

Inflammation inhibitory effect of water extract from pumpkin' s tendril

Ha-Na Jeong¹, Ju-Hee Choi², Ha-Nul Lee², So-Hyeon Lee¹, Soon-Chang Cho³,
Jong-Hwan Park², Young-Min Kim^{1,4*}

¹Department of and BK21 Plus Program, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

²Laboratory animal Medicine, College of Veterinary Medicine and BK21 PLUS Project Team,
Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

³NaturePureKorea, Damyang 57039, Korea

⁴Bio-energy Research Center, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

호박 덩굴손 물 추출물의 염증제어 활성

정하나¹ · 최주희² · 이하늘² · 이소현¹ · 조순장³ · 박종환² · 김영민^{1,4*}

¹전남대학교 식품공학과 및 BK21 Plus 프로그램, ²전남대학교 수의학과 실험동물학 교실, ³네이처퓨어코리아,
⁴전남대학교 바이오에너지 중점연구소

Abstract

Pumpkin has long been used as traditional health materials in oriental medicine, pharmacy, medicine, and food industries in many countries. In this study, the water extract and two active components from tendril of young *C. moschata* Duch. were investigated on inflammation inhibitory activity. The water extract of young *C. moschata* Duch. showed high cell viability over 95% and it decreased the production of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF- α) in the capacity of mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM) upon lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Also, isolated fraction (B4) suppressed the secretion of IL-6 and TNF- α . Among the domestically cultivated pumpkins, B4 fraction contained in the tendril part of them and it comprised of the order of tendril from *Cucurbita pepo* var. *cylindrica*, old of *C. moschata* Duch., and young of *C. moschata* Duch. These results suggest that water extracts of *C. moschata* Duch. and purified active compound, rutin, show anti-inflammation activity by suppression of the secretion of IL-6 and TNF- α . It can be applicable as pharmaceutical materials.

Key words : *Cucurbita moschata* Duch., tendril, inflammation inhibitory effect, interleukin 6, tumor necrosis factor α

서 론

호박(*Cucurbita* spp.)은 박목 또는 박과에 속하는 일년생의 덩굴성 식물로 열대 아메리카 지역과 한국, 일본 등의 아시아 지역에서 자생하거나 재배되고 있으며(1), 다른 박과 채소에 비하여 기후 환경에 대한 적응력이 높고 병해충

에도 비교적 강하여 농약사용이 적은 무공해 식품으로서 최근 그 가치가 더 높게 평가되고 있다(2). 호박은 크게 동양계 호박(*Cucurbita moschata* Duch.), 서양계 호박(*Cucurbita maxima* Duch.), 페포계 호박(*Cucurbita pepo* L.) 등으로 구분되는데(1), 우리나라에서 재배되는 호박은 대부분 동양계 호박으로(3) 애호박, 늙은 호박 등이 이에 속하며(2), 재래종호박인 늙은 호박은 예로부터 약리적인 효과를 기대하는 용도로 사용되어 왔다(1). 식품공전상의 호박은 동양계 호박에 한하여 열매, 잎, 종자, 줄기 부위가 식용으로 허가되어 있는데 반해, 서양계 호박은 열매와 종자만 식용이 가능하다. 국내에서 주로 열매, 잎, 종자를 주로 섭취하고 있지만 줄기는 식품으로 이용되지 않고 있다. 호박잎

*Corresponding author. E-mail : u9897854@jnu.ac.kr

Phone : 82-62-530-2142, Fax : 82-62-530-2149

Received 10 November 2017; Revised 4 December 2017;

