

مطالعه اثر عصاره آبی *Origanum vulgare* و *Melilotus officinalis* بر میزان نایتريك اكساید [NO] تولید شده توسط سلول‌های اندوتلیوم عروقی کشت شده (mouse endothelioma F-2 cell line)

احمد شریف تبریزی (M.D.)***

محمد انصاری (Ph.D.)**

عبدالکریم مهروز (M.Sc.)*

چکیده

سابقه و هدف: طی سال‌های اخیر، نایتريك اكساید (NO) به عنوان مولکول دخیل در شروع سردردهای میگرنی مطرح شده است. این رادیکال آزاد از طریق مسیر پیام‌رسانی NO/cGMP و انبساط عروق مغز به ویژه سرخرگ‌های بزرگ درون جمجمه، در بروز سردردهای میگرنی دخالت می‌کند. در این تحقیق، تأثیر عصاره آبی دو گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare*) و اکلیل‌الملک (*Melilotus officinalis*) که در طب سنتی و طب جدید اثر درمانی و تسکینی آنها بر میگرن مورد تأکید قرار گرفته، بر میزان NO تولید شده توسط سلول‌های اندوتلیوم عروقی کشت شده، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۲۵ گرم پودر از قسمت مورد استفاده هر گیاه با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. بعد از تصفیه و خشک کردن، عصاره نهایی به دست آمد. سلول‌های mouse endothelioma F-2 cell line در محیط DMEM (محیط تغییر یافته Eagle) محتوی ۱۰ درصد FCS و ۱-۲ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین تکثیر یافتند. غلظت نایتريت به عنوان شاخصی از تولید نایتريك اكساید با روش گریس و با دستگاه ELISA در ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: غلظت‌های (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) $\mu\text{g/ml}$ از عصاره مرزنجوش به ترتیب، ۳۳/۹ درصد ($p < 0.001$)، ۲۵/۸ درصد ($p < 0.01$) و ۱۳/۱ درصد ($p < 0.05$) میزان NO را نسبت به گروه شاهد کاهش داد. برخلاف انتظار ما، عصاره‌های گیاه اکلیل‌الملک به جای کاهش میزان NO، مقدار آن را به طور چشمگیری افزایش داد. غلظت‌های (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰) $\mu\text{g/ml}$ از عصاره این گیاه به ترتیب ۷۲/۹ درصد ($p < 0.001$)، ۳۶/۵ درصد ($p < 0.001$) و ۱۲/۷ درصد ($p < 0.05$) میزان NO را افزایش داد.

استنتاج: با توجه به نتایج به دست آمده و نظریه نایتريك اكسایدی میگرن شاید بتوان گفت، عصاره آبی مرزنجوش اثر خود را احتمالاً از طریق کاهش میزان NO انجام می‌دهد و عصاره آبی اکلیل‌الملک اثر خود را با مکانیسم دیگری اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نایتريك اكساید (NO)، *Origanum vulgare*، *Melilotus officinalis*، میگرن، سلول‌های اندوتلیوم

* دانشجوی Ph.D. گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی تبریز + تبریز: خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی

E-mail: kmahrooz@yahoo.com

** استادیار گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی تهران

*** پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی تهران

تاریخ دریافت: ۸۴/۷/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۴/۸/۸ تاریخ تصویب: ۸۵/۴/۱۴

مقدمه

NO (nitric oxide) رادیکال آزادی است (۱) که در بسیاری از اعمال حیاتی بدن نظیر فرایندهای التهابی، تنظیم سیستم قلبی-عروقی، به عنوان پیام رسان عصبی شرکت دارد (۲،۳). در سال‌های اخیر، NO به عنوان یکی از عوامل دخیل در سردردهای میگرنی نیز مطرح شده است (۸-۳). مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی سردردهای میگرنی و مولکولی که در ایجاد آنها دخالت دارد به طور دقیق شناخته نشده است. برخی مطالعات نشان دادند موادی نظیر GTN (glyceryl trinitrate) که در آزمایشگاه به طور تجربی سردرد ایجاد می‌کنند، از طریق NO سبب بروز سردرد می‌شوند (۶،۸). برخی از مطالعات نشان داده که در افراد مبتلا به میگرن، دهنده‌های NO نظیر GTN سبب القا حملات میگرنی می‌شود (۶).

