

RAW 264.7 세포에서 *Euryale ferox* Salisbury 추출물의 항산화기전을 통한 산화적 스트레스·염증반응 억제효과 규명

김영환 · 이민자¹ · 이혜숙 · 김정국 · 박원환*

동국대학교 한의과대학 진단학교실, 1: 한의학연구소

Suppressive Effect of *Euryale ferox* Salisbury Extracts on Inflammatory Response in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells through the Antioxidative Mechanism

Young Hwan Kim, Min Ja Lee¹, Hye Sook Lee, Jung Guk Kim, Won Hwan Park*

Department of Diagnostics 1: Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The stems and branches of *Euryale ferox* Salisbury (EF), are used in Chinese herbal medicine for latent-heat-clearing, antipyretic, detoxicant and anti-inflammatory ailments. This plant is used worldwide for the treatment of many types of inflammatory disease including respiratory infections, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis and play an important role in the immune reaction. Topical natural antioxidants are a useful strategy for the prevention of oxidative stress mediated inflammatory disease. Plants produce significant amounts of antioxidants to prevent the oxidative stress caused by photons and oxygen, therefore they represent a potential source of new compounds with antioxidant activity. This study was designed to evaluate whether EFEA (ethylacetate fraction of EF) may ameliorate oxidative stress and inflammatory status through the antioxidative mechanism in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell line. Treatment of RAW 264.7 cells with EFEA significantly reduced LPS-stimulated inflammatory response in a dose-dependent manner. In conclusion, the EF extracts have anti-inflammatory effects in vitro system, which can be used for developing pharmaceutical drug against oxidative stress and chronic inflammatory disease.

Key words : *Euryale ferox* Salisbury (EF), oxidative stress, antioxidative, anti-inflammatory, RAW 264.7 cell

서 론

생체 내에서는 정상적인 생리상태에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)을 포함하는 유리기(free radical)가 생성되며 이러한 유리기와 이를 제거하는 항산화 방어계(antioxidant defense system)가 균형을 이루고 있다¹⁾. 그러나 세포 내 항산화 방어계와 ROS 및 RNS 간의 불균형이 초래될 때 '산화적 스트레스'가 생성되어 수많은 질환의 생리/병리학적인 현상에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이러한 산화적 스트레스는 생체 내 단백질, 지질, DNA, 당질, 고도불포화지방산과 같은 거대분자를 불

활성화 시켜 파괴시키고, 세포 구조를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시키는 염증 반응에 관여한다^{2,3)}. 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복, 재생하기 위한 생체 방어 반응과정이고, 이 과정에는 국소 혈관, 체액의 각종 조직세포 및 면역세포 등이 작용한다. 정상적으로 외부 침입균에 의하여 유도되는 염증반응은 생체를 보호하기 위한 방어 시스템인 반면, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면, 염증관련 세포에서 ROS 및 RNS가 과다 생성되고, 그 결과 영구적인 유전자의 변형이 야기되어 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 이러한 질환들을 염증질환이라 총칭한다⁴⁾. 염증질환은 광과민성 피부질환, 급성 용혈성 빈혈, 기관지 천식 등의 알러지질환을 비롯하여 노화로 인한 파킨슨질환, 노인성 치매, 암, 당뇨, 고혈압 및 동맥경화 같은 만성 염증성질환(chronic

* 교신저자 : 박원환, 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 진단학교실

· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373

· 접수 : 2011/01/28 · 수정 : 2011/02/20 · 채택 : 2011/03/16

inflammatory disease)을 포함한다⁵⁾.

일반적으로 단핵식균세포들은 면역계를 구성하는 세포이며 식균작용을 나타낸다. 특히 macrophage는 항원에 대한 면역작용의 증추적인 역할을 하는 세포로, 활성화된 macrophage는 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)로써 lymphocyte의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비 등 비특이적 면역작용(non-specific immune response)을 한다. 또한, macrophage는 산화적 스트레스 상황에서 pro-inflammatory cytokine을 증가시키게 되는데 이러한 pro-inflammatory cytokine에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 만들어지는 prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 및 TNF α 등이 있다. 이러한 염증 매개 물질들은 염증반응의 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF κ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE2를 생성하여 염증반응을 촉진한다⁶⁾. Macrophage에서 생성된 염증성 매개물질들은 박테리아 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 면역 자극제 등에 노출될 경우 많은 염증 조직에서 발견되며, 그들의 mRNA 발현 또한 증가하게 된다⁷⁾.

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물 유래 약물, 기능성 식품 및 의약품 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 허브를 포함한 다양한 유용식물을 이용하여 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항알러지, 항비만, 항산화 및 항염 등에 효과가 있는 기능성 물질을 다량 함유하는 자원을 선별하여 이들 유용한 물질들을 약으로, 식품첨가제로 또는 화장품의 원료로 개발하려는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다^{8,9)}. 또한 항산화제에 의해 산화적 스트레스가 차단될 경우 염증반응이 효과적으로 억제된다는 여러 연구결과들이 보고되고 있다^{10,11)}.

검인(芡仁, *Euryale ferox* Salisbury)은 鷓頭實, 雁喙實, 刺蓮蓬實 등으로도 불리며, 생약명은 EURYALES SEMEN이다. 基原을 살펴보면 이 藥은 睡蓮科(수련과; Nymphaeaceae)에 속한 一年生 水生草本인 가시연꽃 *Euryale ferox* SALISB.의 成熟한 種仁을 乾燥한 것으로, 늦은 가을이나 초겨울에 成熟한 果實을 採取하여 果皮를 除去하고 洗淨한 후 다시 外種皮를 除去하고 曬乾한다. 性狀에 있어 이 약은 둥근 球形이고 대개는 쪼개져 있으며, 완전한 것은 지름이 5~8 cm이다. 表面은 褐紅色의 內種皮가 있으며 한쪽 끝은 黃白色으로 全體의 1/3를 차지하며, 움푹 들어가 點狀의 種臍 흔적이 있고, 內種皮를 除去하면 白色을 나타낸다. 質은 비교적 단단하고, 斷面은 白色의 粉狀이다. 成分은 다음과 같다. 種字에는 많은 澱粉이 含有되어 있으며, 100 g 중에 함유되어 있는 성분은 단백질 4.4 g, 지방 0.2 g, 탄수화물 32 g, 粗纖維 0.4 g, 회분 0.5 g, 칼슘 9 mg, 磷 110 mg, 鐵 0.4 mg, vitamin B1 0.40 mg, vitamin B2 0.08 mg, vitamin C 6 mg, nicotine 酸 2.5mg, carotene 微量이 含有되어 있다^{12,13)}. 검인에는 cerebroside 및 tocopherol trimr로서 ferocerebroside A 및 B와 ferotocotrimer C 및 D가 함유되어 있다¹⁴⁾. Zhao 등¹⁵⁾의 보고에 따르면 가시연꽃의 껍질에는 glucosylsterol이 함유되어 있으며, 이러한 성분은 24-methylcholest-5-enyl-3 β -O-pyranoglucoside,

