

마우스 대식세포에서 도기탕 (導氣湯) 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효과

김동완, 윤현정, 허준영, 김태훈, 조현진, 박선동*

동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of Do-Ki-Tang methanol extract in mouse macrophage cells

Dong-Wan Kim, Hyun-Jeong Yun, Jun-Young Heo, Tae-Hoon Kim,
Hyun-Jin Cho, and Sun-Dong Park*

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : The aim of this study was to determine whether methanol extract of Do-Ki-Tang (DKT) inhibit free radical generation and production of nitrite an index of NO, PGE₂, iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MCP-1 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Methods : Cytotoxic activity of extract on RAW 264.7 cells was measured using 5-(3-carboxymethyl-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. The expression level of inflammatory response-related proteins was confirmed by western blot. The production of proinflammatory cytokines was measured by ELISA.

Results : Our results indicated that DKT scavenged DPPH radical and nitric oxide *in vitro*. Moreover, DKT significantly inhibited the LPS-induced NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression accompanied by an attenuation of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MCP-1 formation in macrophages. Furthermore, DKT treatment also blocked LPS-induced intracellular ROS production and the activation of NF- κ B and MAPKs.

Conclusion : Our data suggest that the anti-inflammatory effect of DKT is mediated through down-modulation of pro-inflammatory mediators and cytokines by blocking the signaling pathways of NF- κ B and MAPKs. These inhibitory effects by DKT represent a potential therapeutic approach to the treatment of inflammatory diseases.

Key words : Do-Ki-Tang (DKT), inflammation, macrophage

서론

도기탕 (導氣湯)은 『沈氏尊生書』에 기재된 처방으로 천련자 (川練子, *Melia toosendan* Sieb.), 목향 (*Aucklandia lappa* DECNE.), 소회향 (小茴香, *Nigella sativa* L.), 오수유 (吳茱萸, *Evodia officinalis* DODE.)로 구성된다. 본 처방은 理氣하는 약물들로 구성되어 行氣疏肝하고 散寒止痛시키는 효능이 있어 寒凝氣滯로 인한 寒疝疼痛을 치료한다. 『醫學發明』에 기재되어 있는 대표적인 理氣劑인 “天台烏藥散”과 비교하였을 때, 主治는 비슷하나 처방 구성이 간략하며, 症情이 비교적 경한 경우에 응용하여 치료하는 처방이다¹⁾.

도기탕을 구성하고 있는 각각의 약재에 관해 분자-세포생물학적 실험을 통한 많은 연구가 진행되어 보고되고 있다 (Table 1). 천련자 (*Melia toosendan* Sieb.)에 관한 보고로는 항염증 활성에 관한 보고, 천련자로부터 분리한 성분인 toosendanin이 간암세포주인 SMMC-7721와 Hep3B에서 apoptosis를 유도함으로써 세포의 증식을 억제한다는 항암 활성에 관한 보고, toosendanin에 의해 유도되는 간손상에 관련된 메커니즘에 관한 보고 등이 있었다. 목향 (*Aucklandia lappa* DECNE.)에 관해서는 관절염 유발 쥐에서 항염증 활성에 대한 보고와 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 대식세포에서의 항염증 활성, 위암세포주인 AGS에서 apoptosis

*교신저자 : 박선동. 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실.
· Tel : 054-770-2371, · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2010년 11월 11일 · 수정 : 2010년 12월 6일 · 채택 : 2010년 12월 15일

유도를 통한 항암활성, 간암세포에서 B형 간염 바이러스 항원의 발현 억제제를 통한 항암활성에 관한 보고가 있었고, 그 밖에 항산화 활성 및 항미생물 활성에 관한 보고가 있었다. 소회향 (*Nigella sativa* L.)에 관한 보고로는 소회향으로부터 분리한 herbal melanin이 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, vascular endothelial growth factor (VEGF)의 생성 억제제를 통한 항염증 활성, radical scavenging activity와 소회향의 에탄올 추출물의 산화적 손상 억제 등을 통한 항산화 활성, 소회향의 성분인 thymoquinone의 전립선암 세포와 췌장암 세포의 증식을 억제한다는 보고가 있었다. 그 밖에 항미생물 활성에 관한 보고와 신경전달물질의 분비를 조절한다는 연구보고가 있었다. 오수유 (*Evodia officinalis* DODE.)에 관한 보고로는 free radical scavenging activity, 대장암 세포주 HT29, 유방암세포주 MCF-7, 간암세포주 HepG2에서 DNA topoisomerase의 활성을 억제함으로써 세포의 증식을 억제하는 통한 항암 활성, 오수유로부터 분리한 aucubin의 자외선에 의한 피부노화 억제 활성, 신경세포 보호 활성, 저산소증 개선 효과에 관한 활성 보고가 있었다.

인체 내에는 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이루고 있는데 균형상태가 깨져서 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 유발되면 세포 손상 및 병리적 질환이 야기된다²⁾. 산화적 스트레스는 내부적으로는 염증 (inflammation), 자가면역반응 (autoimmune reactions), 대사장해 (dysregulation of metabolism), 허혈 (ischemia) 등에 의해서, 외부적으로는 미생물 (microbiological organism), 전자기 조사 (electromagnetic radiation), 화학적인 자극 등에 의해서 유발될 수 있다. 이러한 산화적 손상에 관여하는 것이 reactive oxygen species (ROS)와 reactive nitrogen species (RNS)가 있는데, superoxide (O_2^-), nitric oxide (NO), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등의 free radical, 그 외에 산소 유래종 (oxygen-derived species)인 singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 여기에 속한다³⁾.

