

무당벌레(*Harmonia axyridis*) 추출물에 의한 BV-2 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해 활성

한상미 · 이상한¹ · 윤치영² · 강석우 · 이광길 · 김익수 · 윤은영 · 이평재 · 김선여³ · 황재삼*
농업과학기술원 농업생물부, ¹경북대학교 식품공학과, ²대전대학교 생물학과, ³경희대학교 동서의학대학원

Inhibition of Nitric Oxide Production by ladybug extracts(*Harmonia axyridis*) in LPS-activated BV-2 cells

SangMi Han, SangHan Lee¹, Chi Young Yun², SeokWoo, Kang, KyungGill Lee,
Iksoo Kim, EunYoung Yun, Pyeongjae Lee, SunYeou Kim³ and JaeSam Hwang*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

²Department of Biology, Daejeon University, Daejeon 307-716, Republic of Korea

³Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Republic of Korea

ABSTRACT : Inflammation in the brain has known to be associated with the development of a various neurological diseases. The hallmark of neuro-inflammation is the activation of microglia, brain macrophage. Pro-inflammatory compounds including nitric oxide(NO) are the main cause of neuro-degenerative disease such as Alzheimer's disease. In the study, we examined whether *Harmonia axyridis* extracts inhibit the NO production by a direct method using Griess reagent, western blotting and by RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) the gene expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS). Distilled water(H₂O) and methanol(MeOH) extracts of *H. axyridis* inhibited the protein expression of TNF- α (Tumor Necrosis Factor) and IL-6(Interleukin) in LPS (Lipopolysaccharide) stimulated BV-2 cells at the concentration of 100 ng/ml. Incubation of BV-2 cells with the extracts of H₂O of MeOH inhibited the LPS induced NO and iNOS protein. And this inhibition of iNOS protein is concordant with the inhibition of iNOS mRNA expression. These data suggested that *H. axyridis* extracts may play a crucial role in inhibiting the NO production.

KEY WORDS : *Harmonia axyridis*, Mmicroglia, BV-2, Nitric oxide

초 록 : 퇴행성 뇌질환은 뇌에 존재하는 면역세포인 소교세포의 염증반응이 발병 요인 중의 하나로 알려져 있다. 이에 본 연구는 초고속자동화시스템(high throughput screening: HTS)을 이용하여 약용곤충추출물로부터 항산화와 항염증 기능이 있다고 알려진 무당벌레 추출물로부터 염증발생인자인 nitric oxide의 생성에 어떠한 영향을 주는지 다음과 같은 결과를 얻었다. 소교세포인 BV-2세포에 대한 무당벌레 추출물의 세포독성은 물과 메탄올, DMSO 추출물에서는 100 ng/ml까지는 거의 없었으나 에탄올 추출물은 1 ng/ml에서도 세포독성이 있었다. 물과 메탄올 추출물(50 ng/ml)은 LPS로 활성화된 BV-2세포에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 발생을 35-60 % 가량 억제 하였다. LPS로 유도된 NO의 생성은 물과 메탄올 추출물을 처리했을 때 각각 55%, 76% 억제되었다. 또한, MeOH 추출물을 처리했을 경우 LPS에 의한 iNOS 발현 정도를 단백질 수준과 mRNA 수준에서 현저하게 억제시킴을 확인하였다.