24-ethylchoest-5-enyl-3 β -O-pyranoglucoside 및 24-ethylcholesta-5,22E-dienyl-3 β -O-pyranoglucoside로 알려져 있다. 性味에 대해 性은 平 無毒하고, 味는 甘澁한 것으로 알려져 있으며, 效能 및 主治로는 益腎固精, 補裨止瀉, 祛濕止帶, 治夢遺滑精, 遺尿尿頻, 脾虛久瀉, 白濁, 帶下이라고 하였다^{12,13)}.

검인에 대한 국내·외 연구로 이 등¹⁴⁾은 검인의 각종 추출물에 대한 생리활성을 검토한 결과, 에틸아세테이트 추출물 및 부탄올 추출물이 항산화 효소인 glutathione peroxidase 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 또한 Puri 등¹⁵⁾은 면역능에 대한 검인의 효능을 검토한 결과, 검인이 체액성 면역능을 증가시킨다는 사실을 확인한 바 있다. 한편, Das 등¹⁶⁾은 검인이 심근의 허혈성 재관류 손상에 있어 보호효과를 나타낸다고 보고하였는데, 검인을 심장세포에 처리하였을 때 심장보호효과를 나타내는 단백질인 thioredoxin-1 (Trx-1)과 thioredoxin-related protein-32 (TRP32)의 함량이 증가한 것으로 관찰되었다. 한편, 저자 등의 전 연구에서 검인의 다양한 용매별 추출물은 강력한 항산화 및 LDL 산화 억제효과를 나타내었는데, LDL 산화는 생리활성 물질을 분해하고 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 칼슘 침착으로 결국에는 동맥경화를 유발하게 되는 것으로 알려져 있다.

이처럼 검인의 생리활성에 관한 몇몇 연구가 진행되어 있으나, 검인 에틸아세테이트 추출물을 이용한 산화적 스트레스(oxidative stress)-유도 염증반응 억제효과에 대한 깊은 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 macrophage cell line을 이용하여 검인의 산화적 스트레스 및 염증반응 억제효과를 탐색함으로써 검인의 산화적 스트레스에 기인한 염증성 질환의 예방 및 치료에의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), ethanol (E), hexane (H), dichloromethane (DCM), ethylacetate (EA), butanol (B) 및 methanol (M)은 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Sodium nitroprusside (SNP), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), dimethyl sulfoxide (DMSO), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), tris base, glucose와 gelatin은 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)와 6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였으며, peroxyinitrite는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. CellTiter96 colorimetric assay kit 는 Promega (Madison, WI, USA)에서, NucBusterTM PRO-PREPTM Protein extraction kit는 Novagen (Darmstadt, Germany)에서, Protein extraction solution은 Intron Biotechnology (Gyeonggi-do,

Korea)에서 각각 구입하였다. Polyvinylidene fluoride membrane과 ECL kit Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)에서, mouse PGE₂, TNF α , IL-1 β 및 IL-6 ELISA kit는 Endogen (Thermo Fishen Scientific Inc., Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. β -actin monoclonal antibody (mAb), COX-2 polyclonal antibody (pAb)는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, HO-1 pAb는 Millipore (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. iNOS mAb, NF κ B p65 mAb, I κ B- α pAb, Nrf2 pAb, goat anti-rabbit IgG-HRP 및 goat anti-mouse IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입해 사용하였다. 그 외 기타 시약들은 제1급 정품을 이용하였다.

2. 시료 및 시료의 제조

본 실험의 시료로 사용한 검은(炭仁 Euryale ferox Salisbury, EF)는 2008년산 중국산 제품을 (주)유니허브 (경북 영천, 한국)에서 구입한 후 정선수치하여 사용하였다.

1) EF 70% 에탄올 추출물의 제조

시료 100 g에 2 L의 70% 에탄올을 첨가하여 1차 12 hr, 2차 6 hr, 3차 3 hr 동안 실온에서 교반 추출한 뒤 110 mm-pore-size filter를 통해 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)로 감압 농축한 뒤 동결건조 하여 동결건조분말 시료 0.86 g을 얻었다(수율: 0.86%).

2) EF 계통분획물의 제조

70% 에탄올로 추출한 EF는 hexan : 70% 에탄올 추출물 : 물 (10:9:1, v/v/v)로 분획하여 hexan 추출물을 얻은 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물의 순으로 계통 분획하여 감압 농축하였다. 이때의 용매 회분별 수율은 hexan 추출물(H) 0.17%, 디클로로메탄 추출물(DCM) 0.02%, 에틸아세테이트 추출물(EA) 0.16%, 부탄올 추출물(B) 0.16%, 물 추출물(A) 0.14%였다.

3. 세포 배양

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

4. MTS assay에 의한 세포 생존율 평가

EFEA (Euryale ferox Salisb.의 ethyl acetate fraction)의 세포에 대한 독성은 CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay 방법으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 방법으로 96 well plate에 1×10⁴cell/well의 RAW 264.7 cell을 분주하고 LFEA를 농도별(10-800 μ g/mL)로 처리하거나 LPS와 함께 처리한 후 18시간 동안 배양하였다. Well 당 20 μ L의 MTS solution을

첨가하여, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간 동안 반응 시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 EFEA가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 함께 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 나타내었다.

5. DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

96 well plate에 2X10⁴cell/well의 RAW 264.7 cell을 분주한 후 배양하여 세포를 well에 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 갈아주었다. 세포를 24시간 배양한 후 EFEA 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 다음 1 μ g/mL의 LPS를 주입하고 18시간 배양하였다. 배양 마지막 30분 동안 10 μ M DCFH-DA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후 PBS (pH 7.4)로 DCFH-DA를 3회 씻어낸 후 fluorescence microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광을 측정하여 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대한 ROS 생성을 비교하여 나타내었다.

