

RAW 264.7 대식세포 내에서 남정목 열매 추출물의 항염증 효과

문주호 · 고흥 · 신선미 · 김기태*

세명대학교 한의과대학 내과학교실

Abstract

Anti-Inflammatory Effect of Extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. fruits in RAW 264.7 Macrophages

Ju-ho Moon · Heung Go · Seon-mi Shin · Ki-tae Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Objectives

This study was designed to investigate the anti-inflammatory effect of extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. fruits(LOF) in RAW 264.7 Macrophages stimulated with lipopolysaccharide(LPS).

Methods

We examined productions of nitric oxide(NO), reactive oxygen species(ROS), inducible isoforms of NO synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) to investigate the anti-inflammatory effect of LOF extracts. In addition, we measured generation of pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-6).

Results

Cell viability showed that LOF extracts had no cytotoxicity in Raw 264.7 cells.

The treatment with LOF extracts significantly decreased the generation of NO and pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-6) in LPS-stimulated macrophage cells.

Furthermore LOF extracts inhibited intracellular ROS generation dose dependently and reduced the expression of iNOS, COX-2 proteins.

Conclusions

These results showed that the LOF extracts had an anti-inflammatory effect on LPS-stimulated Raw 264.7 cells.

These findings provide scientific support for the use of this *Ligustrum obtusifolium* S. for inflammatory-related diseases.

Key Words

anti-inflammation, *Ligustrum obtusifolium* S., nitric oxide, nitric oxide synthase, reactive oxygen species (ROS)

* 교신저자 : 김기태 / 소속 : 세명대학교부속 제천한방병원

TEL: 043-649-1815 / E-mail: onehorn@daum.net

투고일 : 2013년 11월 29일 수정일 : 2013년 12월 23일 게재확정일 : 2013년 12월 24일

I. 서론

염증반응은 면역세포가 외부 물질의 유입을 인지하여 인체를 보호하기 위하여 다양한 매개물질들을 분비함으로써 발생하는 방어장치의 하나이다¹⁾. 인체에서 발생하는 대부분의 급만성 질환의 병태는 염증반응을 포함하거나, 염증반응을 주된 병태기전으로 이해하고 있다. 심장질환 및 뇌졸중 등 혈관질환에서는 혈관내피의 손상과 복구 과정에서의 염증과 그 수복과정에서 병변이 진행되는 것으로 알려져 있고, 암세포의 성장과 발달에서도 국소 만성 염증반응에 대한 조직변성과 관련성이 높은 것으로 알려져 있다²⁻⁴⁾. 초기 염증반응에 반응하는 면역세포 중 대식세포는 많은 염증 매개 물질들을 생산하는데, proinflammatory cytokine, nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂)를 생성하고 염증반응이 촉발되면 통증, 부종, 열 등의 관련 증상이 발현된다⁵⁻⁷⁾.

염증성 변화에 있어서 산화성 부하(oxidative stress)는 중요한 기전 중 하나로 지목되는데, 다양한 원인으로 인해 증가한 체내 산화적 스트레스는 염증반응이 유발되기 용이한 환경을 조성하여 만성염증 유발을 유도한다. 산화적 스트레스에 대한 처치는 건강인에 있어서 질병 예방의 측면 뿐만 아니라, 난치성 만성질환을 가진 환자들에 있어서 병의 진행을 막고 병발할수 있는 합병증을 예방할수 있는 중요한 요건이 되므로 최근 다양한 건강기능식품, 영양제 등에 대한 관심도가 증가 되고 있는 실정이다⁸⁾. 실제로 항산화 효과를 지닌 약제 혹은 식품을 섭취하면 산화적 스트레스와 관련된 요인들이 감소하여 만성적인 염증반응이 호전반응을 나타내었다고 보고되었다^{9,10)}.

