

LPS로 자극된 Raw 264.7 대식세포에서 오미자 씨앗오일의 항염증 효과

장재윤^{1#}, 박근혜^{1,2*}

1 : (주)대한바이오위드, 2 : 대구한의대학교 화장품약리학과

Anti-inflammatory effect of seed oil of *Schisandra chinensis* in the LPS-treated RAW 264.7 macrophages

Jae-Yoon Jang^{1#}, Geun-Hye Park^{1,2*}

1 : DAEHAN BIOWID Co., Ltd., 2 : Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Korea.

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate of the anti-inflammatory effects of *Schisandra chinensis* seed oil(SSO) on the production of pro-inflammatory substances in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Methods : SSO was measured the production of pro-inflammatory factor (NO, PGE₂, IL-1 β iNOS and, COX-2) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. we used the following methods : cell viability assay, Griess reagent assay, enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting analysis.

Results : The cell viability of SSO(0~500 μ L/mL) processing group was 96.9% and the processing of SSO didn't have an effect on the cytotoxicity. The inhibitory effect of the nitric oxide (no) production of SSO(500 μ g/mL, 50 μ g/mL, 10 μ g/mL) was each 70.3%, 37.6% and 26.5%. IL-1 β production inhibition ability of SSO(500 μ g/mL, 100 μ g/mL) was each 49.88% and 48.8%. PGE₂ production inhibition ability of SSO(500 μ g/mL, 100 μ g/mL) was each 49.88% and 73.1%, 70.5%. By using SSO, it experimented about iNOS protein expression inhibition ability, that is the NO production enzyme. iNOS protein expression increased in the group processing LPS independently. iNOS protein expression decreased in the group processing SSO together. The expression of the COX-2 protein decreased 89.6%, 81.8% in the group processing SSO. The significance was in the relationship with NO formation inhibition with the relationship with the PGE₂ formation inhibition and iNOS protein, it confirmed in SSO with the COX-2 protein.

Conclusions : Stimulation of the RAW 264.7 cells with LPS caused an elevated production of nitric oxide (NO), IL-1 β and PGE₂ which was markedly inhibited by the pretreatment with SSO without causing any cytotoxic effects. The reduced expressions of iNOS protein were consistent with the reductions in NO production in the culture media. SSO may be useful for the treatment of various inflammatory diseases.

Key words : *Schisandra chinensis* seed oil, NO, PGE₂, IL-1 β , iNOS, COX-2, Anti-inflammatory

서론

염증(炎症)은 외부 병원체나 항원 혹은 생체 내 자극물질에 대한 생체 방어반응으로 발열(發熱), 홍조(紅潮), 부종(浮腫), 통증(痛症) 등의 급성염증 증후가 동반되며, 염증관여 매개물

질로는 혈관에 작용하는 amines류 (histamine, serotonin, catecholamines), 혈장 단백질분해효소인 complement와 arachidonic acid 대사산물인 prostaglandins (PGs), leukotrienes (LT) 이 있으며 cytokines, chemokines, nitric oxide(NO), 백혈

*Corresponding author : Geun-Hye Park, Dept. of Cosmeceutical Science, Daegu Haany Univ, Daegu, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-819-1464 · Fax : +82-53-818-9554 · E-mail : ssdh11@naver.com

#First author : Jae-Yoon Jang, DAEHAN BIOWID Co., Ltd., Hayang-eup, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea.
· Tel : +82-53-852-9552 · Fax : +82-53-818-9554 · E-mail : wodbs10@naver.com

· Received : 19 October 2015 · Revised : 18 November 2015 · Accepted : 26 November 2015