6. NO 생성 평가

NO 생성 정도는 24 well plate에 5X10⁵ cell/well의 RAW 264.7 cell을 배양하여 세포를 well에 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 24시간 배양하였다. EFEA 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 후 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포 배양액 50 μ L에 Griess reagent인 1% sulfanilamide (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 5% phosphoric acid 50 μ L와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 50 μ L를 첨가하여 10분 간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 농도별로 조제하여 사용하였다.

7. Cytokines 생성 측정

Raw 264.7 cell을 24 well plate에 5X10⁵ cell/well이 되도록 분주하고, 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 18시간 배양하였다. EFEA 추출물을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 후 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 다시 18시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 실험 전까지 -70°C에 보관하였다.

1) PGE₂ 생성 측정

Commercial competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, Minneapolis, USA)를 이용하여 PGE₂의 양을 측정하였다. Anti-mouse PGE₂로 pre-coating된 96 well plate에 배양액 혹은 standard reagent 100 μ L씩을 넣은 후 primary antibody solution과 PGE₂ conjugate를 각각 50 μ L씩 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. Washing buffer로 4회 세척한 후 substrate

solution 200 μ L를 첨가하여 30분 간 빛을 차단한 조건 하에서 반응 시킨 다음, stop solution 50 μ L를 처리하고 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정된 흡광도 값을 550 nm 값으로 보정하였다.

2) TNF α , IL-1 β 생성 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)를 이용하여 TNF α 와 IL-1 β 의 양을 측정하였다. Anti-mouse TNF α 와 Anti-mouse IL-1 β 로 precoating된 96 well plate에 각각 배양액 50 μ L 혹은 standard reagent를 넣은 후 Biotinylated antibody reagent 50 μ L씩을 첨가하여 2시간 반응시켰다. Washing buffer로 5회 세척한 후, 희석된 streptavidin-HRP concentrate를 100 μ L 첨가하여 30분 간 반응 시킨 다음 plate를 세척하였다. 여기에 TMB substrate 100 μ L를 첨가하여, 빛을 차단한 조건 하에서 30분 간 반응 시킨 후, stop solution 100 μ L를 처리하고 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정된 흡광도 값을 550 nm 값으로 보정하였다.

3) IL-6 생성 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)를 이용하여 IL-6의 양을 측정하였다. Anti-mouse IL-6로 precoating된 96 well plate에 배양액 50 μ L를 넣어 2시간동안 반응시킨 후 Washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 biotinylated antibody reagent 50 μ L를 첨가하여 1시간 반응시킨 후 세척한 다음, 희석된 streptavidin-HRP concentrate를 100 μ L 첨가하여 30분 간 반응 시켰다. Plate를 세척한 후, TMB substrate 100 μ L를 첨가하여, 빛을 차단한 조건 하에서 30분간 반응 시킨 후, stop solution 100 μ L를 처리하고 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정된 흡광도 값을 550 nm 값으로 보정하였다.

8. Immunoblotting

100 mm dish에 2×10^6 cell/well의 RAW 264.7 cell을 배양하여 세포를 well에 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 18시간 배양하였다. EFEA 추출물을 농도별(0~400 μ g/mL)로 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 1시간 배양한 다음 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 18시간 후 세포를 수확하여 각각 nuclear fraction과 total cell fraction을 추출하는데 사용하였다. 전기영동을 위한 total cell fraction의 단백질 추출은 냉각 tris buffered saline (TBS: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 8.0)으로 세포를 씻은 후, PRO-PREPTM Protein Extraction Solution (Intron Biotechnology, Seoul, Korea) 200 μ L를 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 30분 간 반응 시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 13,000 rpm (SORVALL, Langensfeld, Germany)으로 원심분리하고 얻은 상층액은 Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동일한 양의 단백질로 정량하였다. 한편, NucBusterTM Protein Extraction Kit (Novagen, Darmstadt, Germany)를 이용하여

cytoplasmic 및 nuclear fraction에서 단백질을 추출하였다. 즉, 냉각 TBS로 씻은 세포에 150 μ L의 NucBuster Extraction Reagent 1을 첨가하여 vortex한 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분 간 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액 (cytoplasmic fraction)을 제거하고 남은 침전물에 75 μ L의 NucBuster Extraction Reagent 2와 100 mM DTT 및 100X Protease Inhibitor Cocktail을 각각 1 μ L씩 첨가한 후 vortex하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 13,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 상층액 (nuclear fraction)을 모아 동일한 양의 단백질로 정량하였다. 얻어진 단백질은 7.5% (iNOS)와 12% (COX-2, I κ B α , NF κ B p65, HO-1, Nrf2 및 β -actin) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 polyvinylidene fluoride transfer membrane으로 transfer 하였다. 항체의 비특이적인 결합을 억제시키기 위해 membrane을 blocking buffer (5% skim milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 3회 세척한 다음, secondary antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시키고 TBST로 3회 세척한 후, ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜 X-ray film 상에서 단백질의 발현을 확인하였다. Band density 정량은 VisionWorks Image Software (UVP, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다. β -actin monoclonal antibody (mAb), COX-2 polyclonal antibody (pAb)는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, HO-1 pAb는 Millipore (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. iNOS mAb, NF κ B p65 mAb, I κ B α pAb, Nrf2 pAb, goat anti-rabbit IgG-HRP 및 goat anti-mouse IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입해 사용하였다.

9. 통계처리

통계 분석은 SPSS version 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $p < 0.05$ 에서 유의한 차이가 있는 경우 Tukey test를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 세포 생존율

마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell에 대한 EF EA분획물 (EFEA)의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. EFEA 추출물을 단독으로 농도별(0, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 μ g/mL)로 19시간 처리하였을 때 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 한편, LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 경우 RAW 264.7 cell에 EFEA를 농도별로 처리하였을 때 400 μ g/mL의 농도까지는 세포독성이 관찰되지 않았으나 800 μ g/mL 이상의 농도에서는 세포 생존율을 40% 이상 감소시켰다(Fig. 1). 따라서 EFEA가 RAW 264.7 cell의 세포 생존율에 영향을 주지 않는

400 µg/mL의 농도로 이후 실험을 진행하였다(Fig. 1).