Accepted 18 December 2017.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

추출물은 *in vitro* 실험에서 항산화 및 항암효과가 보고되었고(4), 호박의 과육부위의 탄수화물로는 포도당, 과당, 설탕 등이 주를 이루며, 세린과 아스파르트산 등의 아미노산 함량이 높아 위장이 약한 사람이나 회복기의 환자, 부종의 완화(5). 늙은 호박 추출물의 지방세포에 대한 항비만 효과 등이 보고되고 있다(6). 또한, 염증억제 효능을 보인 소재로서 출산 후 산후 조리나 미용의 목적으로 호박은 많이 섭취되어 왔다(7). 호박 줄기의 일부인 호박 덩굴손의 효능이 알려지며 상품화 되어 인기를 끌고 있으나 이에 대한 연구는 미비한 실정이다. 지금까지 다양한 호박부위에 관한 연구가 존재하지만(4-9), 호박 덩굴손에 존재하는 유효성분과 염증억제 활성은 보고되지 않았다. 또한, 경제성을 고려하더라도 호박덩굴손은 원예농가에서 사용하지 않고 버리고 있어 농업부산물로서 이를 활용하여 염증억제 효능을 지닌 소재를 발굴한다면 부가가치를 높이는 수단이 될 것이다. 이는 농가에서 버려지는 호박 덩굴손의 부가가치의 향상을 통해 농가의 2차 소득원 증대로 농가에 활력을 불어 넣어 줄 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 호박 덩굴손 열수추출물 및 활성성분들을 분획·분리하여 염증억제 효능실험을 통하여 염증 억제 효과에 대하여 검증하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 시료는 광주광역시 근교의 농가에서 시설 재배한 애호박(Young of *Cucurbita moschata* Duch.)과 추키니(*Cucurbita pepo* L.)의 덩굴손, 잎, 줄기, 열매, 꼭지 등을 시료로 사용하였고, 전라남도 순천시 농가에서 노지 재배한 늙은 호박(Old of *Cucurbita moschata* Duch.)의 덩굴손, 잎, 줄기, 열매, 꼭지의 시료를 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 모든 시약 및 용매는 HPLC등급을 사용하였다.

호박 덩굴손 추출 및 분획

열수추출물은 호박 덩굴손 시료 200 g에 증류수 1,000 mL을 가하고 90°C에서 4시간동안 가열한 다음 원심분리하여 상등액을 여과 및 감압농축(EYELA, Tokyo, Japan) 후 -20°C, 48시간 냉동고에서 보관한 후 동결 건조(TFD8503 Ilshin Lab Co., Ltd., Siheung, Korea)한 시료를 사용하였다. 동결 건조된 호박덩굴손 열수 추출물은 3.5 g에 물 15 mL를 가하여 Diaion HP-20 레진에 충전된 컬럼(2.5 cm×20 cm, 50 mL)을 이용하여 물과 에탄올로 순차적으로 용매분획하였다. 각 획분을 진공농축기(EYELA)를 사용하여 35°C에서 감압농축하여 물 획분과 에탄올 획분으로 용매 분획하였다(Fig. 1). 이중 에탄올층 획분을 이용하여 ODS column chromatography(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)과 Sephadex

LH-20 column chromatography(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 이용하여 유효성분을 순수 분리하였다. 각 획분의 정성분석을 위해 thin-layer chromatography(TLC, silica gel 60 F₂₅₄, 0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting 하고, chloroform/ethyl acetate/acetic acid/H₂O /methanol=10:10:2:3:10 (v/v/v/v/v)를 전개용매로 하여 전개하여 분석하였고, 정량분석은 high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 다음과 같은 분석조건에서 실시하였다. ODS column(4.6×250 mm, ZOBRA 30 ODS-C₁₈, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고, 분석과장은 254 nm를 이용하였고, 이동상으로는 acetonitrile의 농도구배(10, 20, 30, 60, 80, 100%-v/v)를 달리 하여 분석하였다. 유효성분인 rutin의 정량분석을 위해 표준품인 rutin(Extrasynthese, Genay, France)의 농도(0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/mL)를 달리하여 얻어진 피크 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 표준물질과 B4획분의 머무름 시간(retention time, RT)은 동일한 10.95분으로 조사되었다. 표준품인 rutin(10 mg/mL)과 B4획분(16.6 mg/mL)을 DMSO-d₆에 용해시킨 후, ¹H(500 MHz)와 ¹³C(125 MHz) NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum을 분석하여 분자구조를 확인하였다.

세포배양

8 주령에서 12 주령 사이의 C57BL/6 수컷 생쥐의 대퇴골(femur)과 NNN(tibia)에서 골수를 분리하였다. 30% L-sup, 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin streptomycin (PS), non-essential amino acid(NEAA) 및 sodium pyruvate가 첨가된 Iscov's modified Dulbecco's medium(IMDM)배지에 배양하였다. L-sup은 macrophage stimulating factor (M-CSF)가 포함되어 있으며, mouse fibroblast cell line 인 L929 세포를 키운 배지(10% FBS와 1% PS가 첨가된 IMDM 배지) 상층액을 사용하였다. 150 mm petri-dish에서 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 6일간 배양하였으며, 배양 3일째에 배지를 첨가하였다. 배양 6일째 48-well plate에 2×10⁵ cells/well의 밀도로 24시간 배양하였다.

