pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 35. No. 2, 116~126 (2022)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2022.35.2.116

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 청대의 항염증효과

장 수 주* · †강 순 아**,***
호서대학교 벤처대학원 융합공학과 박사과정 학생, *호서대학교 보건산업연구소 연구원,
**호서대학교 벤처대학원 융합공학과 교수, ***호서대학교 보건산업연구소 소장

Anti-Inflammatory Effect of Chung-Dae in LPS-Treated RAW 264.7 Cells

Sou Jou Jang* and †Soon Ah Kang**,***
Ph.D. Student, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea
**Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea*
***Professor, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea*
****Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea*

Abstract

The purpose of this study was to analyze the anti-inflammatory effect of Chung-Dae Indigo Pulverata Levis, indigo naturalis) produced during indigo dyeing. As a result of *in vitro* cytotoxicity experiments using RAW 264.7 cell, Chung-Dae extract did not inhibit cell proliferation in Raw 264.7 cells in the range of 1~32 μg/mL. NO production was significantly reduced when Chung-Dae extracts were treated at concentrations of 2, 8, and 32 μg/mL (p<0.05). The pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6, IL-1β and IFN-ɣ significantly decreased when the Chung-Dae extract was treated at concentrations of 2, 8, and 32 μg/mL compared to the LPS group, and similarly, the TNFα and IL-6 mRNA levels also decreased. Additionally, the mRNA level of COX-2 was also suppressed. At the protein expression level, the expression of TNF-α, IL-6, iNOS and COX-2 were observed with LPS and Chung-Dae extract significantly decreased compared to the group treated with only LPS (p<0.05). From the above results, it shows that Chung-Dae extract, a plant-derived compound, inhibits the inflammatory response induced by LPS in RAW 264.7 cells. and in particular, regulates the inflammatory response by inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines and inflammation-related enzymes.

Key words: anti-inflammatory effect, Chung-Dae, indigo pulverata levis, *Polygonum tinctorium* Lour., LPS-treated RAW 264.7 cells

서 론

쪽(蓼藍: *Polygonum tinctorium* Lour.)은 마디풀과 여뀌 속에 속하는 식물로 수세기 동안 한의학 소재와 염색 염료로 사용되었다. 쪽잎은 해독작용, 해열효과, 소종의 효능이 있어 바이러스로 유발하는 호흡 계통의 질환인 감모현상, 이질, 황달 등의 증상 및 각종 염증완화에 약재로 이용하였다(Cho KR 2007; Korean Studies Information Service 2007; Heo J 2011). 쪽잎에는 인디고(indigo) 색소가 인디칸(indican)이라는 무색의 전구체(precursor) 형태로 존재하는데 수용성이므로 쪽잎을 물속에 담그면 잎속의 효소에 의하여 발효되어 인독실(indoxyl)과 포도당으로 가수분해 된다(Kim 등 2013). 노란빛인 인독실은 공기 중 산소에 의해 산화되면서 청색 색소인 불용성 인디고틴(indigotin)으로 변한다(Stoker 등 1998). 쪽에는 인디고틴과 소량의 인디루빈(indirubin)이 함유되어 있는데 인디루빈은 항암성 및 항균성 활성이 있어 백혈병 및 골수염 등에 치료효과가 보고되고 있다(Xia & Zenk 1992). 청대(Indigo Pulverata Levis, indigo naturalis, Chung-Dae)는 쪽 색소를 만들 때 생성된 중간산물로서 남색의 거품 형상을 하는데 이를 햇볕에 말린 분말이다(The Compilation Committee of

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Engineering, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2059-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

Korean Medicine Encyclopedia 2001; Park 등 2011). 청대는 감염성, 염증성 질환, 궤양성 대장염 및 잠열을 치료하기 위해 전통 한의학에서 수세기 동안 사용되어 왔다(Tang & Eisenbrand 1992; Kim 등 1998). 또한, 청대는 해열, 항염 및 해독 특성을 가지고 있다고 보고했다. 최근에는 위장 질환 및 알츠하이머병 치료에 탁월한 임상 효능이 있음이 입증되었다(Seo HS 2008; Han 등 2014a; Sun 등 2021). 그리고 청대에는 면역 체계에 영향을 주어 세균 감염, 암, 염증 등 다양한 질병 치료에 효과적인 인디고(indigo)와 인디루빈(indirubin)이 함유되어 있다고 알려져 있다(Lin 등 2009; Choo 등 2014).

염증반응이란 외부로부터 물리 화학적 자극 혹은 세균감염에 대비하여 면역세포가 염증 매개 물질을 분비하여 손상된 조직을 재생하려는 기전이다(Willoughby DA 1975). 현대사회에서 생활환경 변화 및 식생활 변화에 따른 스트레스가 증가하면서 여드름, 아토피, 천식, 과민성 피부염 등의 만성염증 질환이 증가하였다. 그러나 만성염증반응은 조직의 손상을 유도하여 활성산소가 생성되고 염증성 싸이토카인은 내독소 자극을 포함한 염증질환을 포함한 다양한 질병의 매개체 역할을 한다(Chung 등 2011).

일반적으로 천연물에 존재하는 페놀성 화합물 중 폴리페놀계 화합물들은 항산화, 항균효과, 항심혈관질환, 항당뇨, 항암 및 항골다공증 생리활성을 나타낸다(Scalbert 등 2005). 자연계에 존재하는 다양한 식물유래 천연색소물질도 항산화 효소가 존재하며 항산화 활성을 비롯하여 건강과 관련된 다양한 생리활성에 역할을 한다(Rice-Evans 등 1996; Kim 등 2015). 따라서 본 연구에서는 쪽 염색 시 생성되는 청대의 항염증 활성을 분석함으로써 고부가가치의 기능성 식품소재로서의 개발 가능성을 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 추출물 제조

본 실험에 사용한 청대는 킨디고(경기도 용인시)에서 제공받아 진행하였다. 청대는 전통적인 방법으로 쪽을 물에 2~3일 발효시켜 쪽은 건져내고 우려낸 액체에 패분(조개가루)을 넣고 저어주어 산화시켜 위에 떠오른 남색 거품만 모은 것을 말려 분말화하였다(The Compilation Committee of Korean Medicine Encyclopedia 2001). 분말시료에 10배의 메탄올을 첨가하여 24시간 교반한 후 추출물을 No. 2 filter paper (Whatman, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)을 이용하여 여과한 후 추출액만 모으는 과정을 2회 반복하였다. 추출물은 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 50℃에서 감압 농축하여 메탄올 추출물을 획득하였다. 농축된 청대시료의 메탄올 추출물은 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 250 mg/mL의 농도로 희석한 후 *in vitro* 실험에 사용하였다 (Kim 등 2015).

