

등골나물 추출물의 항염증 효과

이하나¹ · 임도영¹ · 임순성^{1,2} · 김종대³ · 윤정한^{1,2*}

¹한림대학교 식품영양학과, ²한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성 소재개발센터,
³강원대학교 BT특성화학부 식품생명공학전공

Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract from *Eupatorium japonicum*

Han Na Lee¹, Do Young Lim¹, Soon Sung Lim^{1,2}, Jong Dai Kim³, and Jung Han Yoon Park^{1,2*}

¹Department of Food Science and Nutrition

²Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University

³Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract *Eupatorium japonicum* belongs to a family of Asteraceae plants and flowers of *E. japonicum* have been consumed as a tea. In this study, we investigated whether *E. japonicum* extract inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in Raw264.7 macrophages. The cells were treated with various concentrations (0, 1, 2.5, 5, or 10 mg/L) of 70% ethanol extract from *E. japonicum* flowers (EJE) in Raw264.7 cells. LPS-induced nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production were inhibited by EJE up to 67% and 49% of these productions, respectively without any reduction of viable cell numbers. EJE reduced LPS-induced expression of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 proteins and their corresponding mRNA levels. Additionally, EJE decreased the levels of interleukin (IL)-6, IL-1β, and tumor necrosis factor (TNF)-α mRNA. EJE was further fractionated with water, butanol, ethylacetate (EA), hexane, or methylene chloride (MC). Among the resulting five fractions, EA and MC, respectively from EJE significantly inhibited LPS-induced NO production (each inhibition rate was 85.3% of 10 mg/L EA fraction and 97.2% of 10 mg/L MC fraction) without significant cytotoxicity in Raw264.7 cells. These results indicate that EJE exhibits powerful effects of anti-inflammation and can be developed as a potential anti-inflammatory agent.

Keywords: *Eupatorium japonicum*, NO, iNOS, COX-2, pro-inflammatory cytokine

서 론

염증반응은 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다(1). 그러나 만성으로 진행된 염증반응은 반대로 조직손상을 촉진하여 식도, 위, 대장, 방광 그리고 전립선 암으로의 진행을 유도하게 된다(2). 염증반응이 일어나면 염증매개물질들인 nitric oxide(NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), 염증성 cytokine 등이 분비된다. 염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase(NOS)에 의해 합성된다. NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS(iNOS)의 세가지 형태가 있으며, 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다(3). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 면역반응의 역할을 한다(4). 그러나 lipopolysaccharide(LPS) 또는 염증성 cytokine 등에 의해 발현이 유도된 iNOS에 의한 과도한 NO 생성은 염증 반응을 심화시켜 조직의 손상,

유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다(5-8). Prostaglandin은 세포막에 존재하는 인지질에서 나온 arachidonic acid로부터 유래된 불포화지방산에 속하는 호르몬이다. 생성된 PG들 중 PGE₂는 염증반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(9). Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid를 PG로의 변화를 촉진시키는 효소로써, 특히 COX-2는 암세포에 의해 발생한 염증, growth factors, cytokines의 다양한 자극에 의해 유발된다(10-12). 염증반응시 발현이 증가되는 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로는 tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-6, IL-1β 등이 있으며 대식세포 등은 이들을 분비하여 다양한 염증 반응을 매개하며 NO와 PGE₂생성을 유도한다. 등골나물(*Eupatorium japonicum*)은 산과 들에 자생하는 여러해살이풀로 80-120 cm 정도로 자라며 줄기는 곧게 자라고 전체에 짧은 털이 밀생하고 흑자색 무늬가 있다. 끝이 뾰족한 잎은 마주나며 가장자리에 톱니가 있고 짧은 잎자루가 있으며, 뒷면에 선점이 있다. 8-9월에 흰색 또는 붉은색의 원통형의 꽃이 줄기 끝에 조밀하게 핀다(13). 예부터 식용으로 사용되었으며, 어린 순은 살짝 데쳐 양념에 무쳐 먹고, 묵나물로 쓰기도 하며, 꽃을 그늘에 말린 뒤 차로 마시기도 하였다(14). 하지만 등골나물의 약용 효과에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 염증성 질환의 예방 및 치료제로서 등골나물의 이용가능성을 밝히기 위하여 본 실험에서는 LPS로 염증반응을 유도한 Raw264.7 세포에서 등골나물 에탄올추출물(EtOH extract from *E. japonicum*; EJE)의 항염증 효능을 조사하였다.

