

담죽엽의 항산화 효과와 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 iNOS 발현에 미치는 영향

황성연^{1,3} · 이성원^{2,3} · 권강범⁴ · 최원종² · 김재효² · 안성훈^{2,3*}

1: 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 경혈학교실,
3: 한국전통의학연구소, 4: 원광대학교 한의과대학 한방생리학교실

Antioxidant Effects and Anti-inflammation Effects of Lophatheri Herba Water Extracts Via Reducing iNOS Synthesis Induced by LPS in RAW 264.7 Cell

Sung Yeoun Hwang^{1,3}, Sung Won Lee^{2,3}, Kang Beom Kwon⁴, Won Jong Choi²,
Jae Hyo Kim², Seong Hun Ahn^{2,3*}

1: Department of Herbology, 2: Department of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine,
3: Reserch Center of Traditional Korean Medicine, 4: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

We studied to know the anti-inflammation effect on water extracts of Lophatheri Herba which was growing in every places in our country. We objected free radical scavenger effect and nitrite eliminate effect of the Lophatheri Herba water extracts, and the cell viability, the effects of Lophatheri Herba water extracts on NO production, iNOS synthesis induced by LPS. Free radical scavenger effects were 27.91±0.12%, 38.96±0.10%, 46.22±0.15% depend on 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml each dose of Lophatheri Herba water extracts. Nitrite eliminate effects were 9.86±0.3%, 80.61±0.23%, 97.62±0.56% in 0.1, 1.0, 2.0 mg/ml Lophatheri Herba water extracts on pH 1.2. NO production and iNOS synthesis induced by LPS were reduced in RAW 264.7 cell by Lophatheri Herba water extracts. As the above results, Lophatheri Herba water extracts have anti-inflammation effects via NO production decrease, iNOS synthesis decrease mechanism. So Lophatheri Herba water extracts will be used as the protection or treatment in chronic inflammation disease like a asthma, stomatitis etc.

Key words : lophatheri herba, nitrite oxide, iNOS synthesis, anti-inflammation effect

서 론

우리나라 각지에서 야생하고 있는 淡竹葉(Lophatheri Herba)은 벼과(Gramineae)에 속하는 Lophatherum gracile Bronghiart의 꽃피기 전의 지상부로서 그 성분은 triterpenoid계 화합물인 arundoin, cylindrin, taraxerol, fredelin, amino acids, 지방산 등이 함유되어 이 또는 잇몸이 아플 때, 구강염 등에 효과가 있다¹⁾.

O₂⁻, H₂O₂ · OH와 같은 활성산소종(reactive oxygen species,

ROS)은 세포 내에 존재하는 미토콘드리아, 퍼옥시좀, xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase 및 cyclooxygenase (COX) 등의 효소들에 의해서 생성되어 산화적 손상을 일으킬 수 있으며²⁾, lipopolysaccharide (LPS)는 RAW 264.7 세포와 같은 대식세포에서 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α inflammatory cytokine을 증가^{3,4)}시키며 염증을 유발한다. 이러한 염증매개 물질 형성은 iNOS의 발현에 의하여 nitric oxide (NO)형성을 유발한다^{5,6)}.

NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있으나^{7,8)} 그중 소량의 NO 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 역할을, 염증 반응시 등과 같은 iNOS에 의한 NO의 과잉 생성은 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉

* 교신저자 : 안성훈, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : drpoint@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6448

· 접수 : 2010/11/16 · 수정 : 2010/11/28 · 채택 : 2010/12/09

진하여 염증을 심화시킨다^{9,10}).

염증(inflammation)은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복, 재생하려는 기전이나¹¹, 지속적인 염증 유발은 점막손상을 촉진할 뿐만 아니라, 암 등의 질환도 유발할 수 있다¹².

최근에 진행된 담죽엽에 대한 연구로 Zhang 등¹³은 微細腦機能障礙에 대한 효과를, 李 등¹⁴의 담죽엽 등에서 추출한 물질이 항산화 효과가 있다고 하였고, 朴 등¹⁵은 담죽엽 추출물이 HL-60 세포와 L1210 세포에 대한 세포독성 및 활성산소 소거효과가 있다고 하였고, 高 등¹⁶은 in vitro에서 담죽엽 등이 인슐린 작용 및 분비를 활발히 한다고 보고하였으며, 全 등¹⁷은 담죽엽의 에탄올 추출물에서 항균활성작용 및 부종, 혈관투과성, myeloperoxidase 활성도 억제 효과를 보이고 있어 항염증성을 보고한 바 있다.

