

석사학위논문

RAW264.7 세포에서 제주자생식물
녹나무(*Cinnamomum camphora*)의
염증성 생체지표 억제효과에 관한 연구



제주대학교 대학원
의학과

이혜자

2003년 12월

RAW264.7 세포에서 제주자생식물
녹나무(*Cinnamomum camphora*)의 염증성
생체지표 억제효과에 관한 연구




지도교수 : 유 은 숙

이 혜 자

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2003년 12월

이혜자의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	강 희 경	
위 원	현 진 원	
위 원	유 은 숙	

제주대학교 대학원

2003년 12월

Inhibitory Effect of *Cinnamomum
camphora*, Jeju Native Plant, on The
Inflammatory Biomarkers in RAW264.7
Cells

Hye-Ja Lee

(Supervised by Professor Eun-Sook Yoo)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF MEDICINE

DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12

ABSTRACT

Cinnamomum camphora is a native plant growing only at Jeju Island in Korea, and has been used for the treatment of several diseases such as nephritis, epilepsy and neurasthenia *etc.* as a oriental folk medicine. However, there are few reports on the biological activities and constituents of *Cinnamomum camphora*. Therefore, this study examined the inhibitory effect of *Cinnamomum camphora* on the production of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α), iNOS and COX-2 in RAW264.7 cell activated with lipopolysaccharide (LPS). The amount of released inflammatory cytokines and the mRNA expression were determined using ELISA and RT-PCR, respectively. Also, this study examined the anti-oxidizing effect by determination of the DPPH radical-scavenging activity. The crude extract (80% MeOH) of *Cinnamomum camphora* inhibited the TNF- α production in a concentration-dependent manner. In the sequential fractions of the 80 % MeOH extract, the EtOAc extract potentially inhibited the protein and the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and iNOS. And, the BuOH extract inhibited the protein and the mRNA expression of COX-2. And then, the inhibition of iNOS was correlated with the decrease of nitrite level. These results that anti-inflammatory activity of *Cinnamomum camphora* seems to arise from the inhibition of the production of inflammatory cytokines, iNOS and COX-2.

Key word: *Cinnamomum camphora*, pro-inflammatory cytokines, iNOS, COX-2

목 차

A B S T R A C T	i
목 차	ii
LIST OF SCHEME	iv
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시료의 추출	
2. 세포 배양 및 시약	
3. <i>In vitro</i> 에서 pro-inflammatory cytokines 의 생성 및 정량	
4. RNA 분리	
5. RT-PCR	
6. Western blot analysis	
7. Nitric oxide assay	
8. 항산화 활성 검정	
III. 결 과	10
1. Pro-inflammatory cytokines 의 생성에 미치는 영향	
2. Pro-inflammatory cytokines 의 mRNA발현에 미치는 영향	
3. iNOS의 발현에 미치는 영향	
4. Nitric oxide 의 생성에 미치는 영향	
5. COX-2의 발현에 미치는 영향	
6. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 활성	
IV. 고 찰	23

V. 참 고 문 헌	25
VI. 적 요	32



LIST OF SCHEME

Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from <i>Cinnamomum camphora</i>	5
---	---



LIST OF TABLES

- Table 1.** Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis.....7
- Table 2.** The inhibitory effects of solvent fractions of *C. camphora* on the pro-inflammatory cytokines production in RAW264.7 cells12
- Table 3.** The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the production of nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells17
- Table 4.** Comparison DPPH radical-scavenging activities of several extracts of *C. camphora*.....22



LIST OF FIGURES

- Figure 1.** The inhibitory effect of MeOH extract of *C. camphora* on the TNF- α production in RAW264.7 cells.....11
- Figure 2.** The inhibitory effects of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in RAW264.7 cells.13
- Figure 3.** The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of iNOS in RAW264.7 cells.....15
- Figure 4.** The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the level of iNOS in RAW264.7 cells.....16
- Figure 5.** The inhibitory effect of the EtOAc fraction of *C. camphora* on NO production in RAW264.7 cells.....18
- Figure 6.** The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells.....19
- Figure 7.** The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the level of COX-2 in RAW264.7 cells.....20