염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응으로, 그람 음성 세균의 세포외막의 성분인 LPS나 바 이러스, 미생물 등의 자극에 의해 대식세포 (macrophage)가 활성화되면 염증반응에 관련된 많은 염증인자들의 생성이 촉진되어 세균의 침입으로부터 숙주를 방어하는데 효과적으로 작용하게 된다⁴⁾. 그러나 염증 반응이 만성화되면 류마티스 관절염, 동맥경화증, 위염, 천식 등의 염증성 질환을 유발할 수 있다⁵⁾. LPS에 의해 활성화된 대식세포에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 등의 pro-inflammatory 사이토카인들과 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)가 과량 생산되면 염증반응이 지속적으로 유발되어 인체의 각종 질환을 악화시키는 원인이 된다.

사이토카인의 생성에는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway가 관여하는 것으로 알려져 있다. 대식세포에서 LPS와 같은 자극이 오면 MAPKs와 NF- κ B가 활성화되어 각종 염증인자들의 생성이 유도된다⁶⁾. 따라서 각종 염증성 질환들을 개선하기 위해서는 염증을 유발하는 염증인자의 조절과 염증반응에 관련된 MAPKs와 NF- κ B의 활성을 조절하는 것이 중요하다.

본 연구에서는 마우스 대식세포인 RAW 264.7에서 도기탕 메탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성을 조사하였다. *in vitro* 상에서 free radical scavenging activity 측정을 통해 추출물의 항산화 활성을 조사하였고 마우스 대식세포인 RAW 264.7 내의 ROS 생성량에 미치는 영향을 알아보았다. 또 항염증 활성을 조사하기 위하여 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도시켜 약재가 이를 얼마나 효과적으로 저해할 수 있는 지 관찰하였다. 그 지표로서 세포가 방출하는 NO, PGE₂ 생성량과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 발현 정도와 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, monocyte chemoattractive protein (MCP)-1의 생성량을 측정하였다. 그리고 이때 세포 내의 MAPKs와 NF- κ B pathway에 어떠한 영향이 있는지 조사한 바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

Table 1. Reported pharmacological effects of component herbs of Do-Ki-Tang (DKT)

Herbal name	Reported effects
천련자	anticancer effect ⁷⁾ , anti-inflammatory activity ⁸⁾ , liver injury-related mechanism ⁹⁾ , hepatotoxicity ¹⁰⁾
목향	anti-inflammatory activity ^{11,12)} , anticancer effect ^{13,14)} , antioxidative activity ¹⁵⁾ , antibacterial activity ¹⁶⁾
소회향	anti-inflammatory activity ¹⁷⁾ , antioxidative activity ¹⁸⁾ , anticancer effect ^{19,20)} , antibacterial activity ²¹⁾ , modulation of neurotransmitter ²²⁾
오수유	antioxidative activity ²³⁾ , anticancer effect ²⁴⁾ , photoprotective activity-preventing photoaging ²⁵⁾ , neuroprotective effect ²⁶⁾ , antianoxic action ²⁷⁾

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 도기탕의 구성 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 천련자, 목향, 소회향, 오수유를 Table 2과 같이 배합하여 6000 ml의 methanol을 가한 다음 70 $^{\circ}C$ 에서 48시간 동안 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 39.2 g의 메탄올 추출물 (수율 13.1%)을 얻었다. 이 메탄올 추출물은 Figure 1에서와 같이 용매 분획하였다.

Table 2. Composition and contents of DKT

	학 명	사용량 (g)
천련자	<i>Melia toosendan</i> Sieb.	120
목향	<i>Aucklandia lappa</i> DECNE.	90
소회향	<i>Nigella sativa</i> L.	60
오수유	<i>Evodia officinalis</i> DODE.	30
총량		300

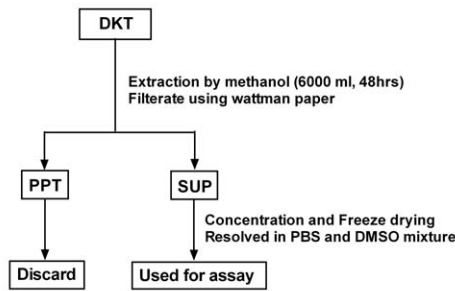


Fig. 1. Extraction and fractionation procedures of Do-Ki-Tang (DKT). PPT ; precipitate, SUP ; supernatant

2) 시약

세포 배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS), Acrylamide, Bis는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, sodium nitroprusside (SNP), LPS, 4,5-diaminofluorecein (DAF-2), 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), AEBSEF, CAPS, tween 20, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 2차 항체인 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody와 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, 1차 항체인 iNOS, COX-2, p-ERK, p-p38, p-JNK, p-IκBα, NF-κB p65와 β-actin antibody는 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였으며 ERK, p38, JNK는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit와 Griess Reagent System은 Promega사 (Madison, USA)에서 구입하였고, 각종 cytokine 측정을 위한 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit와 Nuclear and cytoplasmic protein extraction reagents는 Pierce Biotechnology사 (Rockford, USA)에서 구입하였으며, PGE₂ assay kit는 R&D사 (Minneapolis, USA)에서 구입하였다. Protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) Free radical 소거활성 측정

1-1) DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Gyamfi 등의 방법²⁸⁾에 따라 측정하였다. 먼저 도기탕 메탄올 추출물 50 μl에 0.1 mM DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 μl를 가하여 잘 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 30분간 정치한 다음, microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 파장 517 nm에서 흡