그러나 담죽엽의 NO 생성 및 iNOS 발현에 관한 연구는 보고된 바 없어, 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포에서 LPS로 NO 생성을 유발하고 담죽엽 열수추출물이 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양을 위한 RPMI 1640, Fetal bovine serum(FBS), Penicillin-streptomycin, Trypsin-EDTA dms Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, iNOS 항체는 Santa Cruz(San Diego, CA)에서 구입하였으며, Lipopolysaccharide(LPS), methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), NaNO₂, Griess reagent, pyrogallol 는 Sigma(ST. Louis, MO, USA)을 구입하였다.

2. 담죽엽 추출물

대한민국 서산시 운산면 용현계곡에서 담죽엽(200 g)을 채취(2008. 05. 10)하여 초고속 저온(농축) 추출기(경서, 대한민국)로 진공상태 100℃에서 5시간 열수추출 하였다. 그 후 농축과정과 동결과정을 거쳐 4.3 g의 추출물(수득율 2.15%)을 획득하여 Millex-GV (Millipore corporation, U.S.A., pore size 직경0.22 μm)로 여과 후 사용하였다.

3. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois¹⁸의 방법에 준하여 DPPH(1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정농도의 시료 2.0 ml에 absolute ethanol에 0.2 mM농도의 DPPH용액 1.0 ml 가하고 혼합하여 37℃에서 30분간 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

4. 아질산염 소거능(Nitrite scavenging ability; NSA) 측정

아질산염 소거능은 Kato 등의 방법¹⁹에 따라 일정 농도의 추출물 시료 1 mL에 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL를 가하고, 이 용액에 0.1 N HCl을 가하여 pH 1.2로 조정하였다. 여기에 증류수를 가하여 부피를 10 mL로 정용한 후 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5mL, Griess 시약(A:B=1:1, A: 1% sulfanilic acid in 30% acetic acid, B: 1% naphthylamine in 30% acetic acid)을 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 15 분간 방치시킨 후 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 산출하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 첨가한 후, 동일한 방법으로 측정하여 담죽엽 추출물의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

5. 세포배양

세포는 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 μg streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37℃, CO₂ incubator(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25%-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

6. 세포 증식 측정

Raw 264.7 세포 3×10⁴ cell를 96 well plate 분주하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 담죽엽 추출물을 다양한 농도 처리하여 18시간 동안 배양한 후, phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 5 mg/mL의 MTT용액 50 μl를 각 well에 넣고 37℃ 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액을 버리고 DMSO 100μl 씩 넣어 formazin을 용해한 후, microplate reader(Bio-Tek instruments. INC.)로 570 nm에서 흡광도를 측정²⁰하였다.

7. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정²¹하였다. RAW 264.7 세포에 담죽엽 추출물 농도별로 처리하고 동시 LPS 1μg/mL 를 처리하여 18 시간 배양하였다. 배양액 100 μl와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어 주고 10분간 상온에서 반응 시킨 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

8. Western blot analysis

RAW 264.7 세포에 각각의 시료를 처리하고 일정시간 수 거하여, ice-cold PBS로 2회 세척한 후 각각의 세포에 세포용해 완충용액(10 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X, 1mM PMSF, 1μg/mL aprotinin, 1μg/mL leupeptin, 1mM DTT)을 첨가하여 30분간 용해 시킨 후

13,000rpm에서 30분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bio-rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 30 μ g의 lysate를 6% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)에 300 mA로 60분간 transfer하였다. 그리고 membrane은 blocking buffer(5% nonfat dry milk in TBS-T(20mM Tris-HCL pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) buffer 에 2시간 동안 antibody의 비특이적 결합을 억제 시키고, TBS-T로 세척하였다. iNOS 항체를 TBS-T용액으로 희석하여(1:1,000) 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다 TBS-T로 3회 세척한 후 2차 항체는 HRP(Horse Radish Peroxidase)이 결합된 anti-rabbit IgG를 1:1,000으로 희석하여 사용하였으며, 상온에서 30분 동안 반응을 진행하였다. 그 후 TBS-T로 3회 세척한후, ECL western blotting detection reagent(Amersham)으로 반응시킨 후 ChemiDoc image 분석기기 (Bio-rad, USA)를 이용하여 관찰하였다.