세포독성

세포에 대한 호박덩굴손 열수 추출물의 세포 독성평가를 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay를 시행하였다. Bone Marrow-Derived Macrophages(BMDMs)을 48-well plate에 2×10⁵ cells/well의 밀도로 분주하여 호박덩굴손 추출물 및 lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/mL)를 24시간 처리하였고, 상층액을 제거한 plate에 노란색의 4 mg/mL MTT solution(tetrazolium)을 배지에 10 배 희석하여 200 μL/well에 넣고 37°C 및 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 빛을 차단해주었다(10). 보라색을 띠는 비수용성의 formazan이 형성되면 MTT solution

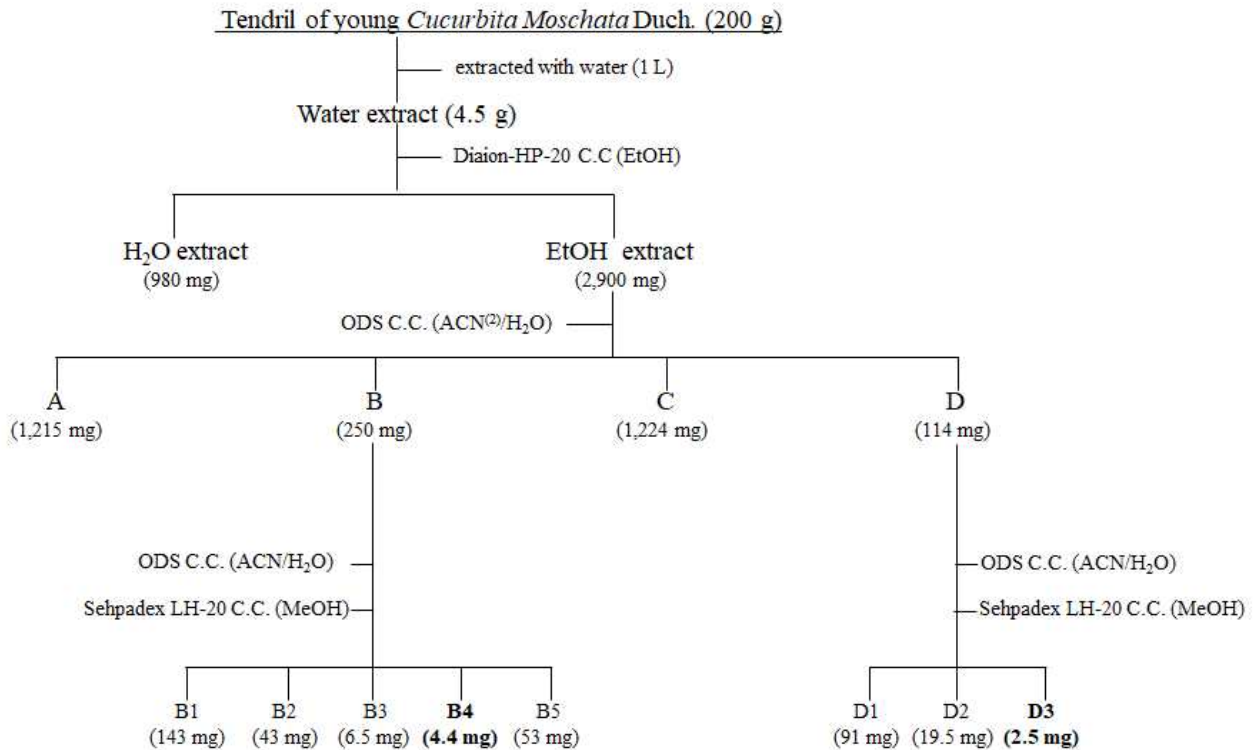


Fig. 1. Flow chart for sequential fractionation of water extract from tendrils of *Cucurbita moschata* Duch..

C.C means column chromatography; ACN means acetonitrile.

을 제거한 후, dimethyl sulfoxide를 200 µL/well을 넣어서 용해시켰다. Microplate reader를 사용해서 570 nm로 측정하며, control의 상대적인 정량값을 그래프화하였다.