광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 50%의 소거능을 보이는 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

1-2) Nitric oxide 소거활성 측정

Nitric oxide의 소거활성은 Sutherland 등의 방법²⁹⁾에 의하여 측정하였다. 먼저 1 mg의 DAF-2를 0.55 ml의 DMSO에 용해시키고, 이를 다시 50 mM phosphate buffer를 사용하여 400배 (v/v)로 희석해서 DAF-2 용액을 준비해 놓았다. 도기탕 메탄올 추출물 10 μl를 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 130 μl와 혼합한 다음, 40 mM SIN-1 10 μl 및 DAF-2 용액 50 μl를 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 10분간 배양한 다음, DAF-2와 NO의 반응에 의해 생성되는 triazolofluorescein의 형광강도를 fluorescence microplate reader (SPECTRA MAX GEMINI EM, Molecular Devices Corp., USA)를 사용하여, excitation 파장 495 nm 및 emission 파장 515 nm에서 측정하였다.

2) 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) MTS assay

도기탕 메탄올 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법³⁰⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별 (0, 10, 20, 30, 50 μg/ml)로 18 시간 동안 처리하였다. Well당 20 μl의 MTS solution을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4 시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 농도별 약제가 갖는 흡광도는 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교해서 보정하였다.

4) DCF-DA assay

도기탕 메탄올 추출물이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다^{31,32)}. 먼저 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고, 약제를 농도별로 1시간 전처리한 후 1 μg/ml의 LPS를 처리하여 37℃, 5% CO₂의 조건에서 18시간 동안 배양한 후 배지를 제거한 다음, 10 μM DCFH-DA를 처리하여 45분간 배양하였다. PBS로 2회 세척하고 fluorescence microplate reader를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다.

5) NO 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess

Reagent System³³⁾을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포에 도기탕 메탄올 추출물을 전처리하고 1시간 후 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 배양액 $50 \mu\text{l}$ 와 같은 양의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 계산하였다.

6) PGE₂ 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 R&D systems (Minneapolis, USA)에서 구입하여 실험하였다. 세포에 도기탕 메탄올 추출물을 전처리하고 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 PGE₂ 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 $100 \mu\text{l}$ 씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution $50 \mu\text{l}$ 와 PGE₂ conjugate $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 $200 \mu\text{l}$ 씩 처리하여 5분간 반응시킨 후, $50 \mu\text{l}$ 의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 세포 배양액 내의 cytokines 측정

세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 세포에 도기탕 메탄올 추출물을 처리하고 1시간 후 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다. 18 시간 후 세포 배양액을 얻어 cytokine 측정에 이용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척하고 $100 \mu\text{l}$ 의 biotinylated antibody reagent를 각각의 well에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, $100 \mu\text{l}$ 의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxy benzalmalonate (TMB) substrate를 $100 \mu\text{l}$ 씩 처리하여 5~30분간 반응시킨 후 $100 \mu\text{l}$ 의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 PBS로 3회 세척한 후, lysis buffer (pH 7.5, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, $10 \mu\text{g/ml}$ aprotinin, $10 \mu\text{g/ml}$ leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. Nuclear extract의 경우는 nuclear extraction kit를 사용하여 얻었다. 이후, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat

milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2 시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 means \pm SEM으로 나타내었으며, 통계분석법은 GraphPad Prism 4.0을 이용하여 one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test를 실시한 후, *P*값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다. Western blot을 통해 얻은 band의 density 분석은 GelDoc-It BioImaging System (UVP, USA)을 사용하여 측정하였다.

실험결과

1. 도기탕 메탄올 추출물의 free radical 소거활성 측정

도기탕 메탄올 추출물의 전자 공여능을 비교하기 위하여, DPPH radical에 대한 소거활성을 측정한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하였고, $230.3 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다 (Fig. 1A). RNS의 하나인 NO의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, $41.8 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 소거활성 (IC₅₀)을 보였다 (Fig. 2B).

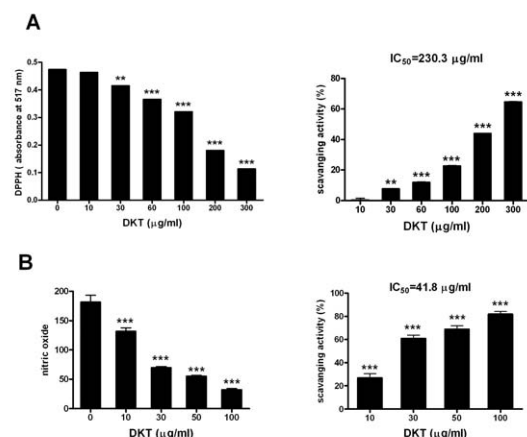


Figure 2. Scavenging activities of DKT methanol extract on free radicals. (A) Scavenging activity on DPPH radical. (B) Scavenging activity on nitric oxide. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control; *** : *P* < 0.001, ** : *P* < 0.01.

2. 도기탕 메탄올 추출물이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향

마우스 대식세포인 RAW 264.7에 대한 도기탕 메탄올 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 추출물을 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml)로 18 시간 동안 처리한 결과, 20 μ g/ml의 농도에서 92.3%의 세포생존율을 나타내었고 30 μ g/ml의 농도에서 84%의 생존율을 보였다. 40 μ g/ml의 농도에서부터 65% 이상의 세포사가 관찰되어 세포독성이 나타났다. 따라서 30 μ g/ml의 농도까지 RAW 264.7에 처리하여 다음 실험을 진행하였다 (Fig. 3).