9. 통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 mean \pm SE으로 나타내었다. 수집된 결과는 Origin 5.0 (USA)를 이용하여 분석되었으며, 각 실험군의 평균치간의 유의성은 student's t-test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 담죽엽 추출물의 free radical 소거활성 측정

1) DPPH radical 소거활성 측정

일반적으로 항산화능은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력, 즉 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법이 이용되어지고 있다. 담죽엽 추출물 0.1~2.0 mg/ml의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과, 0.1 mg/ml에서는 10.76 \pm 0.06% 전자공여능을 보였고, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 에서는 각각 27.91 \pm 0.12, 38.96 \pm 0.10, 46.22 \pm 0.15%의 전자공여능을 나타내었다 (Fig. 1).

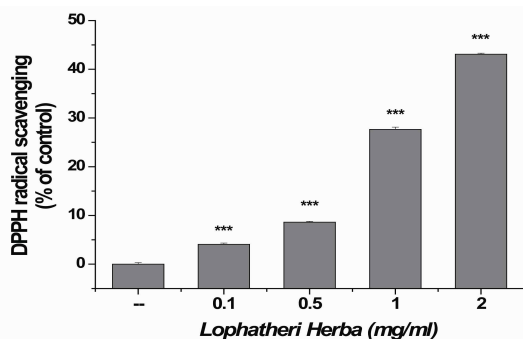


Fig. 1. The DPPH radical scavenger abilities of water extract from Lophatheri Herba with various concentration. Data presented as Means \pm S.D. of three independent experiments. ***; p<0.001, vs negative group.

2) 아질산염 소거능 측정

아질산나트륨 용액에 담죽엽 추출물 0.1~2.0 mg/ml을 첨가하고 pH 조건을 각각 1.2, 3.0 그리고 6.0으로 조정하여 아질산염에 대한 소거능을 측정하였다. 이들 pH는 인체내 위에서의 pH 변화를 고려하였으며, 각 pH 조건하에서 아질산염 소거능을 조사하였다. 담죽엽 추출물을 첨가하여 pH 1.2로 조정하여 아질산염 소거능을 조사한 결과, 0.1 mg/ml에서는 9.86 \pm 0.3%의 소거능을 보였으나, 1.0, 2.0 mg/ml 첨가에서는 80.61 \pm 0.23, 97.62 \pm 0.56%의 아질산염 소거능이 유의성있게 나타났다. 그러나 pH 6.0의 조건에서는 아질산염 소거능이 상실됨을 관찰할 수 있었다(Table 1).

Table 1. Nitrite scavenging abilities of water extracts from *Lophatheri Herba* at pH respectively

Concentration (mg/ml)	pH		
	1.2	3.0	6.0
0.1	9.86 \pm 0.30%	1.69 \pm 0.06%	7.68 \pm 0.64%
0.5	47.89 \pm 0.25%	27.31 \pm 0.40%	7.48 \pm 0.06%
1.0	80.61 \pm 0.23%	71.67 \pm 0.15%	7.35 \pm 0.55%
2.0	97.62 \pm 0.56%	91.87 \pm 0.36%	7.92 \pm 0.35%

Data presented as Means \pm S.D. of three independent experiments

2. 세포생존율

담죽엽 추출물이 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 담죽엽 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay로 측정한 결과, 담죽엽 추출물 100~500 μ g/ml에서 세포생존율이 모두 96% 이상으로 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않은 것을 확인하였다(Fig. 2).

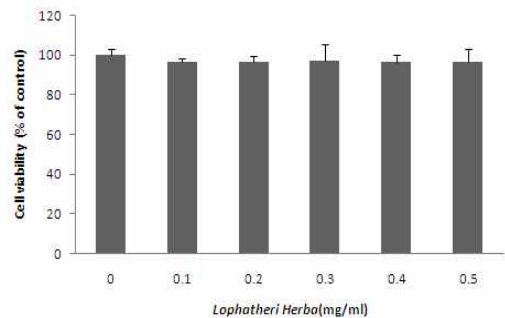


Fig. 2. Effect of Lophatheri Herba extracts on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml) of Lophatheri Herba extracts for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data presented as Means \pm S.D. of three independent experiments.