NO از مسیر پیام رسانی NO/cyclic guanosine (NO/cGMP) در بروز میگرن دخالت می‌کند؛ به این صورت که NO تولید شده در سلول‌های اندوتلیوم عروق به سلول‌های ماهیچه صاف مجاور خود منتشر شده و در آنجا با تحریک تولید cGMP باعث فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز وابسته به cGMP می‌شود. این پروتئین کیناز نیز با فسفریله کردن ملکول‌های هدف خود در نهایت سبب کاهش کلسیم در سارکوپلاسم ماهیچه‌های صاف جدار عروق شده و در نتیجه باعث انبساط این عضلات می‌شود. به این ترتیب، NO با انبساط عروق مغزی به‌ویژه سرخرگ‌های بزرگ درون جمجمه در ایجاد میگرن دخالت می‌کند (۶،۹).

مرزنجوش (*Origanum vulgare*) گیاهی است پایا از خانواده لامیاسی (Lamiaceae) که برگ و سرشاخه های گلدار آن مصارف درمانی دارند. محل رویش این گیاه در ایران، نواحی شمالی، آذربایجان، بلوچستان،

خراسان و اطراف تهران است. از مواد مؤثره مرزنجوش می‌توان به کارواکرول، گاما-ترپینن، میرسن، تیمولول و لینالول اشاره کرد (۱۰). اکلیل الملک (*Melilotus officinalis*) گیاهی است علفی از تیره فاباسی (Fabaceae) که در نواحی مختلف شمال ایران مانند لاهیجان و آستارا می‌روید. کومارین، دی‌هیدرو کومارین و ملیوتول از مواد مؤثره این گیاه هستند (۱۱). این دو گیاه از جمله گیاهانی هستند که در کتاب‌های طبی قدیمی نظیر قانون در طب (ابوعلی سینا) و الحاوی (زکریای رازی) و کتاب‌های جدید مانند گیاهان دارویی (علی زرگری) اثر آنها در درمان و تسکین سردرد و میگرن مورد تأکید قرار گرفته است (۱۵-۱۰). در تحقیق حاضر، تأثیر عصاره آبی این دو گیاه بر میزان NO تولید شده توسط سلول‌های اندوتلیوم عروقی کشت شده، مورد مطالعه قرار گرفت. برطبق نظریه نایتريك اكسایدی میگرن و دخالت سلول‌های اندوتلیوم در این نظریه، بایستی رده سلولی مربوط به این سلول‌ها انتخاب می‌شد. mouse endothelioma F-2 cell line سلول‌هایی بودند که در دسترس بودند و قابلیت تکثیر بالایی نیز داشتند؛ لذا این سلول‌ها انتخاب شدند.

باتوجه به نقش NO در بروز سردردهای میگرنی، این مطالعه می‌تواند مکانیسم احتمالی دخالت این گیاهان در درمان یا کاهش سردردهای میگرنی را توجیه کند.

مواد و روش‌ها

گیاهان

سرشاخه‌های گلدار مرزنجوش (*Origanum vulgare*) و دانه اکلیل الملک (*Melilotus officinalis*) از بازار گیاهان دارویی تهران تهیه شد و به تأیید هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران رسید.

روش عصاره‌گیری:

سرشاخه‌های گلدار مرزنجوش و دانه اکلیل‌الملک با آسیاب برقی کوچک به صورت پودر در آمدند. ۲۵ گرم از پودر هر گیاه با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت برگردانده (Reflux) و سپس با قیف بوخنر و کاغذ صافی صاف گردید. محلول صاف شده، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تبخیر شد و عصاره خشک به دست آمد. غلظت‌های ($\mu\text{g/ml}$) ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ از عصاره آبی هر گیاه با حل کردن عصاره خشک در (phosphate-buffered PBS) (saline) تهیه شد (۱۶).