2. Raw 264.7 대식세포 배양

Raw 264.7 세포는 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. Raw 264.7 세포는 1% penicillin-streptomycin solution(Welgene, Gyeongsan, Korea)과 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS)(GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Media, GIBCO)을 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였고 일주일에 2~3회씩 계대 배양하였다(Huang 등 2019).

3. MTT assay를 이용한 세포 성장 억제효과

Luna automated cell counter(Logos Biosystems, Gyunggido, Korea)로 세포의 수를 측정하고, 96-well plate에 1개의 well당 1×10^5 cells/mL 농도로 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후에, 배지만 제거하고 1~64 μg/mL 농도의 청대 추출물 및 2 μg/mL LPS를 배지로 희석해 각 well 당 100 μL씩 첨가한 후 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 500 μg/mL 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) solution을 배지로 희석해 각 well에 100 μL씩 분주하고 4시간 동안 배양하였다. 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시키고, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Skehan 등 1990).

4. NO 생성능 측정

NO 생성능은 Griess 시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 측정하였고, Luna automated cell counter (Logos Biosystems, Gyunggido, Korea)로 세포의 수를 측정하였고, 6-well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 배지 2 mL를 첨가한 다음 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 2, 8, 32 μg/mL 농도의 청대 추출물과 2 μg/mL LPS를 48시간 동안 첨가한 후, Griess 시약을 배지에 처리하였고, Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(PerkinElmer, Wellesley, MA, USA)로 흡광도를 550 nm에서 측정하였다 (Khan 등 2009).

5. Enzyme-linked immunosorbent(ELISA) assay 이용한 염증관련 사이토카인 측정

실험을 위하여 6-well plate에 한 개의 well당 2×10^5 cells/mL 농도로 37℃, 5% CO_2 incubator 조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 2, 8, 32 μg/mL 농도의 청대 추출물과 2 μg/mL LPS를 각각 well에 처리하고, 48시간 동안 배양한 후 ELISA

Kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)로 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 IFN-ɣ의 농도를 측정하였다. 제조사가 제공한 실험방법에 따라 진행하였다(Kim 등 2012). TMB substrate solution이 함유된 기질액 100 μL씩 일정량을 접종한 후 실온에서 20분 후 stop solution을 100 μL 처리하여 반응을 종결시켰다. Optical density는 Wallac Victor3 1420 Multilabel Counter(Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

6. RT-qPCR을 이용한 염증관련 유전자의 mRNA level 측정

본 실험을 위하여 6-well plate에 한 개의 well에 세포를 1×10^5 cells/mL 농도로 처리하고 24시간 동안 37℃에서 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배지를 제거한 후 2, 8, 32 μg/mL 농도의 청대 추출물과 2 μg/mL LPS를 배지로 희석해 각각 well에 2 mL씩 처리하였다. 배양 48시간 후, 배지를 제거한 다음 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 샘플당 1 mL씩 처리하여 RNA를 분리하였다. 사이코카인 RNA 정량은 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하였고, 정량된 RNA는 Superscript Ⅱ reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Thermal Cycler BioRad CFX-96 Real Time System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 사이토카인 유전자 발현을 분석하였다(Song 등 2017). 유전자로는 18S rRNA, TNF-α, IFN-ɣ, IL-1β와 COX-2를 사용하였고, primer 서열은 다음과 같다: 18S rRNA forward 5'-TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA-3', reverse 5'-CCC TCC AAT GGA TCC TCG TT-3', TNF-α forward 5'-CAG GCG GTG CCT ATG TCT C-3', reverse 5'-CGA TCA CCC CGA AGT TCA GTA G-3', IL-6 forward 5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA A-3', reverse 5'-AGT GGT ATC CTC TGT GAA G-3', COX-2 forward 5'-GGT GCC TGG TCT GAT GAT G-3', reverse 5'-TGC TGG TTT GGA ATA GTT GCT-3'.

7. Western blot을 이용한 AGS 세포 내 유전자의 단백질 발현 측정

실험을 위한 세포의 배양 및 샘플처리 과정은 mRNA 측정과 동일한 방식으로 진행하였다. 샘플을 처리한 후 배지를 제거한 다음 분석을 위한 Radio-immunoprecipitation assay (RIPA)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) buffer을 사용하여 단백질을 분리하였다. 단백질의 농도는 Bradford assay 방법을 이용하여 정량하였다(Bradford MM 1976). 분석을 위한 추출된 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용하여 분리한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) membrane으로 이동 후, PBS-T를 함유한 5% skim milk를 사용하여 비 특이적인 단백질을 blocking 시켰다. Blocking 시킨 후, PVDF membrane 세척은 PBS-T 3회, PBS 1회로 세척한 후, 4℃에서 1차 항체를 overnight하면서 반응시켰다. 다음 단계로 PBS-T 3회, PBS 1회 세척 후 실온에서 2시간 동안 2차 항체를 처리하였다. TNF-α, IL-6, COX-2, iNOS, IκB-α 및 α-TUBLIN(Santa Cruz, Dallas, TX, USA)의 1차 항체를 사용 후 각각에 맞는 2차 항체 사용 후 LAS-4000(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 사용하여 확인하였다(Zhao 등 2013).

8. 통계 처리

실험결과 RT-qPCR 데이터는 평균±표준오차(standard error, SE)로 보여주었고, 이를 제외한 모든 실험의 데이터는 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 보여주었다. 실험군 간의 유의성은 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 각 처리 시료(n=3) 간의 유의성을 검증하였다. $p<0.05$ 이하일 때 유의성이 있다고 간주하였다. SPSS v18 statistical software package(SPSS Inc., Westlands, Hong Kong)를 이용하여 모든 실험을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 청대의 cell viability 측정

세포의 증식 억제 정도를 측정하기 위한 MTT assay는 formazan crystal로 침전되는 변화 정도를 흡광도로 측정하여 확인하는 방법이다. 1~64 μg/mL 범위에서 청대 추출물의 농도가 2 μg/mL에서 99.39±1.70%, 8 μg/mL에서 98.91±1.06%, 32 μg/mL에서 93.27±3.93%로 Raw 264.7 세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않았지만, 세포독성이 64 μg/mL 이상의 농도에서 확인되었다(Fig. 1A). 또한 LPS와 청대 추출물을 함께 세포에 처리한 경우, LPS만 처리하면 79.36±3.40%의 생존율을 보이지만 LPS와 2 μg/mL의 청대 추출물을 함께 처리했을 때 82.05±3.69%, LPS와 8 μg/mL의 청대 추출물을 함께 처리했을 때 86.13±3.31% 그리고 LPS와 64 μg/mL의 청대 추출물을 함께 처리했을 때 91.97±2.03%로 LPS 처리에 의한 세포독성을 청대추출물에 의하여 억제하는 것으로 확인되었다(Fig. 1B). LPS는 LBP 및 TLR4와 같은 여러 단백질과 상호작용하도록 자극하면서(Poltorak 등 1998; Gioannini & Weiss 2007), LPS에 의해 활성화된 TLR4는 NF-κB를 유도하고 활성화된 NF-κB는 핵에서 전염증성 사이토카인 TNF-α, IL-1β, IL-6, type 1 IFN, iNOS, COX-2의 전사를 촉진한다(Xie 등 1994; Lee 등 2004; Lu 등 2008). 따라서 실험 결과를 통하여 2, 8, 32 μg/mL의 청대 추출물 농도를 선정하여 다음 실험을 진행하였다.

