

연꽃의 산화적 DNA 손상 억제 활성 및 항염증 효과

정형진^{1#}, 박연경², 장태원², 김도완³, 정진부¹, 박재호^{2*}

1 : 안동대학교 생약자원학과, 2 : 중원대학교 생약자원개발학과, 3 : 중원대학교 식품공학과

Inhibition Effects on Oxidative DNA Damage and Anti-inflammatory Effects of Nelumbinis Flos

Hyung Jin Jeong^{1#}, Yeon Gyeong Park², Tae Won Jang², Do Wan Kim³
Jin Boo Jeong¹, Jae Ho Park^{2*}

1 : Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong, 36729, Korea

2 : Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

3 : Department of Food Science and Industry, Jungwon University, Goesan, 367-805, Korea

ABSTRACT

Objective : *Nelumbo nucifera*, its rhizome and semen have been used as a traditional medicine which was studied on antioxidant, hepatoprotective effect, anti-obesity and the others. However, Nelumbinis Flos have not studied. We investigated protective effects on oxidative DNA damage and anti-inflammatory effects of Nelumbinis Flos.

Methods : The antioxidant activity was conducted by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical, 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging assay and reducing power assay. Total phenolic content was analyzed. Also, phenolic compounds were detected by HPLC/UV. The inhibitory effect on oxidative DNA damage was determined using $\Phi X-174$ RF I plasmid DNA cleavage assay. The anti-inflammatory effect of Nelumbinis Flos was measured by the amount of nitric-oxide (NO) produced and protein levels of iNOS, and COX-2 in LPS induced RAW 264,7 cells.

Results : The results of DPPH and ABTS radical scavenging activity at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extraction were $97.02 \pm 0.88\%$ and $96.42 \pm 0.25\%$. Reducing power (fold of L-ascorbic acid as control) was 100.14 ± 0.31 at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Total phenol content was 8.70 ± 0.02 mg/g. Chlorogenic acid, catechin and epicatechin were found by HPLC. Nelumbinis Flos has inhibitory effect in dose-manner against oxidative DNA damage. In addition, it showed the anti-inflammatory effect by suppression of NO production as well as protein levels of iNOS, and COX-2.

Conclusion : This study suggested that Nelumbinis Flos showed potential antioxidant and suppression activities of various factors were related in NO produced. Therefore, Nelumbinis Flos as natural plant resources that may help reduce inflammation and alleviate DNA damage.

Key words : Anti-inflammatory effect, Antioxidant, DNA damage, Nelumbinis Flos

I. 서 론

체내에서 생성되는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 대부분의 전자 운반 과정 중 불완전하게 환원되거나

cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성된다. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는 항산화 시스템에 의해 활성 산소종이 제거되지만 이 시스템의 작동이 원활하지 못하면 세포는 산화적 손상을 입게 된다. 활성산소는 세균을 죽이는 살균의

*Corresponding author : Jae Ho Park, Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University.

· Tel : +82-43-830-8614 · E-mail : parkjh@jwu.ac.kr

#First author : Hyung Jin Jeong, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University.

· Tel : +82-54-820-5464 · E-mail : jhj@andong.ac.kr

· Received : 14 April 2017 · Revised : 2 May 2017 · Accepted : 20 May 2017

생체 방어 작용을 하기도 하지만 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병을 초래하는 작용을 하며¹⁾, 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고 노화는 성인병 질환에 관여하게 되며 그 결과 여러 질병에 원인이 된다는 보고도 있다²⁾. 따라서 이러한 활성 산소종에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호할 수 있는 항산화제에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 특히 천연물에서 기인하는 천연 항산화제에 대한 연구가 주목받고 있으며, 천연에서 유래하는 페놀류 화합물인 식물화학물질(Phytochemicals)은 식물의 2차 대사산물에 의해 생성되며, 다양한 스트레스 환경, 자외선, 병원균의 침입, 적박한 토양, 온도, 가뭄 등 많은 요인과 연관되어 있다¹⁾. 식물화학물질은 항산화, 항암효과를 포함한 다양한 작용을 통해 인간의 건강에 유익한 도움을 준다³⁾. 식물화학물질에 의한 항산화 활성은 체내에서 생성되는 활성산소종의 소거활성과 연관이 있으며, 세포는 활성산소에 대항하기 위한 항산화 체계를 갖고 있으나, 과도한 활성산소에 의한 산화-환원 항상성의 변화는 세포의 보호 체계의 균형을 무너뜨려, 세포는 oxidative stress에 노출되게 된다⁴⁾. 이러한 oxidative stress로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래하여 여러 가지 질병을 유발 하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 특히 유전적인 측면에서, 정상세포에서 종양 세포로 진행되는 과정은 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 과정을 거쳐 발생하며, 개시(initiation)는 전자 친화성 발암인자(initiator)가 생체 내 대사에서 활성화되어, 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합하여 정상세포의 DNA를 손상시키고, 신생물 전구세포(preneoplastic cell)를 형성하는 돌연변이가 현상이다. 암의 개시(initiation) 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로, 개시(initiation) 단계에서의 DNA 손상 억제제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다^{6,7)}. 또한 활성산소종은 다양한 병리적 증상에 영향을 미치며 염증 반응과도 관련이 깊다⁸⁾. 염증 반응은 미생물 감염, 내독소, 조직 손상 등에 대한 방어기작으로, 이는 조직의 구조와 기능을 정상적으로 회복하기 위해 일어나는 필수적인 반응이다. 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 염증촉진성 매개체(pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소되고, 항염증성 매개체(anti-inflammatory mediators)는 증가됨으로써 스스로 염증반응이 제한되는 조절과정을 가지고 있다⁹⁾. 체내의 염증반응에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포(macrophages)는 이러한 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다. Lipopolysaccharide(LPS)에 의하여 유발된 inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 칼슘비의존성 경로를 통해 발현되며, cyclooxygenase-2(COX-2)는 염증 부위에서 염증성 자극에 의하여 다량 유도되어 발현된다. iNOS와 COX-2는 정상 상태에서는 발현되지 않으나 LPS 등에 의해서 발현이 유도되면 다량의 NO를 생성하거나 prostaglandin E2(PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증발현 증개 물질이 발생 된다^{10,11,12)}. 염증반응은 인체의 생체조직을 방어하기 위한 기전이지만 이러한 물질들의 과도한 생성을 통한 염증반응은 점막손상을 유발하고 심각한 경우 암을 비롯한 다양한 질병을 유발하기도 한다¹³⁾. 따라서 염증성 매개체들의 생성을 억제하는 천연물에서 유래하는 화합물의 탐색은 부작용이 적은 항염증 치료제 개발을