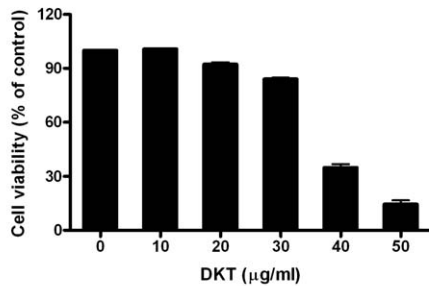


Figure 3. Effect of DKT methanol extract on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml) of DKT methanol extract for 18 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in materials and methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

3. 도기탕 메탄올 추출물이 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성에 미치는 영향

LPS에 의해 생성되는 RAW 264.7 세포 내의 ROS에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여 LPS를 단독 처리한 실험군에서는 유의성 있는 형광강도의 증가를 보였다. 이로써 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. LPS 단독 처리군의 경우, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 약 2.1배 형광강도가 증가한 반면, 10, 20, 30 μ g/ml의 도기탕 메탄올 추출물 처리군은 LPS 단독 처리군에 대해 각각 26.5%, 67.4%, 91.3%의 ROS 생성 억제능을 보였다 (Fig. 4).

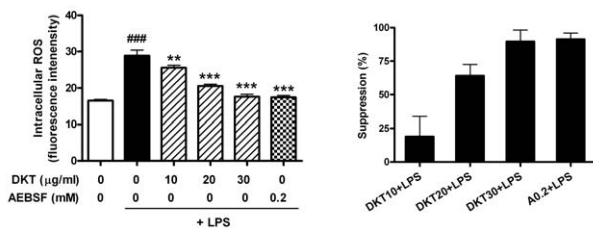


Figure 4. Inhibitory effect of DKT methanol extract on intracellular ROS production in RAW 264.7 induced by LPS. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 20, 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 1 hr. And then 1 μ g/ml of LPS were treated to induce intracellular ROS production for 18 hr. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ###, *** : $P < 0.001$, ** : $P < 0.01$.

4. 도기탕 메탄올 추출물이 NO와 PGE₂의 생성량에 미치는 영향

도기탕 메탄올 추출물의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 Griess 시약을 사용하여 조사한 결과, 10 μ g/ml에서부터 70%이상의 생성억제 효과가 나타났다 (Fig. 5A). 그리고, figure 5B에서 보듯이 LPS에 의해 생성되는 PGE₂의 양이 도기탕 메탄올 추출물에 의해 30 μ g/ml에서 22.4% 감소되었다 (Fig. 5B).

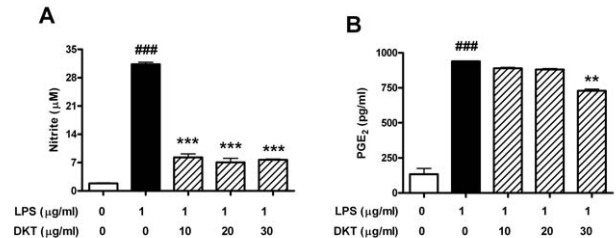


Figure 5. LPS-induced NO and PGE₂ production. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 20, 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 1 hr. And then the cells were treated with 1 μ g/ml of LPS to induce NO and PGE₂ production for 18 hr. The NO production was measured by Griess Reagent System, and the PGE₂ production was measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); ###, *** : $P < 0.001$, ** : $P < 0.01$.

5. 도기탕 메탄올 추출물이 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

염증인자인 NO와 PGE₂의 합성효소인 iNOS와 COX-2의 발현량에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS 단독 처리에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 발현이 도기탕 메탄올 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). Image 분석 장치를 사용하여 정량적으로 감소효과를 확인해 본 결과, 도기탕 메탄올 추출물 30 μ g/ml의 처리에 의해서 iNOS는 99.8%, COX-2는 67.2%까지 발현 감소효과가 있음을 알 수 있었다.

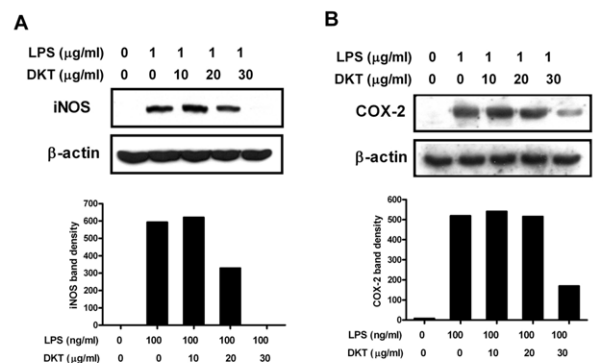


Figure 6. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 expression by DKT methanol extract. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 20, 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 1 hr, and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blotting as described in materials and methods and the density of band was calculated by GelDoc-It Biomaging System. β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

6. RAW 264.7 세포에서 도기탕 메탄올 추출물이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성량에 미치는 영향

염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)인 TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1의 생성량에 미치는 영향을 조사하였다. TNF- α 는 10, 20, 30 μ g/ml의 농도에서 각각 49.8%, 72.1, 90.6%의 감소효과가 나타났고, IL-6의 경우에는 10, 20, 30 μ g/ml의 농도에서 74.1%, 76.3%, 89.1%의 감소효과가 나타났다. IL-1 β 는 10, 20, 30 μ g/ml의 농도에서 63.0%, 85.3%, 90.5%의 감소효과를 보였고, MCP-1의 경우에는 각각 8.7%, 31.2%, 76.8%의 감소효과를 보였다 (Fig. 7). 이상의 결과를 볼 때, 도기탕 메탄을 추출물은 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