구의 lysosomal enzymes, free radical 유리기 등이 있다¹⁾. NO는 반응성이 높은 물질로 nitric oxide synthetase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, NOS는 constitutive NOS(cNOS, or nNOS)와 inducible NOS(iNOS)로 나누어진다. 특히 iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 다량의 NO를 생산하며 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진한다고 보고되고 있다²⁾. COX-2(cyclooxygenase-2)는 cytokine 및 lipopolysaccharide(LPS) 등 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서 다량 발현되고 이로 인해 발생된 prostaglandins E₂와 같은 혈관 확장 물질은 자극이 가해지면 국소적으로 유리되어 혈관 투과성을 증대시켜 염증을 유발하며, 발열, 통각 전달작용, 호중구 화학주성 유도 등 다양한 생리효과를 나타낸다³⁾. IL-1 β 는 활성화된 단구와 대식세포에 의해 생산되는 모노카인으로 T세포, B세포, 섬유아세포의 증식, PGs의 생산, 발열 등 염증반응의 중요한 매개체로 여러 가지 반응에 관계한다. 대식세포(machrophage)는 염증반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화되며 생체방어에 중요한 역할을 한다⁴⁾. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 LPS는 대식세포 또는 단구를 자극하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비를 촉진한다⁵⁾. 오미자(Schizandra chinensis Baillon, Omija)는 동의보감(東醫寶鑑)에 의하면 시고, 달고, 쓰고, 맵고, 짠 다섯 가지의 맛을 가지고 있는 생약으로 예로부터 거담, 진해, 정전, 철혈, 검한, 생진지갈 등 여러 가지의 약효가 있고 anthocyanin 뿐만 아니라 flavonoid 및 유기산(有機酸)류 등이 풍부하여 한방에서는 거담자양강장제(祛痰滋養強壯劑) 등으로 이용 되었으며, 또한 간장보호, 알코올해독, 혈당강하, 콜레스테롤저하, 고지혈증완화, 면역조절, 항암 및 항종양 등 다양한 생리적 활성을 나타낸다⁶⁾. 이는 오미자에 함유된 성분 중 schizandrin, schizandrol, schizanthrin, isoschizandrin, gomisin, angeloylgomisin, epigomisin, benzoylgomisin, tigloylgomisin, deoxygomisin, pregomisin 등의 lignan 화합물과 정유 및 색소에 기인 한다고 보고되고 있다. 정유 성분은 주성분이 terpene류로서 특히 monoterpenes과 sesquiterpene이 90% 이상을 차지하는데 오미자에서는 caryophyllene, calarene, cubebene, acoradiene과 β -himachalene 등 성분의 함유량이 높다.⁷⁾ 지방산은 불포화 지방산인 linoleic acid, oleic acid와 포화지방산인 palmitic acid의 함유량이 많으며, 불포화지방산이 포화지방산보다 3배 이상 많아 지방산 조성이 우수하다. 오미자에 대한 연구는 해독작용, 항균작용, 항산화작용 등이 보고되고 있으며, 최근 오미자 씨에서 추출된 유지의 성분에서 항산화효능 등, 일부 연구가 진행되어 긍정적인 결과가 도출되었으나, 아직 시작단계에 불과하다. 본 연구에서는 오미자 씨앗 오일의 항염증 효과를 검토하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 오미자씨앗 오일을 처리하여 염증매개 물질인 NO, PGE₂, IL-1 β 의 생성 및 염증매개 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현을 조사하여 효능과 유의성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 오미자(五味子)는 경북 문경에서 2014년 9월~10월 채취한 오미자 열매에서 과육을 제거하고 씨앗 부분을 냉풍 건조하여 냉 압착오일추출기를 이용하여 추출한 후 슬러지를 제거하여 실험재료로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

염증반응을 실험하기 위하여 사용한 세포주는 macrophage인 Raw 264.7(KCLB No 40071)를 계대 배양하여 사용하였다. 전 배양 및 본 배양을 위한 액체배지는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco (New York, USA)에서 구입하여 사용하였다. sodium nitrite, griess reagent, lipopolysaccharide, NP-40, protease inhibitor, RIPA buffer 등은 Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA) 실험에 사용된 1차 항체인 iNOS BD Bioscience (Sanjose, CA, USA) COX-2 Cayman (Ann Arbor, MI, USA), β -actin (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-rabbit Ig-G horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz에서 구입하였으며, PGE₂ 측정을 위한 ELISA kit는 (R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)에서 구입 하였으며, 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Camichael⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포(2×10^5 cells/mL)를 96 well plate에 seeding 하고 24시간 뒤, 오미자 씨앗오일을 0~500 μ g/mL의 농도가 되도록 세포배양배지로 희석하여 20 μ g 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 염증 반응을 유도하였다. 대조군은 시료와 동량의 DMEM을 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 무혈청 배지로 교체한 후 MTT(5mg/mL) 용액 20 μ g를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : Ethanol (1 : 1) 150 μ g를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 대조군에 대한 흡광도의 차를 백분율로 표시하여 비교분석 하였다.