تعیین مسمومیت سلولی سلول‌ها

برای تعیین زنده بودن سلول‌ها از آزمون MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol 2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] استفاده شد که اساس آن احیای وابسته به تنفس میتوکندریایی ماده MTT است (۱۶). با انجام این آزمون، حداکثر غلظتی که مسمومیت سلولی ایجاد نمی‌کرد، مشخص شد ($400 \mu\text{g/ml}$). چند غلظت ($200 \mu\text{g/ml}$ ، $100 \mu\text{g/ml}$ ، $50 \mu\text{g/ml}$) پایین‌تر از غلظت حداکثر نیز مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ پایین‌ترین غلظتی بود که بر میزان NO تأثیر داشت (اگرچه تأثیرش معنی‌دار نبود).

سلول‌های اندوتلیوم

در این تحقیق از mouse endothelioma F-2 cell line (از بانک سلولی ژاپن) استفاده شد. در دسترس بودن، قابلیت تکثیر بالا و داشتن شناخت کافی از شرایط رشد و تکثیر آنها از عوامل موثر در انتخاب این رده سلولی بود. این سلول‌ها در فلاسک‌های کشت ۲۵ سانتیمتر مربع در محیط DMEM (dubecco medium) (سیگما) محتوی ۱۰ درصد FCS (modified eagle) (سیگما) و ۲-۱ درصد پنی‌سیلین- (Roche) (fetal calf serum) و در شرایط ۵% CO₂ تکثیر یافتند. سلول‌ها در حالت subconfluent با استفاده از تریپسین (سیگما) با غلظت ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا شدند. سلول‌های جدا شده از کف فلاسک، در محیط کشت غوطه‌ور گردیده و سپس سانتریفوژ (200g ، ۵ دقیقه) شدند. بعد از سانتریفوژ، رسوب سلولی در محیط کشت جدید غوطه‌ور گردید. سپس سلول‌ها به فلاسک‌های جدید یا جهت انجام آزمایش، به ظرف منتقل شدند (۱۶، ۱۷).

اندازه‌گیری نایتريت

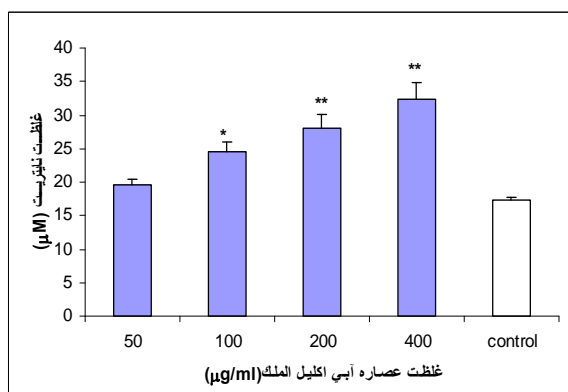
غلظت نایتريت به عنوان شاخصی از تولید نایتريتک اکساید با روش گریس (Griess) اندازه‌گیری می‌شود (۱۶، ۱۷). در این روش، معرف گریس [سولفانیل آمید و N- (۱- نفتیل) اتیلن دی آمین] برای سنجش غلظت نایتريت به نمونه اضافه می‌شود؛ به عنوان استاندارد نیز از نایتريت سدیم استفاده می‌گردد. $1 \mu\text{g}$ ۱۰۰ سوپرناتانت محیط کشت با $1 \mu\text{g}$ ۱۰۰ معرف گریس حاوی ۲ درصد سولفانیل آمید در اسید کلریدریک ۵ درصد و ۰/۱ درصد N- (۱- نفتیل) اتیلن دی آمین مخلوط گردید. سپس جذب نوری با دستگاه ELISA در 540 nm قرائت شد (۱۶، ۱۷). هرچه غلظت نایتريت در نمونه بیش‌تر باشد، میزان جذب در این طول موج بیش‌تر خواهد بود. به این ترتیب می‌توان با روش گریس کاهش یا افزایش نایتريتک اکساید را در نمونه‌ها با شاهد مقایسه کرد.

تحلیل آماری

برای تحلیل آماری بین گروه‌های شاهد و مورد از student's t-test استفاده شد (۱۸). p values در اشکال ۱ و ۲ بیان شده‌اند.

یافته ها

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های (۴۰۰ و ۲۰۰) $\mu\text{g/ml}$ از عصاره این گیاه ارتباط معنی‌دار خوبی را با کنترل نشان دادند ($P < 0.001$). برای غلظت (۵۰) $\mu\text{g/ml}$ ارتباط معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد (نمودار شماره ۲).