위한 방편으로 주목 받고 있다.

연(蓮, *Nelumbo nucifera*)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 다년생 수생식물로 식물 부위에 따라 그 쓰임이 다양하다. 특히 종자는 연자육(蓮子肉)으로 收澀藥에 속하며 성미가 짝하고 甘, 澀하며, 脾, 腎, 心經에 작용한다¹⁴⁾. 연자육의 다양한 효능 중 養心安神의 작용이 정신과 스트레스에 연관성이 있고, 본 연구진의 선행 연구¹⁵⁾에 의하면 연자육의 ethyl acetate 분획물은 높은 항산화 활성과 함께 산화적 DNA 손상 억제 효과가 매우 탁월하였다. 종자는 꽃에서 기인하는 것에서 착안하여 연꽃에 대한 항산화 및 산화적 DNA 손상억제 활성을 확인하였으며, 항염증 효과를 확인하고 페놀류 화합물의 분석을 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 연꽃(Nelumbinis Flos)은 2016년 8~9월 충남 아산시 연티읍 석정리 연 재배 논에서 채집한 것을 사용하였으며, 중원대학교 생약자원개발학과에서 식물학적 동정을 실시하였으며, 실험에 사용된 시료의 확정표본(표본번호 JWU16-002)은 중원대학교 생약자원개발학과에 보관하고 있다.

HPLC 분석에 사용된 methanol, petroleum ether, ethyl acetate, chloroform, acetonitrile 및 dimethyl sulfoxide는 Merck (HPLC grade, Frankfurter, Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. 그 외 용매는 SK chemicals (Seoul, Korea) 제품을 사용 하였다. 나머지 시약은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. ϕ X-174 RF I plasmid DNA는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타시약 및 기기는 별도 표기하였다. HPLC 분석에 사용된 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) Ethyl acetate 분획

연꽃(Nelumbinis Flos)의 ethyl acetate 분획물은 시료 100 g을 분쇄한 후, 80% methanol 3 L로 3일간 침지한 후 filter paper (Whatman NO. 2, Maidstone, UK)로 여과하였다. methanol 추출물을 40°C이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, JAPAN)로 농축한 후 분별 깔대기를 이용하여 petroleum ether, ethyl acetate 순으로 3회 용매분획 하였다. 이 중 ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, dimethylsulfoxide(DMSO)에 4000 ppm으로 용해하여 시료로 사용하였다.

항산화 활성을 나타내는 성분들은 주로 페놀류 화합물로, ethanol이나 ethyl acetate 등의 유기 용매에 쉽게 용해된다. 본 실험에서는 methanol 추출물 및 petroleum ether, ethyl acetate 분획물의 비교 실험 결과, ethyl acetate 분획물에서 항산화 활성 및 추출 수율이 효율적으로 나타나 이 분획물을

추출용매로 사용하였다.

2) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet¹⁶⁾ 방법을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300 μM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 를 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물 (0.32, 1.6, 8, 40, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 40 μl 에 DPPH solution 760 μl 를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC, Korea) 를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

3) ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg¹⁷⁾ 등의 방법을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7.4 mM 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간 ABTS radical을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 희석하였다. 각 농도별 추출물 40 μl 에 ABTS solution 760 μl 를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

4) 환원력

환원력은 Oyaizu의 방법¹⁸⁾을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출물 100 μl 에 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.6) 250 μl 과 1% potassium hexacyanoferrate (III) 250 μl 을 혼합한 후, 50°C에서 20분 반응시킨 후 찬물로 냉각하여, trichloroacetic acid (TCA) 250 μl 를 첨가하였다. 위 반응액을 2000 \times g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400 μl 에 증류수 400 μl 와 0.10% ferric chloride 16 μl 를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법¹⁹⁾을 참고하여 측정하였다. 추출물 50 μl 와 증류수 950 μl , folin 500 μl 를 혼합한 후, 20% sodium carbonate 2.5 ml를 넣어 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응물을 흔들지 않고 맑은 액체를 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 tannic acid를 사용하였고, 정량 직선방정식을 사용하였다.

6) Phenolic compounds에 대한 HPLC 분석

페놀류 화합물의 High performance liquid chromatography

(HPLC) 분석은 Waters 2695 system과 Waters 2487 Dual λ absorbance detector를 통해 분석하였다. 실험에 사용된 시료는 1 mg을 취하여 1 ml의 메탄올에 용해하여 0.45 μm membrane filter (Waters, USA)를 이용해 여과하였고, 시료 10 μl 를 메탄올 및 1% acetic acid/H₂O을 이동상으로 Waters XBridgeTM C-18 column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5.0 μm diameter particles를 이용하여 흡광도 280 nm에서 분석하였다. 추출물의 각 페놀성 화합물은 각각의 표준품과 비교하여 동정 및 정량하였다.