남정목 열매(*Ligustrum obtusifolium* S. fruits. LOF)는 염증질환, 성기능감소, 혈액순환장애 등에 유효한 한약재로 알려져 있다. 광나무(*Ligustrum lucidum*), 쥐똥나무(*Ligustrum robustum*)와 같은 물푸레나무과

(Oleaceae) 쥐똥나무속(*Ligustrum*)에 속한 몇몇 종들은 유럽, 중국, 일본에서 수세기 동안 허브차나 약재로 사용되어 왔고, 특히 일본과 중국에서는 오랫동안 광나무(*L. lucidum*)를 간염과 노화 관련 증상을 치료하기 위해 사용하였는데, 최근의 약물학적 연구에 의하면 이들 쥐똥나무속에 속한 종들은 항산화, 항돌연변이 작용을 하며 간과 신경을 보호하는 기능이 확인되었다¹¹⁻¹⁴⁾. 동물실험 연구에서 고지방식을 투여한 스트렙토조토신 유도 당뇨 쥐에서 항고혈당 작용이 보고되었는데¹⁵⁾. LOF의 항염증 및 항산화 효능에 대한 실험적 지지 연구는 아직 보고되지 않았다.

이에 남정목 열매(*Ligustrum obtusifolium* S. fruits. LOF)를 이용하여 산화적 스트레스 및 염증관련 인자들에 대한 영향을 확인하기 위해 LPS 자극 이후 LOF 추출물이 대식세포 내에 산화질소(NO)와 활성산소(ROS), iNOS와 COX-2의 발현, 전염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6의 생성을 억제하는지 여부를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

남정목 열매(*Ligustrum obtusifolium* S. fruits. LOF)는 충청북도 제천 약제시장에서 구입했다. LPS from *Escherichia coli* (serotype 0127:B8)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입 사용했다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), FBS, 페니실린, 스트렙토마이신은 Hyclone (Logan, UT, USA)사에서, iNOS, COX-2, β -actin antibodies, peroxidase-conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. TNF- α 와 IL-6에 대한 효소면역측정

(EIA) 키트는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 특급 및 일급을 구입 사용하였다.

2. LOF 추출

LOF는 물과 70% 에탄올로 추출하였다. 70% 에탄올 추출물은 70% 에탄올로 두 번 추출했고 상온에서 여과지(Whatman No.41)로 여과하였다. 여과물을 건조기(EYELA, Tokyo, Japan)에서 40°C로 용매를 증발시키고, 동결건조기(Samwon, Busan, Korea)로 동결건조하여 추출물을 얻었다. 물 추출물은 동시에 두 시간 동안 전탕하여 여과한 후 에탄올 추출물처럼 동결건조 하였다. 건조 추출물의 무게를 측정하여 추출 수율을 계산하고 원료 약재(10g)에 대한 조추출물 무게의 비율로 표시하였다.

3. 세포 배양

대식세포 RAW 264.7을 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 10% FBS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37 °C 포화 습도 하에서 배양하였다. 대식세포는 96-well plate에서 5×10^4 cells/well 농도로 분주 후 24시간 동안 배양하였고, 이후 LOF 추출물을 다양한 농도로 첨가하거나 추출물이 없는 상황 하에 LPS (100 ng/mL)로 자극하였다. 20시간 동안 배양한 후 상청액의 NO, IL-6, TNF- α 의 농도를 분석했다.

4. 세포 생존력 측정

세포 생존력은 기존의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay 로 측정했다. Raw 264.7을 96-well plate에 5×10^4 cells/well 농도로 분주 후 24시간 동안 배양한 후 LOF 추출물을 다양한 농도로 첨가하거나

추출물이 없는 상황 하에 LPS (100 ng/mL)로 자극한 후, 0.5 mg/mL MTT를 넣고 37 °C, 3시간 동안 배반 응시켰다. 흡광도는 540 nm로 microplate reader에서 측정했고 대조군에 대한 백분율로 세포생존율을 나타내었다.

5. 산화질소(NO)의 측정

Raw 264.7를 96-well plate에 10^5 cells/mL 농도로 분주 후 24시간 동안 배양한 후 LOF 추출물을 다양한 농도로 첨가하거나 추출물이 없는 상황 하에 LPS (100 ng/mL)로 20시간 동안 자극했다. NO, IL-6, TNF- α 측정을 위해 배지를 추출했다. 산화질소(NO)는 전에 기술한 대로 안정적 산화 대사산물인 아질산염을 탐지하여 측정했다. 간단히 말하면, 배양 배지 100 μ L를 같은 양의 Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)과 섞어서 5분 동안 상온에서 흔들어서 주었다. 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, NO²⁻ 농도는 sodium nitrate를 이용해 작성한 교정곡선을 사용하여 결정하였다¹⁶⁾.