I. 서 론

최근 삶의 질 향상과 의학의 발전으로 수명이 연장되면서 류마티스 관절염, 천식 등 만성 염증이 증가하는 추세이며, 효과적인 치료법이 절실히 요구되는 실정이다 (Han, 2003). 현재까지의 비스테로이드성 항염증 약물 (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)의 사용으로 인한 염증의 감소는 상당한 기간 동안 통증의 완화를 초래해 왔으며, 비마약성 진통제 (아스피린 등)의 대부분 역시 항염증 효과를 가지므로 급성 및 만성 염증 질환의 치료에 적절히 사용되어 왔다 (Ellis *et al.*, 1994). 그러나 장기간 사용할 때 변비를 유발하며, 중심 신경계에 작용하여 두통, 어지러움증, 이상감각, 신경질적인 증상을 유발시키며, 간혹 정신병도 발생하는 등의 치료법에 부작용의 심각성이 너무 크기 때문에 새롭거나 개선된 치료제 개발은 필수적이고 시급하다고 할 수 있다 (Cho *et al.*, 2001). 이러한 부작용을 극복하는 문제와 관련지어 최근에는 민간에서 사용되고 있는 천연물에서 그 활성 성분을 찾으려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 오래된 코감기, 관절통, 습관성 유산 등에 민간에서 사용되고 있는 겨우살이의 추출물이 폐종양, 유방암, 대장암 등에서 항암 효과를 나타낸다고 보고되어 있으며 (Khwaja *et al.*, 1986; Kuttan *et al.*, 1996; Antony *et al.*, 1997), 마늘 성분인 diallyl disulfide의 유방암 세포주 (MCF-7)에 대한 세포사멸 유도 기전에 관한 연구가 보고되어 있다 (Park *et al.*, 2001). 그리고, 녹차 잎 등에서 얻어지는 phenolic compound인 (-)- epigallocatechin gallate (EGCG)는 사람의 연골세포에서 IL-1 β 로 유도된 염증성 매개인자의 억제효과가 있음이 보고되어 있다 (Salahuddin *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2002). 또한, 한방에서 천식, 기침 및 감기의 치료제로 이용되고 민간에서 황달, 성홍열, 류머티스성 관절염 치료에 사용되고 있는 넘취의 정유성분도 항염 효과가 있음이 입증되었다 (Kim *et al.*, 2002).

사람의 신체방어는 면역반응을 통하여 병원체로부터 보호받을 수 있다. 바이러스나 박테리아와 같은 외래 미생물에 대한 생체방어 기작으로는 자연면역 (innate immunity)과 특이면역 (specific immunity)으로 나뉘어지며, 이는 면역관련 세포에서 주로 분비되는 cytokine에 의해서 매개된다 (Klaus, 1988).

내독소 (endotoxin)로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성세균의 세포 외막에 존재하며, 단핵식세포 (macrophage 또는 monocyte)로부터 다양한 염증 발병

인자로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)과 같은 pro-inflammatory cytokines를 증가시키는 것으로 알려져 있다 (An *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2000; Ashutosh *et al.*, 2002). TNF- α 와 같은 다기능성 (multifunctional) cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 특히 암 촉진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다 (Groves *et al.*, 1994; Wakefield *et al.*, 1991). TNF- α 가 인간의 염증성 피부 질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고 되어있다 (Piguet *et al.*, 1991; Burrell, 1994). 그리고, 류마티스 관절염에서 TNF- α 와 IL-6 같은 cytokine의 발현은 상당히 증가되며 신경계 조직 손상등을 일으킨다 (Ishii *et al.*, 2003).

체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 NO synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다. 이 중 nitric oxide는 NOS 라는 유도성 (inducible) 또는 상존성 (constitutive) 효소에 의하여 생성되어지는 반응성 radical로서 (Choi *et al.*, 1996) 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다 (Kim *et al.*, 2002; Nathan, 1992). NOS는 물리 화학적 성상에 따라 3종류의 동종 효소로 나누어진다 (Gaby, 1997). 세포속에서 계속적으로 존재하기 때문에 Type I (neuronal NOS)과 Type III (endothelial NOS)는 지속적 NOS (constitutive NOS)로 분류되며 (Hartmut *et al.*, 1996), 상대적으로 일부 세포에서 LPS 및 cytokine, 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II (inducible NOS)로 나누어진다 (Ryu *et al.*, 2003; Stuber *et al.*, 1991; Iida *et al.*, 1992). 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다 (Ohshima, 1994). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상등을 유발한다 (Weisz, 1996).