호박덩굴손 추출물 및 분획물의 염증 억제효과

호박덩굴손 열수 추출물 및 정제과정에서 얻어진 분획물을 각각 2시간 동안 전처리하였다. 염증반응을 유발시키기 위해서 LPS를 100 ng/mL 농도로 처리해주었다(11). 24시간 후 상층액을 제거하여 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)를 통해 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α를 측정하였다. BMDMs을 48-well plate에 2×10⁵/well의 밀도로 분주하여 24시간 배양하였다. 추출물을 처리한 후 세포에서 분비된 사이토카인을 측정하기 위해 상층액은 -80℃에 보관하였다. 384-well plate에 capture antibody를 분주한 후, 코팅시키기 위해 상온에서 24시간 방치시켰다. Reagent diluent로 1시간 blocking시켰다. 세포 상층액을 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후 detection antibody를 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후 Streptavidin-HRP를 넣고 20분 동안 반응시켰으며 이 단계부터 빛을 차단해주었다. 세척 후 substrate solution을 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. Stop solution(2 N H₂SO₄)을 첨가한 후 microplate reader를 사용해서 450 nm로 측정하였으며, control의 상대적 정량값으로 그래프화하였다(12).

호박 종류별 부위별 추출물의 유효성분 함량 조사

염증 억제 유효성분이 호박의 종류별, 부위별에 얼마나 함유되어 있는지 확인하기 위하여 동일한 열수 추출조건을 이용하여 애호박, 늙은 호박, 쭈키니 호박을 사용하였고 부위로는 각 호박 종류별 덩굴손, 열매, 꼭지, 잎을 사용하였고, 각 호박 종류별 부위별 추출물의 정량분석에는 호박 덩굴손 추출 및 분획시 사용된 분석조건을 이용하였다.

통계분석

실험결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 20.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군간 평균의 차이별 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후, Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검증 하였으며 p<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

호박덩굴손 열수 추출물 준비 및 세포 독성 평가

국내에서 재배되는 애호박덩굴손 200 g을 90℃에서 4시

간 동안 열수추출, 여과, 감압농축 및 동결 건조하여 최종적으로 3.5 g의 열수 추출물을 획득하였다. MTT assay를 통해 열수 추출물(0.313 mg/mL-2.5 mg/mL)의 세포 독성 평가를 실시한 결과 모든 농도에서 독성이 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 2C).

A

B

C

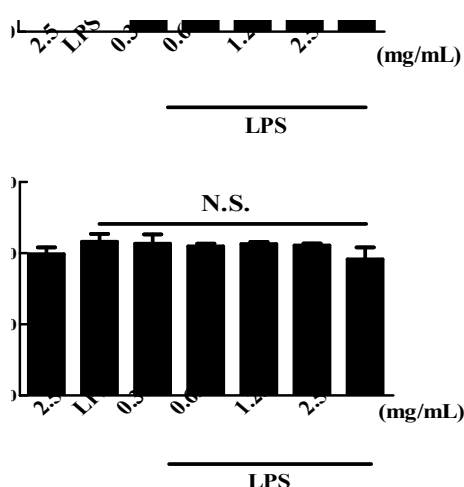


Fig. 2. Inflammatory cytokines [IL-6 (A) and TNF- α (B)] and cell viability (C) depend on the water extract from tendrils of *Cucurbita moschata* Duch..

호박덩굴손 열수 추출물에 대한 항염 효과

호박덩굴손 열수 추출물에 대한 항염 효과를 실험하기 위해 LPS에 의한 염증반응 유발 시 염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 발현이 증가한다고 알려져 있어서 positive

control로 설정하였다. 호박덩굴손 열수 추출물의 항염효과를 확인하기 위해서 호박덩굴손 열수 추출물을 2시간 전처리하고 LPS를 처리하였고, 세포에서 분비된 염증성 사이토카인을 측정하였다. 염증성 사이토카인을 측정할 결과 LPS 단독 처리군과 비교했을 때 1.25 mg/mL 또는 2.5 mg/mL 열수 추출물에서 IL-6와 TNF- α 의 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A and B). 호박덩굴손 열수 추출물에 의한 염증성 사이토카인 발현 억제를 확인하였다. 특히 호박덩굴손 열수 추출물의 IL-6 감소 효과가 더 확연히 드러났다(Fig. 2A). 따라서 추후 연구는 호박덩굴손 열수 추출물로부터 활성 분획을 분리하여 실험을 진행하였다.