6. TNF- α , IL-6 측정

Raw 264.7를 1시간 동안 LOF 추출물(0.05, 0.1 and 0.2 mg/mL)로 전처리하고 LPS (100 ng/ml)로 4시간, 18시간 동안 자극했다. 상층 배양액 100 μ L를 제거하고 효소-연결 면역 흡수 측정 검사 키트를 사용하여 제조업체 메뉴얼에 따라 TNF- α , IL-6의 농도를 측정했다.

7. 세포내 활성산소(ROS) 측정

DCFH 산화로 세포내 산화적 스트레스를 측정하였는데, DCFH-DA를 메탄올에 1 mm 농도로 준비하고, 페놀레드를 제거한 DMEM로 10 μ m로 희석

했다. LOF 추출물과 LPS로 20시간 동안 처리한 후 대식세포를 37 °C에서 30분 동안 DCFH-DA에 노출시켰다. 그 후 세포를 차가운 PBS로 3번 씻어내고 PBS로 다시 부유시켰다. ROS의 세포내 농도는 유동 세포 계수기(BD FACSCalibur, USA)로 평균 형광 강도를 측정하여 결정하였다. excitation는 488 nm, emission은 525 nm로 하였다. 표본마다 최소 10,000 개가 개수되었다. 수치는 대조군에 대한 비율로 정규화된 평균 흡광도로 표시했다.

8. Western Blot

Raw 264.7 대식세포를 단백질 분해효소 억제제가 들어 있는 RIPA 완충액으로 4 °C에서 15분 동안 용해했다. 불용성 물질은 15분간 13,000 rpm으로 원심 분리하여 제거하고, 단백질 함량은 Bradford 분석법을 사용하여 결정했다. 10-12% SDS-polyacrylamide gel로 같은 양의 용해물(25-40 µg of protein)을 분리하였고, PVDF membrane (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Germany)으로 옮겼다. PVDF membrane은 TBS-T 용액에서 1차 항체

(COX-2, iNOS)로 4°C로 overnight 하였다. TBST로 세 번 세척한 후, membrane을 TBST 용액에서 2차 항체(1:1,000, SantaCruze Biotech, MA, USA)를 상온으로 2시간 동안 부착시켰다. 강화 화학발광 고급 감지 키트를 사용하여 LAS-3000 detector (Fuji, Tokyo, Japan)로 형광화하였다¹⁷⁾.

9. 통계 분석

데이터는 3번 측정하여 평균치 ± 표준편차로 표시했다. 각 군 간의 유의성의 검증은 GraphPad Prism 5.0 version을 이용하여 One-way ANOVA 중 Tukey test로 검증하여 p값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 추출 수율

물과 에탄올 추출물은 각각 47.9, 336 mg/g을 얻

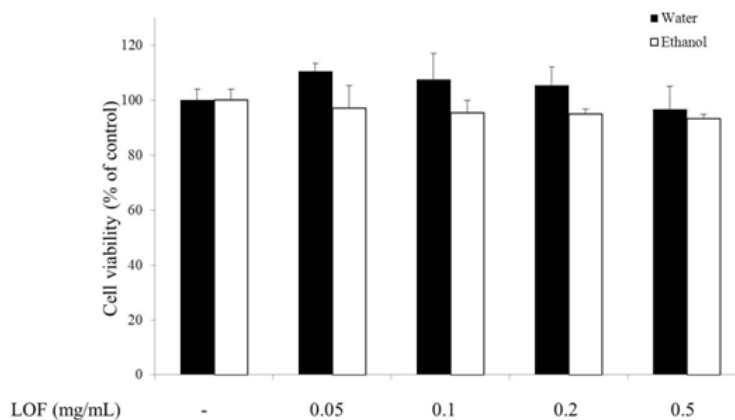


Figure 1. Effects of LOF extracts on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. LOF extracts were treated with various concentrations in RAW 264.7 cells for 24 h. Values are expressed as the mean ± SD of determinations made in triplicate experiments.