2) Nitric oxide(NO), PGE₂ 및 Cytokine(IL-1 β) 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 cell에서 오미자 씨앗오일의 NO 생성 억제능을 측정하기 위해 RAW 264.7 세포(2×10^5 cells/mL)를 6 well plate에 seeding 하고 24시간 뒤, 오미자 씨앗오일을 0~500 μ g/mL의 농도가 되도록 세포배양배지로 희석하여 200 μ g 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator

에서 24시간 염증 반응을 유도하였다. 대조군은 시료와 동량의 DMEM을 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. NO 생성량은 96 well plate에 세포 배양 상등액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응 시킨 후 ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 96 well plate 세포 배양 상등액 내의 PGE₂, cytokine(IL-1 β)의 생성량은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량해 분석하였다.

3) Western blot을 통한 iNOS, COX-2 단백질 발현 측정

iNOS와 COX-2의 세포 내 발현은 Western blot을 이용하여 측정하였다. 세포를 1X PBS로 2회 세척 후 RIPA buffer (serine protease, protease and phosphatase inhibitor cocktail; Genedepot USA) 100 μ g로 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 cell lysis 하고 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm에서 15분간 원심 분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상등액은 Bradford assay로 정량하여 lane당 20 μ g의 세포 단백질을 10%의 SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane막 (polyvinylidene difluoride membrane; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 transfer한 다음 실온에서 30분 동안 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 1차 항체를 희석하여 2시간 동안 반응한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 membrane을 HRP가 중합된 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 60분 동안 반응시켰다. 3회 washing 한 뒤 Davinch-k western imaging system 기기를 이용하여 분석하였다.

3. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차(SD)를 구하여 신뢰수준 95%(* p < 0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. Macrophage cell (Raw 264.7)의 생존율 확인

오미자 씨앗 오일의 샘플처리 농도에 따른 Raw 26.47 cell의 세포 생존율을 MTT법에 의해 확인한 결과 SSO는 1~500 μ g/mL의 농도까지 95% 이상의 생존율을 확인하였다 (Fig. 1). 시료를 첨가하지 않고 DMEM을 동일 농도로 처리한 대조군과 비교 했을 때 생존률의 차이는 10% 미만 이었다. 이 결과는 오미자 씨앗 오일의 세포독성이 현저히 낮음을 확인할 수 있는 결과이다. 이후 실험은 96.6%의 세포 생존율을 확인 한 500 μ g/mL 농도 이하에서 진행하였다.

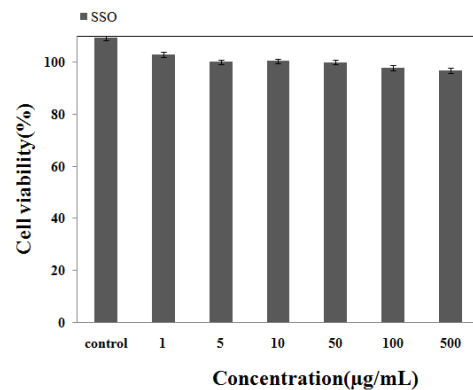


Fig. 1. Cell viability of SSO on Raw 264.7 cell. Cell viability was determined by an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) assay. Data represent the mean \pm S.D. with eight separate experiments. (Control : Dulbecco's modified eagle medium, SSO : *Schisandra chinensis* seed oil)

2. Nitric oxide 생성량 측정 결과

NO는 활성산소 중 하나이며, 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. LPS로 유도된 Raw 264.7 Cells에 오미자 씨앗 오일 농도별 (1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/mL) 처리하여 상등액속에 있는 NO의 양을 측정한 결과, 500 μ g/mL에서 70.3%의 NO 저해활성을 확인 하였으며, 50 μ g/mL, 10 μ g/mL 농도에서 각 37.6%, 26.5% NO 저해활성과 같이 농도 의존적임을 확인할 수 있다(Fig. 2).

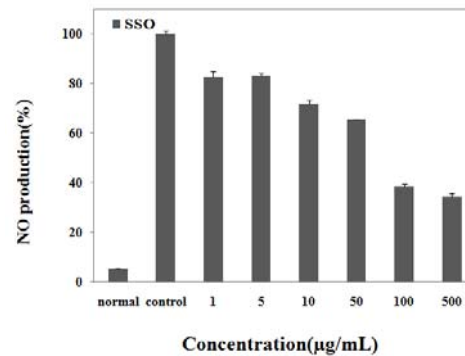


Fig. 2. Effect of SSO on LPS-induced nitric oxide(NO) production in RAW 264.7 cell. Raw 264.7 cells was treated with 0~500 (μ g/mL) of SSO and LPS (1 μ g/mL) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D (significant as compared to control. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.01).