*Corresponding author: Jung Han Yoon Park, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea
Tel: 82-33-248-2134
Fax: 82-33-256-0199
E-mail: jyoona@hallym.ac.kr
Received October 2, 2010; revised November 22, 2010;
accepted November 28, 2010

재료 및 방법

재료

BALB/c mouse에서 유래한 macrophage cell line인 Raw264.7 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 등은 Cambrex Bio Technology(Biowhittaker, Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. LPS와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum(MTT), β -actin antibody는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, iNOS와 COX-2 antibody는 BD Transduction Laboratories(Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다. Horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG와 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

시료의 추출 및 분리

등골나물의 꽃 부분에 70% 에탄올을 가하여 등골나물 꽃을 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 70°C에서 환류시키면서 추출하였다(EJE, 수율 3.47%). 추출을 통해 제조된 등골나물 추출액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압농축한 뒤, -20°C에서 동결건조하였다. 등골나물 에탄올추출물의 분획물은 추출물 30 g을 300 mL의 증류수로 치환한 후, 동일한 양의 methylene chloride(MC, 19.5%)를 첨가하고 분획하여 MC층만을 분리함으로써 MC 분획액을 제조하고, 나머지 용액에 동일한 양의 증류수와 hexane(H, 0.185%)을 첨가하고 분획하여 H 층만을 분리함으로써 H 분획액을 제조하고, 나머지 용액에 동일한 양의 증류수와 ethylacetate(EA, 77.16%)를 첨가하고 분획하여 EA 층만을 분리함으로써 EA 분획액을 제조하고, 나머지 용액에 동일한 양의 증류수와 butanol(B, 0.7%)을 첨가하고 분획하여 B 층만을 분리함으로써 B 분획액을 제조하고, 나머지 용액을 water(W, 1.484%) 분획액으로 사용하였다. 분획을 통해 제조된 각 용매별 등골나물 분획물을 각각 감압농축기를 이용하여 감압농축한 뒤, -20°C에서 동결건조하여 분획물을 제조하였다. EJE 및 EJE 분획물(W, B, EA, H, MC)은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 40 g/L로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였고, 모든 처리군의 DMSO농도는 0.01% 미만으로 동일하게 사용하였다.

세포배양

Raw264.7 세포를 DMEM에 10% FBS, penicillin(100 U/mL) 및 streptomycin(100 μ g/mL)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

NO와 PGE₂ 생성량과 세포생존율 측정

Raw264.7 세포를 10% FBS가 포함된 배지를 사용하여 24 well plate에 7.5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 뒤, 10% FBS가 포함된 배지에 LPS(1 mg/L)가 포함되지 않은 것 또는 포함한 배지에 EJE를 0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L로 처리하였고, EJE분획물의 NO 생성 억제 능력을 조사하기 위해 위와 같은 조건의 배지에 각 W, B, EA, H, MC로 분획한 EJE 분획물을 10 mg/L로 처리하거나 또는 농도를 세분화(0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L)한 후에 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. Raw264.7 세포로부터 생성된 NO의

양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로서 Griess reagent system(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 제조사에서 제시한 방법대로 Griess 시약을 첨가하여 반응시킨 뒤 540 nm 파장에서 microplate reader(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. PGE₂의 생성량을 측정하기 위해 nitrite를 측정하였던 동일한 배지로 PGE₂ assay kit(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조사에서 제시한 방법으로 실험하였다. 세포생존율은 MTT assay 방법을 이용하여(15) 측정하였다.

염증 관련 단백질 수준

Raw264.7 세포를 1.0×10^6 cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주하고 24시간 후, 1% FBS가 함유된 배지로 갈아주고, 12시간 이상 serum deprivation하였다. 1% FBS가 함유된 배지에 LPS(1 mg/L)가 포함되지 않은 것 또는 포함한 배지에 EJE를 0, 2.5, 5, 10 mg/L의 농도로 처리한 뒤 6시간 후에 다음의 방법(16)으로 cell lysate를 수행하였다. Total cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. Total cell lysate(단백질 40 μ g)를 4-20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기에 따라 분리한 후, polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% non-fat dry milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 1시간 동안 교반한 후 측정하고자 하는 항체(iNOS 1:1000, COX-2 1:1000, β -actin 1:2000)를 각각 첨가하여 상온에서 1시간 또는 2시간 동안 교반하였다. 그 후 anti-mouse 또는 anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 단백질 밴드는 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 가시화 하였다. 각 단백질 밴드의 강도는 ImageJ(ver. 1.42, NIH Image, developed and maintained by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 수치화 하였다.