검색어 : 무당벌레, 소교세포, BV-2 세포주, 산화질소

*Corresponding author. E-mail: hwangjs@rda.go.kr

노령화 사회로 접어들면서 알츠하이머, 파킨슨병, 허혈성 뇌질환 등 퇴행성 뇌질환의 발생이 크게 증가됨에 따라 전 세계적으로 메카니즘 구명과 질병을 사전 예방 할 수 있는 치료법과 치료 약물 개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 최근 퇴행성 뇌질환 발생 메카니즘으로 뇌에 존재하는 면역세포인 소교세포의 염증반응 매개체 분비는 여러 가지 다양한 퇴행성 질환과 밀접한 관계가 있다고 보고 되었으며(Han *et al.*, 2002), 이러한 소교세포 활성화는 결과적으로 면역체계 전반의 항상성을 유지하는데 있어 문제를 발생시킬 수 있는 가능성이 있다(Arimoto and Bing, 2003; Depino *et al.*, 2003). LPS(Lipopolysaccharide)는 소교세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 다양한 매개체를 통한 소교세포의 활성화는 뇌에서 발생될 수 있는 여러 가지 질환과 직·간접적으로 연관되어 있다(Sola *et al.*, 2002). 파킨슨병이나 알츠하이머병의 정확한 원인은 아직까지 잘 밝혀지지 않았지만 표적세포가 자유 유리기에 의해 손상 받음으로써 발생되는데, 가장 흔한 세포의 자유 유리기가 바로 hydroxyl radical, superoxide radical, nitric oxide(NO) 이다(Arimoto and Bing, 2003; Emerit *et al.*, 2004). 특히 NO는 작고 불안정하며 독성이 강한 자유 유리기로서 신체 내에서 정상적으로 충추 신경계와 말초 신경계에 존재한다. NO는 신체 내에서 때에 따라 부정적, 긍정적으로 작용하는 두 가지 측면을 모두 가지고 있다. 긍정적인 측면에서는 세포 내 신호 전달 및 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으나, 부정적인 측면으로는 과량의 NO가 생성될 경우 신체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상을 초래할 뿐만 아니라 염증 반응을 비롯한 뇌막염, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 질환에 있어 무엇보다 중요한 원인으로 대두되고 있다(Kasckow *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2001; Lezoualc'h *et al.*, 2000).

곤충은 동물군 중에서 가장 많은 생물군으로서, 전 세계적으로 180만종이 서식하고 있고, 우리나라에서만 1만 2천만종이나 서식하는 것으로 알려져 있다. 곤충은 생물 다양성이 매우 풍부하며, 환경에 따라서 이 곤충의 다양성이 결정되고 이에 관련된 여러 가지 곤충 유래의 생리활성 물질의 양과 질이 다양하게 변화된다. 최근에는 새로운 기능성을 갖는 약용곤충을 발견, 상용화, 사육화, 보급화 함으로서 농가의 수익을 보장하고 새로운 식의약품으로 개발이 활발히 진행되고 있는 추세이다(Park and Lee, 1998; Park *et al.*, 2004). 무당벌레(*Harmonia axyridis* Pallas)는 인공적으로 대량 사육이 가능한 곤충으로서 옛 문헌에 의하면 배앵이와 어린아이의 흉진 등의 민간요법

으로 사용했다는 기록이 있으며, 무당벌레 으깬 것을 충치의 구멍에 넣으면 아픔이 멈추게 된다고 하였다(Park and Lee, 1998).

이와 관련하여 본 연구는 무당벌레 추출물이 소교세포에서 NO 분비를 억제할 수 있는가를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출

본 실험에 사용한 곤충 추출물은 대전대 생명과학과와 경북대학교 식품공학과로부터 제공 받았다. 증류수, DMSO(dimethyl sulfoxide), 에탄올, 메탄올을 이용하여 24시간 추출과정을 거쳤으며, 물 추출물은 섭씨 60℃에서 열수 추출한 것으로 HTS(high throughput screenig) system으로 항산화와 항염 효과가 있다고 확인되어 분양받은 무당벌레 추출물을 대상으로 하였다 (Park *et al.*, 2005).

세포 배양

소교세포(BV-2)는 경희대학교 한약리학교실로부터 분양받아 사용하였으며, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함하고 있는 DMEM(Cambrex, USA)으로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 계대배양하여 실험에 사용하였다. 배양세포가 바닥 면적의 90% 가량 차도록 자라면 계대배양을 하고 대수 성장기의 세포를 실험에 사용하였다.

세포독성 및 Cytokine 생성 및 정량

TNF(tumor necrosis factor)- α , IL(interlukin) -1 β 정량은 BV-2 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/ml 씩 넣어 준 다음 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고, LPS와 시료를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 세포 독성은 MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약을 이용하여 측정하였고, TNF- α , IL-1 β 의 정량은 mouse ELISA kit(R&D Systems, USA)를 이용하였다.

NO 측정

BV-2 세포를 96-well plate에 1×10^5 cells/ml 씩 넣어 준 다음 LPS와 무당벌레 추출물을 각각의 농도에 따라

배양세포에 첨가하고 20시간 동안 배양한 다음 각 well로부터 100 μ l 씩의 배양액을 취하여 동량의 Griess reagent (Sigma, USA)를 첨가하고 20분간 실온에 두었다. 전체 NO_2^- 생성 정도는 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 NO_2^- 농도에 대한 표준 곡선은 NaNO_2 를 사용하여 작성하였다.