7) Φ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성

Φ X-174 RF I plasmid DNA 산화적 스트레스 손상 억제 활성은 Jung과 Surh의 방법²⁰⁾을 참고하여 측정하였다.

- Ferric Chloride (FeCl₂)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출물 40 μl 와 1.5 mM FeCl₂ 60 μl 와 증류수 700 μl 를 넣은 후, 37°C에서 15분 반응하였다. 반응물 20 μl 와 Φ X-174 RF I plasmid DNA 5 μl 를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

- Ferrous sulfate (FeSO₄)을 통한 산화적 스트레스

각 농도별 추출물 40 μl 와 0.5 mM FeSO₄와 0.5 mM hydrogen peroxide (H₂O₂)를 1:1로 혼합한 용액을 760 μl 를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응하였다. 반응물 20 μl 와 Φ X-174 RF I plasmid DNA 5 μl 를 넣고, 37°C에서 3분간 반응한 후, 10X loading buffer와 혼합한 후 1% agarose gel로 전기영동을 실시한 후 UV하에서 사진 촬영하였다.

8) 세포배양

본 연구에 사용된 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 실험하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin 및 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM에서 37 °C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다.

9) 세포 생존율

RAW 264.7 세포를 96-well plate에 1.0 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료를 처리하였다. 시료 처리 24시간 후 alamarBlue[®] Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 배지의 총량의 10%씩 처리하여 2시간 배양하였다. 반응 후 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Seoul, Korea)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

10) NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 96-well plate에 1.0 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료를 처리하였다. 시료 처리 1시간 후 LPS를 처리하여 24시간 배양한 상등액을 NO 생성량 측정에 사용하였다. 세포 상등액에 Griess

reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylendiamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid)를 처리하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) Western blot

RAW 264.7 세포를 6-well plate에 1.0×10^5 cells/well의 밀도로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료 및 LPS를 처리하였다. 시료 처리 24시간 후 PBS로 두 번 세척한 후, protease inhibitor cocktail을 포함한 RIPA buffer로 용해한 후 얼음에서 30분간 정치시켰다. 세포 용해액을 4 °C, 12,000 rpm에서 20분 간 원심분리하고, 상층액은 Bradford 시약(Bio-rad, California, USA)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 세포 용해액은 2×Lamillae buffer와 혼합하여 95 °C에서 5분간 가열 후 각 20 μg 단백질량에 해당하는 시료를 10% SDS-PAGE에서 전기 영동하여 분리하였다. 전기 영동된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 막에 옮겨 상온에서 1시간 동안 blocking (5% skim milk in TBST) 하였다. 1차 항체를 1 : 2000으로 희석하여 4 °C에서 overnight 처리하였다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고, 2차 항체 1 : 5000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit(Bio-rad, California, USA)로 반응하였다. 단백질 밴드는 FluorChem E (Cell biosciences, Santa Clara, USA)로 촬영하여 확인하였다.

12) 통계학적 분석

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences)을 이용하여 각 실험의 평균과 표준편차를 계산하였고, ANOVA를 통한 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 각 실험의 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 항산화 활성

항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력을 평가하였다. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 (Figure 1), 각 추출물의 농도가 높을수록 DPPH 소거 활성이 높았으며 각 추출물의 농도(0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml)에서 $8.38 \pm 0.41\%$, $18.03 \pm 0.80\%$, $50.10 \pm 2.57\%$, $94.00 \pm 0.68\%$, $97.02 \pm 0.88\%$ 로 나타났다. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과(Figure 2), 각 추출물의 농도(0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml)에서 $10.54 \pm 0.73\%$, $31.57 \pm 3.57\%$, $91.27 \pm 1.74\%$, $93.85 \pm 8.06\%$, $96.42 \pm 0.25\%$ 의 소거 활성을 나타내었으며, 연꽃 ethyl acetate 분획물의 환원력은 각 추출물의 농도(0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml)에서 L-ascorbic acid (100)와 비교하여 각 추출물의 농도(0.32, 1.6, 8, 40, 200 μg/ml)에서 10.72 ± 0.54 , 18.42 ± 0.48 ,

66.52 ± 1.21 , 91.62 ± 0.48 , 100.14 ± 0.31 로 높은 환원력을 나타냈다(Figure 3).

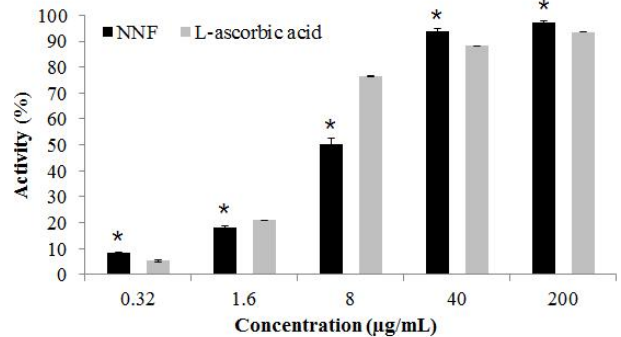


Figure 1. DPPH radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF). Data are means \pm SD (n = 3). Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (* $p < 0.05$). All data are from one experiment, representing three independent experiments.