염증성 사이토카인의 mRNA 발현 측정

Total RNA의 추출은 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 수행하였고, total RNA에서 cDNA를 합성하는데 oligo-(dT) primer와 SuperScript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였다(16). cDNA로 합성된 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 mRNA의 발현은 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 Rotor-Gene™ 6000(Corbett Life Science, Sydney, Australia)을 이용해 측정하였다(17). 측정하고자 하는 mRNA는 GAPDH로 수치를 정량화 하였고 Rotor-gene software(ver. 6, Corbett Life Science, Sydney, Australia)을 사용하여 계산하였다. 각각 수치는 LPS control(1 mg/L LPS+0 mg/L EJE)를 100%로 나타낸 것이며 같은 실험을 3번 반복하여 나타내었다. mRNA primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 제작하였으며 다음과 같다. GAPDH, sense 5'-GGCATGGCCTTCCGTGT-3' anti-sense 5'-GGTTTCTCCAGGCG-GCA-3'; iNOS, sense 5'-AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT-3' anti-sense 5'-GCTGTGTGTACAGAAAGTCTCGAACTC-3'; COX-2, sense 5'-GGAGAGACTATCAAGATAGT-3' anti-sense 5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACA-3'; IL-6, sense 5'-CCCAATTTC

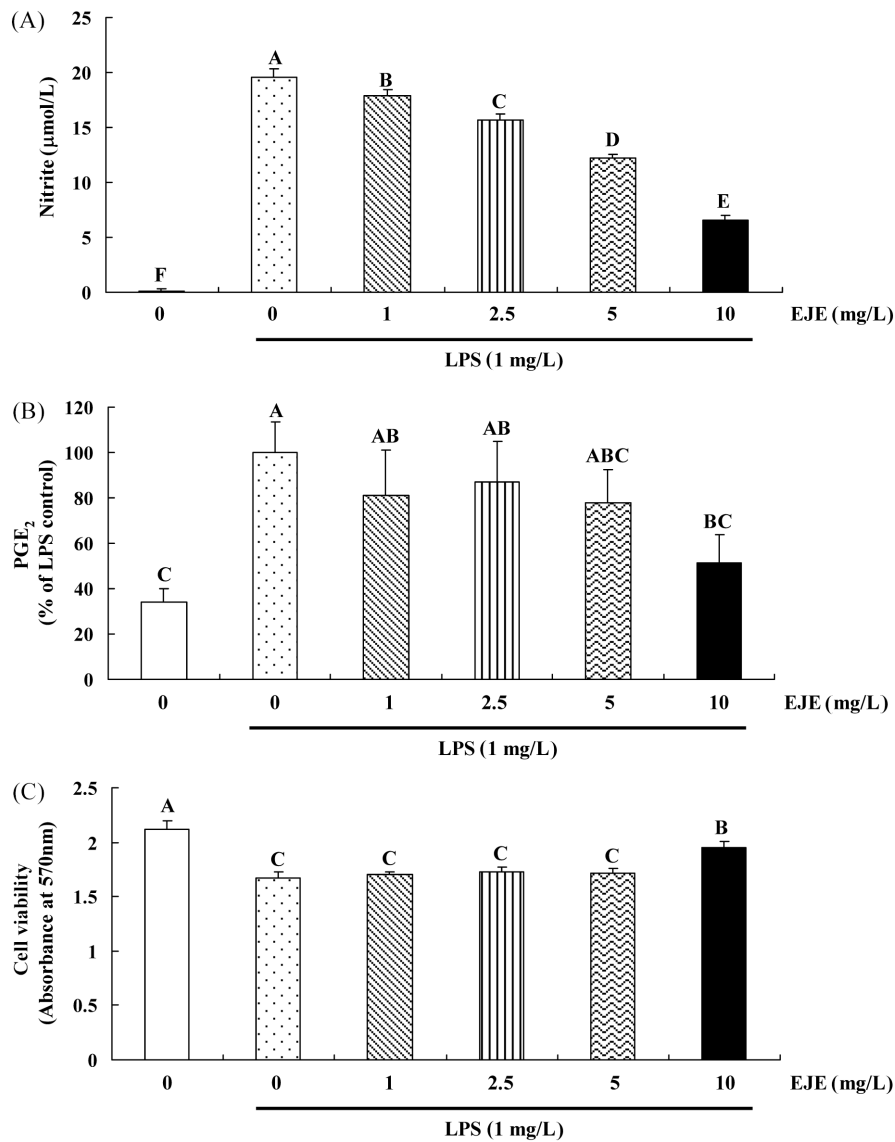


Fig. 1. Effects of EtOH extract from *Eupatorium japonicum* (EJE) on LPS-induced NO and PGE₂ production in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were plated in 24-well plates at 7.5×10^4 cells/well. After 24 h, cells were treated with various concentrations (0, 1, 2.5, 5, or 10 mg/L) of EJE in the absence or presence of 1 mg/L LPS. The media were conditioned and collected at 24 h after EJE treatment. NO (A) and PGE₂ (B) in the conditioned media were measured using the NO Griess reagent system and PGE₂ assay kit, respectively. Cell viability (C) was estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n=4). Means without a common letter differ significantly (p < 0.05).