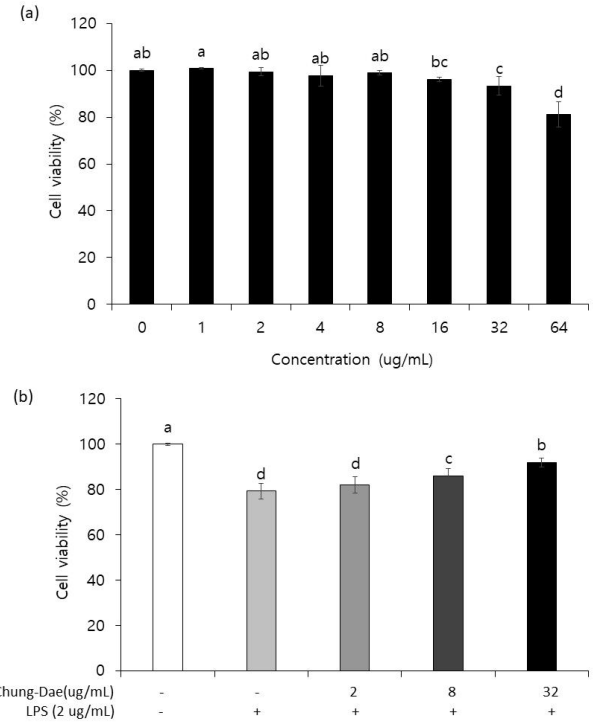

Fig. 1. Effect of Chung-Dae on RAW 264.7 cell viability (a) and Chung-Dae on LPS-induced RAW 264.7 cell (b). LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-d]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

2. 청대의 LPS로 유도된 NO 생성능 억제

L-arginine으로부터 iNOS의 효소 활성에 의하여 합성되는 NO는 면역계에서 가장 다기능적인 역할을 한다(Bogdan C 2001). Raw 246.7 세포에 LPS를 처리한 경우 NO 생성능은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 보였다(p<0.05) (Fig. 2). LPS+2 μg/mL(39.05±0.93 μM), LPS+8 μg/mL(22.34±0.52 μM)과 LPS+32 μg/mL(11.20±0.20 μM)는 LPS(42.52±0.14 μM)군보다 NO 함량이 통계적으로 유의하게 낮아졌다(p<0.05). 이 결과는 Raw 264.7 세포에 LPS로 염증을 유도 후 쪽 부위별(뿌리>잎>줄기) 추출물의 NO 억제효과를 보인 결과(Kim 등 2015)와 유사하게 억제효과를 보였다. NOS의 다양한 형태에 의한 자극에 의해 활성화되면서 NO의 생성을 증가시키는 유도물질 중 LPS는 전염증성 사이토카인과 iNOS를 활성화시켜 NO 생성을 증가시켰다(Korhonen 등 2005). 따라서 실제로 청대 추출물이 LPS로 유도한 전염증성 사이토카인 조절 여부를 확인하고자 연구를 진행하였다.

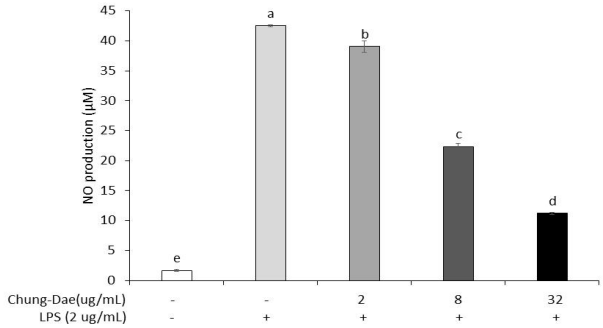

Fig. 2. Effect of Chung-Dae on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-e]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

3. 청대추출물이 전염증성 사이토카인 함량에 미치는 영향

염증이 시작되면 면역반응이 일어나 다양한 면역세포가 활성화된다. 청대추출물이 전염증성 사이토카인에 미치는 결과는 Fig. 3에 보여주었다. Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군에 비하여 전염증성 사이토카인인 TNF-α와 IFN-ɣ 생성을 유의하게 증가시켰다(p<0.05) (Fig. 3). LPS+2 μg/mL(388.01±17.52 pg/mL), LPS+8 μg/mL (364.42±17.12 pg/mL)과 LPS+32 μg/mL(358.14±28.27 pg/mL)는 LPS(401.12±11.32 pg/mL)군에 비해 TNF-α의 수준을 유의하게 감소시켰다(p<0.05)(Fig. 3A). 그리고 LPS(140.24±9.94 pg/mL)는 LPS 미처리군(67.10±1.38 pg/mL)에 비해 IFN-ɣ의 수준을 증가시켰다(p<0.05)(Fig. 3B). 청대 추출물은 LPS로 염증이 유도된 Raw 264.7 세포의 전염증성 사이토카인인 IFN-ɣ의 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다(LPS+2 μg/mL: 126.32±20.98 pg/mL, LPS+8 μg/mL: 120.86±9.75 pg/mL, LPS+32 μg/mL: 100.95±7.34 pg/mL). LTA(lipoteichoic acid) 및 LPS와 같은 다양한 병원체 및 사이토카인에 의해 자극을 받은 대식세포는 활성화되며 신체의 면역 반응, 다양한 염증 상태 및 대사 조절에 중요한 역할을 한다(Liu 등 2019). 대식세포는 다양한 종양 세포 및 미생물의 성장을 억제하고 TNF-α 및 IL-10과 같은 신호 인자를 방출하여 면역 조절 기능을 나타낸다(Wu 등 2021). Th 세포는 면역 반응에 중요하며 다양한 사이토카인을 생성하는데(Grewe 등 1998) Th는 생산하는 사이토카인의 유형에 따라 분류할 수 있다. Th1은 TNF-α, IFN-ɣ 및 IL-12를 생성하는 반면 Th2는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10을 생성한다(Grewe 등 1998). IL-1β는 Th2를 자극하고 Th2에 의한 사이토카인 생성을 촉진하지만 IL-6 및 TNF-α와 같은 일부 사이토카인의 과잉 생산은 신체의 자가면역 균형