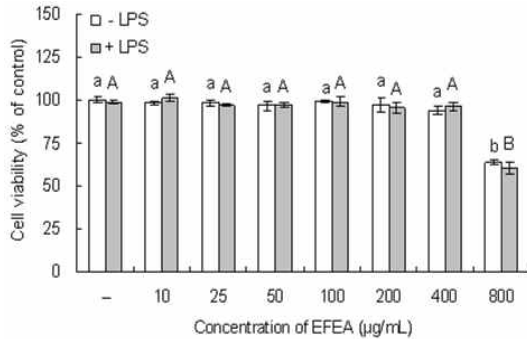


Fig. 1. Effect of ethyl acetate fraction from *Euryale ferox* Salisb. (EFEA) on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was evaluated by MTS assay. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with or without 1 µg/mL LPS for 18 h. Values are mean±S.D. (n=3). *a-bBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

2. EFEA의 intracellular ROS 생성 저해

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7에서 EFEA 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 DCFH-DA assay를 통해 알아보았다. DCFH-DA는 세포에 전처리하면 세포 안으로 쉽게 들어가고, H₂O₂와 만나면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 DCF의 형광강도를 측정하면 세포 내의 ROS 생성량을 측정할 수 있다¹⁷. 또한 LPS는 세포 내의 ROS를 효과적으로 유발시키는 물질로 알려져 있다¹⁸. 본 실험 결과, EFEA 추출물을 처리한 군에서 LPS 단독으로 처리한 control군에 비해 농도-의존적으로 ROS 생성이 유의적으로 억제되었고, 400 µg/mL 농도에서 ROS 생성이 control군에 비해 83% 이상 감소하였다(Fig. 2).

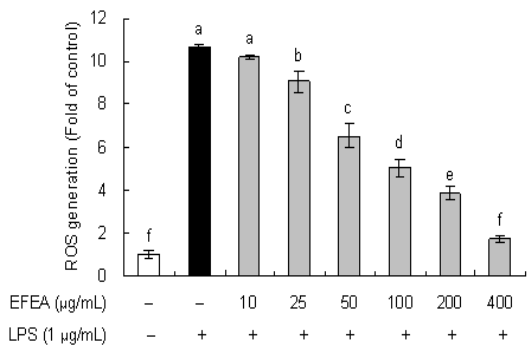


Fig. 2. Effects of EFEA on LPS-induced intracellular ROS generation in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. In the last 30 min of treatment, 10 µM DCF-DA was added. Values are mean±S.D. (n=3). Values are expressed as compared with vehicle.*a-fBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

따라서 in vitro 상에서의 항산화 활성이 세포 내에서도 유효함을 확인할 수 있었다. ROS와 같은 free radical로부터 생체 내 물질을 보호할 수 있는 항산화제 및 항산화 방어계는 활성산소 라디칼의 발생을 미연에 방지하는 시스템과 생성된 라디칼을 포착·제거하는 시스템, 손상된 조직의 회복과 신생 기전에 관여

하는 세 가지 시스템으로 분류할 수 있다¹⁹. 이상의 실험결과로 미루어 보아 플라보노이드, 폴리페놀을 함유하고 있는 EFEA는 위에 언급한 세 가지 시스템 모두를 통해 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다(Fig. 2).

3. EFEA의 NO 생성 및 iNOS 발현 저해

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7에서 EFEA가 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS 처리에 의해 활성화된 cell에서 생성되어 배양액 중으로 유리된 NO의 농도를 NO₂의 형태로 Griess 시약을 사용하여 정량하였다. 이는 NO가 매우 불안정하며 NO₂ 형태로 즉시 변환되기 때문이다. 그 결과, LPS를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군 보다 NO 생성이 20 배 가량 증가되었으며, 이러한 LPS의 산화적 스트레스 유발에 관해서는 이미 여러 문헌에서 보고된 바 있다^{20,21}. 산화적 스트레스 유발 상황에서 EFEA는 10 µg/mL 농도 이상에서 NO 생성을 농도-의존적으로 억제하였고, 특히, 400 µg/mL 농도에서 LPS 단독 처리군에 비해 79%까지 NO 생성이 억제되었다(Fig. 3A).

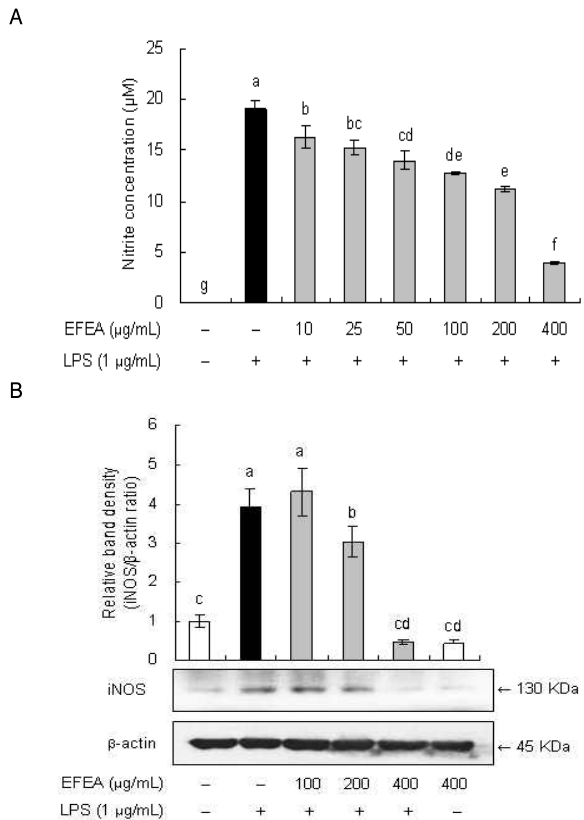


Fig. 3. Effects of EFEA on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite levels. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h and subjected to western blotting using antibody specific for iNOS. The data was calculated and compared with vehicle from densitometry quantification of bands. Values are mean±S.D. (n=3). *a-gBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

Macrophage에서 NO의 생성은 NO 합성 효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현과 직접적으로 연관되어 있다²²⁾. 따라서 본 실험에서는 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7에서 EFEA 추출물이 iNOS protein 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS 처리 1시간 전에 EFEA 추출물을 농도별로 전처리하여 배양한 후, iNOS의 protein 발현 변화를 immunoblotting으로 확인하였다.