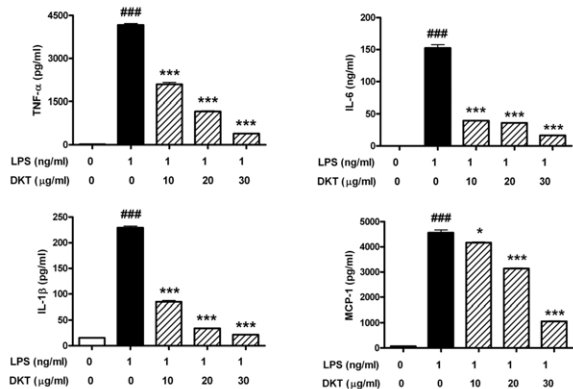


Figure 7. Inhibition of LPS-induced TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1 by DKT methanol extract. RAW 264.7 cells were preincubated with 10, 20, 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1 production was measured by ELISA as described in materials and methods. Data are represented as means \pm SEM. Significantly different from control (#) or LPS alone (*); * : $P < 0.05$; ##, *** : $P < 0.001$.

7. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향

LPS에 의해서 활성화되는 NF- κ B의 subunit인 p65의 핵 안으로의 translocation과 세포질에서 I κ B α 의 phosphorylation에 도기탕 메탄을 추출물이 미치는 영향을 확인해 보았다. Nuclear extraction를 통해 핵 내로 이동한 NF- κ B p65를 관찰한 결과, LPS 단독 처리군이 현저한 translocation을 유발한 것에 비해 도기탕 메탄을 추출물 처리군에서는 저해효과가 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 8A). 또한 세포질에서 LPS에 의해서 유도되는 I κ B α 의 phosphorylation이 도기탕 메탄을 추출물에 의해 효과적으로 저해됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 8B).

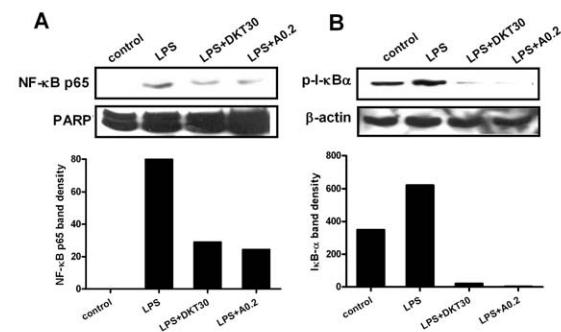


Figure 8. Effect of DKT methanol extract on LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B p65 and on the phosphorylation of I κ B α . RAW 264.7 cells were preincubated with 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 1 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 18 hr. The expression levels of NF- κ B p65 and p-I κ B α were determined by western blotting using nuclear extracts and cytosol extract, respectively. The density of band was calculated by GelDoc-It Bioluminescence System. PARP and β -actin levels were used as internal markers for loading variation.

8. 도기탕 메탄을 추출물이 mitogen-activated protein kinases의 활성화에 미치는 영향

도기탕 메탄을 추출물이 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 통해 ERK, JNK, p38의 변화를 살펴보았다. Figure 9에서 보듯이, LPS 단독 처리군에서는 ERK, JNK, p38의 phosphorylation이 증가하였던 것이 도기탕 메탄을 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있다. 또한, ROS의 저해제인 AEBBSF에 의해서도 그 활성이 효과적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다.

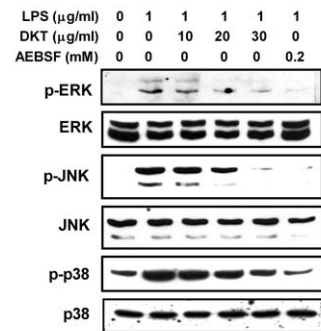


Figure 9. Effect of DKT methanol extract on MAPKs. RAW 264.7 cells were preincubated with 0, 10, 20, 30 μ g/ml of DKT methanol extract for 18 hr and then treated with 1 μ g/ml of LPS for 1 hr. The expression level of MAPKs was determined by western blotting.

고찰

우리 몸은 항상성 유지를 위해 산화촉진물과 산화억제물질이 균형을 이루고 있는데, 이 균형이 깨져서 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 각 기관과 세포에 유해한 작용을 하게 되고, 이를 산화적 스트레스라고 한다. 세포내에 존재하는 미토콘드리아, 퍼옥시좀, xanthine oxidase (XOD), NADPH oxidase 및 COX 등의 효소들은 O $_2^-$, H $_2$ O $_2$, \cdot OH와 같은 활성 산소종 (ROS)을 생성하는데, 이 ROS는 산화손상을 일으키는 주범이 된다. 또한 \cdot NO, HNO $_2$, ONOO $^-$ 와 같은 활성 질소종 (RNS)은 염증반응 시 대식세포, 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성된다. ROS와 RNS는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응과 깊이 관련되어 있다. 합성 항산화제의 부작용들이 밝혀지면서 천연자원에서부터 항산화제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다. 그리고 뛰어난 항산화 효과를 지닌 물질들이 뛰어난 항염증 작용을 수반하고 있다고 알려진 경우도 많다³⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 도기탕 메탄을 추출물의 항산화 및 항염증 활성화에 관한 실험을 수행하였다.