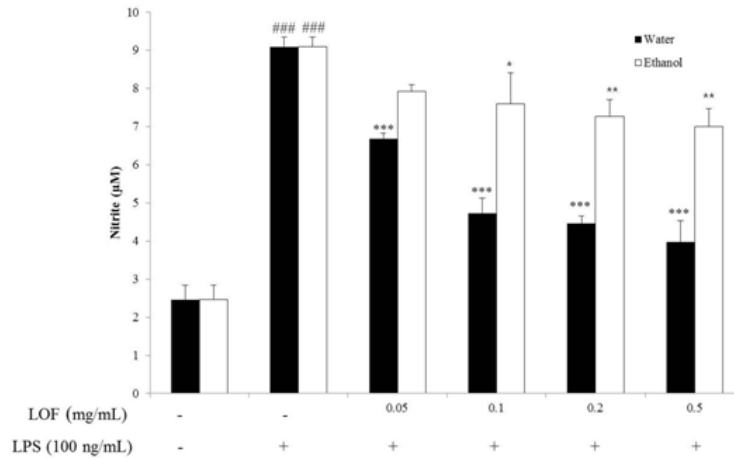


Figure 2. Effects of LOF extracts on nitrite production in macrophage. RAW 264.7 (2×10^5 cell/48 well) were incubated with medium alone or with LPS (100 ng/mL) in the presence. After cells were incubated for 20 h, to quantify the level of nitrite in the medium, cultured medium was analyzed. Values are expressed as the mean \pm SD of determinations made in triplicate experiments. ### $p < 0.001$, versus control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, versus LPS alone-treated group.

었다. 에탄올 추출물이 더 높은 수율을 보였다.

2. LOF 추출물의 세포독성

세포 생존률은 0-0.5mg/mL 범위에서 물과 에탄올 추출물 모두 95% 이상이었다. 이는 LOF 추출물이 시험 농도(Fig. 1)에서 RAW 264.7 대식세포에 대해 세포독성이 없음을 보여준다. 이는 NO 생산 억제가 세포 사멸에 기인하지 않음을 보여준다.

3. NO 생산에 대한 LOF의 영향

LPS (100 ng/mL)는 산화질소(NO)의 생산을 거의 3.5배 증가시켰다. 반면에 LOF (0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mg/mL)로 전처리된 세포는 LPS 유발 NO 생산이 용량 의존적으로 뚜렷이 감소하였다(Fig. 2). 특히 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 NO 생산 감소가 뚜렷하게 나타났다. 이에 의거하여 이후 실험은 LOF의 물 추출물로만으로 수행했다.

4. IL-6, TNF- α 생산에 대한 LOF 추출물의 효과

IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인은 염증 증성 질환에서 다양한 급만성 염증 반응의 중요한 매개체이다¹⁸⁾. 이번 연구에서 전처리된 LOF 물추출물은 LPS 유도 IL-6, TNF- α 생산을 용량 의존적으로 유의미하게 감소시켰다(Fig. 3A and B).

5. 활성산소(ROS)에 대한 LOF 추출물의 효과

ROS 과잉생산으로 인한 산화적 스트레스는 다양한 병리 과정에 매개하는데 관련된다¹⁹⁾. 세포내 ROS는 flow cytometer를 사용하여 DCFH-DA 형광탐지로 측정했다. 형광강도는 LPS가 없는 대조군에 비해 Raw 264.7 대식세포가 LPS에 노출되었을 경우 매우 크게 증가했으며, 이는 세포내 ROS가 생성되었음을 의미한다. LOF 물 추출물로 전처리한 경우에 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포의 ROS 생성이 뚜렷하게 억제되었다. ROS 생성에 대한