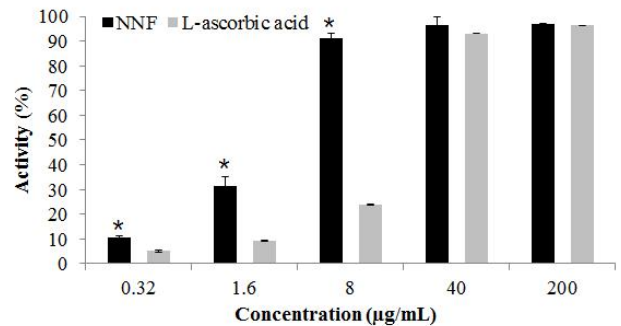


Figure 2. ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF). Data are means \pm SD (n = 3). Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (* $p < 0.05$). All data are from one experiment, representing three independent experiments.

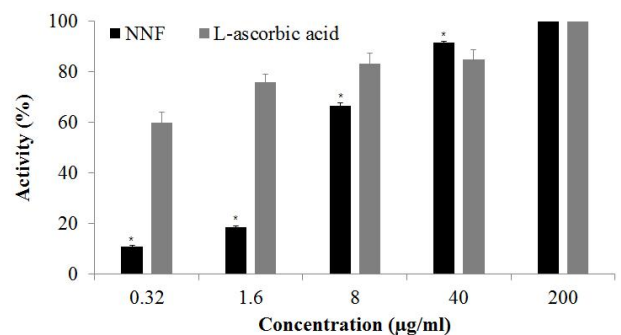


Figure 3. Reducing Power of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF). Data are means \pm SD (n = 3). Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (* $p < 0.05$). All data are from one experiment, representing three independent experiments.

2. 총 페놀 화합물 함량 및 HPLC를 통한 페놀류 화합물 동정

연꽃 ethyl acetate 분획물의 총 페놀류 화합물의 함량 및 HPLC 분석을 통한 페놀류 화합물의 분석 및 동정을 위해 표준품과 비교하여 정량 분석하였다. 총 페놀 화합물 함량을 분석한 결과(Table 1), 총 페놀 화합물은 8.70 ± 0.02 mg/g으로

나타났다. 총 페놀 함량은 농도별로 희석한 Tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다. 표준품과 비교하여 HPLC를 통한 페놀류 화합물을 분석 및 동정한 결과(Table 1 and

Figure 4), Chromatogram상에서 chlorogenic acid, catechin, epicatechin을 동정하였으며, catechin의 함량이 가장 높은 120.27±6.02로 확인되었다. caffeic acid는 확인되지 않았다.

Table 1. Total phenol content and identification of phenolic compounds of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos by HPLC analysis.

Sample	Total phenol content (mg/g TAE)	Chlorogenic acid (μg/g)	Catechin (μg/g)	Caffeic acid (μg/g)	Epicatechin (μg/g)
Nelumbinis Flos	8.70±0.02	7.08±0.15	120.27±6.02	ND	9.09±0.14

Data are means ± SD (n = 3). All data are from one experiment, representing three independent experiments. ND : Not detected

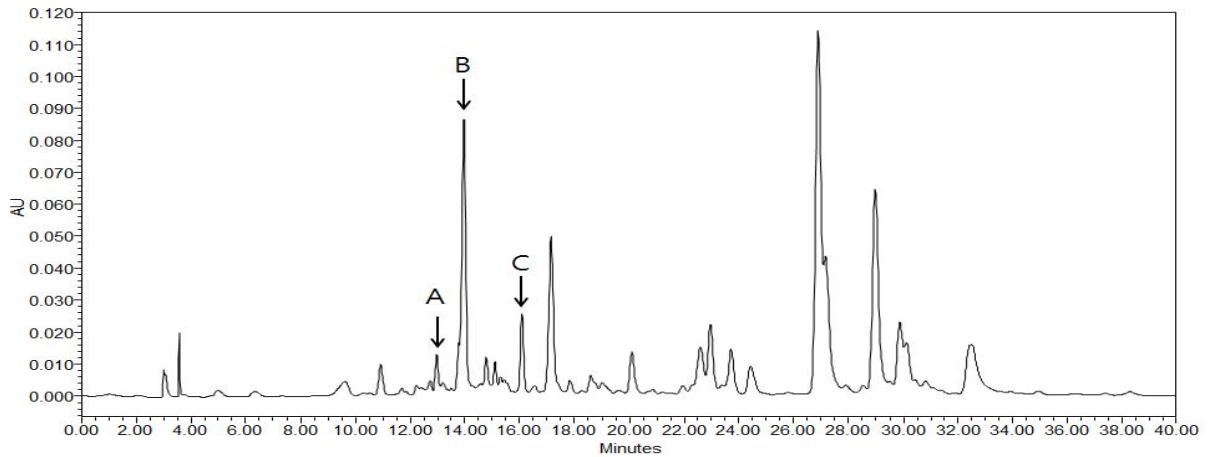


Figure 4. Chromatogram of identification of phenolic compounds of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos by HPLC. A : Chlorogenic acid, B : Catechin, C : Epicatechin

3. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성

연꽃 ethyl acetate 분획물의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 활성을 평가하기 위해 FeCl₂(ferric chloride)의 산화적 스트레스와 FeSO₄(ferrous sulfate)와 H₂O₂의 fenton 반응을 이용한 산화적 스트레스를 이용하여 DNA 손상을 비교 분석하였으며, ϕX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포적 시스템으로 평가하였다. 연꽃 Ethyl acetate 분획물 모두 대조군과 비교해서 모든 농도에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 억제하는 활성을 보였다 (Figure 5). Fe²⁺로 기인한 라디칼에 대한 방어효과는 추출물 농도 200 μg/ml에서 약 70.01%를 나타내었으며, OH⁻로 야기된 라디칼에 대한 방어효과는 200 μg/ml에서 가장 높은 약 78.75%으로 확인되었다. 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled (SC) 형태로 존재하나 H₂O₂와 철의 fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼 또는 철 이온 존재 하에서는 산화적 스트레스에 의한 손상을 받아 open-circular (OC)형태로 전환된다.