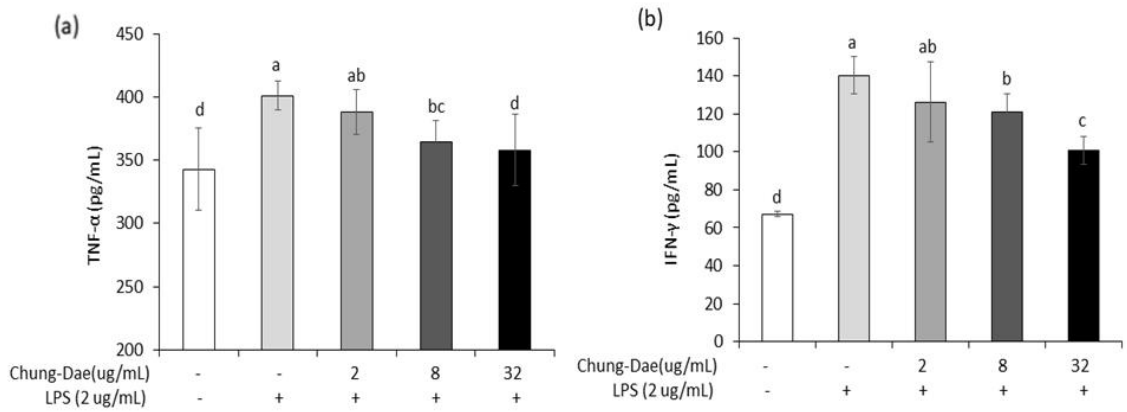

Fig. 3. Effect of Chung-Dae on pro-inflammatory cytokines TNF-α and IFN-γ expression level in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-d]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

을 손상시킬 수 있는 면역 장애를 유발할 수 있다(Chen 등 2008).

LPS는 대조군에 비해 IL-1β 및 IL-6 수준을 유의하게 증가시켰다(p<0.05)(Fig. 4). LPS+2 μg/mL(760.58±20.51 pg/mL), LPS+8 μg/mL(569.44±17.38 pg/mL)와 LPS+32 μg/mL(283.19±5.09 pg/mL)는 LPS(792.35±27.38 pg/mL)군에 비해 IL-1β의 수준을 유의하게 감소시켰다(p<0.05)(Fig. 4A). 그리고 LPS(592.25±5.68 pg/mL)는 LPS 미처리군(331.31±14.33 pg/mL)에 비해 IL-6의 수준을 증가시켰다(p<0.05)(Fig. 4B). 청대 추출물은 LPS로 염증이 유도된 Raw 264.7 세포의 전염증성 사이토카인인 IL-6의 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다(LPS+2 μg/mL: 514.30±36.52 pg/mL, LPS+8 μg/mL: 347.27±14.95 pg/mL, LPS+32 μg/mL: 337.92±10.81 pg/mL). 따라서, 청대 추출물은 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 전염증성 사이토카인을 감소시키는 결과를 보였다. 쪽에서 만들어지는 천연색소인 니람의 아토피 피부염 완화제로 IL-4, IL-6 와 caspase 1의 발현을 감소시키며 항염증 효과에 의하여 아토피 피부염의 증세를 완화할 수 있다고 보고하였고(Choo 등 2014; Han 등 2014b) 조갑 건선 임상연구에서 청대 오일이 효과적이면서 안전한 처방이라고 하였다(Lin 등 2014), 나주 쪽(*Polygonum tinctorium*

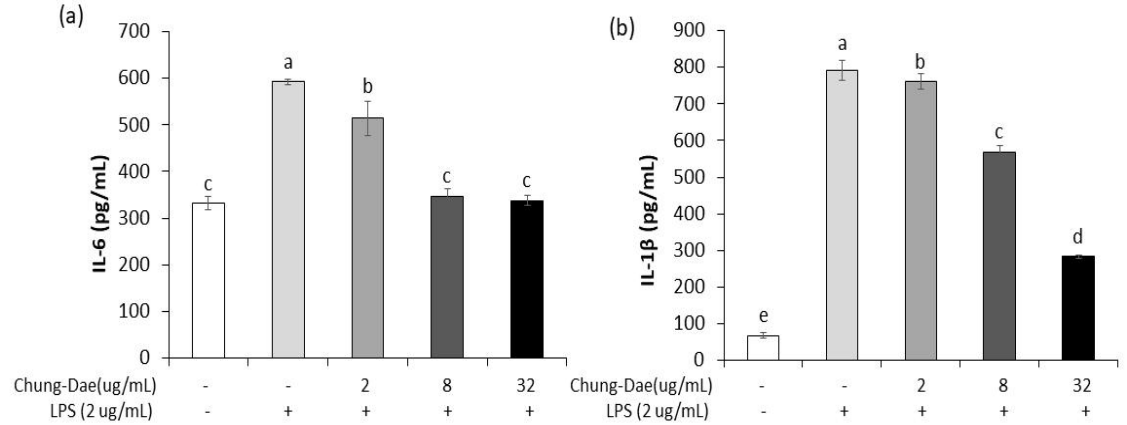

Fig. 4. Effect of Chung-Dae on pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1β expression level in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-e]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

Lour.)은 항산화 효과, 항암, 항염 등(Kim 등 2010; Jang 등 2012)의 효능이 있음을 보고하였고, 쪽의 활성 화합물은 인디루빈(Indirubin)으로(Kim 등 2010) 인디루빈은 과민성 염증반응을 억제하였다(Kunikata 등 2000). 또한, 인디루빈은 Th 세포 매개 면역 반응을 조절하여 알레르기성 접촉 피부염을 억제하였다(Kim 등 2013). 본 실험에서 사용한 청대는 쪽을 물에 2~3일 발효시켜 쪽은 건져내고 우려낸 액체에 패분(조개가루)을 넣고 저어주어 산화시켜 위에 떠오른 남색 거품만 모은 것을 말려 분말화한 것으로 쪽의 일반적인 염료로의 활용보다 약용으로도 활용 가능한 소재임을 밝힌 연구로서 가치가 있다.