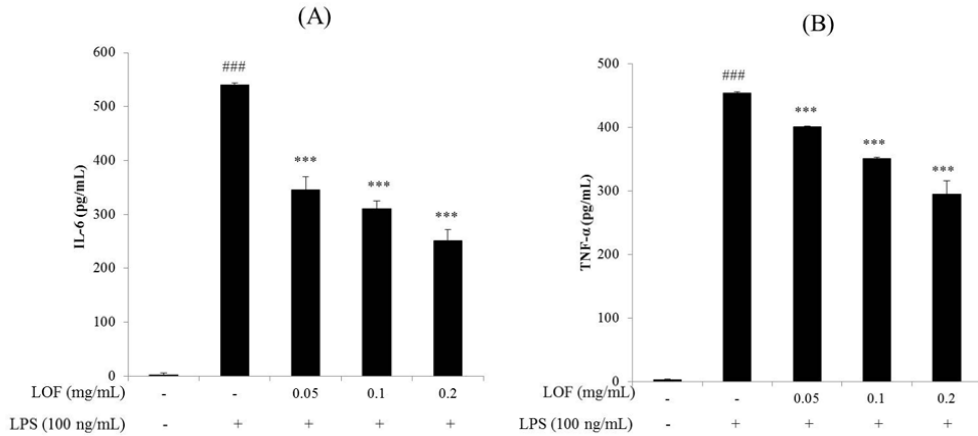


Figure 3. Effects of LOF water extracts on IL-6(A) and TNF-α(B) production in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pretreated with indicated concentrations of LOF water extracts for 1 h and stimulated for 4 h with LPS (100 ng/mL) for TNF-α, 18 h with LPS for IL-6. Values are expressed as the mean ± SD of determinations made in triplicate experiments. ### p<0.001, versus control group, *** p<0.001, versus LPS alone-treated group.

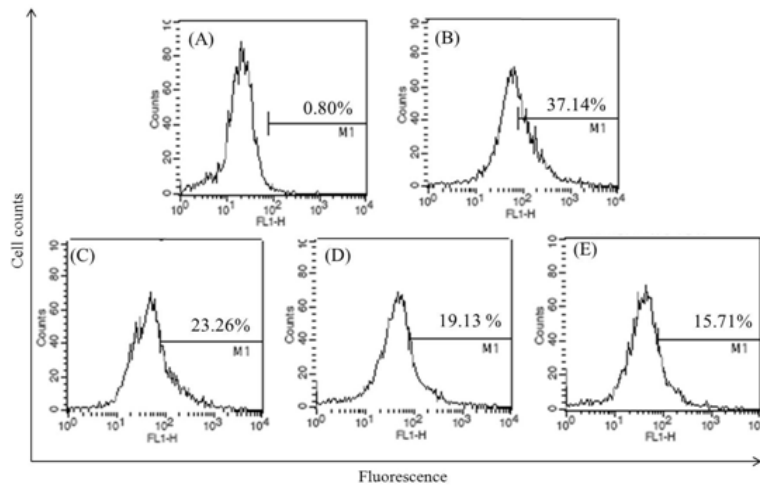


Figure 4. Detection of the intracellular ROS generation in the RAW 264.7 cells by a flow cytometer. The water extracts from LOF were treated with various concentrations in RAW 264.7 cells for 1 h prior to LPS(100 ng/mL) treatment for 20 h. (A) Control, (B) LPS, (C) LPS + 0.05 mg/mL, (D) LPS + 0.1 mg/mL, (E) LPS + 0.2 mg/mL.

LOF 추출물의 억제 효과는 용량 의존적으로 나타났다(Fig. 4).

6. iNOS, COX-2 단백질 발현에 대한 LOF 추출물의 효과

본 연구에 의하면 LOF 물 추출물이 NO, ROS,

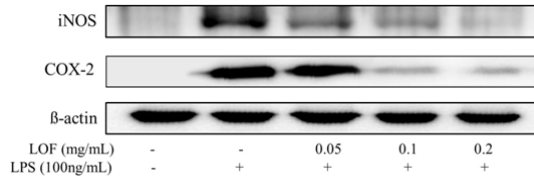


Figure 5. Effect of LOH water extracts on the LPS-induced iNOS, COX-2 expressions. RAW 264.7 cells treated with various concentrations of LOF for 1 h prior to the addition of LPS (100 ng/mL), and the cells were further incubated for 20 h.