3. IL-1 β 생성 억제 효과

Immunoregulatory cytokine로 다양한 역할을 하는 interleukin-1 β (IL-1 β)은 활성화된 단구와 대식세포에 의해 생산되며 PGs의 생산, 발열 등 염증반응의 중요한 매개체로 관계한다. LPS 유도로 활성화된 Raw 264.7 Cells에서 오미자 씨앗 오일의 IL-1 β 생성억제 효과를 확인한 결과, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL농도에서 각 49.88%, 48.8%의 IL-1 β 억제능을 확인할 수 있다(Fig. 3).

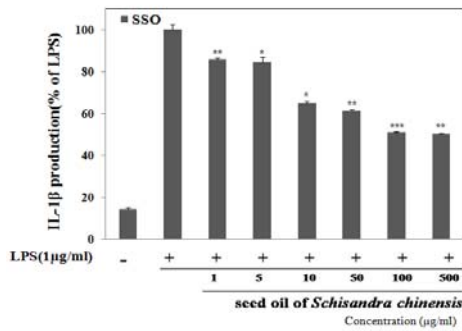


Fig. 3. Effect of SSO on the production of cytokines stimulated by LPS. Production of IL-1β were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μg/mL) in the presence or absence of SSO for 24 h. The amount of IL-1β was measured by immunoassay as described in materials and methods. Nor : LPS not induced group, Con : LPS induced group. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (significant as compared to control. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.01).

4. PGE₂ 생성 억제 효과

PGE₂는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증 매개물질로 IL-1β와 COX-2등에 의해 생성된다. 오미자 씨앗 오일에서 PGE₂의 생성억제 효과를 확인한 결과, 500 μg/mL, 100 μg/mL 농도에서 각 73.1%, 70.5%의 PGE₂ 저해능을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

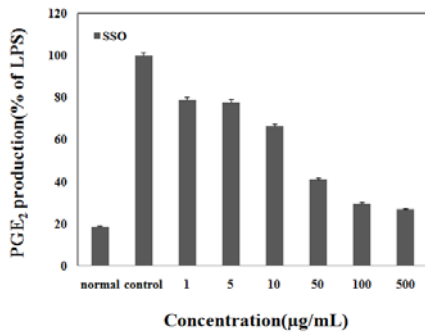


Fig. 4. Effect of SSO on the production of cytokines stimulated by LPS. Production of IL-1β were measured in the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS (1 μg/mL) in the presence or absence of SSO for 24 h. The amount of IL-1β was measured by immunoassay as described in materials and methods. Nor : LPS not induced group, Con : LPS induced group. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments. (significant as compared to control. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.01).

5. iNOS 단백질 생성 억제능 측정 결과

외부 자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 다량의 NO를 생산하는 iNOS 단백질 발현에 대한 SSO의 억제효과를 Western blot에 의해 측정된 결과, 500 μg/mL, 100 μg/mL 농도에서 45.3%, 31.6% 와 같이 처리된 SSO의 농도 의존적으로 40% 이상 현저하게 억제됨을 확인 하였다. Fig. 5의 결과로부터 SSO에 의한 NO의 생성 억제는 iNOS 단백질의 생성 억제능과 관련이 있음으로 관찰 되었다.

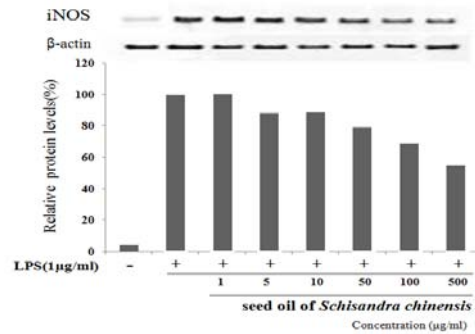


Fig. 5. Inhibitory effects of SSO on the protein levels of iNOS Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells (5×10⁴ cells/well) were pre-incubated for 24hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (1 μg/mL) in the presence of complex extracts sample(1, 5, 10, 50, 100, 500 μg/mL) for 24hr. Nor : LPS not induced group, Con : LPS induced group. The data represent the mean ± SD of three separate experiments.

6. COX-2 생성 억제능 측정 결과

COX-2(cyclooxygenase-2)는 cytokine 및 lipopolysaccharide (LPS) 등 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서 다량 발현되고 PGs를 발생하게 한다. SSO의 COX-2 protein 발현 억제효과 측정 결과, 500 μg/mL, 100 μg/mL 농도에서 89.6%, 81.8%의 생합성 효소 발현 억제능을 확인 하였다. Fig. 6의 결과로부터 SSO에 의한 PGE₂의 생성억제는 COX-2 단백질의 생성 억제능과 관련이 있음으로 관찰되었다.