LPS는 Gram 음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 NO의 생성을 상승적으로 증가시킨다고 보고되고 있다²³⁾. 본 실험 결과, LPS를 처리하지 않은 무처리군에 비해 LPS를 처리한 군에서 iNOS protein 발현이 유의적으로 증가하였고, LPS와 함께 EFEA를 처리한 군에서 protein 발현이 유의성 있게 감소되었으며 400 µg/mL 농도에서는 무처리군 보다 더 낮은 protein 발현 수준을 보였다(Fig. 3B). 따라서, 본 실험에서 EFEA 추출물은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 상황에서 iNOS 발현을 효과적으로 억제함으로써 NO 생성을 감소시키고, 항산화·항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Wang 등²⁴⁾과 Hsieh 등²⁵⁾은 각각 *Polygala japonica*로부터 분리한 triterpenoid saponin과 *Chamaecyparis formosensis* Matsumura이 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 RAW 264.7 cell에서 NO 생성을 저해한다고 보고한 바 있고, Suh 등²⁶⁾의 보고에서는 천연에 존재하는 biflavonoid인 ochnaflavone이 LPS로 유도되는 NO 생성을 ERK1/2와 NFκB regulation에 의해 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 본 실험에서 EFEA는 NO 생성 억제능이 뛰어난 것으로 나타났으며, 이는 EFEA에 함유된 페놀물질에 의한 것으로 보인다(Fig. 3).

4. EFEA의 PGE2 생성 및 COX-2 발현 저해

마우스 대식세포인 RAW 264.7에서 EFEA가 LPS에 의해 유도되는 염증성 인자인 PGE2 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE2를 정량하였다. 그 결과 PGE2 생성이 EFEA 농도의존적으로 유의성 있게 감소하였으며, 특히 400 µg/mL의 농도에서는 LPS 단독 처리군에 비해 74%까지 PGE2 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). PGE2는 COX에 의해 arachidonic acid로부터 만들어진다. 따라서, RAW 264.7 세포에서 EFEA가 LPS로 유도된 COX-2의 protein 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, LPS를 처리하지 않은 무처리군에 비해 LPS를 처리한 군에서 iNOS protein 발현이 유의적으로 증가하였고, LPS와 함께 EFEA를 처리한 군에서 protein 발현이 현저히 감소되었으며 400 µg/mL 농도에서는 무처리군 보다 오히려 더 낮은 수준을 보였다(Fig. 4B). 따라서, 본 실험에서 EFEA 추출물은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 산화적 스트레스를 유발 상황에서 COX-2의 발현을 효과적으로 억제함으로써 PGE2 생성을 감소시키고, 항산화·항염증 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

COX에 대해서는 1990년대 초반에 주로 연구되었는데 이는 COX-1과 COX-2의 두 가지 이성효소(isozyme)가 존재한다. COX-1은 대부분의 생체조직에서 일정 수준으로 발현되어 위, 신장기능의 유지, 혈소판 생성에 필요한 PGs의 합성에 관여하나²⁷⁾,

COX-2는 일반 정상조직에서는 발현 정도가 매우 낮고 염증성 인자, 세포성장인자, 발암원 등 스트레스에 노출된 대식세포에서 발현되는 효소로 알려져 있어 염증 및 암세포 성장에 주요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 따라서, COX-2에 의한 PGE2 생성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 EFEA는 COX-2 발현을 저해하여 PGE2 생성을 효과적으로 억제하였으므로 동맥경화를 비롯한 고혈압, 당뇨, 암, 관절염과 같은 만성 염증성 질환의 예방 및 치료에 효과적으로 적용 가능할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 4).

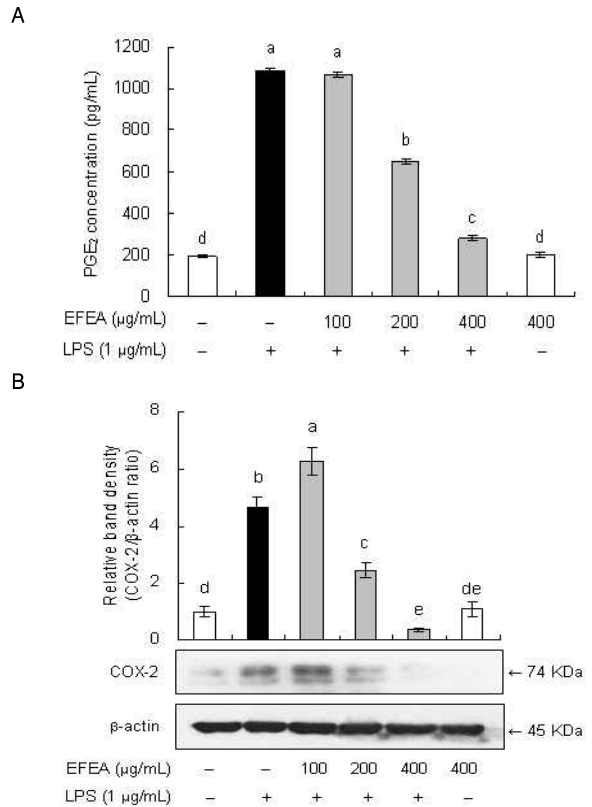


Fig. 4. Effect of EFEA on LPS-induced prostaglandin E2 (PGE2) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. The culture supernatants were subsequently isolated and the amount of PGE2 production was measured using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h and subjected to western blotting using antibody specific for COX-2. The data was calculated and compared with vehicle from densitometry quantification of bands. Values are mean±S.D. (n=3). *a-eBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

5. EFEA가 pro-inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향

EFEA가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 proinflammatory cytokine의 생성을 억제하는지를 알아보기 위해 ELISA kit를 이용하여 tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin-1β (IL-1β) 및 interleukin-6 (IL-6)의 발현을 측정하였다. 그 결과, TNFα는 LPS와 함께 EFEA를 처리하였을 때 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 5).

또한 IL-1β는 EFEA 추출물 100, 200, 400 µg/mL 처리 시

control군에 비해 100 µg/mL 이상에서 농도-의존적으로 현저히 감소하는 경향을 나타내었으며(Fig. 6A), IL-6도 EFEA 100 µg/mL 농도에서부터 유의적으로 감소되는 경향을 나타내어 400 µg/mL에서는 무처리군과 유사한 수준을 보였다(Fig. 6B).