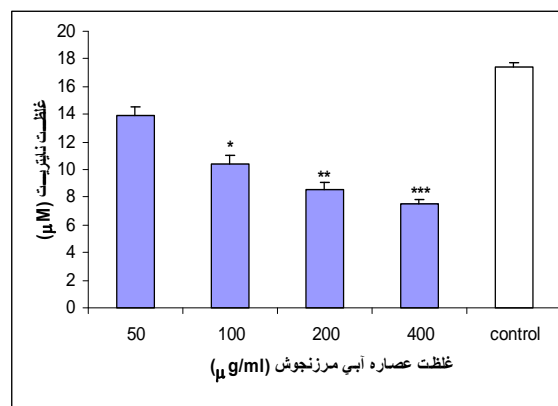
نمودار شماره ۲: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی اکلیل الملک (*Melilotus officinalis*) بر افزایش غلظت نایتریت (μM) در کشت سلول‌های اندوتلیوم. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) نمایش داده شده‌اند، ($n=3$).
 $P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ** اختلاف نسبت به گروه شاهد را نشان می‌دهند.

بحث

تاکنون مطالعات زیادی روی گیاهان دارویی و اثر آنها در بیماری‌های مختلف انجام گرفته است. بسیاری از این گیاهان از زمان‌های قدیم مورد استفاده انسان بوده‌اند و اکثر آنها در طب امروزی نیز کاربرد دارند. مرزنجوش و اکلیل الملک از جمله گیاهان دارویی هستند که هم در طب سنتی و هم در طب جدید کاربردهای زیادی دارند. یکی از کاربردهای این گیاهان که هم در منابع قدیمی و هم منابع جدید ذکر شده، سردردهای میگرنی است (۱۵-۱۰).

بر اساس نظریه نایتریک اکسایدی میگرن، نایتریک اکساید تولید شده در سلول‌های اندوتلیوم عروق مغز به

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های (۴۰۰) $\mu\text{g/ml}$ و ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ از عصاره آبی گیاهان مورد مطالعه به این شرح می‌باشد: غلظت ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره مرزنجوش برای کاهش میزان NO ارتباط معنی‌داری را با شاهد نشان نداد. اثر غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در کاهش میزان NO معنی‌دار بود ($p < 0.05$). غلظت ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره این گیاه ارتباط معنی‌دار خوبی نسبتاً به شاهد داشت ($p < 0.01$). برای این گیاه بهترین اثر در کاهش NO مربوط به غلظت ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. برای این غلظت، $p < 0.001$ به دست آمد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بر کاهش غلظت نایتریت (μM) در کشت سلول‌های اندوتلیوم. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) نمایش داده شده‌اند، ($n=3$).
 $P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ** و $P < 0.001$ *** اختلاف نسبت به گروه شاهد را نشان می‌دهند.

بر اساس فرضیه این تحقیق انتظار می‌رفت که گیاه اکلیل الملک نیز مانند مرزنجوش بتواند تولید NO در کشت سلول‌های اندوتلیوم را کاهش دهد. اما برخلاف انتظار، غلظت‌های مورد استفاده از این گیاه به جای کاهش NO، مقدار آن را افزایش داد. افزایش میزان NO توسط غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره اکلیل الملک نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). غلظت‌های

ویژه سرخرگ‌های بزرگ درون جمجمه می‌تواند به سلول‌های ماهیچه صاف مجاور خود منتشر شود. نایتريک اکساید در این سلول‌ها از طریق مسیر پیام رسانی NO/cGMP سبب انبساط عروق مغزی شده و می‌تواند در شروع سردردهای میگرنی نقش داشته باشد (۸-۳). لذا، بر طبق نظریه نایتريک اکسایدی میگرن، فرضیه این بود که این گیاهان اثر خود در درمان یا تسکین سردرد و میگرن را احتمالاً با کاهش میزان NO انجام می‌دهند. برای آزمایش این فرضیه، اثر گیاهان مورد مطالعه را بر تولید NO در سلول‌های اندوتلیوم کشت شده، بررسی شد.

برای یافتن مطالعاتی که ارتباط مرزنجوش و اکلیل الملک با NO را نشان دهند، جستجوهای وسیعی در پایگاه‌های اینترنتی مختلف و منابع دیگر انجام شد ولی نتیجه قابل ملاحظه‌ای حاصل نشد. به هر حال، در برخی مطالعات، اثر گیاهان دارویی مختلف در محیط کشت سلول‌های مختلف بر میزان NO مورد بررسی قرار گرفته است؛ مواردی از این مطالعات در ادامه ذکر می‌شود.