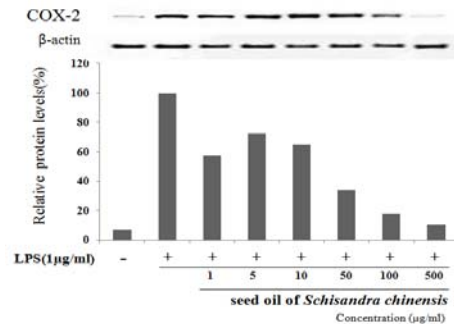


Fig. 6. Inhibitory effects of SSO on the protein levels of iNOS Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells (5×10⁴ cells/well) were pre-incubated for 24hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (1 μg/mL) in the presence of complex extracts sample(1, 5, 10, 50, 100, 500 μg/mL) for 24hr. Nor : LPS not induced group, Con : LPS induced group. The data represent the mean ± SD of three separate experiments.

고찰

오미자(五味子)는 예전부터 수렴, 자양, 강장, 목마름, 진해약(鎮咳藥), 해주독(解毒毒), 수렴고습(收斂固澀), 익기생진(益氣生津), 보신염심 등의 약효를 가져 생약원료로 한방에서 사용해오던 재료이며, 체내 섭취에 따른 인체 안정성이 이미 확인되어 있다. 동의보감 잡병편(八)에서는 오미자가 응저(癰疽)에 대한 효능이 기록 되어있다⁹⁾. 응저는 몸에 생긴 종기를 의미하며 응저문에는 종기가 생기는 원인, 각종 종기의 종류,

중기의 치료법이 있다. 그 외에도 염증 억제와 관련된 효능을 찾아볼 수 있는데 본 연구에서는 오미자 씨앗오일이 LPS에 의해 자극된 Raw 264.7 macrophage에서 활성화되는 염증 관련 인자들의 생성량을 확인함으로써 오미자 씨앗오일의 항염증 효능효과를 확인하였다. 대식세포는 cytokine, TNF- α , LPS와 같은 자극 물질에 의해 염증반응의 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키고 그 결과, 발현된 iNOS, COX-2에 의해 과량의 NO와 PGE₂가 생성되어 염증이 유발된다^{10,11}. NO는 free radical 이며 다량 생성된 NO는 혈관확장 세포독성 조직 손상등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. PGE₂는 NO와 마찬가지로 손상된 부위나 조직에서 통증과 발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로서 COX-2에 의해 합성되는데 과량생산 되면 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성 질환을 유발시키게 된다. COX-2는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소이며, 염증매개 물질인 프로스타글란딘(prostaglandin)을 합성하는 효소이다¹². 염증반응의 지표인 산화질소를 생성하는 효소인 iNOS의 유전자 발현에 대하여 연구를 진행한 결과 iNOS 단백질은 LPS만 단독으로 처리한 군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 여기에 오미자 씨앗오일을 농도별로 처리하였을 때, 그 발현량이 감소함을 확인하였다. 이를 통해 오미자 씨앗오일이 LPS에 의해 유도되는 산화질소와 관련된 iNOS의 유전자 단백질의 발현량을 감소시켜 세포 내의 산화질소의 농도를 감소시키는 것을 확인하였다. COX-2 단백질 발현량을 확인한 결과, iNOS와 마찬가지로 LPS만 단독으로 처리한 군에서 그 발현량이 급증한 것을 확인하였다. 그러나 오미자 씨앗오일을 처리하였을 때, 농도인 500 μ g/mL, 100 μ g/mL를 처리한 실험 군에서만 COX-2 단백질의 발현량이 89.6%, 81.8% 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다. COX-2는 핵 내로 이동하여 전사인자로서 작용하는 NF- κ B의 활성화에 의해 합성이 이루어지는 것으로 알려져 있다^{13,14}. 그리고 전염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현량을 500 μ g/mL의 농도에서 49.88%, 48.8%감소시켰으며 시료의 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 오미자 씨앗오일은 염증매개인자를 합성하는 효소인 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 억제하고, NO, IL-1 β , PGE₂와 같은 염증질환의 주요 매개물의 생성을 억제하여 항염증 활성을 유도하는 것으로 사료되었다. 또한 오미자 씨앗오일에서 COX-2단백질과 PGE₂ 생성억제와의 관계 및 iNOS 단백질과 NO 생성억제와의 관계에 에 유의성이 있음을 확인 하였다.