3. RAW 264.7 세포에서 담죽엽이 LPS로 유도된 NO 생성량에 미치는 영향

염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 담죽엽 추출물이 NO 생성의 억제 하는지 알아보았다(Fig. 3). 먼저 염증 유발 물질에 주로 사용되는 LPS는 iNOS에 의한 NO 생성을 증가시킨다. RAW 264.7 세포에 LPS 1 μ g/ml와 담죽엽 추출물을 0.125, 0.25, 0.50 mg/ml를 동시 처리한 후 24시간 후 Griess reagent 시약을 사용하여 NO의 생성량을 측정된 결과,

대조군 5.33 ± 0.21 uM에 비하여 LPS 단독 처리에서는 10.64 ± 0.53 uM로 증가하였으나, 담죽엽 추출물 0.25 mg/ml에서 7.88 ± 0.14 uM, 0.50 mg/ml 처리군에서는 5.97 ± 0.42 uM으로 농도의존적인 NO의 억제를 보였다.

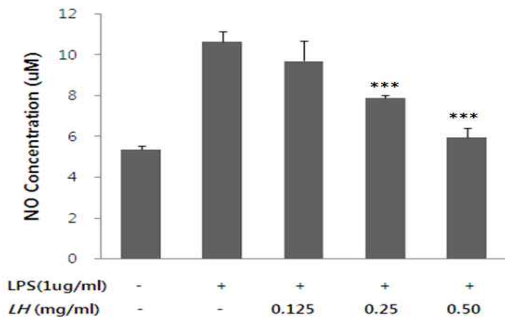


Fig. 3. Inhibition of LPS-induced NO production by *Lophatheri Herba* extracts. RAW 264.7 cells were treated with LPS(1 ug/ml) and LH for 24 hr. Nitric produced was measured by Griess reagent as described in Materials and Methods. Data presented as Means±S.D. of three independent experiments. ***, p<0.001, vs LPS positive group

4. 담죽엽의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

담죽엽 추출물 0.125, 0.25, 0.50 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, 담죽엽 추출물과 LPS의 상호결합의 작용에 의한 세포독성으로 인한 것인지를 관찰하였다. 담죽엽 추출물을 0.125, 0.25, 0.50 mg/ml로 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 실시하여 세포생존율을 측정하였다. 실험결과 담죽엽 추출물의 0.125, 0.25, 0.50 mg/ml 농도에서 95 %이상의 세포생존율을 보였다. 이러한 실험결과 담죽엽 추출물과 LPS의 상호결합에 의한 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 4)

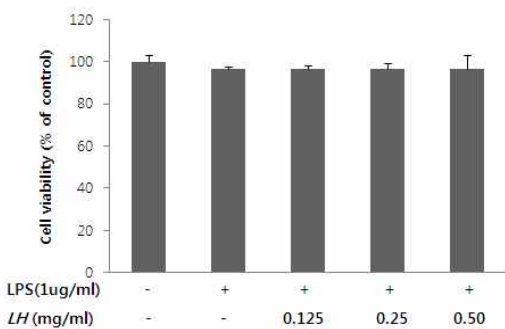


Fig. 4. The effect of LH on LPS-induced cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated LPS and LH for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data presented as Means±S.D. of three independent experiments.

5. RAW 264.7 세포에서 담죽엽이 LPS로 유도된 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

담죽엽 추출물에 의한 염증 인자(NO)의 억제와 iNOS 단백질 발현과의 관련성을 조사하기 위하여 western blot을 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다(Fig. 5). LPS 처리에서는 iNOS 단백질의 발현이 증가 되었으나, LPS

1ug/ml와 담죽엽 0.25와 0.50 mg/ml 동시 처리시 iNOS 단백질 발현량이 감소함을 관찰할 수 있었다.