호박덩굴손 열수 추출물 유래 항염증 유효성분 단리 및 구조분석

호박덩굴손 열수 추출을 수행한 후 동결 건조한 호박덩굴손 열수추출물 4.5 g을 물 15 mL에 녹여 Diaion HP-20 레진에 충전된 컬럼을 이용하여 물과 에탄올로 순차적으로 용매분획을 실시하여 최종적으로 물 희분 980 mg과 에탄올 희분 2,900 mg의 용매 분획물을 얻었다(Fig. 1). 이중 에탄올 층에서 얻어진 희분을 ODS 컬럼 크로마토그래피(Nacalai Tesque)에 로딩하여 acetonitrile 농도구배(0, 20, 40, 60%-v/v)를 이용하여 4개의 희분(A-1,215 mg, B-250 mg, C-1,224 mg, D-114 mg)을 얻을 수 있었다. 얻어진 4개의 희분에 대해 염증억제효과를 분석한 결과 B와 D 희분이 효과적인 억제활성을 보였다. 활성을 보인 B희분과 D희분으로 부터 항염활성을 보이는 유효성분으로부터 Sephadex LH-20과 ODS 컬럼 크로마토그래피를 통해 5개의 희분(B1-143 mg, B2-43 mg, B3-6.5 mg, B4-4.4 mg, B5-53 mg)을 얻을 수 있었으며, D희분으로 부터는 3개의 희분(D1-91 mg, D2-19.5 mg, D3-2.5 mg)을 얻을 수 있었다. 동일한 방법으로 각각의 얻어진 희분에 대한 염증억제효과를 분석한 결과 B4희분과 D3희분에서 효능이 확인되었다. 구체적으로 호박덩굴손 유래 열수 추출물의 유효성분의 항염 활성을 확인하기 위해 0.1 mg/mL-1.0 mg/mL의 농도의 B4와 D3을 2시간 전처리하고 LPS를 반응시킨 후 염증성 사이토카인을 측정하였다. LPS 단독 처리군과 비교했을 때 IL-6은 1 mg/mL에서 억제됨을 확인하였다(Fig. 3와 Fig. 4). 특히 B4 및 D3희분에서 높은 IL-6생성 억제능을 보였고 동일한 방법으로 TNF- α 를 측정할 결과 IL-6과 마찬가지로 대부분의 활성물질의 1 mg/mL 농도에서 억제됨을 확인할 수 있었고 D3와 B4희분이 IL-6 및 TNF- α 억제능을 보여 항염증 활성의 주요성분임을 알 수 있었다. B4와 D3희분의 구조해석을 통한 유효성분의 검증을 위해 ^1H 또는 ^{13}C -NMR(Nuclear Magnetic Resonance)을 시도하였으나 D3의 구조해석에는 도달하지 못하였다. 염증억제 활성이 강한 B4성분은 표준품인 rutin과 동일한 머무름 시간(10.95분)을 보였고, ^1H -과