4. 청대추출물이 전염증성 사이토카인 및 염증 관련효소 mRNA 발현에 미치는 영향

본 연구 결과 Raw 264.7 세포에서 TNF-α, IL-6, COX-2의 mRNA 발현은 LPS 처리군이 미처리군에 비해 통계적으로 유의하게 높았다(p<0.05)(Fig. 5). LPS와 청대추출물을 함께 처리했을 때, 전염증성 사이토카인인 TNF-α의 mRNA 발현 수준은 LPS+2 μg/mL군이 2.63배, LPS+8 μg/mL군이 2.16배, LPS+32 μg/mL군이 1.23배 LPS군보다 감소하였다. 청대추출물의 농도가 높을수록 항염증 효과가 뛰어났다. 또한 IL-6의 mRNA 발현 수준은 LPS+2 μg/mL군이 1.02배, LPS+8 μg/mL군이 0.74배, LPS+32 μg/mL군이 0.48배 LPS군보다 감소하였다. 염증관련 효소인 COX-2의 mRNA 발현 수준은 LPS+2 μg/mL군이 6.92배, LPS+8 μg/mL군이 6.57배, LPS+32 μg/mL군이 4.85배 LPS군보다 감소하였다. NF-κB는 염증의 발현을 조절하는 주요 전사 인자이며, NF-κB 활성화는 과도한 염증 매개체, 특히 iNOS 및 COX-2의 생성을 매개한다(Chen 등 2017). COX-2는 정상 조직 세포에서 매우 낮은 활성을 나타내지만 염증 인자 및 기타 요인에 의해 세포가 자극되면 그 발현이 급격히 증가하여 세포 염증 반응 및 조직 손상을 유발한다(Huang 등 2020). 병균 혹은 바이러스로부터 방어의 역할을 하는 백혈구의 호중구에서 청대(indigo naturalis)의 항염증 효과를 보인 연구(Lin 등 2009)결과도 있었고, 일본에서는 청대가 함유된 처방으로 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)을 치료하는 것으로 알려져 있다(Sugimoto 등 2016). 또한, 청대는 만성 골수성 백혈병 (chronic myeloid leukemia, CML)의 치료에 효과적임이 보고되었는데 청대의 성분 중 인디루빈이

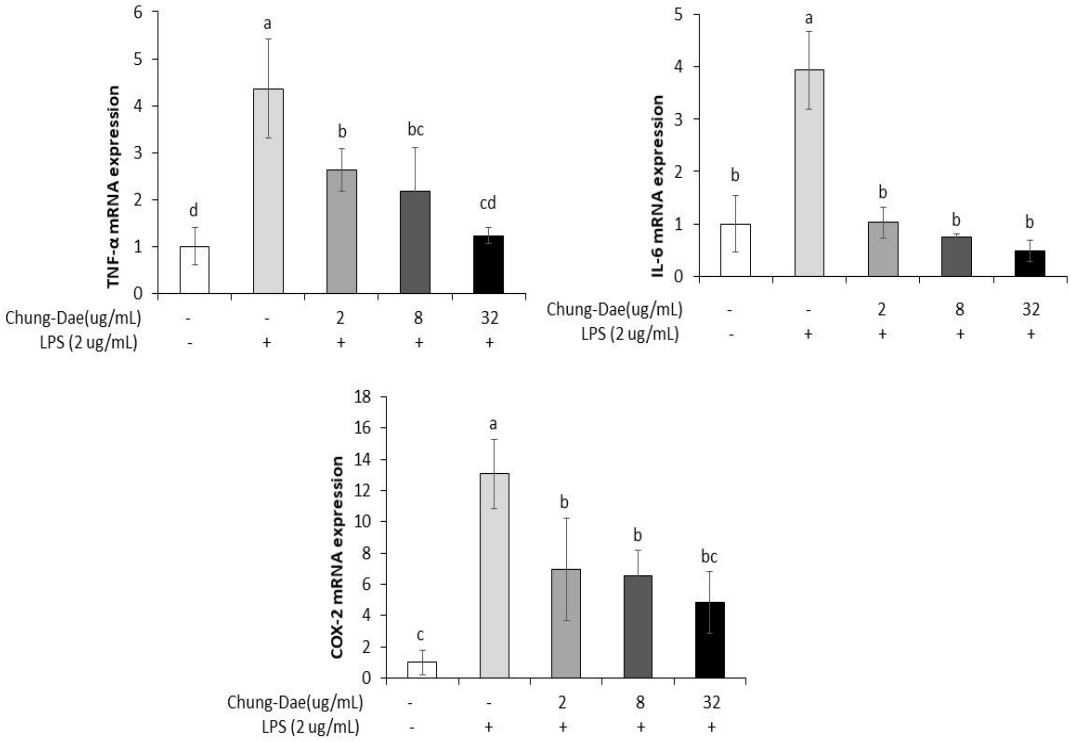

Fig. 5. Effect of Chung-Dae on mRNA expression of TNF-α, IL-6 and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-d]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

동물 종양실험 및 임상연구에서 효과가 있는 것으로 나타났다(Xiao 등 2002). 본 연구에서는 청대추출물의 농도가 높을수록 전 염증성 사이토카인과 염증관련 효소의 mRNA 발현을 감소시켜 항염증 효과가 뛰어났다.

청대에는 면역 체계에 영향을 주어 세균 감염, 암, 염증 등 다양한 질병 치료에 효과적인 인디고(indigo)와 인디루빈(indirubin)이 함유되어 있다고 알려져 있다(Lin 등 2009; Choo 등 2014). 특히, 쪽 염료의 성분 함량분석을 한 결과는 인디고 색소가 4.06%, 인디루빈 1.06%로 밝혀졌다(Chung 등 2007). 청대의 항염증 효과가 있는 것도 푸른색 인디고와 함께 나타나는 인디루빈의 기능이므로 쪽 중에서 쪽 색소 함량이 가장 높은 청대에 항염증 효과는 가장 높을 것이다.