4. 세포 생존율

연꽃 ethyl acetate 분획물 처리에 따른 RAW 264.7 세포 생존율은 alamarBlue[®] Cell Viability assay로 확인하였다. 세포 생존율은 각 추출물의 농도(25, 50, 100, 200 μg/ml)에서 101.31±4.00%, 103.32±10.87%, 114.75±5.00%, 110.06±4.86%로 나타났다(Figure 6). 이 결과, 연꽃 ethyl acetate 분획물은 RAW 264.7 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다.

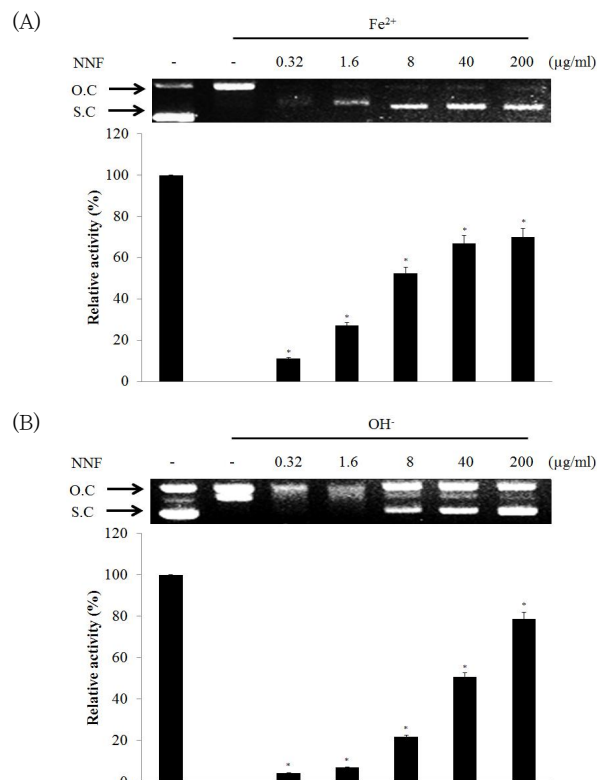


Figure 5. Inhibition effect of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF) against oxidative DNA damage by Fe²⁺ ion (A) and hydroxyl radical (B). Data are means ± SD (n = 3). Comparing with non-treated *N. nucifera* flower with oxidative DNA damage by Fe²⁺ ion and hydroxyl radical (*p < 0.05). All data are from one experiment, representing three independent experiments.

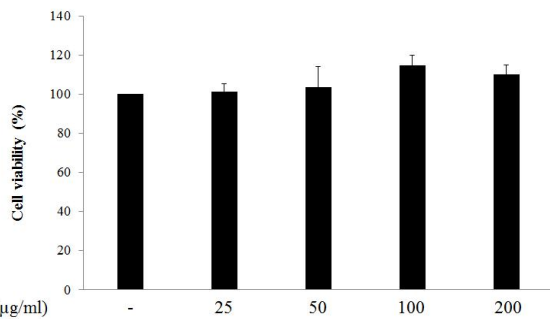


Figure 6. Effects of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF) on cell viability. RAW 264.7 macrophages were treated with NNF (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml). After incubation for 24 hours, cell viability was measured by using the alamarBlue® Cell Viability reagent. Data are means ± SD (n = 3). All data are from one experiment, representing three independent experiments.

5. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

연꽃 ethyl acetate 분획물의 항염증 효과를 확인하기 위해 LPS 처리에 따른 RAW 264.7 세포의 NO 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 세포에서 NO 생성량은 LPS 무처리구에 비해 LPS 처리구에서 급격한 상승을 보였다. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 NO 생성량을 측정한 결과(Figure 7), 각 추출물의 농도가 높을수록 NO 생성량이 감소하였으며 각 추출물의 농도 (25, 50, 100 µg/ml)에서 265.41 ± 6.40, 209.99 ± 18.73, 103.82 ± 14.03 µM로 나타났다.

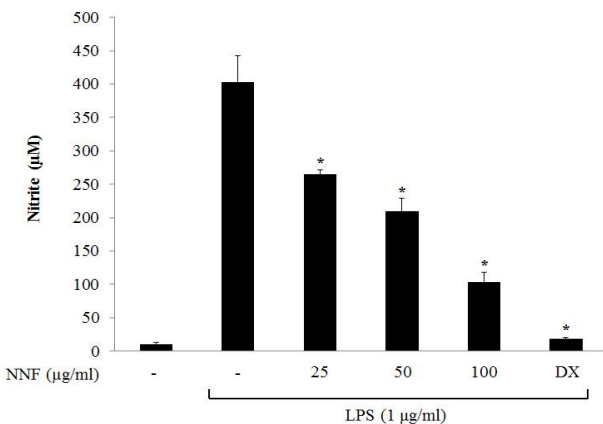


Figure 7. Inhibitory effects of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF) on the production of nitric oxide (NO). RAW 264.7 macrophages were stimulated with treatments of Lipopolysaccharide (LPS), NNF (0, 25, 50, 100 µg/ml), and dexamethasone (100 µg/ml) for 24 hours. After 24 h stimulation, NO secretion in the supernatants was measured by using Griess reagent. NO secretion was calculated by using a standard curve according to sodium nitrite standard solution. Data are means ± SD (n = 3). Comparing with LPS-treated group (*p < 0.05). All data are from one experiment, representing three independent experiments. DX : dexamethasone at 100 µg/ml.

6. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 iNOS 및 COX-2 발현 억제

연꽃 ethyl acetate 분획물의 iNOS 및 COX-2 발현 억제를 확인하기 위해 Western blot 분석을 실시하였다. Pro-inflammatory mediator인 NO는 iNOS와 COX-2의 발현과

관련이 깊으며, LPS에 의해 자극되지 않은 RAW 264.7 세포는 iNOS 및 COX-2 단백질이 거의 발현되지 않는다. 그러나 LPS에 의해 이러한 인자들은 급격히 증가하게 된다. 각 추출물의 농도(25, 50, 100 µg/ml)에서 iNOS 단백질 발현은 530.50 ± 19.47%, 508.84 ± 18.43%, 119.17 ± 9.74%으로 나타났다(Figure 8). 또한 각 추출물의 농도(25, 50, 100 µg/ml)에서 COX-2 단백질 발현은 119.93 ± 6.98%, 116.94 ± 6.80%, 113.43 ± 6.60%으로 나타났다(Figure 9).

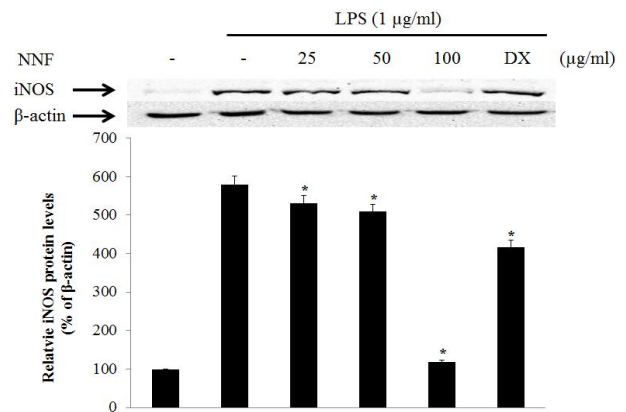


Figure 8. Inhibitory effects of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF) on the expression of iNOS protein. RAW 264.7 macrophages were stimulated with treatments of Lipopolysaccharide (LPS), NNF (0, 25, 50, 100 µg/ml), and dexamethasone (100 µg/ml) for 24 hours. After 24 h stimulation, total cell lysates were subjected to Western blotting analysis. The protein expression of iNOS was detected by using an enhanced chemiluminescence reagent. Those levels were quantified by analysis with the software Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.) and normalized to corresponding β-actin levels. Data are means ± SD (n = 3). Comparing with LPS-treated group (*p < 0.05). All data are from one experiment, representing three independent experiments. DX : dexamethasone at 100 µg/ml.

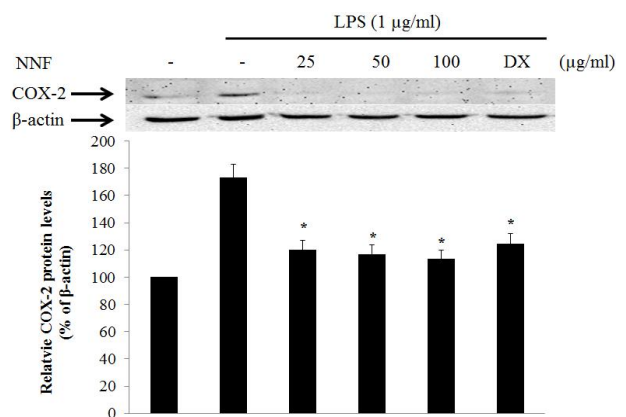


Figure 9. Inhibitory effects of ethyl acetate fractions from Nelumbinis Flos (NNF) on the expression of COX-2 protein. RAW 264.7 macrophages were stimulated with treatments of Lipopolysaccharide (LPS), NNF (0, 25, 50, 100 µg/ml), and dexamethasone (100 µg/ml) for 24 hours. After 24 h stimulation, total cell lysates were subjected to Western blotting analysis. The protein expression of COX-2 was detected by using an enhanced chemiluminescence reagent. Those levels were quantified by analysis with the software Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.) and normalized to corresponding β-actin levels. Data are means ± SD (n = 3). Comparing with LPS-treated group (*p < 0.05). All data are from one experiment, representing three independent experiments. DX : dexamethasone at 100 µg/ml.

IV. 고 찰

본 연구는 약용 및 식품으로 이용되고 있는 연의 꽃의 이용 가치를 확인하기 위해 연꽃의 항산화 활성, 산화적 DNA 손상 억제 활성 및 항염증 효과를 확인하여 생물학적 유용성을 검증하였다. 항산화 활성의 기작은 유리기와 반응하는 것으로, 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH와 ABTS는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 DPPH 라디칼 소거 활성은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법이며, 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다²¹⁾. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력으로 평가하였다. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성에서, 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였으며 추출물 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $97.02 \pm 0.88\%$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $94.00 \pm 0.68\%$ 로 L-ascorbic acid와 비교하여 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한 L-ascorbic acid(5.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 비교하여 IC_{50} (inhibitory concentration) 값이 6.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유사한 활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거활성은 라디칼을 생성하는 ABTS가 존재 시, hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 빠른 항산화 반응에 의해 myoglobin radical을 감소시키는 기전으로 소거활성을 나타낸다. ABTS 라디칼 소거활성에서 추출물 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $96.42 \pm 0.25\%$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $93.85 \pm 8.06\%$ 로 L-ascorbic acid와 통계적으로 비교하였을 때 유의성 없는 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한 L-ascorbic acid(10.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 비교하여 IC_{50} 값이 2.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 상당히 높은 활성을 나타냈다. 환원력 평가는 시료의 환원력에 따라 노란색의 실험 용액이 청색 또는 녹색으로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 항산화제와 같은 환원제는 Fe^{3+} /ferricyanide complex를 환원시켜 ferrous 형태로 전환하고, 이로 인한 Perl's Prussian blue의 형성을 700 nm에서 측정하는 원리이다²²⁾. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 환원력은 L-ascorbic acid(100.00)와 비교하여 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 100.14 ± 0.31 의 환원력을 나타냈으며, 통계적으로 유의성 없는 높은 환원력을 나타냈다. 이러한 항산화 활성은 전자 공여능과 밀접한 연관이 있으며 체내에서 생성되는 활성산소종의 소거활성과 깊은 연관성을 가진다.