CAATGCTCTCC-3', anti-sense 5'-ACAGATAAGCTGGAGTCA-CAGAAGGAGTGGCT-3'; IL-1 β , sense 5'-ACCTGTCCTGTG-TAAATGAAAGACG-3', anti-sense 5'-TTGGTATTGCTTGGGATCC-3'; TNF- α , sense 5'-TCCAGCGGTGCCTATGT-3' anti-sense 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGT-3'.

통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 mean ± SE으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis system) Windows v. 8.12 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군의 평균치간의 유의성은 p < 0.05 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO와 PGE₂ 생성에 대한 등골나물 에탄올추출물(EJE)의 효과

대식세포에서는 LPS와 같은 외부 자극 등에 의해 염증반응이 일어나면 NO, PGs, 염증성 cytokine과 같은 다양한 물질을 생성하고, 염증반응을 조절하는 다양한 병리적인 반응이 유도된다(18). 따라서 본 연구에서는 등골나물 에탄올추출물(EJE)이 NO와 PGE₂의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 마우스의 대식세포인 Raw264.7에 LPS(1 mg/L)의 단독처리 또는 EJE를 0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L로 동시에 처리하여 24시간 동안 배양한 후, NO와 PGE₂에 대한 EJE의 생성 억제 효과를 조사하였다. EJE 처리는 LPS

