. LPS or propolis-stimulated Raw264.7 cells morphology. Raw264.7 cells morphology was confirmed at $\times 100$ microscope. LPS or propolis was treated for 24 hr.

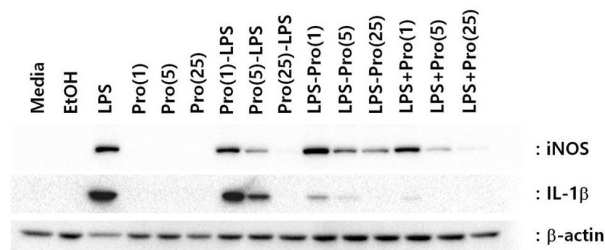


Fig. 5. Effect of propolis extracts on the LPS-induced iNOS and IL-1 β expression. Raw264.7 cells were treated with various concentration of propolis extracts (1, 5 and 25 μ g/ml) or LPS. iNOS and IL-1 β antibody were diluted in 2% skim milk at 1:2,000. β -actin was housekeeping control for Western blotting.

가 높아질수록 LPS에 의해 생성이 유도된 NO양이 감소함을 나타냈다. 흥미로운 것은 프로폴리스 추출물을 전처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 LPS에 의해 발생하는 NO 생성이 크게 감소되었으며, 마찬가지로 LPS와 프로폴리스 추출물을 동시에 처리한 군에서도 NO 생성이 저해되는 것으로 나타났다. 이는 LPS에 의해 발생하는 NO 생성 증가가 프로폴리스 추출물 처리로 인해 감소되었음을 나타내는 결과이다. Fig. 4에서는 LPS와 프로폴리스 추출물 처리에 따른 세포 형태를 볼 수 있다. 사진에 있는 프로폴리스 추출물이 처리된 세포는 모두 25 μ g/ml의 프로폴리스 추출물을 처리했을 때의 세포 형태이다.

프로폴리스 추출물에 의한 iNOS와 IL-1의 단백질 합성 저해

프로폴리스 추출물에 의한 NO 생성 저해가 세포 내부의 분자 조절을 통해 이루어지는 것인지를 확인하기 위하여 NO 생성 합성 효소인 iNOS의 발현 여부를 Western blotting을 통해 확인하였다. 또한 염증성 반응이 진행될 때 세포 내부에서 발현양 차이를 보이는 IL-1 단백질의 변화 여부를 확인하였다. Fig. 5에서 보는 것과 같이 프로폴리스 추출물 처리에 따라 iNOS 단백질의 발현 감소를 확인할 수 있었으며, IL-1 단백질도 동일한 결과를 나타내었다. 또한 실험 초반에 설정한 프로폴리스 추출물의 적정 농도인 25 μ g/ml에서 가장 확연한 단백질 발현 감소를 나타냈다. -actin 단백질은 loading 단백질이 모든 시료에서 이상이 없음을 보여주고 있다. 이 결과는 앞에서 실시한 NO assay 실험 결과에서 나타난 것과 명백히 일치됨을 보여주고 있으며, 이는 프로폴리스 추출물이 염증 반응에 있어 세포 내부의 iNOS 단백질 발현을 조절하여 NO 생성 감소를 이끌어내고 있고, 이에 따라 염증성 인자인 IL-1의 발현 조절에도 영향을 끼치고 있음을 보여주고 있다. 또한 본 결과를 바탕으로 볼 때 프로폴리스 추출물은 이미 생성된 염증 반응 경감에 있어서도 효과를 나타내고 있지만, 그보다 프로폴리스 추출물에

의한 염증 예방 효과가 더 뛰어남을 시사하고 있다.