연꽃 ethyl acetate 분획물의 페놀류 화합물을 분석한 결과, 총 페놀류 화합물의 함량은 8.70 ± 0.02 mg/g TAE로 나타났다. 또한 플라보노이드 화합물의 함량이 높은 연잎 추출물의 유방암 세포 증식에 관한 연구²³⁾에서 gallic acid, catechin, epicatechin 등의 페놀류 화합물에 대한 HPLC 분석을 참고하여, HPLC 분석을 통한 페놀류 화합물을 동정한 결과, caffeic acid를 제외한 chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin의 함량이 각각 7.08 ± 0.15 , 120.27 ± 6.02 , 9.09 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{g}$ 으로 확인되었다. 확인된 페놀류 화합물의 항산화 활성은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬전단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다.

총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 2차 대사산물로서 항산화 활성과 항암, 항균, 항염증, 간 보호 효과 등 많은 생리적 작용을 하는 생리활성물질로 알려져 있다²⁴⁾.

연꽃 ethyl acetate 분획물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 환원력과 같은 전자 공여능을 바탕으로 한 항산화 활성은 페놀류 화합물의 구조적인 활성과 깊은 연관성을 가지고 있다고 사료된다. 세포는 활성 산소종을 방어하기 위한 여러 항산화 체계를 유지하고 있지만, 활성산소의 총량이 세포가 평형을 유지하는 항산화 보호 체계를 초과하여 산화 및 환원 균형을 붕괴할 때 세포는 산화적 스트레스에 노출 수밖에 없다. 산화로 인한 변이는 단백질과 지질을 분해되고 재합성하는 것을 근거로 하였을 때 DNA의 손상에 의한 암의 발생은 산화적 스트레스에 의해 매우 큰 영향을 받는다고 할 수 있다²⁵⁾. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 산화적 DNA 손상 억제 활성을 평가한 결과, Fe^{2+} 로 기인한 라디칼에 대한 방어효과는 추출물 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 70.01%, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 66.92%로 나타났다. OH^- 로 야기된 라디칼에 대한 방어효과는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 78.75%, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 50.62% 그리고 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 21.58%로 나타났다. FeCl_2 에서 기인한 Fe^{2+} 및 FeSO_4 에서 기인한 OH^- 라디칼에 대한 산화적 손상에 대해 억제효과는 추출물 농도가 증가하는 것에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 추출물 농도 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 약 70.01%와 약 78.75%의 억제 활성을 확인하였으며, 이러한 산화적 DNA 손상 억제 활성은 연꽃 ethyl acetate 분획물이 포함하는 페놀류 화합물의 높은 항산화 활성을 통해 자유 라디칼을 효과적으로 제거하는 것에 기반을 둔다고 볼 수 있다.

Pro-inflammatory cytokines, prostaglandins과 NO 생성은 활성화된 대식세포에서 염증 반응에서 중요한 역할을 한다^{26,27)}. NO는 Inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, 정상적인 상태에서는 신경 전달, 혈관 확장, 면역 반응 등의 생리적인 기능을 조절하는 중요한 역할을 하지만^{28,29)}, 염증 반응에서 과발현된 NO는 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키고 염증을 심화시켜 다양한 세포 및 조직손상을 일으켜 만성 염증 질환 및 자가면역 질환 등을 초래하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. iNOS의 발현은 세포내 Ca^{2+} 농도와 관계없이 세균성 독소 또는 염증 및 면역 반응, 허혈, 조직손상, 산화성 스트레스 등에 따라 유리되는 여러 종류의 cytokine에 의해서 유전자 전사단계에서 유도되며, 이에 따라 NO가 대량 생성 유리될 경우에는 질병의 병태생리에 중요한 인자로 관여할 수 있다³¹⁾. COX-2는 염증 반응뿐만 아니라 혈액응고, 신장기능, 혈관조절 및 면역 반응 등에 관여하고, 염증성 cytokine이 분비되면 COX-2가 활성화 된다³²⁾. 또한 COX-2는 염증조직, 악성 종양조직에서 정상 세포에 비해 많은 양의 프로스타글란딘의 생성을 유도하여 혈관 생성을 촉진하고 세포의 증식을 도울 뿐 아니라 면역능력을 억제함으로써 암세포 성장에 좋은 환경을 제공하여 COX-2의 발현은 또 다른 질병의 병원성과 직접적인 연관성을 나타낸다³³⁾. 본 연구에서 연꽃 ethyl acetate 분획물이 LPS로 활성화된 대식세포의 NO생성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 연꽃 ethyl acetate 분획물의 NO 억제는 iNOS 및 COX-2의 억제와 상관관계가 있다고 사료된다. 이를 통해 강한 항산화 활성과