만성염증반응은 다양한 장기에 대사질환을 유발하여 암, 비만, 당뇨병, 심혈관질환(CVD), 신경변성, 천식 등을 유발한다(Hotamisligil GS 2017). 지질다당류는 toll-like receptor-4(TLR4), LPS-binding protein(LBP) 및 nuclear factor κB(NF-κB)를 자극한다(Poltorak 등 1998; Gioannini & Weiss 2007). NF-κB는 IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-β 및 IFN-ɣ와 같은 제1형 IFN과 같은 전염증성 사이토카인 그리고 염증관련 효소인 iNOS 및 COX-2(Xie 등 1994; Lee 등 2004; Lu 등 2008)의 생성을 촉진한다. TNF-α는 다양한 생물학적 활성을 가질 뿐만 아니라 면역 및 염증 반응에서 중요한 조절 역할을 한다. TNF-α의 농도가 낮을 때는 자가 분비 반응을 통해 백혈구의 기능을 조절하고 세포의 면역 방어 기능을 강화할 수 있다. 그러나 과도한 TNF-α는 열을 발생시키며 NO, IL-1β 및 IL-6의 추가 발현을 통해 일부 사이토카인 매개 염증 반응을 증폭시키고 염증 반응의 확장을 촉진할 수 있다(Borges 등 2019; Hernandez 등 2020). 본 연구결과 청대추출물의 농도가 높을수록 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6)과 염증관련 효소(COX-2)의 mRNA 발현을 감소시키면서 항염증 효과가 뛰어나 만성염증반응에 의한 다양한 대사질환을 예방할 수 있는 기능성 소재로의 가능성을 보였다.

5. 청대추출물이 전염증성 사이토카인 및 염증 관련 protein 발현에 미치는 영향

사이토카인(IL-1β, IL-6, IL8 및 TNF-α) 및 여러 효소(COX-2 및 iNOS)와 같은 전염증 인자는 염증의 병리학적 및 생리학적 과정에서 매우 중요한 역할을 한다. 전염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 LPS를 처리했을 때 LPS 미처리 군에 비하여 유의적으로 증가하였다(p<0.05)(Fig. 6, Fig. 7). TNF-α의 단백질 발현 결과는 LPS군보다 청대추출물을 농도별로 투여시 LPS+2 μg/mL군이 1.53배, LPS+8 μg/mL군이 1.62배, LPS+32 μg/mL군이 1.28배 감소하였다. 또한 IL-6의 단백질 발현 결과는 LPS군보다 LPS+2 μg/mL군이 1.52배, LPS+8 μg/mL군이 0.48배, LPS+32 μg/mL군이 0.45배 감소하였다(Fig. 6). iNOS의 단백질 발현 결과는 LPS군보다 LPS+2 μg/mL군이 2.00배, LPS+8 μg/mL군이 1.27배, LPS+32 μg/mL군이 1.21배 감소하

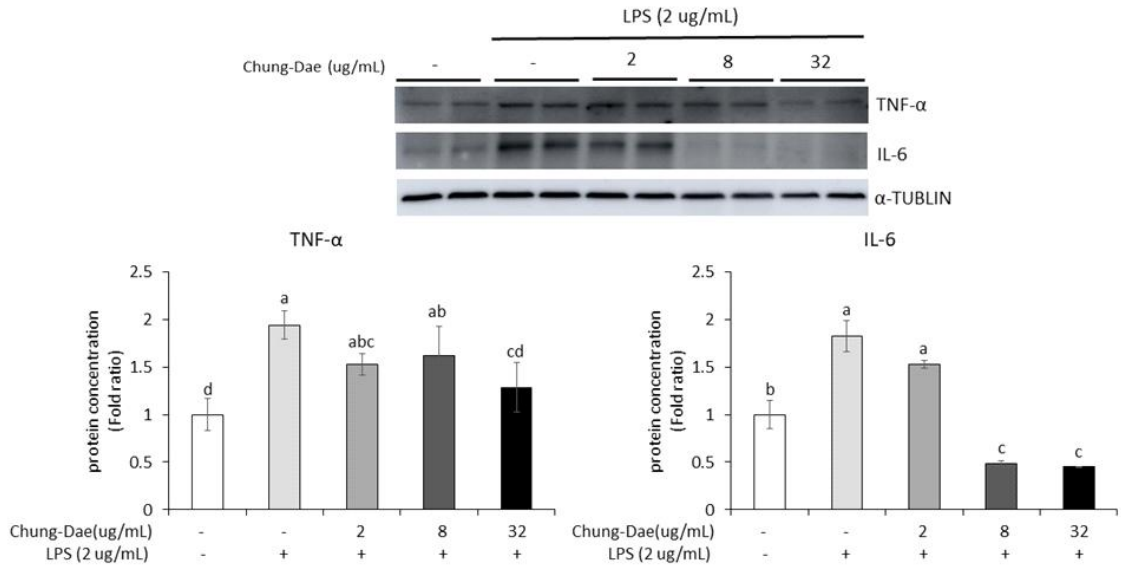

Fig. 6. Effect of Chung-Dae on protein expression of TNF-α and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-d]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

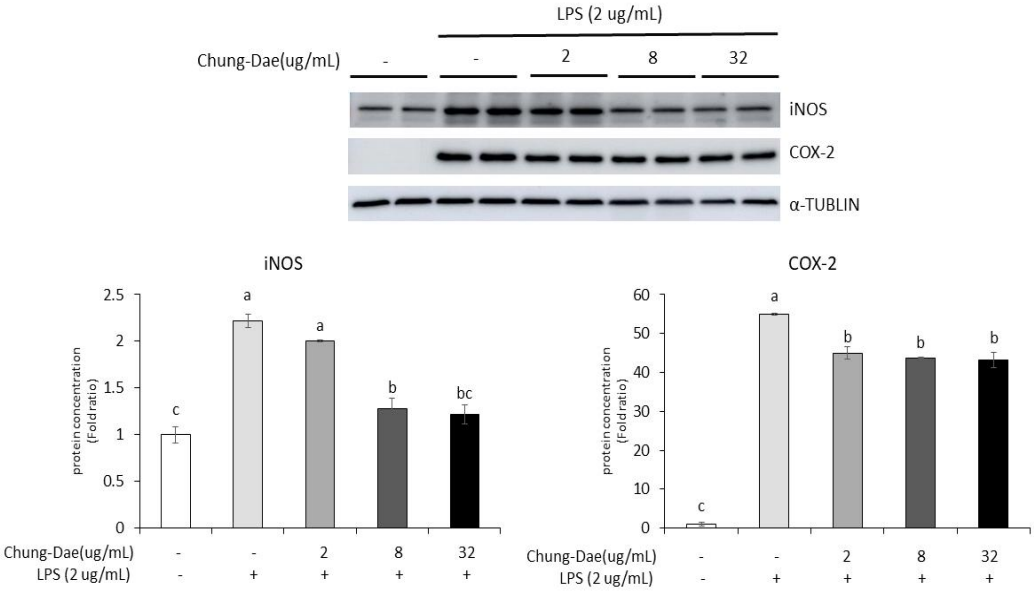

Fig. 7. Effect of Chung-Dae on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cell. LPS: treated with LPS (2 μg/mL), Chung-Dae: treated with various concentrations (2, 8, and 32 μg/mL) of Chung-Dae with LPS (2 μg/mL). [a-c]Means with the different letters on the bars are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range tests.