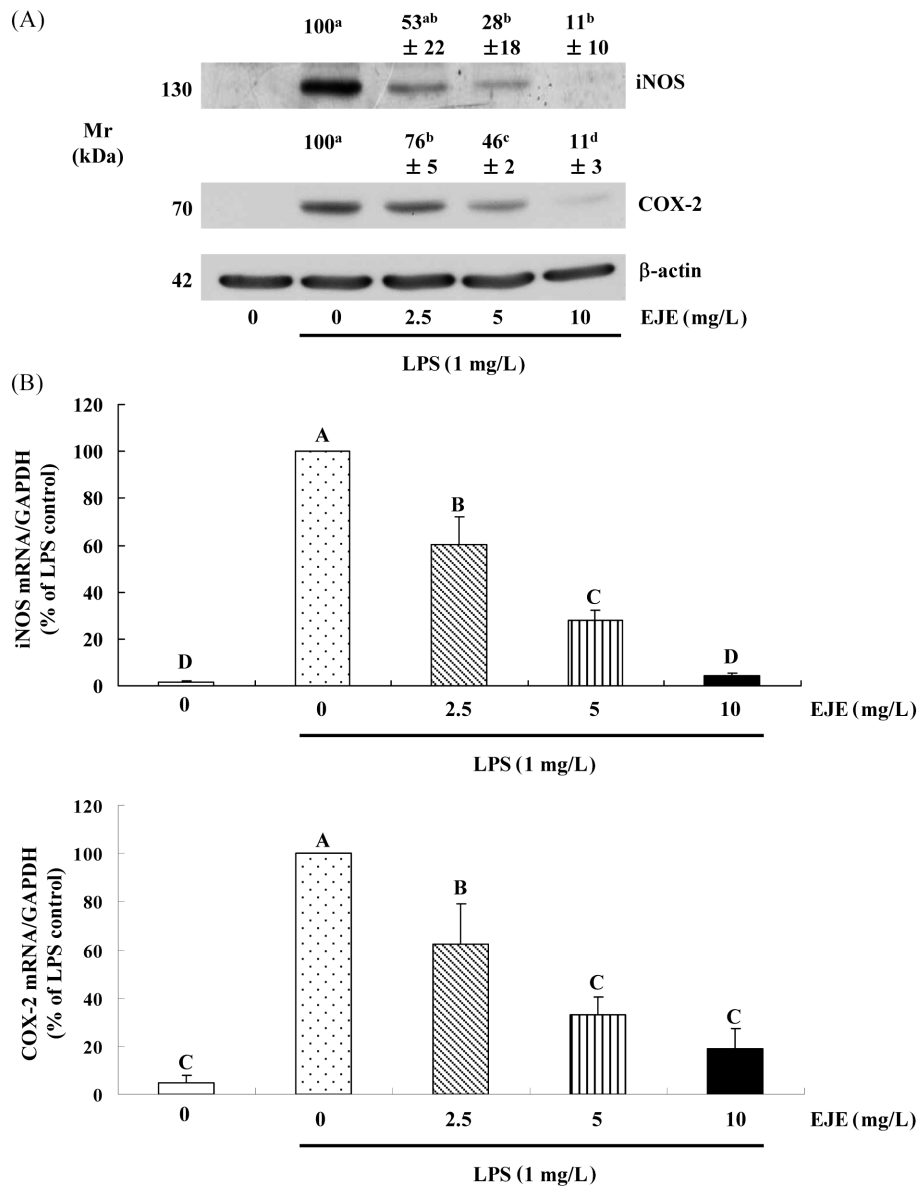


Fig. 2. Effects of EJE on the protein and mRNA levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were serum-deprived with DMEM containing 1% FBS for 24 h. Serum-deprived cells were treated with EJE (0, 2.5, 5, or 10 mg/L) for 6 h. (A) Cell lysates were subjected to Western blotting with an anti-iNOS or COX-2 antibody. Photographs of chemiluminescent detection of the blot, which were representative of three independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β -actin was quantified, and the LPS control levels (1 mg/L LPS+0 mg/L EJE) were set to 100%. The adjusted mean \pm SEM ($n=3$) of each band was provided above each blot. (B) Total RNA was isolated and reverse transcribed, and real time RT-PCR was conducted. mRNA was normalized to GAPDH mRNA, and the LPS control levels (1 mg/L LPS+0 mg/L EJE) were set to 100%. Each bar represents the mean \pm SEM ($n=3$). Means without a common letter differ significantly ($p<0.05$).

에 의해 생성이 증가된 NO의 양을 EJE처리 최종농도에서 67% 정도 감소시켰으며, PGE₂의 생성량도 49%까지 감소시켰다(Fig. 1A and B). 그러나 EJE의 처리는 Raw264.7세포의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 1C). 위 결과는 EJE가 독성을 나타내지 않으면서 LPS에 의해 생성 및 분비가 증가된 NO와 PGE₂를 효과적으로 억제시킨다는 것을 나타낸다.

LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2의 단백질과 mRNA 발현에 대한 EJE의 효과

iNOS와 COX-2는 각각 염증의 매개물질인 NO와 PGE₂를 합성하는데 중요한 역할을 하는 효소이다. EJE가 NO와 PGE₂의 분비

를 감소시켰으므로 이러한 EJE의 생성 억제 효과가 iNOS와 COX-2 단백질의 발현억제에 기인한 것인지 조사하기 위하여 Western blot을 수행하였다. Raw264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 증가되었고, EJE의 처리에 의해 두 단백질 발현이 모두 감소하였다(Fig. 2A). 이러한 EJE에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 감소를 mRNA의 수준에서 조절되는지 확인하기 위하여 real-time RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 iNOS와 COX-2 모두 mRNA의 발현이 LPS에 의해 증가되고 EJE처리 농도 의존적으로 감소하였으며 특히 10 mg/L EJE를 처리한 군에서는 iNOS와 COX-2의 mRNA의 발현이 각각 95.5%와 81%가 감소되었다(Fig. 2B). 이 결과를 통해 EJE는 iNOS와