전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 생산을 억제하였는데, 이러한 억제 효과가 iNOS, COX-2 단백질 조절과 관련이 있는지를 western blot으로 조사했다. RAW 264.7 대식세포를 LOF 추출물로 표시된 농도로 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml LPS에 24시간 동안 노출시켰다. iNOS, COX-2 농도가 LPS에 의해 유의미하게 증가했지만, LOF 추출물(0.05, 0.1, 0.2 mg/mL)로 전처리하면 이런 증가가 용량 의존적으로 억제되었다(Fig. 5).

IV. 고찰 및 결론

남정목은 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하며 학명은 *Ligustrum obtusifolium* SHUNBERG et ZUCCARINI이다. 중국, 대만, 일본, 한국 등지에 분포하고, 국내에서는 제주, 전남, 경남 등 남부지역부터, 강원, 경기, 황해, 평북 등지까지 두루 야생한다. 다 익은 열매가 쥐똥과 유사하여 민간에서는 쥐똥나무라고 불리고, 한방에서는 수랍과(水蠟果)라고 하여 강장 및 지혈효과로 임상에 응용되고 있다. 주요성분은 triterpenoids 화합물인 ursolic acid와 oleanolic acid며, acetyloleanolic acid, nonacosanol, lupenol, ligstroside, 10-hydroxy-ligstroside 등이 알려져 있다. 실험적으로 항당뇨, 항콜레스테롤 등의 효과가 알려져 있지만 그밖에 연구 보고는 미비한 상황이다¹¹⁻¹⁴. 이에 남정목 추출물이 염증매개물질 발현에 미치는

영향을 확인하기 위해 본 연구를 설계하였다.

염증반응은 외부의 세균이나 바이러스 및 이물질로부터 인체의 항상성을 유지하기 위한 필수불가결한 반응이긴 하지만, 면역조절 능력의 이상으로 인한 염증반응의 과잉 혹은 부족으로 다양한 질병상태를 유발시킨다. 면역결핍으로 인해서 기회감염, 반복감염, 암 등이 유발되고 과다 면역반응으로 인한 류마티즘, 동맥경화증, 당뇨병, 다발성경화증 등 이환에 영향을 주고 다양한 심혈관계통 질환의 이환율 및 사망률을 증가시킨다. 결국 염증반응과 관련한 면역기능은 적절한 상태로 유지되는 것이 관건이며, 이와 관련하여 산화적 스트레스를 낮추고 결과적으로 항염증반응을 유도할수 있는 식품 및 천연약제의 개발에 관심이 높아지고 있다^{2,3}.

LOF 물추출물과 에탄올 추출물에서 세포독성을 평가하였는데, 물추출물, 에탄올 추출물 모든 농도군에서 95% 이상 생존율을 보여 RAW26437 대식세포에서 독성을 나타내지 않았다.

NO는 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 일반적으로 많은 질병에서 iNOS가 활성화되면 NO의 생성이 증가하게 되고 그에 따라 여러 가지 질병이 유발되는 것으로 알려져 있으며, NO가 염증반응의 중간 매개역할을 한다^{20,21}. 본 실험에서 RAW264.7 대식세포에 LPS(100 ng/mL)를 처리하였을 때, 생성된 NO의 함량이 무처리군에 비해 3.5 배 증가하였고, 농도별로(0.05, 0.1, 0.2 mg/mL) 처리하였을 때 물추출물에서 농도 의존적으로 NO의

양이 감소되는것으로 나타났다. 이와 같은 결과에 근거하여 LOF 물추출물 만을 이용하여 ROS 소거능, iNOS, COX-2에 대한 western blot을 시행하였다.

Cytokine은 대식세포와 단핵구를 포함하는 다양한 세포에서 생성되는데 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6 등은 급성기 염증반응에서 주된 역할을 하며, 분비되는 양에 따라서 관련 증상을 유발한다²². IL-6는 plasma로의 분화 및 증식을 촉진하고, 항체의 분비를 활성화하는 cytokine이며, IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다²³. TNF- α 의 국소적인 증가는 열, 부종, 통증, 발적 등의 염증의 기본적인 임상 징후를 일으키지만, 전신적인 증가는 미세혈관의 혈전, 전신적으로 모세혈관의 누출을 유발시켜 심장 박출량을 억제하여 조직의 손상을 가져 온다. 또한 다른 염증 세포를 활성화시켜 IL-1, HMGB1(high mobility group B1) 등과 같은 사이토카인, 그리고 염증과 조직손상을 촉진시키는 eicosanoid, 산화질소, 활성산소 등과 같은 매개물질을 분비하게 하여 염증반응을 확장 및 지속시킨다^{24,25}. LOF 물추출물은 전염증성 cytokine TNF- α , IL-6 생산을 용량 의존적으로 유의미하게 감소시킨 결과를 나타내었다.