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다 (Kim *et al.*, 2002). COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며 (Masferrer *et al.*, 1994), COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성시킨다. Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진 등 암발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Seibert *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 1994).

따라서, 발암촉진 단계와 밀접한 관계가 있는 염증단계에서 중추적 역할을 하고 있는 cytokine의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성화에 기인하는 PGE₂의 생성 억제, 그리고 NO 억제를 통해 pro-inflammatory molecule의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다.

제주도는 계절에 따라 대륙성과 해양성의 기후가 뚜렷하게 구분되어 나타나며 사면이 바다로 둘러싸여 있어 해발 1950m의 한라산을 중심으로 지형조건과 특수한 기후조건에 의하여 난대식물에서부터 온대식물, 고산지대의 한대림식물이 다양하게 분포되어 식물의 보고를 이루고 있다 (Yang *et al.*, 2002). 그 분포도도 뚜렷이 구분되어 있어 생태 및 식물학적으로 중요한 연구 대상지가 되고 있다 (Lee *et al.*, 2001).

녹나무 (*Cinnamomum camphora* Sieb.)는 우리나라에서도 제주도에서만 자라는 나무로 (Lee *et al.*, 2001) 장목 또는 예장 나무라고도 부르며 겨울에도 잎이 떨어지지 않는 상록활엽수이다. 녹나무과에 속하는 식물로서 높이 20 m, 흉고직경 2 m에 이르며 병해충이 없고 생육이 좋으며 수명이 긴 특징이 있다. 녹나무에 들어 있는 향기 성분은 캄파, 사프롤, 쯤네올 등의 정유성분으로 녹나무 목질과 잎, 열매에 1 % 쯤 들어 있으며 정유는 나무줄기를 토막내어 수증기로 증류하여 얻는다 (Miyazawa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). 이렇게 해서 얻은 정유를 '장뇌'라 부르며, 민간에서는 신경쇠약, 간질, 방광염, 신우신염 등에 치료약으로 쓰이고 흥분제나 강심제로도 널리 알려져 있다 (임업연구원, 1987). 특히 일본에서는 장뇌를 매우 귀중히 여겨 우리나라의 인삼처럼 국가 전매품으로 취급하고 있으며, 제주도에서는 녹나무가 민간에서 암 치료약으로 사용되어 왔다. 하지만 녹나무의 이러한 성분의 생리 활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 녹나무과의 동속 식물로서는 육계나무 (*cinnamomum cassia*) 와 후박나무 (*Machilus thunbergii*), 생달나무 (*cinnamomum japonicum*) 등이 알려져 있으며 이들이 항염 활성 및 항암 효과가 있음이 보고되어 있다 (Zhu *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

이에 본 연구에서는, RAW264.7 세포를 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하는 염증 반응의 주체가 되는 단핵 식세포 모델에서 녹나무 추출물이 pro-inflammatory cytokine 생성과 iNOS, COX-2 및 NO의 발현을 억제하는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 추출

제주도에 자생하고 있는 녹나무의 잎을 채집하여 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료 (50 g)를 80 % methanol (MeOH)로 2회 교반 추출 후 여과하여 감압 농축하였다. 여기서 얻은 MeOH 추출물 (23.8 g)을 계통적 추출 방법 (우원식, 1995)에 의하여 hexane 분획물 (0.96 g), ethylacetate (EtOAc) 분획물 (2.03 g), butanol (n-BuOH) 분획물 (3.99 g), H₂O 분획물 (1.97 g)을 얻었다. 여기서 얻은 각각의 분획물을 항염 효과 검색의 시료로 이용하였다 (Scheme 1).