IL-6는 TNFα나 IL-1β 같은 요인 외에도 LPS에 의해 유도된다. 또한 IL-6는 염증유도 cytokine으로서 내인성 발열인자(pyrogen)로 작용하며 면역 체계와 조혈 등에 다양한 영향을 미친다. 이들 pro-inflammatory cytokine은 in vitro 및 in vivo 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다²⁹. 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 외부자극이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, PGs, hydroxyeicosa-tetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 만성퇴행성 질환을 유발하게 된다³⁰. 따라서, EFEA는 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 pro-inflammatory cytokine인 TNFα, IL-1β 및 IL-6의 발현을 유의적으로 저해함으로써 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 산화적 스트레스에 의한 염증성 병변 과정을 효과적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 5-6).

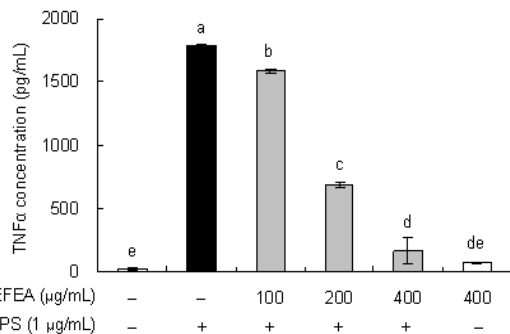


Fig. 5. Effect of EFEA on LPS-induced tumor necrosis factor α (TNF α) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. The culture supernatants were subsequently isolated and the amount of TNFα production was measured using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions. Values are mean±S.D. (n=3). *a-eBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

6. EFEA가 NFκB 활성화에 미치는 영향

NFκB는 cytokine 반응, 염증, 세포성장 조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자로 inducible NFκB가 염증질환의 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다³¹. LPS로 유도된 산화적 스트레스는 AP-1 및 NFκB와 같은 염증성 반응을 매개하는 전사인자들을 활성화시켜, 다양한 pro-inflammatory cytokine 뿐만 아니라 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 촉진하여 염증반응을 일으킨다. 많은 세포에서 NFκB는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor로³² 정상적인 상태에서는 세포질 내에 p50, p65, IκB의 trimer의 복합체를

형성하여 불활성 형태로 존재하다가 산화적 스트레스에 의해 IκB의 인산화가 일어나게 되면 p50/p65 heterodimer가 핵속으로 translocation 되어 연속적인 DNA 결합을 초래하여 다양한 염증반응을 매개하는 것으로 알려져 있다³³.

따라서, LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 EFEA 추출물이 NFκB 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 EFEA 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 다음 LPS (1 µg/mL)를 첨가하여 18시간 배양한 후, 세포질에서의 IκBa 발현과 핵에서의 NFκB 발현을 western blotting으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 세포질에서의 IκBa 발현은 LPS를 처리하지 않은 무처리군에 비해 LPS 처리 시 유의적으로 낮게 나타났고, LPS와 함께 EFEA를 처리하였을 때 LPS 처리군과 비교하여 현저히 높은 IκBa 발현을 나타내었다(Fig. 7A). 또한 핵에서의 NFκB p65의 발현은 LPS 처리군에서 가장 높게 나타났으며, EFEA 100 µg/mL 이상에서는 유의적인 발현 감소를 보였다(Fig. 7B).

이는 LPS에 의해 자극이 가해질 때 세포질에서 불활성형으로 존재하던 IκBa가 인산화되면서 NFκB가 핵 내로 translocation 되어 NFκB가 활성화 되는데, 이때 EFEA가 이러한 LPS를 통한 IκBa의 인산화를 저해하여 세포질 내의 IκBa 발현을 증가시키고 핵으로의 NFκB p65 translocation을 억제함으로써 NFκB의 활성을 유의적으로 감소시켰음을 의미한다(Fig. 7).

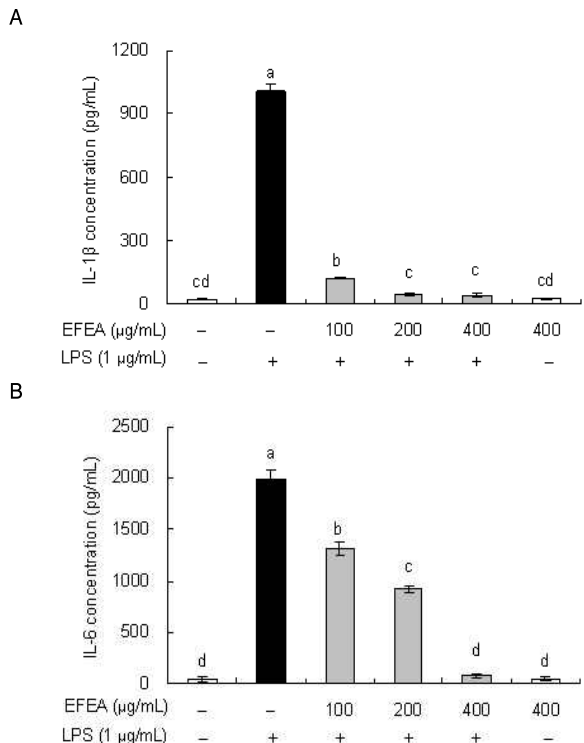


Fig. 6. Effect of EFEA on LPS-induced Interleukin (IL)-1β and IL-6 production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1 h before being incubated with 1 µg/mL LPS for 18 h. The culture supernatants were subsequently isolated and the amount of IL-1β (A) and IL-6 (B) production were measured using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions. Values are mean±S.D. (n=3). *a-dBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