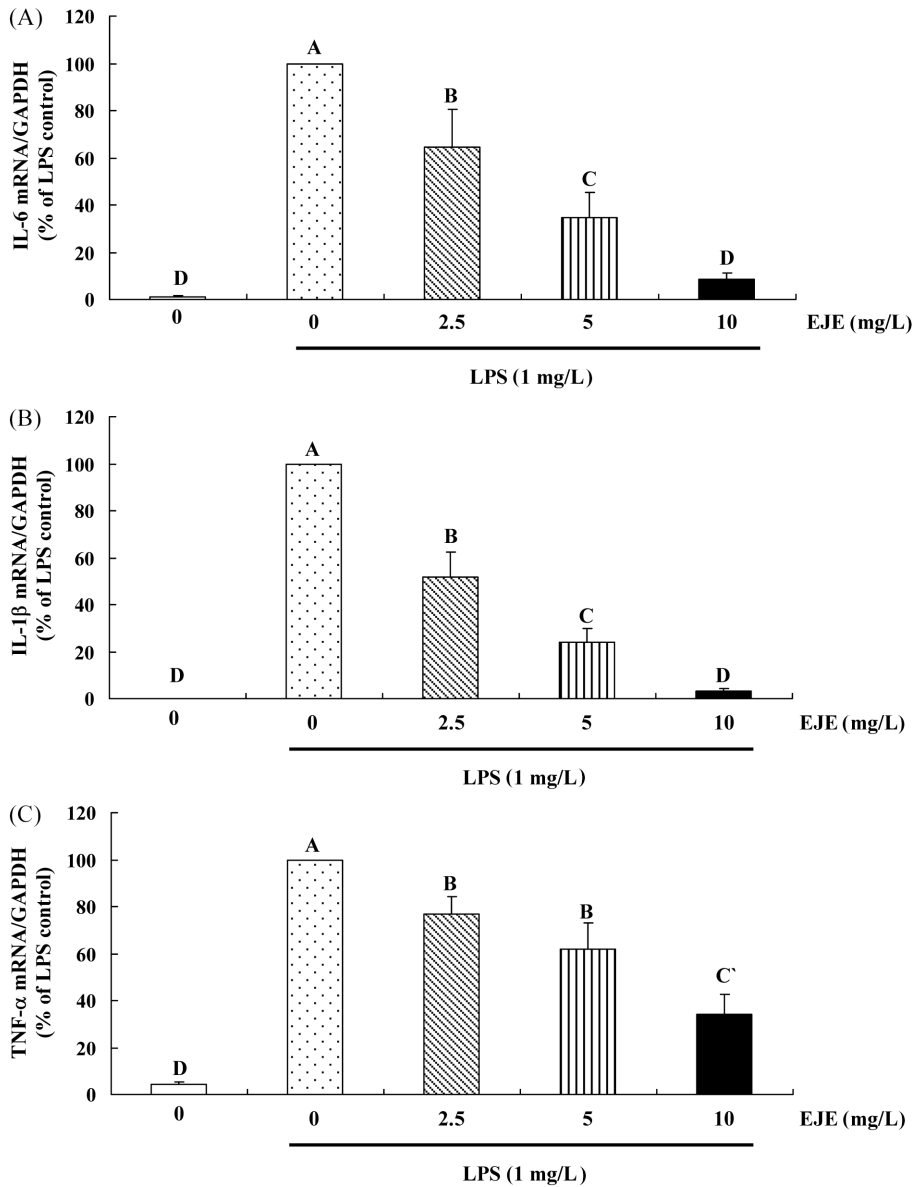


Fig. 3. Effects of EJE on LPS-induced IL-6 (A), IL-1β (B) and TNF-α (C) mRNA expression in Raw264.7 cells. Serum-deprived Raw264.7 cells were treated with EJE (0, 2.5, 5, or 10 mg/L) for 6 h. Total RNA was isolated and reverse transcribed, and real time RT-PCR was conducted using its relative primers as described in materials and methods. mRNA was normalized to GAPDH mRNA, and the LPS control levels (1 mg/L LPS+0 mg/L EJE) were set to 100%. Each bar represents the mean±SEM (n=3). Means without a common letter differ significantly (p<0.05).

COX-2의 발현을 transcript 수준에서 억제시킴으로써 NO 및 PGE₂의 생성, 분비를 효과적으로 억제함을 나타낸다.

LPS에 의해 유도된 염증성 cytokine들의 mRNA발현에 대한 EJE의 효과

IL-6와 IL-1β는 발열작용을 일으키며, 면역계, 신경내분비계, 신경면역계를 자극하는 pro-inflammatory cytokine으로서 TNF-α와 더불어 중앙형성에 관여한다고 알려져 있는 염증 매개물질이다 (4,19-21). 이러한 염증성 cytokine들의 발현을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 여러 질병을 조절할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다. EJE가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Raw264.7 세포에서의 IL-6, IL-1β 및 TNF-α의 mRNA의 발현을 조사하였다. LPS에 의해 증가되었던 IL-6, IL-

1β 및 TNF-α의 mRNA 발현이 EJE치리에 의해 유의적으로 감소하였으며, 최종농도인 10 mg/L의 EJE를 처리한 군에서 이들 mRNA 발현 억제율은 각각 91.1, 96.7, 66%로 나타났다(Fig. 3). 위의 결과는 EJE가 대표적인 염증성 cytokine인 IL-6, IL-1β 그리고 TNF-α의 mRNA 수준을 억제하여 항염증 효과를 나타냄을 보여준다.

Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 EJE 분획물에 대한 NO억제 효과

위의 결과들에서 EJE가 항염증에 탁월한 효과가 있음을 나타내었다. 따라서 EJE의 분획물 중 어떤 분획물이 EJE의 주요한 항염증 효과를 나타내는 분획인지 조사하였다. 먼저 EJE를 W, B, EA, H, MC으로 분획한 후, 분획물을 10 mg/L의 농도로 처리하

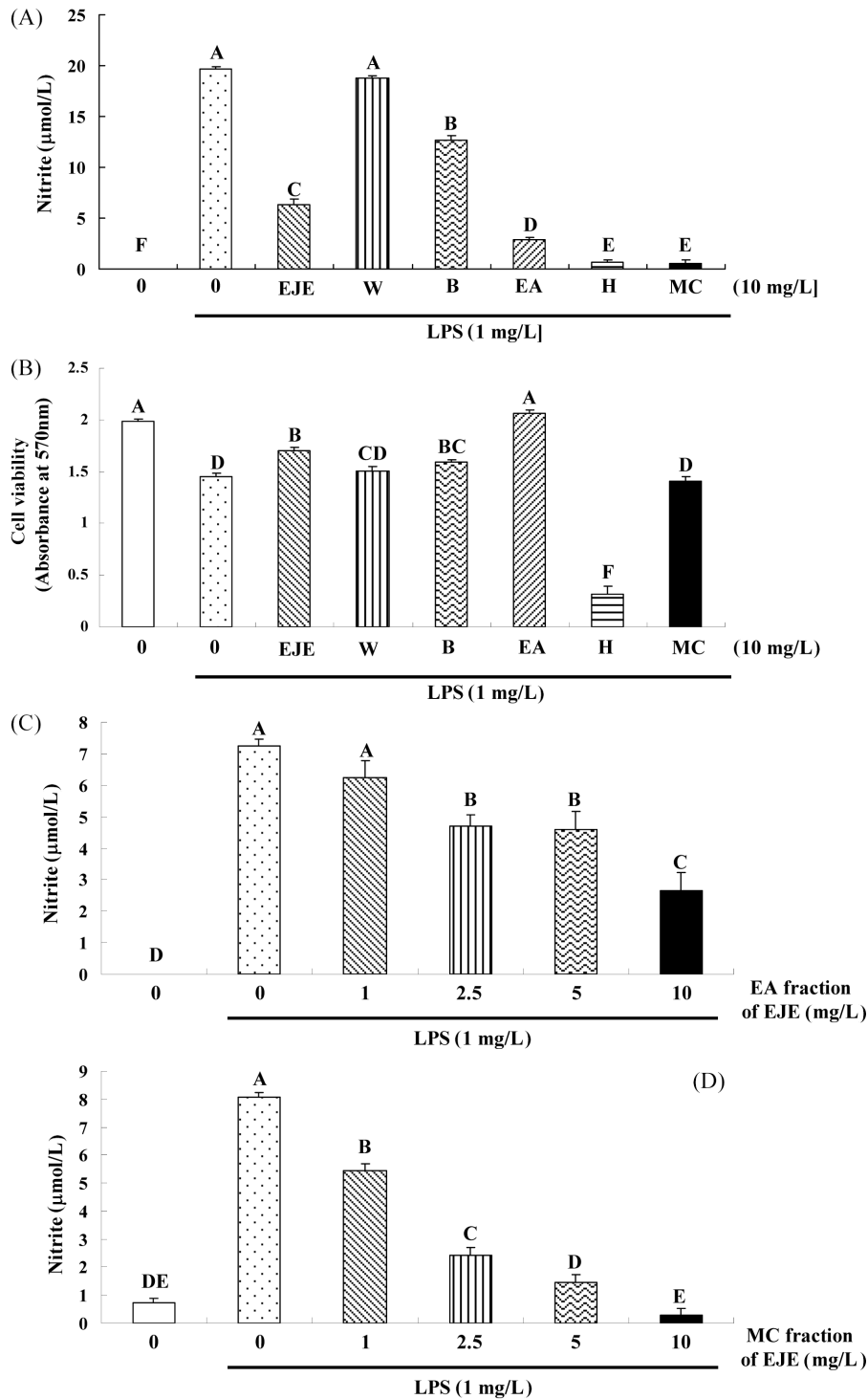


Fig. 4. Effects of fractions from EJE by solvent partitioning on LPS-induced NO production in Raw264.7 cells. After 24 h plating, the cells were treated with 10 mg/L EJE or EJE fractions (water (W), butanol (B), ethylacetate (EA), hexane (H), methylene chloride (MC)) in the absence or presence of 1 mg/L LPS. The media were conditioned for 24 h and collected for NO assay (A) and the viability was measured by MTT assay (B). Each bar represents the mean \pm SEM ($n=3$). Cells were treated with various concentrations (0, 1, 2.5, 5, or 10 mg/L) of EA fraction of EJE (C) and MC fraction of EJE (D) in the absence or presence of LPS (1 mg/L). The conditioned media were measured for NO assay. Each bar represents the mean \pm SEM ($n=4$). Means without a common letter differ significantly ($p<0.05$).