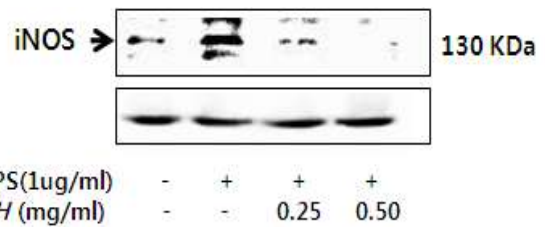


Fig. 5. The effects of LH on iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells are treated with LPS and LH for 18hr. The protein levels of iNOS was determined using immunoblotting method as described in Materials and Methods.

고 찰

염증은 조직의 상해나 파괴에 의해서 일어나는 과정에서 상해를 보호하는 증상으로서 임상적으로는 발열, 발적, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE2, NO, TNF- α , free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하여 선천성 면역과 긴밀한 관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다²².

또한 염증은 활성산소, free radical 및 NO의 과발현으로부터 유도될 수 있으며 세포의 구성성분인 DNA 손상, 단백질의 변이 및 신경손상 등을 일으킬 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다²³.

지금까지 활성산소와 free radical 생성을 방지하기 위해 사용되는 항산화제로는 α -tocopherol, BHT, BHA, PG, ascorbic acid 등이 알려져 있으나²⁴, 그 중 일부는 변이원성 및 독성이 지적²⁵되어 최근 안전한 천연항산화제 개발을 위한 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서 담죽엽 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여, 먼저 DPPH radical scavenging activity를 측정하였다. 항산화제는 보라빛의 DPPH radical (DPPH·)을 무색의 (DPPH-H) 형태로 전환시키는데, 담죽엽 추출물 2 mg/ml에서 약 50%의 DPPH radical 소거능을 보였다(Fig. 1).

질산염은 소화기관내에서 또는 식품의 저장 중에 질산환원효소나 질산염 환원세균에 의하여 아질산염으로 환원되며 아질산염은 amine류와 반응하여 nitrosoamine을 생성하는 것으로 알려져 있다²⁶. Nitrosoamine은 체내에서 diazoalkane으로 변화하여 핵산이나 단백질 또는 세포내의 성분을 alkyl화 함으로써 암을 유발²⁷하고 아질산염은 그 자신이 독성을 갖고 있기 때문에 일정한 농도 이상 계속 섭취시 혈액중의 헤모글로빈을 산화시켜 메트헤모글로빈증(methemoglobinemia)을 유발하기도 한다²⁸. Table 1에서와 같이 담죽엽 추출물은 아질산염 소거능이 관찰되었으며, pH가 낮을수록 더욱 효과적인 특성을 보였다. 이러한 관찰 결과는 朴 등¹⁵의 담죽엽 추출물이 HL-60 세포와 L1210 세포에 대한 세포독성 및 활성산소 소거효과가 있다고 보고된 결과와 유사한 결과라고 판단된다.

산화질소(nitric oxide: NO)는 L-arginine으로부터 nitric

oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 하며²⁹⁾, 포유동물 세포의 nitric oxide synthase (NOS)는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)의 3가지 형태가 존재한다. nNOS와 eNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성의 조절에 중요한 역할을 하며, iNOS는 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin- β (IL- β) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 자극에 의해 발현되며, 저농도의 NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지나 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직손상을 초래한다³⁰⁻³²⁾고 알려져 있다. 상기와 같은 관찰결과로부터 담죽엽의 생체내 약리적 작용을 알아보기 위하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 NO 발생을 유도한 후, 담죽엽추출물을 처리하여 NO 발생정도의 변화유무를 관찰하기로 하였다.

먼저 담죽엽 추출물이 세포독성을 갖고 있는 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 담죽엽 추출물을 농도별 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay로 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 대조군에 비하여 담죽엽 추출물 농도별은 모두 96% 이상의 세포생존율을 보여 RAW 264.7 세포에 유의한 독성을 보이지 아니하였다(Fig. 2).