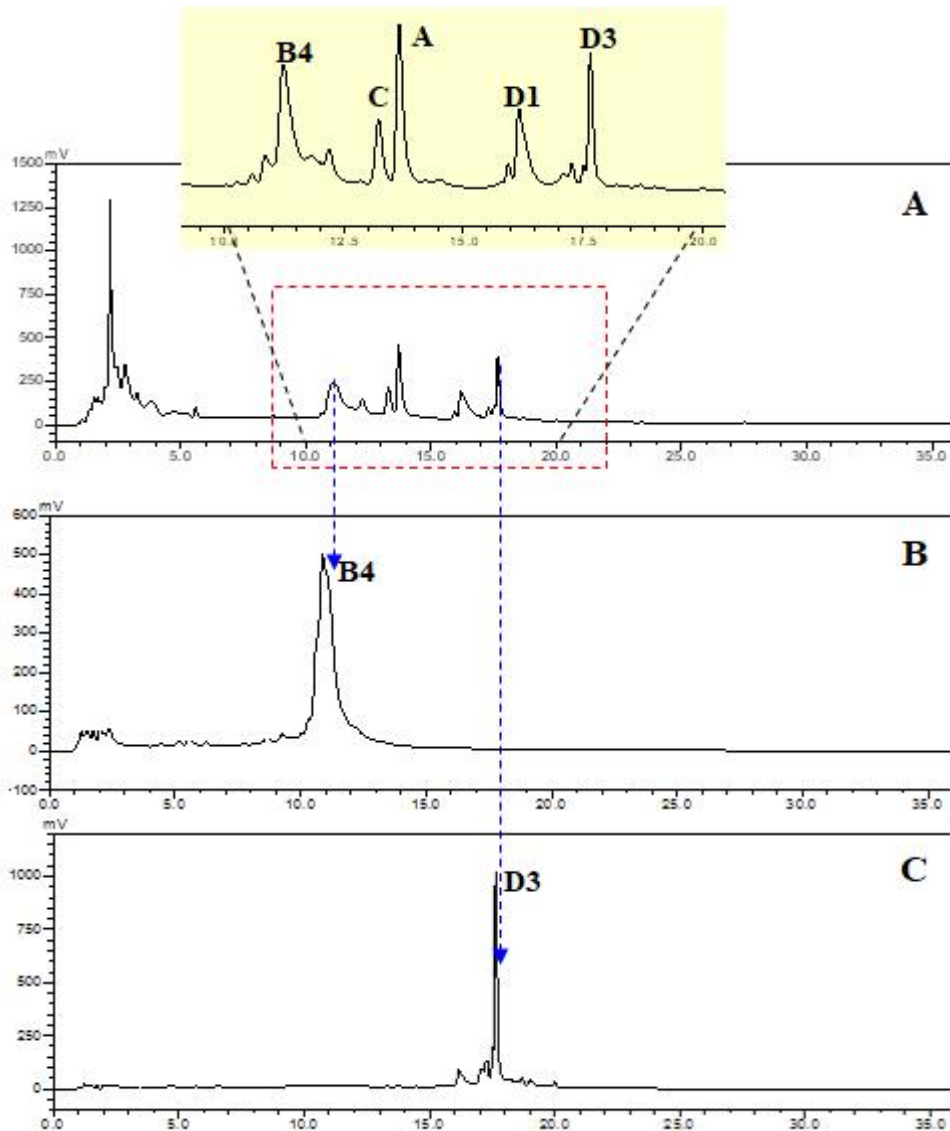


Fig. 3. Active guided fractionation of anti-inflammatory activity from water extract from tendrils of *Cucurbita moschata* Duch..

A, water extracts from tendrils of young *Cucurbita moschata* Duch.; B, isolated active component (B4) from B fraction; C, isolated active component (D3) from D fraction.

^{13}C -NMR spectrum의 비교를 통해 rutin(querceetin-3-O-rutinoside)과 동일 구조임을 확인하였다.

Rutin(B4획분): ^1H NMR(chemical shift δ in ppm, coupling constant J in Hz) 12.62(1H, s, C5-OH), 10.86(1H, s, C7-OH), 9.71(1H, s, C4'-OH), 9.21(1H, s, C3'-OH), 7.56(1H, dd, J=9, 2.1, C6'-H), 7.55(1H, d, J=2.1, C2'-H), 6.86(1H, d, J=9, C5'-H), 6.40(1H, d, J=2, C8-H), 6.21(1H, d, J=2.0), 5.35(1H, d, J=7.4, H1-G), 5.12(1H, d, J=1.9, H1-R), 1.00(3H, d, J=6.1, CH3-R); ^{13}C NMR(chemical shift δ in ppm) 178.2, 164.9, 162.1, 157.5, 157.3, 149.3, 145.6, 134.1, 122.5, 122.0, 117.1, 116.1, 104.8, 102.2, 101.6, 99.5, 94.5, 77.3, 76.7, 74.9, 72.7, 71.4, 71.2, 70.8, 69.1, 67.9, 18.6[R과 G는 각각 람노스와 포도당으로 표시한다].

기존의 다른 식물유래 rutin에 관한 연구에서 항염증에 관한 연구보고들과 유사하게 호박 덩굴손유래에서 단리·정제된 rutin도 염증억제 활성을 보였다(13-15). 호박덩굴손으로부터 얻어진 유효성분인 rutin은 본 연구를 통해 처음으로 단리·정제 및 염증 억제능을 확인할 수 있었고, rutin의 기본 어글리콘인 quercetin의 유도체에 대한 연구도 함께 진행된다면 보다 강력한 염증억제소재 개발이 가능하리라 사료된다.