결론

본 실험에서는 LPS로 자극된 Raw 264.7 대식세포에서 오미자 씨앗오일의 세포독성 및 항염증 효과를 확인하였으며, 실험을 통하여 분석한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. SSO의 샘플처리 농도에 따른 macrophage cells 생존율을 확인한 결과 SSO 0~500 μ g/mL에서 96.9% 이상의 세포 생존률을 확인하였다. 이 결과는 오미자 씨앗 오일의 세포독성이 현저히 낮음을 확인할 수 있는

결과이다.

2. SSO의 NO 생성 억제능을 확인 한 결과, 500 μ g/mL에서 70.3%의 억제능을 확인 하였으며, 50 μ g/mL, 10 μ g/mL 농도에서 각 37.6%, 26.5%와 같이 농도 의존적임을 확인할 수 있다.
3. SSO의 IL-1 β 생성 억제능을 확인 한 결과, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 각 49.88%, 48.8%의 IL-1 β 억제능을 확인할 수 있다.
4. SSO의 PGE₂의 생성 억제능을 확인한 결과, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL농도에서 각 73.1%, 70.5%의 PGE₂ 억제능을 확인할 수 있다.
5. SSO의 iNOS 단백질 발현 억제능 측정 결과, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 45.3%, 31.6% 처럼 현저하게 억제됨을 확인 하였다.
6. SSO의 COX-2 단백질 발현 억제효과 측정 결과, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL 농도에서 89.6%, 81.8%의 우수한 억제능을 확인 하였다.

본 연구에서는 오미자 씨앗오일(SSO)의 항염증 활성을 조사하기 위하여 LPS 자극에 의해 유도된 Raw264.7의 염증반응에서 SSO의 염증매개인자와 염증매개 효소와의 작용기전을 확인 하였다. 이상의 실험결과 SSO가 세포독성이 경미하면서 염증과 관련된 인자인 NO, IL-1 β , PGE₂의 생성 억제와 iNOS, COX-2 단백질 억제능의 결과가 유의성이 있음을 시사하였다.

감사의 글

이 연구는 2014년 산업통상자원부 지역특화산업육성(R&D) 기술개발사업 연구비에 의하여 연구되었습니다.

References

1. Kim CJ, Seo BS. Pathological physiology (I), 5th ed. Seoul : Sin-Il sangsa, 2006 : 148-59.
2. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Curr Med Chem. 2010 ; 17(28) : 3262-88.
3. Ito T, Ikeda U. Inflammatory Cytokines and Cardiovascular Disease. Curr Drug Targets-Inflamm Allergy. 2003 ; 2(3) : 257-65.
4. Bratus VV, Talaieva TV, Radalovska NV, Tretiak IV, Fiziol Zh. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins

- and the development of hypercholesterolemia. *Fiziol Zh*, 1999 ; 45(1-2) : 40-9.
5. Chen TL, Chang CC, Lin YL, Ueng YF, Chen RM. Signal-transducing mechanisms of ketamine-caused inhibition of interleukin-1 beta gene expression in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage-like Raw 264.7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 ; 240(1) : 15-25.
 6. Yoon JE, Kim NK, Hwang CY, Jo EH, Park MC. Experimental study about the effect of several herbs on collagen synthesis. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2010 ; 23(3) : 33-41.
 7. Lee JS, Lee SW. Effect of Water Extract in Fruits of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) on CCl₄ Toxicity. *J Korean Soc Diet Cul*. 1990 ; 5(2) : 253-7.
 8. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987 ; 47(4) : 936-42.
 9. Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, Kim MA, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. The Evaluation of Anti-wrinkle Effects in Oriental Herb Extract. *J Life Sci*. 2007 ; 17(8) : 1147-51.
 10. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 ; 88(17) : 7773-7.
 11. McCarthy-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1993 ; 178(2) : 749-54.
 12. Woo KJ, Kwon TK. Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in 47 COX-2 gene promoter. *Int Immunopharmacol*. 2007 ; 7(13) : 1776-83.
 13. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003 ; 139(1) : 11-20.
 14. Lee HJ, Joo M, Abdolrasulnia R, Young DG, Choi I, Ware LB, Blackwell TS, Christman BW. Peptidylarginine deiminase 2 suppresses inhibitory kappa B kinase activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264,7 macrophages. *J Biol Chem*. 2010 ; 285(51) : 39655-62.