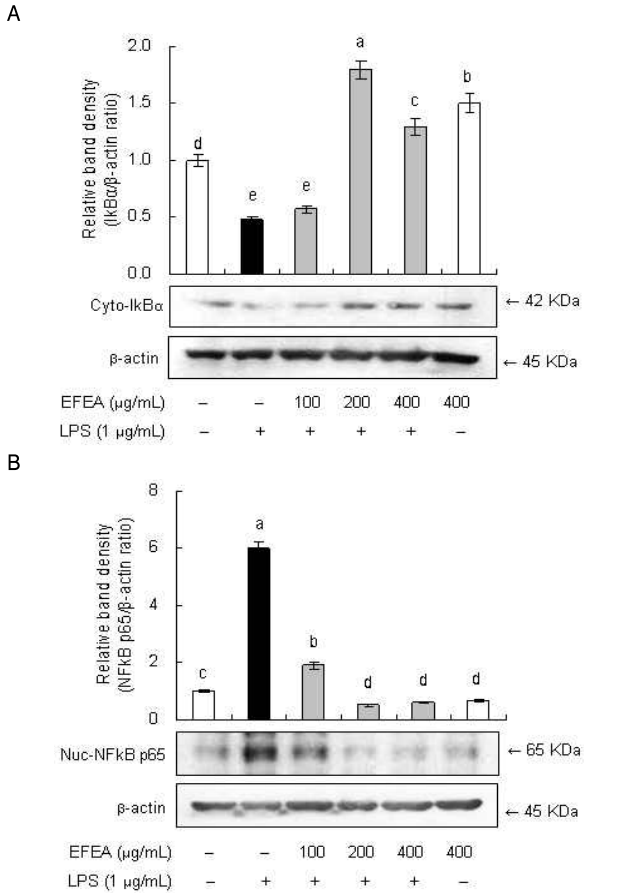


Fig. 7. Effect of EFEA on LPS - induced NFκB activation in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1h before being incubated with 1 μg/mL LPS for 18h and subjected to western blot to analysis expression of cytosolic IκBα (A) and nuclear NFκB p65 (B). A representative figure calculated and compared with vehicle from quantification of bands by densitometer. Values are mean±S.D. (n=3). *a-eBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

7. EFEA가 HO-1 및 Nrf2 발현에 미치는 영향

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 EFEA 추출물이 heme oxygenase-1 (HO-1) 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 EFEA 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 다음 LPS (1 μg/mL)를 첨가하여 각각 8시간 배양한 후 HO-1의 protein 발현을 관찰하였다. 그 결과 LPS 처리 시 HO-1의 발현이 유의적으로 증가하였으며 이는 세포의 자가 보호반응으로 여겨진다. 또한 EFEA를 농도별로 처리하였을 때 protein 수준에서 HO-1의 발현이 농도-의존적으로 증가하였으며 특히, 400 μg/mL에서는 현저한 발현 증가 양상을 보였다(Fig. 8A). 한편, HO-1 발현을 유도하는 전사인자인 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 발현에 미치는 EFEA의 영향을 western blotting으로 살펴본 결과, HO-1의 발현 결과와 비슷한 경향을 보였다. LPS 처리 시 Nrf2 발현이 현저히 증가하였으며 LPS와 EFEA를 함께 처리했을 때 농도-의존적인 발현 증가를 나타내어 Nrf2에 의해 HO-1의 발현이 증가한 것으로 사료되었다(Fig. 8B).

항산화반응에 관련된 유전자의 발현은 각각 유전자 promoter에서 발견되는 특이한 염기서열인 antioxidant

response element (ARE)에 의해서 전사단계가 조절되어진다. ARE에 의해서 조절되는 주요 효소로는 HO-1, NAD(P)H:quinnine oxidoreductase-1 (NQO1), glutathione S-transferase (GST), γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS), thioredoxin reductase-1, thioredoxin 등이 있다³⁴. 이러한 ARE를 통한 전사의 활성화는 주로 basic region-leucine zipper (bZIP) 구조를 공유하는 Nrf2에 의해 조절되어진다³⁵. 또한 산화적 스트레스는 MAPK signaling pathway를 활성화시켜 스트레스성 효소들 뿐만 아니라 Nrf2-Maf-의존성 ARE 유전자를 발현하여 생체 방어 기능을 갖거나 세포성장 또는 세포사를 조절하는 것으로 보고되고 있다³⁶.

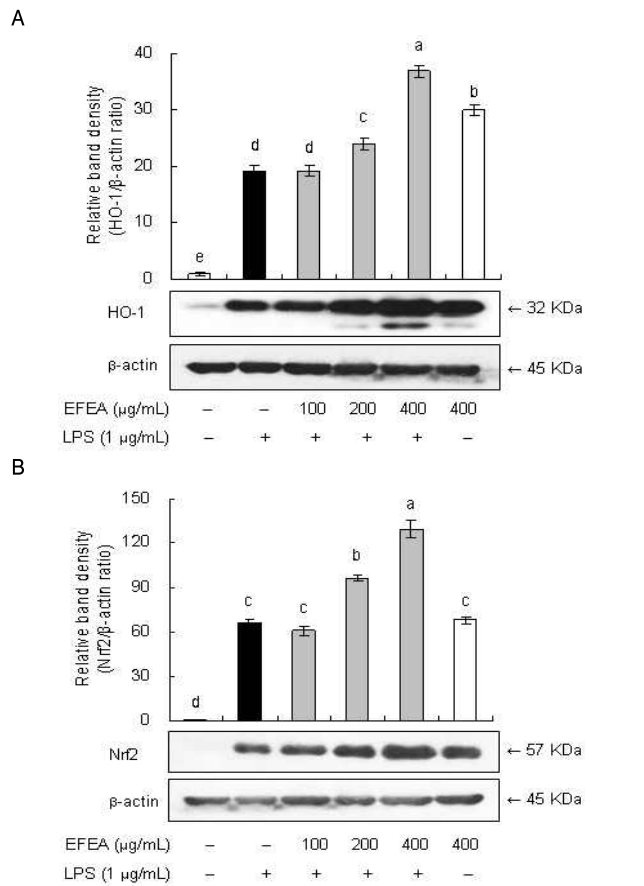


Fig. 8. Effect of EFEA on HO-1 and Nrf2 expression in LPS - stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentration of EFEA for 1h before being incubated with 1 μg/mL LPS for 8h and subjected to western blot to analysis expression of HO-1 (A) and nuclear Nrf2 (B). A representative figure calculated and compared with vehicle from quantification of bands by densitometer. Values are mean±S.D. (n=3). *a-eBars with different letters are significantly different at p< 0.05 by Tukey test.

HO는 여러 조직세포에 존재하는 microsomal 효소로, hemoglobin을 비롯한 heme을 biliverdin/bilirubin, 일산화탄소 (CO) 및 free radical (Fe²⁺)로 유리시킨다³⁷. HO는 HO-1, HO-2 및 HO-3의 세 가지 isozyme이 존재하는데, HO-2와 HO-3는 구형 효소로 HO-2는 자극에 상관없이 발현된다. 반면, HO-1은 HSP계의 한 종류로 32kD의 분자량을 갖는 유도성 이형체로서

LPS, 저산소증, 과산소증, heat shock, UV 및 방사선 등과 같은 다양한 스트레스성 자극에 의해 발현되어 산화적 스트레스로부터 생체를 방어하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있으며³⁸⁾, HO-1을 knockout 시켰을 때 산화적 스트레스에 더 민감한 것으로 보고되었고, 이러한 기전은 Nrf2에 의한 전사 활성을 통해 유도된다.^{39,40)}

따라서, EFEA는 핵에서의 Nrf2 발현을 증가시켜 HO-1의 발현을 유도함으로써 산화적 스트레스에 대해 강력한 보호작용을 나타낼 것으로 여겨진다(Fig. 8).