호박 종류별 부위별 추출물의 유효성분 함량 조사

각 호박 종류별 유효성분을 포함하는지 여부를 확인하기 위해 애호박, 추키니 호박, 늙은 호박의 덩굴손, 열매, 꼭지 또는 잎의 성분을 조사하기 위해 추출물에 포함된 성분을

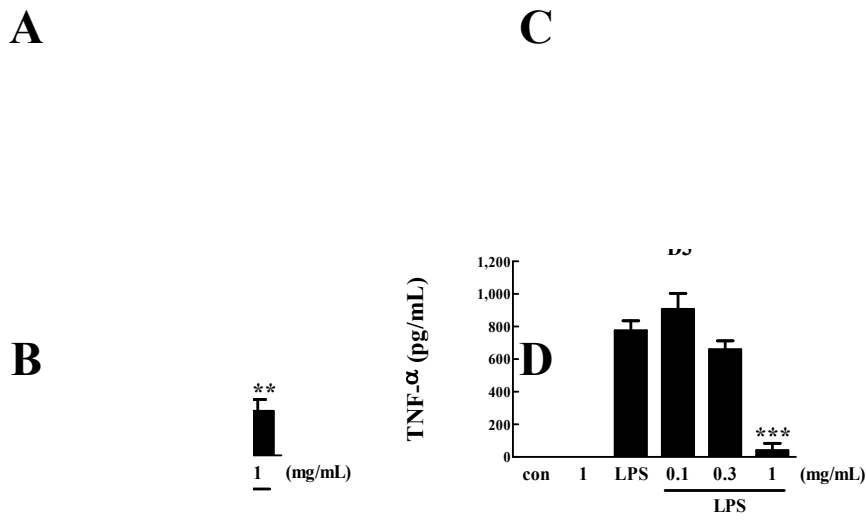


Fig. 4. Inflammatory cytokines [IL-6 (A or C) and TNF- α (B or D)] depend on the isolated fraction (B4 and D3) from water extract from tendril of *Cucurbita moschata* Duch..

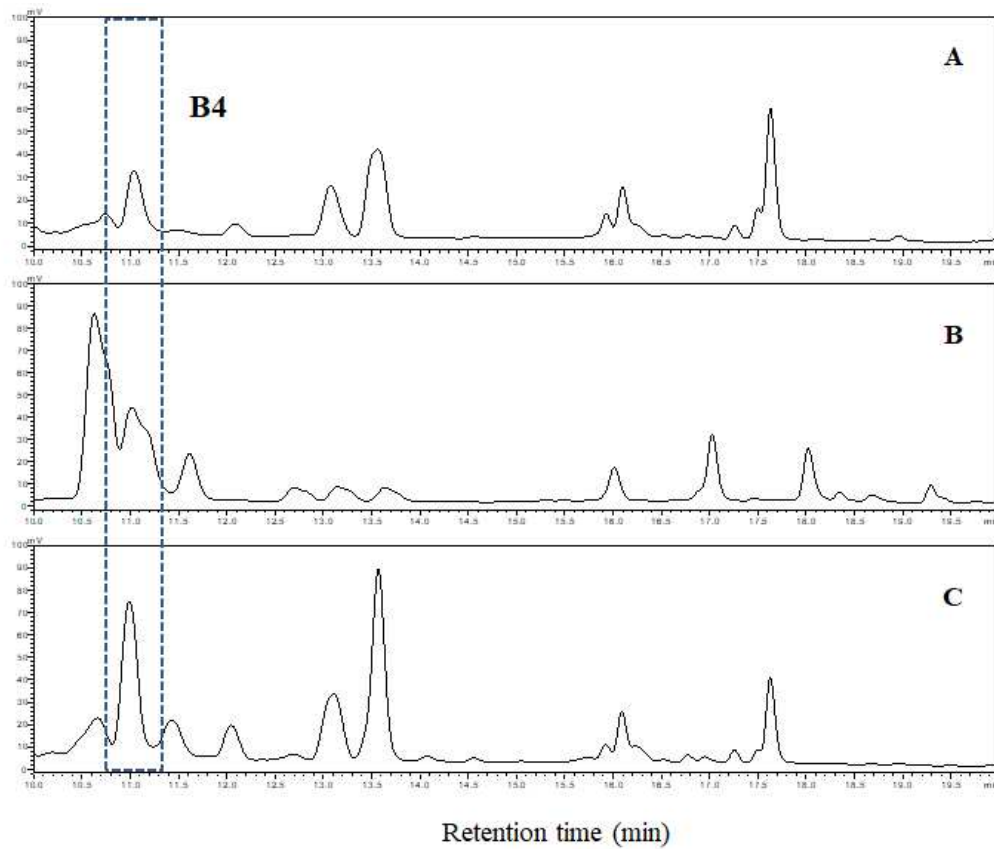


Fig. 5. HPLC analysis for B4 or D3 component from tendril of various pumpkins.