Western blotting

BV-2 세포(1×10^5 cells/ml)를 18시간 배양을 하고, LPS와 무당벌레 추출물을 동시 처리하여 전 배양과 동일조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2-3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 lysis buffer를 첨가, 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 단백질은 BSA를 표준화하여 정량하여 SDS-PAGE 전기영동으로 분리하고, 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride막으로 전이시켰다. 1차 항체로 rabbit iNOS polyclonal antibody (abcam, UK) 200:1로, 2차 항체로 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK)는 1000:1 반응시킨 후 ECMTM western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, UK)에 반응시키고, film에 노출, 현상하였다.

RNA의 분리 및 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

BV-2 세포(1×10^5 cells/ml)를 18시간 배양 한 후, LPS와 무당벌레 추출물을 동시 처리하여 전 배양과 동일조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, BV-2 세포로부터 전체 RNA는 RNAzolB (TEL-TEST, Friendwood, USA)를 사용하여 추출하고 분광광도계 (Beckman, Peapack, USA)로 RNA의 순도와 정제된 양을 구하였다. 분리한 1 μ g의 RNA를 주형으로 1st strand cDNA synthesis Kit (Boehringer Mannheim Co., IN, USA)를 이용하여 oligo dT primed first strand DNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 MgCl_2 의 농도가 1.5 mmol, dNTP 0.5 mmol, 2.5 U/ μ L의 Taq polymerase와 PCR 완충액에 각기 25 pmol의 iNOS와 house keeping gene인 β -actin primer를 혼합하여 PCR반응기(TaKaRa, Japan)에서 증폭하였다. β -actin의 primer는 5'-GTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3', 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3' (Jang *et al.*, 2005)를 사용하여 603 bp의 산물을 얻었고, iNOS의 primer는 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3',

5'-GGCTGTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3' (Jang *et al.*, 2005)를 사용하여 496 bp의 산물을 얻었다. PCR 시간 및 온도는 94 $^\circ\text{C}$ 에서 2분간 변성시킨 후 94 $^\circ\text{C}$ 에서 45초, 58 $^\circ\text{C}$ 에서 45초, 68 $^\circ\text{C}$ 에서 1분간 반응시키는 조건으로 25회 수행하고, 68 $^\circ\text{C}$ 에서 7분간 반응시켰다. 이렇게 얻어진 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

통계 분석

무당벌레 추출물간의 NO발생 억제는 Student's t-tests (SAS Institute, 2004)로 비교하였다.

결 과

무당벌레 용매분획 추출물의 세포독성 및 NO 억제 효과

BV-2 세포에 100ng/ml의 LPS와 무당벌레 추출물을 동시 처리한 후 세포독성을 평가하였다. 그 결과 물, 메탄올 그리고 DMSO 추출물 100 ng/ml 이하의 농도에서는 독성을 갖지 않았으나 에탄올추출물에서는 1ng/ml의 농도에서도 세포 독성을 보였다 (그림 1). 세포독성을 갖지 않는 물, MeOH 및 DMSO의 농도 범위에서 무당벌레 추출물을 처리하여 염증성 cytokine 억제 효과를 확인하였다. 그 결과 물과 메탄올추출물이 TNF- α 를 각각 38%, 53%, IL-1 β 는 각각 36%, 62% 억제하였다 (표 1).

무당벌레 용매분획 추출물의 NO 억제 효과

세포독성을 갖지 않는 물, 메탄올 및 DMSO의 농도 범위에서 무당벌레 추출물을 처리한 후 NO 생성량을 측정하였다. BV-2 세포에 LPS를 단독 처리했을 때에는 43.2 μM 이 생성되었으나 물 추출물과 메탄올추출물에서 28.3 μM , 17.1 μM 로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2 (A)). 메탄올추출물을 농도별로 처리했을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2 (B)). 메탄올추출물에서의 NO 생성 억제율에 대한 IC₅₀ (Inhibitory Concentration)은 32 ng/ml 이었다.

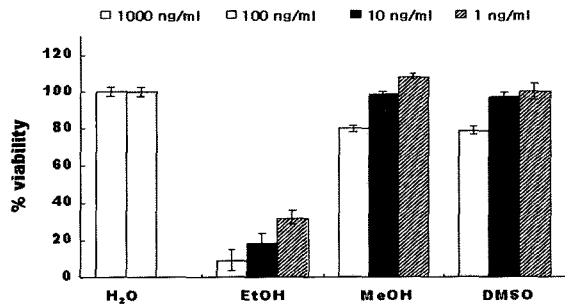


Fig. 1. The viability of BV-2 cells in the presence or absence of solvent extracts of *H. axyridis* were incubated with or without solvent extracts plus LPS (100ng/ml) for 24 hrs at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay. Data are expressed as means±S.D. of triplicate samples.