여 NO 생성 억제효과를 조사하였다. EJE와 EJE 분획물의 NO 생성 억제를 비교한 결과, NO 생성 억제에 대해 EJE보다 효과적이며 세포 독성이 없는 분획물은 EA(85.3%의 NO 생성 억제율)와 MC(97.2%의 NO 생성 억제율) 분획물임이 조사되었다

(Fig. 4A and B). 선택된 두 가지 분획물을 농도별로 처리한 뒤 NO 생성 억제 효과를 조사한 결과, 두 가지 분획물 모두에서 농도의존적으로 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 4C and D). 위 결과는 EJE중 EA와 MC분획 부분에서 나온 물질

이 독성이 없고 항염증 활성이 뛰어난 EJE의 주요 활성 성분을 나타내는 것이며, 앞으로 이 분획부분의 물질을 구조적으로 밝히고, 항염증 활성을 나타내는 기전을 규명하는 연구가 추가적으로 수행되어야 한다고 사료된다.

요 약

등골나물(*Eupatorium japonicum*)은 식용으로 이용되어온 식물이지만 생리활성에 대한 연구가 없었다. 따라서 본 연구진은 등골나물 에탄올추출물이 쥐 대식세포인 Raw264.7 세포에 LPS로 유도된 염증 반응에 미치는 영향에 대하여 연구를 수행하였다. 등골나물 꽃 부분에 70% 에탄올을 가하여 얻은 등골나물 에탄올추출물(EJE)을 Raw264.7 세포에 LPS와 함께 0, 1, 2.5, 5, 10 mg/L로 처리하여 세포를 배양하였다. LPS에 의해 생성된 NO 및 PGE₂ 분비는 EJE를 처리함에 따라 감소하였고 이 결과는 EJE의 독성에 의한 것이 아님이 증명되었다. Raw264.7 세포에 LPS에 의해 생성된 iNOS, COX-2의 단백질과 mRNA의 발현이 EJE의 농도 의존적으로 억제되었으며, 염증 반응시 생성되는 IL-6, IL- β , TNF- α 의 mRNA 발현도 등골나물 추출물에 의해 현저히 억제되었다. 더욱이 EJE의 분획물 중 EA와 MC 분획물이 독성이 적으면서 효과적으로 NO의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. NO 생성 억제효과가 뛰어난 이들 분획물 내의 생리활성 물질에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 한다고 사료된다. 등골나물 꽃을 추출물로 항염증효과를 연구한 논문이 없고 다른 식용 가능한 천연재료들의 항염증효과와 비교하여(data not shown) EJE 분획물의 항염증효과가 낮은 농도에서 탁월한 점을 미루어 볼 때, 등골나물 추출물은 상당히 낮은 농도에서 뛰어난 항염증 물질을 가진 단일물질을 포함할 가능성이 높다고 사료된다. 따라서 위의 결과는 등골나물 추출물이 독성과 부작용이 적은 염증 치료제로 활용될 수 있는 가능성이 높음을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의(지역거점연구단육성사업/의료 바이오 신소재 융복합 연구사업단)과 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: PJ007092)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

문 헌

- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* 6: 347-373 (2000)
- Hofseth LJ, Ying L. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1765: 74-84 (2006)
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064 (1992)
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142 (1991)
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10: 291-316 (1996)
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7773-7777 (1991)
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754 (1993)
- Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316: 209-215 (1996)
- Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol.* 21: 93-101 (2002)
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12013-12017 (1994)
- Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J.* 11: 234-247 (1997)
- Takahashi M, Mutoh M, Shoji Y, Sato H, Kamanaka Y, Naka M, Maruyama T, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis. *Nitric Oxide.* 14: 130-136 (2006)
- Lee DH. *The Illustrated Plants Book (pocket book): Summer and autumn Flower and Tree.* Ebeerak. Seoul, Korea. p. 274 (2010)
- Lee JM. *It's Okay to Become Familiar Slowly: 421 of Wild Edible Greens.* Hwan creative company. Seoul, Korea. p. 152 (2009)
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277 (1986)
- Cho HJ, Kim WK, Kim EJ, Jung KC, Park S, Lee HS, Tyner AL, Park JH. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 284: G996-G1005 (2003)
- Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim JK, Kim SG, Park JH. 3,3-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Nutr.* 138: 17-23 (2008)
- Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating Gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* 15: 155-163 (2001)
- Van Snick J. Interleukin-6: An overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 253-278 (1990)
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance Proc. *Neuropeptides* 37: 355-361 (2003)
- Maes M. The cytokine hypothesis of depression: Inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO & NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuroendocrinol. Lett.* 29: 287-291 (2008)