ROS의 증가는 세포 및 조직에 산화적 스트레스로 작용하게 되고 만성질환에 직간접적으로 영향을 준다. ROS는 세포 또는 조직의 손상은 당뇨병뿐만 아니라 염증, 노화 관련 변성, 종양의 생성 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있고, 세포내 에너지 대사과정에서 생성된 ROS를 소거하는 방어기작으로 항산화효소들이 존재하여 이들 사이의 항상성이 깨어지게 되면 질병의 발병률이 증가하게 된다^{26,27}. 본 실험에서는 Flow cytometer를 사용하여 형광강도를 측정하였는데, LPS에 노출된 대식세포에서 ROS가 생성되었음을 확인하였고, LOF 물추출물로 전처리하였을 경우 ROS 생성이 뚜렷하게 억제되었으며 용량의존적인 경향을 나타내었다.

LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응에는 전염증 cytokine, NO 뿐만 아니라, iNOS, COX-2와 같은 염증물질에 의해 매개되는데, 포유류에서 NO는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) 그리고 iNOS 세가지 형태의 NOS가 있으며, nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하지만, iNOS는 염증유발 자극에 의해 발현된다. 이들 3가지 NOS중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다²⁸.

COX-2는 염증반응 과정에 발현되는 유도성 효소로서, COX는 arachidonic acid를 변환시키는 데에 핵심적 역할을 하며, 이들은 염증반응과 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 PGE₂는 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다. COX-1과 2는 생리적, 병리적인 상황에서 대비되게 나타나는데, COX-1은 위점막보호, 혈소판응집작용 등으로 인체 항상성의 유지에 관여하는 것으로, NSAIDs 사용시 COX-1을 억제하여 부작용을 유발하는 주된 원인으로 알려져 있다. COX-2는 유도형으로서 염증반응, 성장촉진인자, cytokine 등에 의해 유도되어, 염증성 질환, 자가면역질환 등에서 중요한 역할을 한다^{29,30}. 본 연구에서 COX-2는 LPS 처리시에는 대조군에 비교하여 용량 의존적으로 억제되었다.

최근 수많은 연구에서 천연 약초에 항염증, 항암, 항산화 작용과 같은 약리적 효과가 있음을 밝히고 있다^{9,10}. 한약제의 구별에 있어서 중요한 기준이 되는 약물의 성격에 溫熱涼寒의 구분이 있는데, 이는 특정 천연 약물이 체내에 흡수되면 동화 작용과 이화 작용 중 한가지를 좀더 추동하는 역할을 한다는 의미를 내포한다³¹. 고령화와 더불어 만성 질환의 예방 및 치료를 위해 병용투여하는 식품 및 약물군에서는 補氣, 補陽하는 효능으로 이화작용을 추동하는 약제보다는 補陰 효능을 가지고 동화작용을 유도하는 平하거나 涼한 성질이 좀더 적합할 것으

로 사료되는데, 이에 대해서는 좀더 심도 있는 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서 선택한 남정목 열매는 성질이 평이하거나 약간 서늘하며 허약체질, 식은땀, 토혈, 혈변 등에 사용되어 온 약제이다¹¹⁾. 본 연구에서는 여러 염증 분석법을 사용하여 LOF의 항염증 작용에 주목하였는데, LOF 물 추출물은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성과 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 분비를 유의미하게 억제하였으며 세포독성을 보이지 않았다. LOF 추출물물은 또한 세포내 ROS 수준을 용량 의존적으로 유의미하게 감소시켰다. 또한 LOF 물 추출물은 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 감소시켰는데, 이와 같은 결과는 LOF의 항염증성 특성이 대식세포의 ROS를 억제함으로써 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6를 억제하기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구의 결과는 항염증 물질의 연구에 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 기대되며 이후 좀더 정확한 기전에 대한 추가 연구 및 in vivo 실험이 필요할 것으로 판단된다.