Table 1. The effect of solvent extracts of *H. axyridis* on LPS induced TNF- α and IL-6 release in BV-2 cells

Extracts	Inhibition (%)	
	TNF- α	IL-6
H ₂ O	38	36
EtOH	-	-
MeOH	53	62
DMSO	21	20

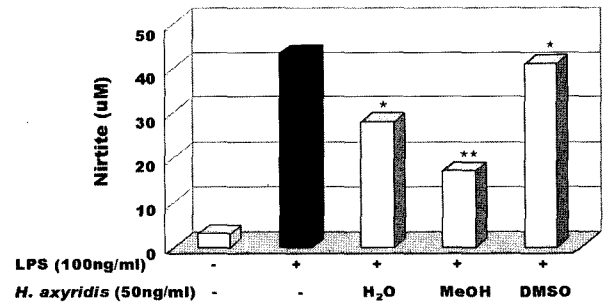
The productions of TNF- α and IL-6 were assayed from culture supernatant of BV-2 cells (1.0×10^5 cells/ml) stimulated by LPS (100 ng/ml) in the presence of testing samples (100 ng/ml).

무당벌레 추출물의 NOS의 mRNA 발현 및 단백질 수준에 미치는 영향

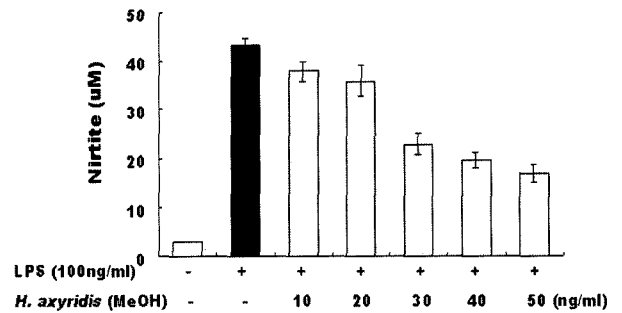
BV-2 세포에서 iNOS의 단백질 발현을 western blot 방법으로 조사하였다. 무당벌레 메탄올추출물 30ng/ml 이상의 농도로 처리하였을 때 강한 발현 억제 효과를 나타내었다 (그림 3 (A)). 그리고 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 억제 효과를 RT-PCR 방법으로 분석한 결과 iNOS의 mRNA가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(그림 3 (B)).

고 찰

과거에는 알츠하이머, 파킨슨병, 근위축성측삭경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 과 같은 신경계 퇴행성 질환의 병리 소견상 관찰되는 microglia세포의 증식과 면역-염증에 관련된 세포 및 면역 매개물질의 침윤 등은 신경세포의 파괴에 따른 비특이적 이차적 현상으로만 받



(A)



(B)

Fig. 2. The effect of solvent extracts (A) and MeOH extract (B) of *H. axyridis* on NO production in LPS induced BV-2 cells. The productions of NO was assayed from culture supernatant of BV-2 cells (1.0×10^5 cells/ml) stimulated by LPS (100 ng/ml) in the presence of testing samples. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ by Student's t-test.

아들여져 왔다 (Akiyama *et al.*, 2000; McGeer and McGeer, 2002). 그러나 분자생물학의 발전으로 면역-염증 기전 (immune-inflammatory mechanism)에 중요한 역할을 하는 세포들의 표피지표에 대한 동정이 가능해졌고, 면역-염증 매개물질들의 정체 및 기능이 밝혀짐에 따라 면역-염증 기전이 신경계 손상에 대한 비특이적 이차적 반응만이 아니고 신경계 퇴행성 질환의 진행 경과 중 초기부터 관여할 수도 있으며, 병리현상의 완급을 조절하고 신경세포의 생존 및 사멸에 적극적으로 관여할 것이라는 증거들이 제시되고 있다 (Popiovic *et al.*, 1998; McGeer and McGeer, 2001; Czlonkowska *et al.*, 2002)

따라서 면역-염증 반응에 중심 역할을 하고 있는 소교세포의 기능을 조절하는 물질과 면역-염증 매개물질인 NO, IL-1, IL-6 및 TNF- α , 급성기반응 단백질인 amyloid P 및 COX (cyclooxygenase) 등을 조절하는 인자를 밝혀려고 노력하고 있으며, 실제로 이들 각 인자는 여러 퇴행성 질환의 치료에 적용되고 있다 (Streit *et al.*, 1988; Raivich *et al.*, 1996).