تزوکا^۱ و همکارانش (۲۰۰۱) در یک کار تحقیقاتی، عصاره‌های گیاهان دارویی چینی را بر کشت سلول‌های بیگانه خوار اثر دادند و تأثیر این عصاره‌ها را بر میزان NO مطالعه کردند. نتایج کار آنان نشان داد که برخی از عصاره‌های این گیاهان اثر مهارى بر تولید NO دارند و میزان NO را کاهش می‌دهند. گیاهان مورد مطالعه تزوکا و همکارانش برای بیماری‌های التهابی استفاده می‌شدند و نتایج تحقیق آنان نشان داد که این گیاهان اثر خود بر التهاب را از طریق کاهش میزان NO انجام می‌دهند (۱۶). کیم^۲ و همکارانش (۱۹۹۸) نیز مشابه همین تحقیق را روی چند گیاه دارویی ژاپنی انجام داده بودند. این محققان نیز اثر گیاهان مورد مطالعه خود را بر میزان NO در کشت

سلول‌های بیگانه خوار تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) مورد بررسی قرار دادند (۱۷). چونگ^۳ و همکارانش (۱۹۹۹) نیز در مطالعه‌ای اثر عصاره گیاه جینکگوبیلوبا (Ginkgo biloba) را بر میزان تولید NO در سلول‌های اندوتلیوم مورد بررسی قرار دادند. آنان نشان دادند که عصاره این گیاه میزان تولید NO در سلول‌های اندوتلیوم کشت شده را تا ۷۰ درصد نسبت به شاهد کاهش می‌دهد (۱۸). چند کار تحقیقاتی مشابه دیگر نیز در این زمینه به انجام رسیده است (۱۹، ۲۰).

در تحقیق حاضر، اثر عصاره‌های آبی مرزنجوش و اکلیل الملک بر میزان تولید نایتريک اکساید مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا غلظت ایجاد کننده مسمومیت سلولی عصاره‌ها با آزمون MTT تعیین شد. حداقل غلظتی که مسمومیت سلولی ایجاد نمی‌کرد و بیش‌ترین اثر را بر میزان NO داشت، غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ بود. عصاره آبی گیاه مرزنجوش اثر خوبی بر کاهش NO داشت. غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ از این گیاه میزان NO را ۳۳/۹ درصد کاهش داد با توجه به این که مرزنجوش خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (۲۱)، شاید کاهش میزان NO توسط عصاره آبی این گیاه مربوط به این خاصیت و جاروب کردن (scavenging) رادیکال‌های NO باشد. با توجه به این که اکلیل الملک نیز همانند مرزنجوش، در منابع ذکر شده (۱۵-۱۰) در درمان سردرد و میگرن کاربرد داشته است، انتظار می‌رفت که عصاره آبی این گیاه نیز احتمالاً بتواند میزان NO را کاهش دهد. ولی برخلاف انتظار و برخلاف فرضیه این تحقیق، عصاره آبی گیاه اکلیل الملک به جای اینکه میزان NO را کاهش دهد، مقدار آن را افزایش داد. هر چهار غلظت مورد استفاده از این گیاه، میزان NO را افزایش دادند و غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ تا ۷۲/۹ درصد مقدار NO را افزایش داد. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً اثر اکلیل الملک بر

3. Cheung

1. Tezuka

2. Kim

الملک اثر خود بر میگرن را با مکانیسم دیگری اعمال می‌کند.

با توجه به موارد بیان شده، شاید بتوان گفت در آینده ای نه چندان دور داروهایی با خاصیت مهار مسیر پیام‌رسانی NO/cGMP که مسیر اثر NO در ایجاد سردرد و میگرن است، ساخته شوند؛ کما این که چند کار تحقیقاتی در این زمینه انجام شده است (۲۴-۲۲).