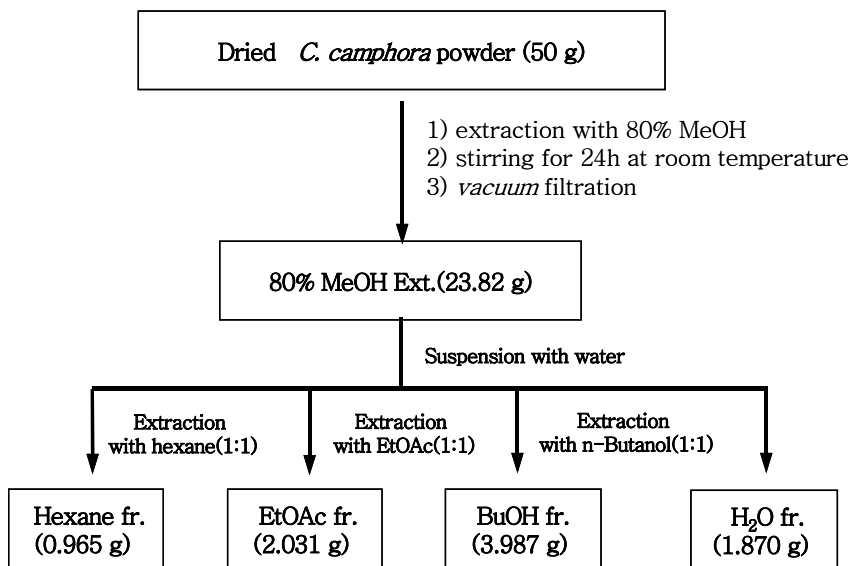
2. 세포 배양 및 시약

Murine macrophage cell line 인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10 % fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, Interferon- γ (mIFN- γ , recombinant E. coli)은 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

3. *In vitro* 에서 pro-inflammatory cytokines 생성 및 정량

Murine macrophage cell line 인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1×10^6 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5 % CO₂ 항온기에서 18시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/ml)로 조제된 시험물질 50 μ l와 450 μ l의 LPS 최종농도 (1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min) 하여 얻어진 상층액의 TNF- α 및 IL-6 함량을 측정하였다 (An., 2002).

IL-1 β 의 정량을 위하여 시험 약물을 처리하고 6시간 배양 후 150 mM NaCl, 50 mM



Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Cinnamomum camphora*

Tris HCl (pH 7.6), 1.0 mM PMSF, 그리고 0.25 % Nonidet P-40을 포함하는 1 ml의 lysis buffer를 이용하여 4 °C에서 10 min 방치후, 원심분리 (12,000 rpm에서 2 min) 하여 상층액을 얻었다 (Schilling *et al.*, 1997; Schilling *et al.*, 2001). 모든 시료는 정량전까지 -20 °C 이하에 보관하였다.

TNF- α 및 그 외의 cytokine 정량은 murine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

4. RNA 분리

RAW264.7 세포 (1×10^5 cells/ml)를 18 시간 전 배양하고 10배 농도로 조제된 시험약물과 LPS (최종농도 $1 \mu\text{g/ml}$)를 동시 처리하여 시간별로 배양 한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리시켰다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심 분리시켜 RNA를 침전시키고 75 %의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

5. RT-PCR

$1 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP ($0.5 \mu\text{M}$), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70 °C 5 min, 37 °C 5 min, 37 °C 60 min, 그리고 70 °C에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS, COX-2, β -Actin을 증폭시키기 위하여 $2 \mu\text{l}$ cDNA, $4 \mu\text{M}$ 의 5' 과 3' primer, 10x buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), $250 \mu\text{M}$ dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 $25 \mu\text{l}$ 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94 °C/45초, 55~60 °C/45초, 72 °C/60초, 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5 % agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다 (Table 1).

Table 1. The sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
TNF- α	F	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'	364
	R	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-1 β	F	5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	447
	R	5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	
IL-6	F	5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R	5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
iNOS	F	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
COX-2	F	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	696
	R	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	
β -Actin	F	5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

6. Western blot analysis

RAW 264.7 세포 (1×10^6 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 5 % CO₂ 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/ml)로 조제된 시험물질과 LPS (1 μ g/ml)와 INF- γ (50 U/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ g의 lysate를 8 % mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer 하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5 % skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1 % Tween 20) 용액에서 overnight 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1 : 1000) (Santa-Cruz) 을 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-rabbit COX-2 (1 : 1000) (Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 40분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

7. NO assay

RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 시험물질과 LPS (1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess시약 [1 % (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid] 100 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Green *et al.*, 1982). 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution하여 얻었다 (1-100 μ M).

8. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

항산화활성은 DPPH를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과 (radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다 (Blois, 1958). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Aldrich) 약 2 mg을 에탄올 15 ml에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 12 ml에 DMSO 6.25 ml를 첨가한 후, 이때 517 nm의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 흡광도가 0.94 - 0.97이 되도록 에탄올로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 그리고, 용매 1 ml에 분말로 추출된 시료 1 mg을 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 DPPH 450 μ l에 시료용액 50 μ l를 넣어 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다가 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA), vitamine C, vitamine E, 소나무 추출물인 pycnogenol 등을 사용하였고, 항산화효과는 DPPH의 흡광도가 50 % 감소할 때 나타나는 검체의 농도 (RC_{50})로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.



Ⅲ. 결 과

1. Pro-inflammatory cytokines의 생성에 미치는 영향

녹나무 잎의 용매 분획이 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성에 어느 정도 영향을 주는지를 조사하였다. 내독소로 알려진 LPS가 macrophage에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등의 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 사용하여 RAW 264.7 세포로부터 이러한 cytokine의 생성을 유도하였다. 녹나무 시료의 단독 처리시에는 cytokine의 생성에는 영향을 주지 않았으며, 세포독성도 나타내지 않았다 (date not shown). 하지만, LPS 자극과 함께 각각 다른 농도의 80% MeOH 추출물을 처리한 결과 TNF- α 생성에서 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단독처리에 비해 농도 의존적인 억제 효과를 보였다 (Figure 1). 이러한 결과는 염증 억제가 세포 독성에 의하지 않은 것임을 보여주었으며, 효과가 나타난 성분에 대한 용매 분획별 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) TNF- α 억제는 80% MeOH 추출물, EtOAc 분획에서 각각 48.8 %, 54.8 %로 80% MeOH 추출물과 EtOAc 분획물에서 높은 억제 효과를 나타내었다. TNF- α 이외의 다른 cytokine IL-6, IL-1 β 생성 억제에서도 TNF- α 와는 약간의 차이가 있었지만, IL-6에 대한 억제효과는 EtOAc 분획에서 68.9 %를, IL-1 β 에 대한 억제효과는 EtOAc 분획에서 49.8 %를 나타내어 녹나무 추출물이 LPS에 의해 발현되는 pro-inflammatory cytokine 억제에 중요한 작용을 함을 알 수 있었다 (Table 2).

2. Pro-inflammatory cytokines의 mRNA발현에 미치는 영향

이러한 cytokine 생성억제가 mRNA 발현을 억제한 결과인지를 조사하기 위하여 LPS와 녹나무 시료를 함께 처리하여 LPS에 의한 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사하였다. TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성 억제에 대한 녹나무 용매 분획물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였을 때 80% MeOH 추출물과 EtOAc 분획물에서 높은 억제 효과를 보였다. β -Actin을 같이 나타내줌으로써 녹나무 자체가 세포에 영향을 주어 감소하는 것이 아님을 보여주었다 (Figure 2).

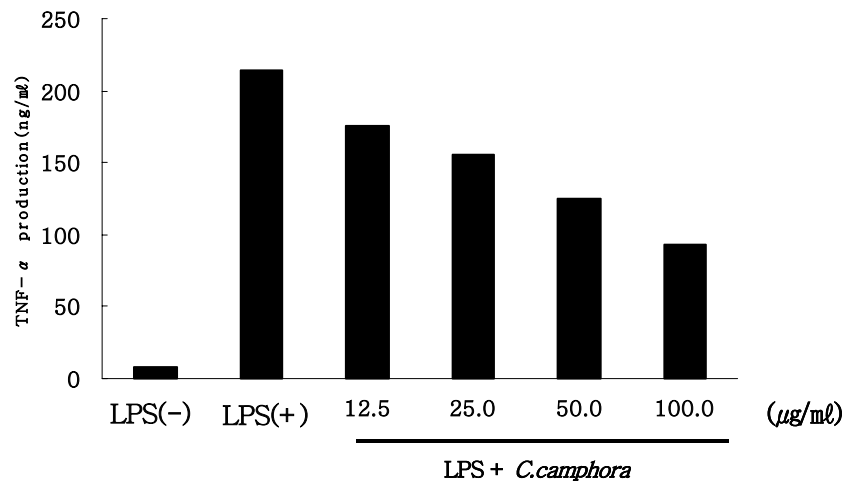


Figure 1. The inhibitory effect of 80% MeOH extract of *C. camphora* on the TNF- α production in RAW264.7 cells. The productions of TNF- α were determined by ELISA method from the culture medium of RAW 264.7 (1×10^6 cells /ml) stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of *C. camphora*.