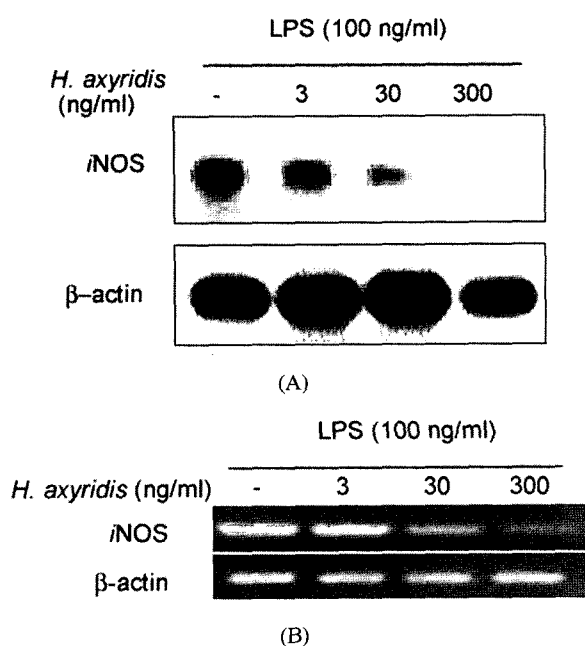


Fig. 3. Inhibitory effect of MeOH extract of *H. axyridis* on the protein (A) and mRNA (B) level of iNOS activated with LPS (100 ng/ml) in BV-2 cells. BV-2 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr and the cells were stimulated by LPS in the presence of MeOH extract for 24 hr.

NO는 작고 불안정하며 독성이 있는 무기 저분자 라디칼로서 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절 및 종양 세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 등에 관여하고 있다 (Chen *et al.*, 2005). NO를 생성하는 효소는 크게 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS (c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)로 분류된다. 신경 염증 반응 등에 의해 생성되는 NO는 LPS, TNF- α 또는 IL-1 β 에 의해 자극 받은 대식세포나 소교세포에서 생성되는 iNOS에 의한 (Nakashima *et al.*, 1995; Motterlini *et al.*, 2000; Scapagnini *et al.*, 2002).

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도 되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이렇게 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 유발한다 (Scapagnini *et al.*, 2002). 염증 상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라 COX를 활성화하여 prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. iNOS에 의한 NO 생성은 iNOS 유전자의 발현에 영향을 주는 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 cytokine이나 다른 chemical을

억제시킴으로서 조절할 수 있다 (Raivich *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2004).

Arimoto와 Bing (Arimoto and Bing, 2003)은 LPS를 주입하여 활성화된 소교세포에서 iNOS가 발현되고 iNOS의 억제제인 L-NG-nitroarginine과 glucocorticoid dexamethasone를 주입하면 LPS에 의해 유발되는 소교세포의 활성이 억제됨을 확인하였다 (Emerit *et al.*, 2004). 이는 NO가 염증에 의해 매개되는 소교세포의 활성화에 기여하는 것을 다시 한번 입증하는 증거이다.

본 연구에서는 소교세포인 BV-2 세포에 LPS (100ng/ml)로 자극시켜 무당벌레 추출물을 세포독성이 없는 농도에서 처리하여 TNF- α , IL-1 β 생성을 관찰한 결과 물, 메탄올과 DMSO 추출물에서 TNF- α 생성과 IL-6 생성이 LPS 단독 처리군에 비하여 억제 되었다. 특히 메탄올 추출물에서 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. LPS에 의한 iNOS 발현 정도를 단백질 수준과 mRNA 수준에서 관찰한 결과에서도 메탄올 추출물이 iNOS 발현을 현저하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었고 iNOS의 산물인 NO 생성량도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 NO의 생성 억제는 iNOS의 발현 저해에 의한 것임을 알 수 있었다. 본 연구는 무당벌레의 유효 성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구와 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이며 더 나아가 퇴행성뇌질환 치료 연구에 도움이 되리라 사료된다.