그에 따른 산화적 DNA 손상 억제 및 항염증 효과 사이에 밀접한 연관성을 확인하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 연꽃 ethyl acetate 분획물의 생물학적 유용성 검증을 위해 산화적 DNA 손상 억제 활성 및 항염증 활성을 확인하였다. 또한 HPLC를 이용한 총 페놀성 화합물의 분석을 통해 페놀성 화합물의 함량을 확인하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성은 추출물 농도 200 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 L-ascorbic acid와 비교하여 유사한 효과를 나타내었으며, 특히 ABTS 라디칼 소거활성에서의 IC_{50} 값은 월등하게 낮은 값을 보였다.
2. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 HPLC 분석을 통한 페놀류 화합물은 chlorogenic acid, catechin, epicatechin이 동정 및 정량되었다.
3. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과에서 Fe^{2+} 및 OH^- 로 기인한 산화적 스트레스에 대한 상당한 억제효과를 보였으며 모든 농도에서 억제 효과를 나타냈다.
4. 연꽃 ethyl acetate 분획물의 항염증 활성은 iNOS 및 COX-2의 억제 활성에서 연관된 NO 생성 억제를 통해 염증 반응의 완화 및 감소를 나타냈다.

결론적으로 연꽃 ethyl acetate 분획물의 산화적 DNA 손상 억제 활성 및 항염증 활성은 높은 페놀류 화합물과 연관성이 있다고 판단되며, 식물 유래의 천연 항산화제로서의 활용 가능성이 매우 높기 때문에 식품이나 화장품 소재로 연구 개발이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 안동대학교 2016년 기본연구지원사업에 의하여 연구된 것입니다.

References

1. Maxwell SJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 1995 ; 49 : 345-61.
2. Marnett L. Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000 ; 21 : 361-70.
3. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011 ; 48 : 197-216.
4. Shosuke K, Yusuke H, Shinji O. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*. 2001 ; 488 : 65-76.
5. Harold ES, Darrell EA, Evan IF, John AM. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nut Biochem*. 2007 ; 18 : 567-79.
6. Surh YJ. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Res*. 1999 ; 428(1-2) : 305-27.
7. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 ; 93(21) : 11848-52.
8. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol*. 1993 ; 23(1) : 21-48.
9. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2002 ; 2(10) : 787-95.
10. Choi DS. Study on the antiinflammatory effect and mechanism of isoegomaketone in vitro and in vivo. Chonbuk National University. 2009.
11. Chae CH. Functional role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in acute inflammation. Gwacheon : Ministry of Health and Welfare. 2004 : 10-1.
12. Bak JP, Son JH, Kim YM, Jung JH, Leem KH, Lee EY, Kim EH. Suppression effect of the inflammatory response in macrophages by Paeoniae Radix Rubra extracts. *Kor J Med Crop Sci*. 2011 ; 19 : 373-9.
13. Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH and Cho HW. Inhibitory effect of Alopecurus aequalis Sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor J Med Crop Sci*. 2014 ; 22 : 98-104.
14. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Boo YM. *Herbological Study on herbal medicine*. Korea : Youngrim, 2008 : 761-6.
15. Park JH, Lee BG, Byun GI, Kim DW. Antioxidant Activities and Inhibitory Effect on Oxidative DNA Damage of Nelumbinis Semen Extracts. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(4) : 55-9.
16. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT - Food Sci Technol*. 1997 ; 30(6) : 609-15.
17. Van den Berg R, Haenen GR, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent

- antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999 ; 66(4) : 511-7.
18. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr.* 1986 ; 44 : 307-15.
 19. AOAC. Official Methods of Analysis, 14th ed, Washington DC, Association of Official Analytical Chemists, 1995 ; 8-35.
 20. Jung YJ, Surh YJ. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic Biol Med.* 2001 ; 30(12) : 1407-17.
 21. Que F, Mao L, Pan X. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int.* 2006 ; 39(5) : 581-7.
 22. Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 2007 ; 100(4) : 1511-6.
 23. Yang MY, Chang YC, Chan KC, Lee YJ, Wang CJ. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Integr Med.* 2011 ; 3 : e153-e63.
 24. Ferreres F, Gomes D, Valentano P, Goncalves R, Pio R, Chagas EA, Seabra R, Andrade P. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem.* 2009 ; 114(3) : 1109-27.
 25. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Res.* 2001 ; 488 : 65-76.
 26. Szabo C. Role of nitric oxide in endotoxic shock. An overview of recent advances. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 ; 30(851) : 422-5.
 27. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 2003 ; 33(3) : 155-67.
 28. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* 1996 ; 316(1) : 209-15.
 29. An SM, Kim HG, Choi EJ, Hwang HH, Lee ES, Baek JH, Boo YC, Koh JS. Screening for anti-inflammatory activities in extracts from Korean herb medicines. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2014 ; 40(1) : 95-108.
 30. Kang CH, Choi YH, Choi IW, Lee JD, Kim GY. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression by aqueous extract of *Orixa japonica* in Raw 264.7 cells via suppression of NF- κ B activity. *Trop J Pharm Res.* 2011 ; 10(2) : 161-8.
 31. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 ; 261(3) : 917-22.
 32. Sato T, Nakajima H, Fujio K, Mori Y. Enhancement of prostaglandin E2 production by epidermal growth factor requires the coordinate activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 in human squamous carcinoma A431 cells. *Prostaglandins.* 1997 ; 53(5) : 355-69.
 33. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages : up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 1998 ; 58(6) : 1208-16.