적 요

염증 반응에 있어 프로폴리스 추출물의 효과를 대식세포인 Raw264.7 세포에서 확인하였다. 에탄올 추출법에 의해 프로폴리스 원료로부터 추출물을 얻었으며, 추출물의 수율은 약 39%였다. 프로폴리스 추출물이 가진 세포 독성 평가를 위해 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 그리고 500 μ g/ml로 세포에 처리하였을 때 세포의 사멸이 없는 최적 농도는 25 μ g/ml로 나타났다. 프로폴리스 추출물에 의한 NO 생성은 앞에서 설정한 25 μ g/ml에서 감소됨을 보였고, 이는 세포 독성 평가에서 설정한 농도가 적절했음을 보여주고 있다. 대표적인 염증 반응 인자인 NO 생성에 있어서 프로폴리스 추출물의 효과를 확인하기 위해 프로폴리스 추출물과 LPS의 전후처리 및 동시처리를 진행하였고, 그 결과 LPS에 의해 증가된 NO 생성이 프로폴리스 추출물에 의해 감소됨을 나타냈다. 또한 이 결과는 Western blotting에 의해 나타난 iNOS와 IL-1의 발현양에서도 일치됨을 보여주고 있었다. LPS에 의해 증가된 iNOS, IL-1의 발현양이 프로폴리스 추출물에 의해 억제됨이 세포 내 분자 수준에서 조절되고 있음이 확인되었다. 본 결과는 프로폴리스 추출물이 염증 반응 경감 및 예방에 있어 분자적 수준에서 조절되고 있음을 보여주고 있으며, 이는 염증 치료 및 예방에 있어 프로폴리스 추출물이 매우 우수한 기능성 물질임을 시사하고 있다. 본 결과를 바탕으로 염증 반응에 관련된 여러 cytokine 분자들의 발현을 확인하고, 염증 반응 치료에 있어 프로폴리스가 매개하는 세포 내 분자의 명확한 기전을 밝혀야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다연구사업(과제번호: PJ01387801)에 의해 수행되었다.

인용 문헌

- Bazo, A. P., M. A. Rodrigues, J. M. Sforcin, J. L. de Camargo, L. R. Ribeiro, and D. M. Salvadori. 2002. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 22: 183-194.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2: 2907-2916.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36: 347-363.
- Cheon, Y. P., L. M. Mohammad, C. H. Park, J. H. Hong, G. D. Lee, J. C. Song and K. S. Kim. 2009. *Bulnesia sarmienti* aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated Raw264.7 cells. *Journal of Life Sciences* 19: 479-485.
- Geller, D. A., A. K. Nussler, M. D. Silvio, C. J. Lowenstein, and R. A. Shapiro. 1993. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90: 522-526.
- Hamsa, T. P. and G. Kuttan. 2011. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of *Ipomoea obscura* (L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation* 34: 171-183.
- Ialenti, A., A. Iannaro, S. Moncada, and M. Di Rosa. 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 211: 177-182.
- Ismaki, P. and J. Punnonen. 1997. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine* 29: 449-507.
- Jeong, I. Y. 2004. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. *Journal of Korean Society Foods Sciences Nutrients*. 34: 162-166.
- Khayyal, M. T., M. A. el-Ghazaly, and A.S. el-Khatib. 1993. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drugs Experimental and Clinical* -19: 197-203.
- Kim, D. H., S. J. Park, J. Y. Jung, S. C. Kim, and S. H. Byun. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Hwangnyenhaedok-tang* in LPS-activated macrophage cells. *Korea Journal of Herbology* 24: 39-47.
- Kunimasa, K., M. R. Ahn, T. Kobayashi, R. Eguchi, S. Kumazawa, Y. Fujimori, T. Nakano, T. Nakayama, K. Kaji, and T. Ohta. 2010. Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: doi: 10.1093/ecam/nep024.
- Ledon, N., A. Casaco, R. Gonzalez, N. Merino, A. Gonzalez, and Z. Tolon. 1997. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologica Sinica* 18: 274-276.

- Lee, E. S., H. K. Ju, T. C. Moon, E. Lee, Y. Jahng, S. H. Lee, J. K. Son, S. H. Baek, and H. W. Chang. 2004. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 617-620.
- McDaniel, M. L., G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 211: 24-32.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 6: 3051-3064.
- Nishida, T., Y. Yabe, H. Y. Fu, Y. Hayashi, K. Asahi, H. Eguchi, S. Tsuji, M. Tsujii, N. Hayashi, and S. Kawano. 2007. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF- κ B. *Digestive Diseases and Sciences* 52: 1890-1896.
- Orsolich, N., I. Kosalec, and I. Basic. 2005. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biological and pharmaceutical Bulletin* 28: 694-700.
- Ryu, J.H., H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Research* 17: 485-489.
- Schnitzler, P., N. Annettr, N. Silke, Z. Christinel, N. Hans, S. H. Karl, and R. Jurgen. 2010. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research* 24: S20-S28.
- Sforcin, J. M. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 243-249.
- Sunyer, T., L. Rothe, X. Jiang, P. Osdoby, and P. Collin-Osdoby. 1996. Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 60: 469-483.
- Uttara, B., A. V. Singh, P. Zamboni, and R. T. Mahajan. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology* 7: 65-74.
- Willoughby, D. A. 1975. Human arthritis applied to animal models: Towards a better therapy. *Annals of Rheumatic Diseases* 34: 471-478.
- Zhang, L., H. Zhu, Y. Lun, D. Yan, L. Yu, B. Du, and X. Zhu. 2007. Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. *Cellular and Molecular Immunology* 4: 359-367.