감사의 글

연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20050301-034-474-116-01-00)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Literature Cited

- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer and G. M. Cole. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21: 383~421.
- Arimoto, T. and G. Bing. 2003. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 12: 35~45.
- Chen, J. C., F. M. Ho, P. D. L. Chao, C. P. Chen, K. C. G. Jeng, H. B. Hsu, S. T. Lee, W. T. Wu and W. W. Lin. 2005. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the

- inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol.* 521: 9~20.
- Czlonkowska, A., I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Czlonkowski, D. Peter and G. Stefano. 2002. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson disease; a potential role for microglia and nitric oxide. *Med Sci Monit.* 8: 165~177.
- Depino, A. M., C. Earl, E. Kaczmarczyk, C. Ferrari, H. Besedovsky, A. Rey, F. J. Pitossi and W. H. Oertel. 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 18: 2731~2742.
- Emerit, J., M. Edeas and F. Bricaire. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 58: 39~45.
- Han, I. O., K. W. Kim, J. H. Ryu and W. K. Kim. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase mediates lipopolysaccharide, not interferon-gamma, -induced inducible nitric synthase expression in mouse BV-2 microglial cells. *Neurosci Lett.* 325: 9~12.
- Jang, J. S., S. K. Kim, J. B. Jan, J. J. Ahn, H. S. Bae and B. I. Min. 2005. Effect of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Ethnopharm.* 99: 157~160.
- Lezoualc'h, F., S. Engert, B. Berning and C. Behl. 2000. Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increase of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappa. B. *Mol Endocrinol.* 14: 147~159.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer. 2001. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 22: 799~809.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer. 2002. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 26: 459~470.
- Motterline, R., R. Foresti, R. Bassi and C. J. Green. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 28: 1303~1312.
- Nakashima, M. N., K. Yamashita, Y. Kataoka, Y. S. Yamashita and M. Niwa. 1995. Time course of nitric oxide synthase activity in neuronal, glial, and endothelial cells of rat striatum following focal cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol.* 15: 341~349.
- Kasckow, J. W., G. Aguilera, J. J. Mulchahey, S. Sheriff and J. P. Herman. 2003. In vitro regulation of corticotropin-releasing hormone. *Life Sci.* 73: 769~781.
- Park, D. S., M. A. Yoon, M. Z. Xu, H. N. Yu, J. R. Kim, T. S. Jeong and H. Y. Park. 2004. Original Articles : Screening of Anti-atherogenic Substances from Insect Resources. *Kor. J. Pharmacogn.* 35: 233~238.
- Park, J. Y., J. C. Heo, S. M. An, E. Y. Yoon, S. M. Han, J. S. Hwang, S. W. Kang, C. Y. Yun and S. H. Lee. 2005. High Throughput-compatible screening of Anti-Oxidative substances by insect extract library. *Korean J. Food Preserv.* 12: 482~488.
- Park, K. T. and J. S. Lee. 1998. Review on Insect Resources for Medical Use in Kangwon Province. *Korean J. Apiculture.* 13: 79~92.
- Park, K. T., and Y. C. Park. 1994. Survey on the aphidivorous predators for biological control agents. *J. Agri. Sci.* 36: 109~118.
- Popovic, M., M. Caballero-Bleda, L. Puelles and N. Popovic. 1998. Importance of immunological and inflammatory processes in the pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Int J Neurosci.* 95: 203~236.
- Raivich, G., H. Bluethmann and G. W. Kreutzberg. 1996. Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med.* 45: 239~247.
- Scapagnini, G., R. Foresti, V. Calabrese, A. M. G. Stella, C. Green and R. Motterline. 2002. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol.* 3: 554~561.
- Sola, C., C. Casal, J. M. Tusell and J. Serratos. 2002. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci* 16: 1275~1283.
- Streit, W. J., M. B. Graeber and G. W. Kreutzberg. 1988. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* 1: 301~307.
- Sweetman, H. L. 1958. The principle of biological control. W. C. Brown Co., Dubuque, Iowa.
- Ward, A. P., M. Deanna, C. Carsten and P. Mark. 2001. Corticotropin-releasing hormone protects neurons against insults relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol dis.* 8: 492~503.
- Yang, N. C., L. H. Lu, Y. H. Kao and L. Y. Chau. 2004. Heme Oxygenase-1 attenuates interleukin-1 β -induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci.* 11: 799~809.

(Received for publication 6 February 2006;
accepted 14 March 2005)