먼저 도기탕 메탄을 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH radical 소거활성 실험을 수행하였다. DPPH radical hydrazyl의 질소 원자는 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소 원자를 받아들이는 성질이 있다. 따라서 수소 공여 능이 뛰어난 항산화 물질과 반응을 시키면 보라색의 DPPH radical (DPPH·)이 무색의 (DPPH-H) 형태로 전환하게 되므로 비교적 간단하면서도 재현성이 있게 항산화력을 측정할 수 있다. DPPH radical 소거능 실험 결과, 230.3 μ g/ml의 IC₅₀ 값을 보였다. (Fig. 1A). 이어서 대표적인 RNS인 NO에 대한 소거활성도 측정하였다. 본 실험에서 도기탕 메탄을 추출물의 NO에 대한 소거활성을 측정하기 위하여 SNP로 NO를 생성시키고 이를 DAF-2로 포집하여 형광강도를 측정하였다. 그 결과, 도기탕 메탄을 추출물의 농도에 의존적으로 소거능이 증가함을 관찰할 수 있었고, 41.8 μ g/ml의 IC₅₀ 값을 보였다 (Fig. 1B).

in vitro 상에서 항산화 활성을 보인 도기탕 메탄을 추출물을 마우스 대식세포인 RAW 264.7에 처리하여 다음 실험들을 진행하였다. 먼저, MTS assay를 수행하여 세포독성이 없는 약제의 농도를 선정하였다 (Fig. 3). 도기탕 메탄을 추출물이 RAW 264.7 세포의 세포 내 ROS 생성을 얼마나 효과적으로 방어하는지 DCF-DA assay를 통해서 확인하였다. 실험 결과, 도기탕 메탄을 추출물은 농도 의존적으로 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었고 (Fig. 4), *in vitro* 상의 항산화 활성이 세포 안에서도 유효함을 확인할 수 있었다.

다음으로 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에 도기탕 메탄을 추출물을 처리하여 항염증 활성을 갖는지 실험을 통해 살펴보았다. 대식세포는 신체 내에 널리 분포되어 있는 면역세포로서 외부 병원체가 침입했을 경우에 백혈구의 이주 (migration)보다 빠른 즉시형 반응을 보임으로써 감염 초기의 면역, 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 박테리아성 내독소인 LPS는 대식세포에서 다양한 염증인자의 생성을 촉진시킨다³⁵⁾. 따라서 LPS에 의해서 생성되는 염증인자들을 억제하는 물질은 대식세포의 활성화와 연관된 다양한 염증 질환들의 치료에 유용하게 쓰일 수 있다고 간주되고 있으며, 대식세포주 중에서도 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 LPS의 자극에 반응하여 아주 효과적으로 염증인자들이 생성되기 때문에 유용한 항염증 물질을 찾는 선별 검사에서 다용되고 있다. 따라서 본 실험에서도 염증유발인자로서 LPS를 사용하였다.

염증은 사이토카인의 네트워크와 다양한 염증인자 (inflammatory mediator)들의 유발 등에 의해서 조절되는 복합적인 과정을 통해서 일어나게 된다. Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)는 많은 염증성 질환을 일으키는 병인으로 알려져 있는데, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 COX-2와 같은 염증인자를 전사시키고 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 여러 염증성 사이토카인의 생성에 있어 중요한 역할을 한다. TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 염증성 사이토카인들은 활성화된 대식세포에서 주로 생산되며 선천면역과 관계되어 내피세포와 백혈구에 작용하여 미생물에 대한 초기 염증반응을 자극하고 조절한다. 사이토카인의 대량 생산은 발열, 내피세포의 염증, 호중구의 활성화, 근육과 지방의 분해 증가 등을 유발하여, 염증 질환은 물론이고 심한 경우에는

패혈성 쇼크까지 유발할 수 있다³⁶⁾. 따라서 활성화된 대식세포에서 염증인자인 NO와 PGE₂ 그리고 이 염증인자들의 합성효소인 iNOS와 COX-2, 염증성 사이토카인의 과발현을 막는 것은 염증반응을 조절함에 있어서 아주 중요한 요소가 될 수 있을 것이다.

LPS에 의해 생성되는 NO와 PGE₂에 도기탕 메탄을 추출물이 미치는 영향을 조사한 결과, 도기탕 메탄을 추출물의 농도에 의존적으로 NO와 PGE₂의 생성량이 효과적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 5). Western blot을 통해 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, LPS 단독 처리에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 발현이 도기탕 메탄을 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 또한 염증성 사이토카인들의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS에 의해 유도되는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1의 생성에 대한 강력한 억제효과를 나타내었다 (Fig. 7). 이러한 결과들을 통해 도기탕 메탄을 추출물의 우수한 항염증 활성을 확인할 수 있었다.

다음으로 도기탕 메탄을 추출물이 염증반응에 관여하는 NF- κ B pathway에 미치는 영향을 알아보았다. LPS 자극에 의해 세포질 내에서 I κ B α 가 인산화되면 I κ B α 와 결합하고 있던 NF- κ B의 subunit인 p65가 자유로워져 핵 안으로 이동해 전사인자로서 작용하여 여러 염증성 사이토카인들과 염증인자들의 발현을 유도하게 된다³⁷⁾. RAW 264.7 세포에 도기탕 메탄을 추출물을 처리하여 LPS에 의해 유도되는 I κ B α 가 인산화와 NF- κ B p65의 핵 안으로의 이동에 대한 영향을 조사한 결과, LPS 단독 처리에 의해 유도되었던 I κ B α 의 인산화와 NF- κ B p65의 핵으로의 이동이 도기탕 메탄을 추출물 처리에 의해 현저한 저해효과가 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 또한, ROS의 저해제인 AEBSF에 의해서 세포질 내에서의 I κ B α 인산화 감소와 핵내의 NF- κ B p65가 효과적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이는 간접적으로 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화에 ROS가 관련되는 것으로 볼 수 있다.