درمان یا تسکین سردرد و میگرن از طریق تأثیر بر NO نیست (۱۵-۱۰). با توجه به این که در برخی منابع (۱۵) از اثرات جانبی استفاده از این گیاه، سردرد ذکر شده است شاید این اثر جانبی اکلیل الملک مربوط به افزایش میزان NO توسط این گیاه باشد. به طور کلی می‌توان گفت عصاره آبی گیاه مرزنجوش اثر خود در درمان یا کاهش سردردهای میگرنی را احتمالاً از طریق کاهش میزان NO انجام می‌دهد و عصاره آبی گیاه اکلیل

فهرست منابع

1. Bruckdorfer R. Nitric oxide in physiology and pathology. *Molecular Aspects of Medicine* 2005; 26: 1-2.
2. Guix F, Uribesalgo I, Coma M, Mounoz J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* 2005; 76: 126-152.
3. William C. Sessa. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 15-18.
4. Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 1995; 15: 94-100.
5. Thomsen LL, Olsen J. Nitric oxide theory of migraine. *Clin Neurosci* 1998; 5(1): 28-33.
6. Thomsen LL. Investigations into the role of nitric oxide and the large intracranial arteries in migraine headache. *Cephalalgia* 1997; 17: 837-95.
7. Vanderkuy PH, Lohman JJ. The role of nitric oxide in vascular headache. *Pharm World Sci* 2003; 25: 146-51.
8. Sances G, Antonaci F, Pucci E, Nappi G. Nitric oxide pathway and response to nitroglycerin in cluster headache patients: plasma nitrite and citrulline levels. *Cephalalgia* 2003; 23: 407-413.
9. Denninger JW, Marleta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1411: 334-350.
۱۰. زرگری علی (مؤلف)، گیاهان دارویی، جلد چهارم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۲، صفحات ۵۵ تا ۵۹.
۱۱. زرگری علی (مؤلف)، گیاهان دارویی، جلد اول، چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۶، صفحات ۶۱۹ تا ۶۲۳.
۱۲. شیخ رئیس سینا ابوعلی (مؤلف)، ترجمه عبدالرحمن شرف‌کنندی (هه ژار)، قانون در طب، کتاب سوم، بخش اول، چاپ چهارم، تهران، انتشارات سروش، ۱۳۷۰، صفحات ۴۷ تا ۸۱.

۱۳. رازی زکریا (مؤلف)، ترجمه سید محمود طباطبایی، *الحاوی*، جلد اول، چاپ اول، شرکت داروسازی رازی، ۱۳۶۹، صفحات ۲۹۳ تا ۲۹۸.
14. Lesley Bremness, **HERBS**, 1st ed. LONDON: Dorling Kindersley; 1994: 226, 244.
15. Brendler T, Jenicke C, Gruenwald J. **PDR for Herbal Medicines**, 2nd ed. New Jersey: Medical Economics Company (MONTVALE); 2000: 559-560, 744-745.
16. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Arjun H, Nagaoka T, Xiong Q, et al. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of Zanthoxylum bungeanum. **Journal of Ethnopharmacology** 2001; 77: 209-217.
17. Kim O, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. **Cancer Letters** 1998; 125: 199-207.
18. Cheung F, Siow Y, Chen W, Zkarmin O. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. **Biochemical Pharmacology** 1999; 58: 1665-1673.
19. Kaneko T, Chiba H, Horie N, Hashimoto K, Satoh K, Kusama K, et al. Effect of two different groups of Chinese medicines on nitric oxide production by mouse macrophage-like cells. **In Vivo** 2004; 18(6): 771-778.
20. Lemhadri A, Zoggwagh N, Maghrani M, Jouad H, Eddouks M. Anti-hyperglycemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. **Journal of Ethnopharmacology** 2004; 92: 251-256.
21. Puertas-Mejia M, Hillebrand S, Stashenko E, Winterhalter P. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare*) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal** 2002; 17: 380-384.
22. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grove R, Donaldson J, et al. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. **Cephalalgia** 1998; 18: 27-32.
23. Lassen LH, Christiansen I, Iversen HK, Jansen-Olesen I, Olesen J. The effect of nitric oxide synthase inhibition on histamine induced headache and arterial dilation in migraineurs. **Cephalalgia** 2003; 23: 887-886.
24. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadby PJ. The effect of anti-migraine compounds on nitric oxide-induced dilation of dural meningeal vessels. **European Journal of pharmacology** 2002; 452: 223-228.