A, tendril of young *Cucurbita moschata* Duch.; B, tendril of old *Cucurbita moschata* Duch.; C, tendril of *Cucurbita pepo* var. *cylindrica*.

HPLC를 통해 조사하였다(Fig. 5). 호박부위별로 조사한 결과, 유효성분인 B4는 호박 열매, 꼭지, 잎에 비해 호박 덩굴손 부위에서 확인되었다. 호박종류별 덩굴손 시료 분석결과, B4는 애호박, 늙은 호박 및 추키니 호박에서 원물대비 0.02, 0.035 및 0.04% 함유하였고, 동아에서는 검출되지 않았다(Fig. 5). 특히, 추키니 호박에서 B4의 유효성분을 더 많이 함유하였고, 동아의 경우 B4의 성분을 포함하지 않아 항염증 소재로는 적합하지 않았다. 최종적으로, 항염증활성의 유효성분인 B4인 rutin은 호박부위 중 덩굴손에 현저하게 많이 포함되었고, 염증억제를 위한 식·의약소재로 대량추출 정제를 위해서는 애호박, 늙은 호박, 또는 추키니 호박이 적합하리라 사료되었다.

요 약

애호박의 부위 중 덩굴손 유래의 열수 추출물에 대한 세포 독성 및 염증제어활성 대하여 조사하였다. 애호박 덩굴손의 열수에 대한 세포의 독성에 미치는 영향을 조사한 결과 0.313-2.5 mg/mL의 농도일 때 물 추출물은 세포의 생장에 영향을 미치지 않아 세포에 대한 독성이 없다고 판단되었다. BMDMs를 배양한 세포에 호박덩굴손 열수 추출물과 LPS와 함께 처리한 결과 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF- α 의 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 호박 덩굴손 열수 추출물로부터 단리·정제된 rutin에 의한 염증성 사이토카인의 분비가 억제되었다. 국내에서 재배되고 있는 호박의 부위별로 조사해본 결과 호박부위 중 유일하게 덩굴손부분에서 염증억제 활성을 보였다. 추키니 호박, 애호박 및 늙은 호박의 덩굴손에서 유효성분인 rutin을 함유하고 있었고 향후 염증 억제 소재로서의 활용가능성을 시사하였다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2016년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0396019)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Doosan-Donga Co Ltd (1996) Doosan world encyclopedia. Doosan-Donga Co Ltd, 28, p 235-236
2. Kang HY, Park SH, Shin UP, Yeo IH, Yoo KB, Jung YK (1978) Vegetable crop science. Hakmun Publishing Inc. Seoul, Korea, p 201
3. Lee YK, Yoon BH, Koo KH (2013) Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures in South Korea. *Endocrinol Metab*, 28, 90-93
4. Kwak YE, Ju JY (2013) Antioxidant and anti-cancer activities of squash (*Cucurbita moschata* Duch.) leaf extract *in vitro*. *Korean J Food Sci Technol*, 45, 770-776
5. Park JR, Park JC, Choi SH (1997) Screening and characterization of anticholesterogenic substances from edible plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutri*, 26, 236-241
6. Do GP, Lee HJ, Do JR, Kim HK (2012) Antiobesity effect of the *Cucurbita moschata* Duch extracts in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Food Preserv*, 19, 138-143
7. Lim JP, Choi H (2001) Effects of the water extract from *Cucurbita maxima* Duchesne on inflammation and hyperlipidemia in rats. *Korean J Medicinal Corp Sci*, 9, 280-283
8. Park YK, Cha HS, Park MW, Kang YH, Seog HM (1997) Chemical components in different parts of pumpkin. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 639-646
9. Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2010) Pysiological activities of *Cucurbita moschata* Duch. extracts with different extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39, 165-171
10. Zhang G, Ghosh S (2000) Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, 6, 453-457
11. Fujiwara N, Kobayashi K (2005) Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets: Inflammation Allergy*, 4, 218-286
12. Ko WM, Lee DS, Jang M, Kim KS, Lee HS, Baek HY, Oh H, Kim YC (2013) A comparison of anti-inflammatory effects of *Sophorae Flos* EtOH extracts at the different flowering stages on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells. *Kor J Pharmacogn*, 44, 291-297
13. Lee YJ, Jeune KH (2013) The effect of rutin on antioxidant and anti-inflammation in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Applied Microscopy*, 43, 54-64
14. Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C (2003) Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol*, 54, 313-318
15. Guardia, T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoides. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *IL Farmaco*, 56, 683-687