參 考 文 獻

- Kundu, J.K., Surh, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer, *Mutat Res.* 2008;659:15-30.
- Park CY, Ryu HJ. Inflammation and Obesity. *J Korean Soc Endocrinol.* 2004; 19:97-108.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420:846-52.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420:853-9.
- Shin JS, Park YM, Choi JH, Park HJ, Shin MC, Lee YS, et al. Sulfuretin solated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF- κ B in RAW 264.7 murine macrophage cells. *International Immunopharmacology.* 2010;10:943-50.
- Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53:503-14.
- Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Katsikis P, et al. Cytokine assays: role in evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol Rev.* 1991;119:105-23.
- Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1996;1288:F31-6.
- Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2002;40:158-68.
- Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- α and IL-12 in activated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28:912-5.
- Lau KM, He ZD, Dong H, Fung KP, But PP. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002;83:63-71.
- Lin HM, Yen FL, Ng LT, Lin CC. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007;111: 129-36.
- Nagy M, Krizkova L, Mucaji P, Kontsekkova Z, Sersen F, Krajcovic J. Antimutagenic activity and radical scavenging activity of water infusions and

- phenolics from Ligustrum plants leaves. *Molecules*. 2009;14:509-18.
14. Sung SH, Kim ES, Lee KY, Lee MK, Kim YC. A new neuroprotective compound of Ligustrum japonicum leaves. *Planta edica*. 2006;72:62-4.
15. Lee SI, Oh SH, Park KY, Park BH, Kim JS, Kim SD. Antihyperglycemic effects of fruits of privet (*Ligustrum obtusifolium*) in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet. *J Med Food*. 2009 Feb;12:109-17.
16. Su YW, Chao SH, Lee MH, Ou TY, Tsai YC. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E production in macrophages. *Planta Med*. 2010;76:1666-71.
17. Wang L, Xu ML, Hu JH, Rasmussen SK, Wang MH. Codonopsis lanceolata extract induces G0/G1 arrest and apoptosis in human colon tumor HT-29 cells - Involvement of ROS generation and polyamine depletion. *Food and Chem. Toxicol*. 2011; 49:149-54.
18. Zhang YF, Wang SZ, Li YY, Xiao ZY, Hu ZL, Zhang JP. Sophocarpine and matrine inhibit the production of TNF- α and IL-6 in murine macrophages and prevent cachexia-related symptoms induced by colon 26 adenocarcinoma in mice. *Int. Immunopharmacol*. 2008;8:1767-72.
19. Johansson H, Svartström O, Phadnis P, Engman L, Ott MK. Exploring a synthetic organoselenium compound for antioxidant pharmacotherapy-toxicity and effects on ROS-production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010;18:1783-8.
20. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*. 1997;278:860-6.
21. Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz*. 1995;3:2-32.
22. Ahn KB, Aggarwal BB. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals. *Ann. NY Acad. Sci*. 2005;1056:218-33.
23. Hibi M, Nakajima T, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med*. 1996;74:1-12.
24. Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett*. 1988;19:183-91.
25. Natarajan K, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Protein Tyrosine Kinase Inhibitors Block Tumor Necrosis Factor-Induced Activation of Nuclear Factor- κ B, Degradation of I κ B α , Nuclear Translocation of p65, and Subsequent Gene Expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;352:59-70.
26. Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF-B activation in T cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;25:346-61.
27. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001;22:189-216.
28. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem*. 1992;267:25934-8.
29. Yen GC, Duh PD, Huang DW, Hsu CL, Fu TYC. Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7

- macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46:175-85.
30. Cho W, Nam JW, Kang HJ, Windono T, Seo EK, Lee KT. Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *International Immunopharmacology*. 2009;9:1049-57.
31. Park KS, Lee SH. The Convergence of Oriental Medicine and Western Medicine on the Harmony of Eum and Yang. *the Korea institute of oriental medical informatics*. 2012;18:116-137.