였고, COX-2도 청대추출물을 처리한 모든 군에서 유의적으로 감소하였다(p<0.05)(Fig. 7). 이러한 결과는 ELISA 실험결과에서 확인되어진 전염증성 사이토카인의 생성과 mRNA 발현과 비슷하게 단백질 발현에서도 전염증성 사이토카인(TNF-α와 IL-6)과 염증관련 효소(iNOS와 COX-2)가 유의적으로 감소한 결과는 LPS 처리로 증가된 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소 발현을 청대 추출물이 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 전염증성 사이토카인은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성되고 림프구는 염증 과정을 매개한다(Bondeson J 1997). TNF-α는 주로 단핵구, 대식세포 및 T 세포(Diehl & Rincón 2002)에 의해 생성되며 많은 세포에 다양한 전염증 효과를 갖는다. 이것은 대식세포의 강력한 활성화제이며 IL-1β, IL-6, PGE2의 생성 또는 발현을 자극할 수 있으며 T 및 B 세포 모두의 성장 인자이다(Diehl & Rincón 2002). IL-1β, TNF-α 및 IL-6은 만성 염증에서 중요한 사이토카인이며(Andreakos 등 2004), 암, 심혈관 질환 및 기타 만성질환과도 관련이 있다(Dinarello CA 1996). COX-2는 아라키돈산을 프로스타글란딘으로 전환(Rocca & FitzGerald 2002)하고 암 발병과 관련된 핵심 효소이다(Marletta MA 1993). 대식세포에서 iNOS는 NO 생산의 주요 조절자이다(Nathan & Hibbs 1991; Guzik 등 2003). 쪽 염료의 성분 함량분석을 한 결과는 인디고 색소가 4.06%, 인디루빈 1.06%로 밝혀졌다(Chung 등 2007). 위 분석은 석회가 포함된 쪽 염료의 색소 분석이었으므로 청대의 경우는 순수한 색소만으로 이루어진 것이라 석회(패분)함량이 거의 없으므로 인디고와 인디루빈 함량이 더 높을 것으로 유추할 수 있다. 청대의 항염증 효과가 있는 것도 푸른색 인디고와 함께 나타나는 인디루빈의 기능이므로 쪽 중에서 쪽 색소 함량이 가장 높은 청대에 항염증 효과는 가장 높을 것이다. 쪽잎에는 인디고 색소가 그대로 들어있는 것이 아니라 인디칸(indican)이라는 무색의 배당체로 전구체 형태로 들어있다. 따라서 쪽잎은 파랗게 보이지 않는 것이며, 인디칸이 물에 가수분해되고 석회(패분)를 넣어 산화되어 인디고로 변해 패분과 함께 가라앉은 색소가 쪽 염료이며, 물 위로 뜬 순수한 색소가 청대이다. 따라서 인디고 및 인디루빈 함량은 청대> 쪽 염료> 쪽잎 순으로 청대가 가장 높은 것이다. 청대에는 면역 체계에 영향을 주어 세균 감염, 암, 염증 등 다양한 질병 치료에 효과적인 인디고(indigo)와 인디루빈(indirubin)이 함유되어 있다고 알려져 있다(Lin 등 2009; Heo 등 2011; Choo 등 2014). 만성질환을 유도하는 염증반응을 억제할 수 있는 청대의 활성을 보여주면서 신소재로의 가능성을 보여주었다.

요약 및 결론

본 연구는 쪽 염색 시 생성되는 청대의 항염증 효과를 분석하기 위해 진행되었다. RAW 264.7 대식세포를 이용하여 *in vitro* 세포 독성 실험을 진행한 결과, 청대 추출물은 1~32 μg/mL 범위에서 Raw 264.7 세포에서 세포증식을 억제하지

않았다. 또한 LPS와 함께 32 μg/mL 농도로 청대 추출물을 처리했을 때 세포 성장률이 가장 높게 나타났다. Raw 264.7 세포에 LPS만 단독으로 처리했을 때 LPS 처리하지 않은 군에 비하여 NO 생성이 증가하였으나 청대 추출물을 2, 8, 32 μg/mL 농도로 처리했을 때 NO 생성이 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-6, IL-1β, IFN-ɣ)은 LPS군에 비해 청대 추출물을 2, 8, 32 μg/mL 농도로 처리 시 유의적으로 감소했으며, TNF-α, IL-6의 mRNA 수준도 감소하였다. 염증관련 효소인 COX-2의 mRNA 발현수준도 억제하였다. 단백질 발현 수준 결과에서도 전염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-6, 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 발현이 LPS와 청대 추출물을 2, 8, 32 μg/mL 농도로 함께 처리했을 때 LPS 단독으로 처리한 군에 비하여 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 이상의 결과를 통해 식물유래 화합물인 청대 추출물은 RAW 264.7 세포실험에서 LPS로 유도된 염증반응을 억제하였고, 특히 전염증성 사이토카인과 염증관련 효소(iNOS, COX-2)의 발현을 억제하여 청대 추출물이 염증반응을 조절하는 결과를 보여주었다.

References

Andreakos E, Foxwell B, Feldmann M. 2004. Is targeting toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev* 202:250-265

Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907-916

Bondeson J. 1997. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: A review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 29: 127-150

Borges L, Passos MEP, Silva MBB, Santos VC, Momesso CM, Pithon-Curi TC, Gorjão R, Gray SR, Lima KCA, de Freitas PB, Hatanaka E. 2019. Dance training improves cytokine secretion and viability of neutrophils in diabetic patients. *Mediators Inflammation* 2019:2924818

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, Zhang Y, Wang H, Bharadwaj U, Zhang S, Li M, Lin P, Yao Q. 2008. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 112:3205-3216

Chen X, Zhao X, Wang H, Yang Z, Li J, Suo H. 2017. Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nutrients* 9:545

Cho KR. 2007. Explanations on Traditional Dyeing Techniques at Gyuhap Chongseo. Korean Studies Information Service

Choo HN, Park EH, Jeong JK, Paek YW, Kim JS. 2014. The effect of the *Polygonum tinctoria* niram on atopic dermatitis in DNCB-induced hairless mice. *Herb Formula Sci* 22: 141-150

Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim HR, Kim KH, Lee BR. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Korean J Org Agric* 2:245-253

Chung IM, Lee KG, Sung GB, Kim HB, Nam SH, Hong IP. 2007. Structural analysis of natural indigo colorants extracted from *Polygonum tinctorium*. *J Seric Entomol Sci* 49:8-13

Diehl S, Rincón M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39:531-536

Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147

Gioannini TL, Weiss JP. 2007. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 39:249-260

Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19:359-361

Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487

Han NR, Kang SW, Moon PD, Jang JB, Kim HM, Jeong HJ. 2014b. Genuine traditional Korean medicine, Naju Jjok (Chung-Dae, *Polygonum tinctorium*) improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesional skin. *Phytomedicine* 21:453-460

Han NR, Park JY, Jang JB, Jeong HJ, Kim HM. 2014a. A natural dye, niram improves atopic dermatitis through down-regulation of TSLP. *Environ Toxicol Pharmacol* 38:982-990

Heo BG, Jang HG, Rhyu DY, Kim JH. 2011. Function and Utilization of Indigo Plant. pp.31-35. Pubplan

Heo J. 2011. Donguibogam. Silla

Hernandez J, Ashley D, Cao R, Abrahem R, Nguyen T, To K, Yegiazaryan A, Akinwale David A, Kumar Tiwari R, Venketaraman V. 2020. Cyclic peptide [R_4W_4] in improving

the ability of first-line antibiotics to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* inside *in vitro* human granulomas. *Front Immunol* 11:1677

Hotamisligil GS. 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542:177-185

Huang CF, Huang JJ, Mi NN, Lin YY, He QS, Lu YW, Yue P, Bai B, Zhang JD, Zhang C, Cai T, Fu WK, Gao L, Li X, Yuan JQ, Meng WB. 2020. Associations between serum uric acid and hepatobiliary-pancreatic cancer: A cohort study. *World J Gastroenterol* 26:7061-7075

Huang CS, Li QL, Lo D, Wang YT, Wu MC. 2019. Anti-inflammatory activity of pectic enzyme-treated pectin on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *J Funct Food Nutraceuticals* 1:23-30

Jang HG, Heo BG, Park YS, Namiesnik J, Barasch D, Katrich E, Vearasilp K, Trakhtenberg S, Gorinstein S. 2012. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1986-2004

Khan MS, Priyadarshini M, Bano B. 2009. Preventive effect of curcumin and quercetin against nitric oxide mediated modification of goat lung cystatin. *J Agric Food Chem* 57: 6055-6059

Kim EJ, Park WH, Ahn SG, Yoon JH, Kim SW, Kim SA. 2010. 5'-Nitro-indirubinoxime inhibits inflammatory response in TNF-α stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 211:77-83

Kim HM, Hong DR, Lee EH. 1998. Inhibition of mast cell-dependent anaphylactic reactions by the pigment of *Polygonum tinctorium* (Chung-Dae) in rats. *Gen Pharmacol* 31:361-365

Kim MH, Choi YY, Yang G, Cho IH, Nam D, Yang WM. 2013. Indirubin, a purple 3,2-bisindole, inhibited allergic contact dermatitis via regulating T helper (Th)-mediated immune system in DNCB-induced model. *J Ethnopharmacol* 145: 214-219

Kim MK, Choi IR. 2013. A study of indigo fermented dyeing using natural yeast. *J Korean Soc Knit Design* 11:1-9

Kim SJ, Jang TW, Kim DW, Park JH. 2015. Study on antioxidant and anti-inflammatory activities of *Persicaria tinctoria*. *Korean J Herbol* 30:17-24

Kim SJ, Kim YG, Park KY. 2012. Inhibitory effects of ginger and processed (Beopje) ginger extracts on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1528-1533

Korean Studies Information Service. 2007. Forest Economy. Korean Studies Information Service

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:471-479

Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. 2000. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 410:93-100

Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. 2004. Spinal NF-κB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 19:3375-3381

Lin YK, Leu YL, Huang TH, Wu YH, Chung PJ, Pang JHS, Hwang TL. 2009. Anti-inflammatory effects of the extract of indigo naturalis in human neutrophils. *J Ethnopharmacol* 125:51-58

Lin YK, See LC, Huang YH, Chang YC, Tsou TC, Lin TY, Lin NL. 2014. Efficacy and safety of *Indigo naturalis* extract in oil (Lindioil) in treating nail psoriasis: A randomized, observer-blind, vehicle-controlled trial. *Phytomedicine* 21: 1015-1020

Liu M, Mu H, Peng W, Zhao L, Hu W, Jiang Z, Gao L, Cao X, Li N, Han J. 2019. Time-dependent C5a and C5aR expression in dental pulp cells following stimulation with LTA and LPS. *Int J Mol Med* 44:823-834

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151

Marletta MA. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268:12231-12234

Nathan CF, Hibbs JB Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70

Park DN, Beak SR, Jeon DW. 2011. A study on the effect of the changes of dyeing conditions on the dye ability of silk fabrics dyed with natural *Polygoum tinctoria*. *J Fash Bus* 15:120-130

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085-2088

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956

Rocca B, FitzGerald GA. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: Shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol* 2:603-630

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81:215S-217S

Seo HS. 2008. The experimental study on anti-inflammation and anti-oxidation of indigo naturalis and rehmanniae radix. *J Korean Med Opthalmol Otolaryngol Dermatol* 21:104-110

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112

Song GH, Park ES, Lee SM, Kim TY, Park KY. 2017. An atopic preventive drink (APD) reduces Th2 cytokines in LPS-treated RAW 264.7 cells. *CELLMED* 7:15.1-15.6

Stoker KG, Cooke DT, Hill DJ. 1998. An improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *J Agric Eng Res* 71:315-320

Sugimoto S, Naganuma M, Kanai T. 2016. Indole compounds may be promising medicines for ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 51:853-861

Sun Q, Leng J, Tang L, Wang L, Fu C. 2021. A comprehensive review of the chemistry, pharmacokinetics, pharmacology, clinical applications, adverse events, and quality control of indigo naturalis. *Front Pharmacol* 12:664022

Tang W, Eisenbrand G. 1992. Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional Modern Medicine. Springer

The Compilation Committee of Korean Medicine Encyclopedia. 2001. Korean Medicine Encyclopedia. Jeong-Dam

Willoughby DA. 1975. Heberden oration, 1974: Human arthritis applied to animal models: Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34:471

Wu Q, Li B, Li J, Sun S, Yuan J, Sun S. 2021. Cancer-associated adipocytes as immunomodulators in cancer. *Biomark Res* 9:2

Xia ZQ, Zenk MH. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31:2695-2697

Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. 2002. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 43:1763-1768

Xie Q, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-4708

Zhao X, Kim SY, Park KY. 2013. Bamboo salt has *in vitro* anticancer activity in HCT-116 cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo*. *J Med Food* 16:9-19

Received 15 January, 2022
Revised 30 March, 2022
Accepted 06 April, 2022