결 론

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 macrophage cell line에서 EFEA 추출물의 산화적 스트레스 및 염증 반응 억제효과를 살펴 본 결과, EFEA는 intracellular ROS의 생성을 농도의존적으로 감소시켰고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시켰으므로 염증인자인 NO 및 PGE2 생성을 유의적으로 감소시켰으며, pro-inflammatory cytokine인 TNF α , IL-1 β 및 IL-6의 발현을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 EFEA는 I κ B α 의 인산화 및 NF κ B의 핵 내로의 translocation을 유의적으로 억제하였고, Nrf2의 발현에 영향을 미쳐 HO-1의 발현을 유도함으로써 산화적 스트레스에 대해 강력한 보호작용을 나타낼 것으로 여겨진다.

이상의 실험결과로부터 본 실험에 사용된 EF는 산화적 스트레스와 염증에 의해 유발되는 만성 염증관련 질환을 항산화·항염증 기작을 통해 예방 및 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 47: 412-426, 1982.
2. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 30: 31S-38S, 1991.
3. Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-247, 2000.
4. Azard, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 11(1):11-15, 2008.
5. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14, 1984.
6. Forman, H.J., Torres, M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.* 22(4-5):189-216, 2001.
7. Allenm, R., Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499, 2000.
8. Kim, H.J., Ahn, M.S., Kim, G.H., Kang, M.H. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* extracts

- prepared from different aerial part. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 799-804, 2006.
9. Ali, K.A., Abdelhak, M., George, B., Panagiotis, K. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. *Food Chemistry* 89: 27-36, 2005.
10. Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF κ B in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 126(3):673-680, 1999.
11. Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20(10):1945-1952, 1999.
12. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 共編, 「本草學」, 서울, 永林社, pp 233-234, 1991.
13. 鄭普變 辛民教共編, 「鄉藥(生藥)大辭典」, 서울, 圖書出版 永林社, pp 938-940, 1990.
14. Lee, S.E., Ju, E.M., Kim, J.H. Antioxidant activity of extracts from *Euryale ferox* seed. *Exp Mol Med.* 34: 100-106, 2002.
15. Puri, A., Sahai, R., Singh, K.L., Saxena, K.C. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *J Ethnopharmacol.* 71: 89-92, 2000.
16. Das, S., Der, P., Raychaudhuri, U., Maulik, N., Das, D.K. The effect of *Euryale ferox* (Makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 289(1-2):55-63, 2006.
17. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* 186: 1-85, 1990.
18. Sampath, V., Radish, A.C., Eis, A.L., Broniowska, K., Hogg, N., Konduri, G.G. Attenuation of lipopolysaccharide-induced oxidative stress and apoptosis in fetal pulmonary artery endothelial cells by hypoxia. *Free Radic Biol Med.* 46(5):663-671, 2009.
19. Djordjevic, V.B. Free Radicals in Cell Biology. *International Review of Cytology* 237: 57-89, 2004.
20. Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1):558-567, 2005.
21. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest.* 103(1):129-135 1999.
22. Liu, Y.H., Lin, S.Y., Lee, C.C., Hou W.C. Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonol

- hydroxamic acid. Food Chemistry 109(1):159-166, 2008.
23. Yoshitake, J., Kato, K., Yoshioka, D., Sueishi, Y., Sawa, T., Akaike, T., Yoshimura, T. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. Nitric Oxide 18(3):223-228, 2008.
 24. Wang, H., Gao, J., Koua, J., Zhua, D., Yu, B. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. Phytomedicine 15: 321-326, 2008.
 25. Hsieh, Y.H., Kuo, P.M., Chien, S.C., Shyur, L.F., Wang, S.Y. Effects of *Chamaecyparis formosensis* Matsumura extractives on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Phytomedicine 14(10):675-680, 2007.
 26. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H. The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF- κ B regulation, in RAW264.7 cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 447(2):136-146, 2006.
 27. Amiram, R., Angela, W., Ned, S., Philip, N. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. J. Bio. Chem. 263: 3022-3024, 1988.
 28. Sunnaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J.T., Araki, R., Devito, B., Weksker, B.B., Dannenberg, A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. Cancer Res. 56: 4424-4429, 1996.
 29. Rios, J.L., Recio, M.C. Natural products as modulators of apoptosis and their role in inflammation. Studies in Natural Products Chemistry 33(13):141-192, 2006.
 30. Gorczynski, R.M. Understanding classical conditioning of immune responses. Neuro Immune Biology 1: 237-254, 2005.
 31. Kalayarasan, S., Prabhu, P.N., Sriram, N., Manikandan, R., Arumugam, M., Sudhandiran, G. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. European Journal of Pharmacology 606(1-3):162-171, 2009.
 32. Grimm, S., Baeuerle, P.A. The inducible transcription factor NF κ B: structure-function relationship of its protein subunits. Biochem J. 290: 297-308, 1993.
 33. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kranke, M., Ben-Neriah, Y., Baeuerle, P.A. Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. Nature 365: 182-185, 1993.
 34. Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. Free Radic Biol Med. 36: 1199-1207, 2004.
 35. Huang, H.C., Nguyen, T., Pickett, C.B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. J Biol Chem. 277: 42769-42774, 2002.
 36. Yu, R., Chen, C., Mo, Y.Y., Hebbar, V., Owuor, E.D., Tan, T.H., Kong, A.N. Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Induces Antioxidant Response Element-mediated Gene Expression via a Nrf2-dependent Mechanism. J Biol Chem. 275(51):39907-39913, 2000.
 37. Allanson, M., Reeve, V.E. Immunoprotective UVA (320-400nm) irradiation upregulates Heme Oxygenase-1 in the dermis and epidermis of hairless mouse skin. The Journal of Investigative Dermatology 122: 1030-1036, 2004.
 38. Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M. Heme oxygenase and heme degradation. Biochemical and Biophysical Research Communications 338(1):558-567, 2005.
 39. Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M.K., Cook, J.L. Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. J Biol Chem. 274(37):26071-26078, 1999.
 40. Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. J Clin Invest. 103(1):129-135, 1999.