RAW 264.7 세포에서 담죽엽 추출물의 NO 생성억제 정도를 관찰하기 위하여 담죽엽 추출물 0.125, 0.25, 0.50 mg/ml의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS 처리군에서는 대조군에 비교하여 NO의 생성량이 유의하게 증가하였으며, 담죽엽 추출물 농도별로 처리하여 24 시간 배양한 후 NO의 측정된 결과 NO의 생성량이 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 담죽엽 추출물 0.25, 0.50 mg/ml의 농도에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제하는 것이 담죽엽 추출물과 LPS 상호협력에 의한 세포독성에 의한 것인지 알아보기 위하여, 담죽엽 추출물의 농도별과 LPS 동시처리 후 MTT assay를 처리하여 세포생존율을 조사하였다. 실험 결과 RAW264.7 세포에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

NO 생성 억제에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. 대조군에 비하여 LPS 처리군에서는 iNOS 단백질량이 유의하게 발현되었으나, LPS 처리와 담죽엽 추출물을 동시 처리에서는 iNOS의 발현량이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

이러한 실험결과들로 보아, 담죽엽 추출물은 항산화 활성을 갖고 있고, 특히 아질산염 소거능이 뛰어난 것으로 관찰되었으며, 또한 LPS로 활성화된 RAW264.7세포에서 iNOS발현을 억제하여 NO발생을 억제한다는 상기의 연구결과로 보아 항염증 활성 역시 우수할 것으로 사료된다. 상기 실험결과와 기전은 보다 자세한 연구가 필요하며, 다만 우리나라 각지에서 자생하고 있는 담죽엽이 구강염, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료되어 이를 보고하는 바이다.

결 론

우리나라 각지에서 자생하고 있는 담죽엽은 치은염, 구강염 등의 염증성 질환과 만성해수에 효과가 있다고 알려져 있어 항산화효과와 항염효과에 대하여 약리 작용을 관찰하였다.

항산화 연구결과, 담죽엽 물추출물의 DPPH radical 소거활성 측정은 0.1 mg/ml에서는 10.76±0.06% 전자공여능을 보였고, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml 에서는 각각 27.91±0.12, 38.96±0.10, 46.22±0.15%의 전자공여능을 나타내었고, 아질산염 소거능 결과는 담죽엽 2.0 mg/ml, pH 1.2에서는 97.62±0.56%를 나타내었으나 동일량의 pH 6.0에서는 소거능력을 상실하였다. 또한 세포 실험 결과, 담죽엽 추출물 100~500 ug/ml에서 세포 독성이 관찰되지 않았으며 LPS로 유도한 NO 유발 실험 결과 대조군 5.33±0.21 uM에 비하여 LPS 단독 처리에서는 10.64±0.53 uM로 증가하였으나, 담죽엽 추출물 0.25 mg/ml에서 7.88±0.14 uM, 0.50 mg/ml 처리군에서는 5.97±0.42 uM으로 농도의존적인 NO의 억제를 보였다. 또한 iNOS 단백질의 발현량을 조사한 결과에서는 LPS 처리에서는 iNOS 단백질의 발현이 증가되었으나, LPS 1ug/ml와 담죽엽 0.25와 0.50 mg/ml 동시 처리시 iNOS 단백질 발현량이 감소함을 관찰할 수 있었다.

이러한 실험결과들로 보아, 담죽엽 물추출물은 항산화 활성을 갖고 있고, 또한 LPS로 활성화된 RAW264.7세포에서 iNOS발현을 억제하여 NO발생을 억제한다는 상기의 연구결과로 보아 항염증 활성 역시 우수할 것으로 사료된다.

상기 실험결과와 기전은 보다 자세한 연구가 필요하며, 다만 우리나라 각지에서 자생하고 있는 담죽엽이 구강염, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

1. Im, J.P. Boncho-Physiology. Shin-il company. Seoul, 90-91, 2005.
2. Delanty, N., Dichter, M.A. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurol Scand 98: 145-153, 1998.
3. Lee, E.S., Ju, H.K., Moon, T.C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S.H., Son, J.K., Baek, S.H. and Chang, H.W. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. Biol Pharm Bull 27: 617-620, 2004.
4. Mukaida, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S., Kuno, K., Matsushima, K. Novel insight into

- molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J Leukoc Biol* 59: 145-151, 1996.
5. Funk, C.D., Frunk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, A.S. and Fitzgerald, G.A. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5: 2304-2312, 1991.
 6. Joydeb, K.K., Young, J.S. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutation Research* 659: 15-30, 2008.
 7. Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y. and Kim, Y.K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytotherapy Research* 17: 485-489, 2003.
 8. Choi, S.Y., Lee, K.C., Jeoung, Y.J. and Lim, B.O. In-vitro anti-inflammatory activity of *Rubus coreanus* Miq. on nitric oxide, interferon-gamma, cyclooxygenase-2, and tumor necrosis factor- α production in the macrophage like cell line raw 264.7 activated by lipopolysaccharide. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 15: 324-329, 2007.
 9. Yang, J.L., Jang, J.H., Radliakrishnan, V., Kim, Y.H. and Song, Y.S. β -Glucan suppresses LPS-stimulated NO production through the down-regulation of iNOS expression and NF-kappaB transactivation in raw 264.7 macrophages. *Food Science and Biotechnology* 17: 106-113, 2008.
 10. Stuehr, H.H., Kwon, N.S., Weise, M. and Nathan, C. Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: and FAD- and FMN- containing flavoprotein. *Proceeding of the national Academy of Sciences of the United States of America* 88: 7773-7777, 1991.
 11. Tizard, I.R. and Schubot, R.M. *Veterinary Immunology : An Introduction*. W. B. Saunders Company, U.S.A. 2004.
 12. Willoughby, D.A. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478, 1975.
 13. Zhang, H., Huang, J. Preliminary study of traditional Chinese medicine treatment of minimal brain dysfunction; analysis of 100 cases. *Ahong Xi Yi Jie He Za Zh* 10(5):278-279, 260, 1990.
 14. Lee, M.J., Moon, G.S. Antioxidative Effects of Korean Bamboo Trees, Wang-dae, Som-dae, Maengjong-juk, Jolit-dae and O-Juk. *Korean J Food SCI Technol* 35(6):1226-1233, 2003.
 15. Park, S.W., Kim, J.H. Cytotoxicity of *Sasamorpha purpurascens* extract against HL60 cells and L1210 cells with alterations of ROS scavenging enzymes activities. Department of chemistry, College of Natural Science, Sangmyung University. 112: 1-22, 2003.
 16. Ko, B.S., Jun, D.W., Jang, J.S., Kim, J.H., Park, S.M. Effect of *Sasa Borealis* and White Lotus Roots and Leaves on Insulin Action and Secretion In Vitro. *Korean J Food Sci Technol* 38(1):114-121, 2006.
 17. Jeon, H., Park, Y.S., Kang, I.T., Cui, X., Lee, T.K., Kim, H., Lim, J.P. Antibacterial Activity against the *Streptococcus mutans* and Anti-inflammatory Effect of *Lophatheri Herba*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 20(6):1567-1571, 2006.
 18. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200, 1958.
 19. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B., Hayase, F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338, 1987.
 20. Lim, B.O., Jeong, Y.J., Park, M.H., Kim, J.D., Hwang, S.J. and Yu, B.P. Immunoregulatory effects of Saengshik on DSS-induced inflammatory bowel disease in mouse model system. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 36: 32-42, 2007.
 21. Wang, S., Chen, Y., He, D., He, L., Yang, Y., Chen, J., Wang, X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol* 114(3):458-462, 2007.
 22. Chung, H.Y., Kim, H.J., Shin, K.H., Kim, K.W. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Aging Dev* 111(2-3):97-106, 1999.
 23. Fridorich, I. The biological activity of oxygen radicals. *Science* 201: 875-881, 1987.
 24. Dziezak, J.D. Antioxidants. *Food Technol* 40: 94-102, 1986.
 25. Brane, A.I. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63, 1975.
 26. Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. *Encyclopedia of food science food technology and nutrition*. Academic Press, New York, NY, USA. pp 3240-3249, 1993.
 27. Bartsh, H., Ohshima, H., Pignatelli, B. Inhibition of endogenous nitrosation: Mechanism and implications in human cancer prevention. *Nut Res*. 202: 307-324, 1998.
 28. Kim, S.B., Ahn, B.W., Yeum, D.M., Lee, D.H., Park, Y.H., Kim, D.S. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 2. Nitrite-scavenging effects of seaweed extracts. *Bull Korean*

- Fish Soc 20: 469-475, 1987.
29. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.
 30. Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chi Med* 28: 217-226, 2000.
 31. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406: 301-309, 2000.
 32. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophage. *Life Sci* 69: 625-635, 2001.