NF- κ B pathway와 함께 MAPKs pathway 또한 염증반응에서 LPS에 의해 활성화되는 세포내 분자이다. MAPKs는 serine/threonine kinase로서 세포내에서 세포의 증식 (proliferation), 분화 (differentiation), 염증, 세포사멸 (apoptosis) 등 다양한 생물학적 반응을 조절한다. MAPKs에는 p44/p42 extracellular regulated kinase (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK의 3가지 형태가 존재한다³⁸⁾. Western blot을 통해 도기탕 메탄을 추출물에 의해 MAPKs의 활성화에 미치는 영향을 알아본 결과, LPS 단독처리에 의해 ERK1/2, JNK1/2, p38의 인산화가 증가되었고 이는 도기탕 메탄을 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 8). 또한, ROS의 저해제인 AEBSF에 의해서도 MAPKs의 활성화가 효과적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이는 간접적으로 LPS에 의해 생성되는 세포내의 ROS가 MAPKs의 활성화에 관련되는 것으로 볼 수 있다.

이상의 실험 결과들로 보아, 도기탕의 메탄을 추출물은 *in vitro* 상에서 항산화 활성을 가질 뿐 아니라, 세포 내 ROS 생성 역시 유의성 있게 감소시켰고, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증관련 인자들의 생성을 효과적으로

억제함을 확인할 수 있었다. 따라서, 도기탕 메탄을 추출물은 천연 항산화제의 개발과 동맥경화, 관절염, 고혈압, 암, 당뇨, 천식 등의 만성 염증성 질환 치료제의 연구에 효과적으로 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

도기탕 메탄을 추출물의 항산화 활성과 마우스 대식세포에서의 항염증 효과에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *in vitro* 상에서 DPPH radical과 RNS의 일종인 nitric oxide의 소거활성을 측정하여 도기탕 메탄을 추출물의 항산화 활성을 확인하였다.
2. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 조사하여 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 (10, 20, 30 μ g/ml)에서 실험을 진행하였다. 이는 도기탕 메탄을 추출물의 항산화 및 항염증 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 약재의 고유한 특성임을 말한다.
3. RAW 264.7 세포에 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 세포 내 ROS 생성을 유도한 결과, 도기탕의 메탄을 추출물의 농도에 의존적으로 ROS의 생성을 억제하였다. 이는 *in vitro* 상의 항산화 활성이 세포 내에서도 적용됨을 의미한다.
4. RAW 264.7 세포에 도기탕 메탄을 추출물을 1시간 전 처리한 후, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 염증을 유발하였다. 그 결과, 도기탕 메탄을 추출물에 의해 LPS로 유도되는 염증인자인 NO, PGE₂와 iNOS, COX-2의 발현, 염증성 cytokines인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1의 생성이 현저히 감소되었다.
5. 도기탕 메탄을 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포질에서 인산화된 I κ B α 의 양과 핵내로 이동한 NF- κ B p65의 양을 확인해 본 결과, 도기탕 메탄을 추출물은 I κ B α 의 인산화를 억제하는 기전을 통해서 NF- κ B 활성을 저해한다는 사실을 알 수 있었고, 염증인자와 염증성 cytokines의 발현을 억제한 것이 NF- κ B의 활성 억제와 연관되어 있다는 것을 알 수 있었다. ROS의 저해제인 AEBSF에 의해서도 NF- κ B pathway의 활성화에 같은 영향을 미치는 것으로 보아 LPS에 의해 생성되는 세포 내의 ROS가 NF- κ B의 활성화와 연관성이 있을 것으로 보인다.
6. 도기탕 메탄을 추출물에 의해 MAPKs의 활성화에 어떠한 영향이 있는지 조사한 결과, LPS 단독처리에 의해 ERK1/2, JNK1/2, p38의 인산화가 증가되었고 이는 도기탕 메탄을 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었다. ROS의 저해제인 AEBSF에 의해서도 MAPKs의 활성이

효과적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이는 간접적으로 LPS에 의해 생성되는 세포내의 ROS가 MAPKs의 활성화에 관련되는 것으로 볼 수 있다.

이러한 실험 결과들로 보아, 도기탕 메탄을 추출물은 항산화 효과 및 항염증 효과를 가지고 있으며, 이는 천연 항산화제의 개발과 동맥경화, 관절염, 고혈압, 암, 당뇨, 천식 등의 만성 염증성 질환 치료제의 연구에 효과적으로 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. 金相贊 外. 方劑學. 서울 : 영림사. 2003 : 389-90.
2. Park SN. Skin aging and antioxidants. J Korean Soc Cosmetic Chem. 1997 ; 23 : 75-132.
3. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev. 1996 ; 76(3) : 839-85.
4. Bhattacharyya A, Pathak S, Kundu M, Basu J. Mitogen-activated protein kinases regulate Mycobacterium avium-induced tumor necrosis factor- α release from macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 ; 34(1) : 73-80.
5. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 2003 ; 24(1) : 25-9.
6. Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. J Immunol. 1999 ; 163(12) : 6403-12.
7. Zhang B, Wang ZF, Tang MZ, Shi YL. Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from chinese traditional medicine. Invest New Drugs. 2005 ; 23(6) : 547-53.
8. Xie F, Zhang M, Zhang CF, Wang ZT, Yu BY, Kou JP. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from Melia

- toosendan fruit. *J Ethnopharmacol*. 2008 ; 117(3) : 463-6.
9. Zhang Y, Qi X, Gong L, Li Y, Liu L, Xue X, Xiao Y, Wu X, Ren J. Roles of reactive oxygen species and MAP kinases in the primary rat hepatocytes death induced by toosendanin. *Toxicology*. 2008 ; 249(1) : 62-8.
 10. Yuen MF, Tam S, Fung J, Wong DK, Wong BC, Lai CL. Traditional Chinese medicine causing hepatotoxicity in patients with chronic hepatitis B infection: a 1-year prospective study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 ; 24(8) : 1179-86.
 11. Gokhale AB, Damre AS, Kulkarni KR, Saraf MN. Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*. *Phytomedicine*. 2002 ; 9(5) : 433-7.
 12. Zhao F, Xu H, He EQ, Jiang YT, Liu K. Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the overproduction of nitric oxide and TNF- α release in LPS-activated macrophages. *J Asian Nat Prod Res*. 2008 ; 10(11-12) : 1045-53.
 13. Ko SG, Kim HP, Jin DH, Bae HS, Kim SH, Park CH, Lee JW. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Lett*. 2005 ; 220(1) : 11-9.
 14. Chen HC, Chou CK, Lee SD, Wang JC, Yeh SF. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res*. 1995 ; 27(1-2) : 99-109.
 15. Jeong GS, Pae HO, Jeong SO, Kim YC, Kwon TO, Lee HS, Kim NS, Park SD, Chung HT. The alpha-methylene-gamma-butyrolactone moiety in dehydrocostus lactone is responsible for cytoprotective heme oxygenase-1 expression through activation of the nuclear factor E2-related factor 2 in HepG2 cells. *Eur J Pharmacol*. 2007 ; 565(1-3) : 37-44.
 16. Yu HH, Lee JS, Lee KH, Kim KY, You YO. *Saussurea lappa* inhibits the growth, acid production, adhesion, and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol*. 2007 ; 111(2) : 413-7.
 17. Oberg F, Haseeb A, Ahnfelt M, Ponten F, Westermark B, El-Obeid A. Herbal melanin activates TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Phytomedicine*. 2009 ; 16(5) : 477-84.
 18. Cemek M, Enginar H, Karaca T, Unak P. In vivo radioprotective effects of *Nigella sativa* L oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. *Photochem Photobiol*. 2006 ; 82(6) : 1691-6.
 19. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med*. 2010 ; 235(6) : 751-60.
 20. Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2009 ; 69(13) : 5575-83.
 21. Kokoska L, Havlik J, Valterova I, Sovova H, Sajfrtova M, Jankovska I. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods. *J Food Prot*. 2008 ; 71(12) : 2475-80.
 22. El-Naggar T, Gomez-Serranillos MP, Palomino OM, Arce C, Carretero ME. *Nigella sativa* L. seed extract modulates the neurotransmitter amino acids release in cultured neurons in vitro. *J Biomed Biotechnol*. Epub 2010 Jun 16.
 23. Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmet Sci*. 1997 ; 19(6) : 299-307.
 24. Xu ML, Li G, Moon DC, Lee CS, Woo MH, Lee ES, Jahng Y, Chang HW, Lee SH, Son JK. Cytotoxicity and DNA topoisomerase inhibitory activity of constituents isolated from the fruits of *Evodia officinalis*. *Arch Pharm Res*. 2006 ; 29(7) : 541-7.
 25. Ho JN, Lee YH, Lee YD, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Cho HY. Inhibitory effect of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005 ; 69(11) : 2227-31.
 26. Kim ST, Kim JD, Lyu YS, Lee MY, Kang HW. Neuroprotective effect of some plant extracts in cultured CT105-induced PC12 cells. *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29(10) : 2021-4.
 27. Yamahara J, Yamada T, Kitani T, Naitoh Y, Fujimura H. Antianoxic action and active constituents of *evodiae fructus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989 ; 37(7) : 1820-2.
 28. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Gen Pharmacol*. 1999 ; 32 : 661-7.
 29. Sutherland H, Khundkar R, Zolle O, McArdle A,

- Simpson AW, Jarvis JC Salmons S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. *Nitric Oxide*. 2001 ; 5 : 475-81.
30. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci*. 2008 ; 97(7) : 2745-56.
31. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:612-6.
32. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1996 ; 20 : 121-7.
33. 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*. 2007 ; 114(3) : 458-62.
34. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*. 1999 ; 20(10) : 1945-52.
35. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 ; 300(2) : 367-75.
36. Abul KA, Andrew HL, Shiv P. 세포분자면역학, 6판. 서울 : 이퍼블릭. 2008 : 271-96.
37. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*. 2005 ; 118 : 4589-92.
38. Ci X, Liang X, Luo G, Yu Q, Li H, Wang D, Li R, Deng X. Regulation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264,7 cells by 2"-hydroxy-3"-en-anhydroicaritin involves down-regulation of NF-kappa B and MAPK expression. *Int Immunopharmacol*. 2010 ; 10(9) : 995-1002.