Table 2. The inhibitory effects of solvent fractions of *C. camphora* on the pro-inflammatory cytokines production in RAW264.7 cells

Fractions	Inhibition (%)		
	TNF- α	IL-6	IL-1 β
80 % MeOH	48.8 \pm 0.5	56.7 \pm 1.6	42.2 \pm 1.6
Hexane	24.3 \pm 3.3	33.5 \pm 0.7	32.4 \pm 2.3
EtOAc	54.8 \pm 2.6	68.9 \pm 1.5	49.8 \pm 1.3
BuOH	-	10.8 \pm 1.8	22.8 \pm 1.0

RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) with various extracts of *C. camphora* ($100 \mu\text{g/ml}$). The amounts of the cytokines were determined using ELISA method, as described method

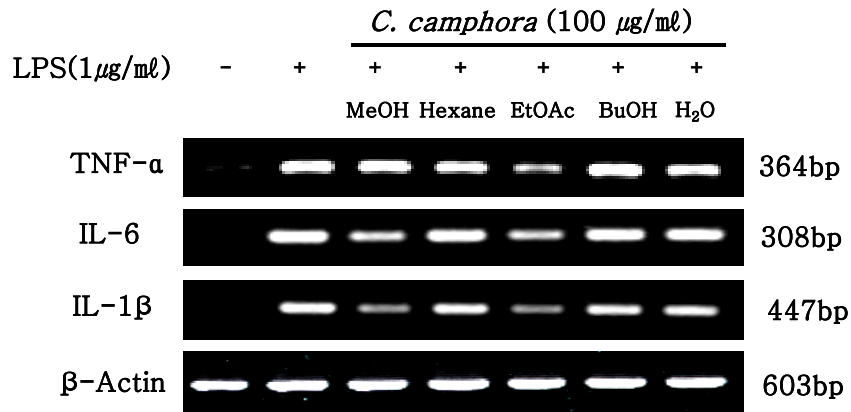


Figure 2. The inhibitory effects of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines were determined from the 6 hr culture of cells stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of *C. camphora* (100 μ g/ml).

3. iNOS 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 iNOS 의 생성을 유도한 후 녹나무 분획물에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. LPS 에 의해 iNOS는 현저히 증가하였으며, 녹나무 분획물을 처리한 결과 EtOAc 분획물이 mRNA expression을 강하게 억제하였다 (Figure 3). 그리고, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 INF- γ (50 U/ml)를 사용하여 단백질양에 대한 억제정도를 western blotting을 통해 알아보았다. 녹나무 분획물을 처리한 결과 단백질 수준에서도 EtOAc 분획물이 LPS 및 INF- γ 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다 (Figure 4).

4. Nitric oxide 형성에 미치는 영향

최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 녹나무 분획물을 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서 59.1 μM 로 NO가 과량 생성되었으며, hexane 분획물과 EtOAc 분획물처리에서 무처리군 3.2 μM 과 비슷한 생성농도 9.4 μM , 9.3 μM 로 생성량이 감소됨을 확인할 수 있었다 (Table 3). 그리고 EtOAc 분획물의 농도별 처리에서도 농도 의존적 억제 효과를 보였으며 이때 IC_{50} 값은 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다 (Figure 5).

5. COX-2 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 COX-2 의 생성을 유도한 후 녹나무 분획물에 의한 mRNA expression 저해정도를 RT-PCR을 통해 알아보았다. 녹나무 분획물을 처리한 결과 BuOH 분획물이 mRNA expression을 강하게 억제하였다 (Figure 6). 그리고, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 INF- γ (50 U/ml)를 사용하여 단백질양에 대한 억제정도를 western blotting을 통해 알아보았다. 녹나무 분획물을 처리한 결과 단백질 수준에서도 BuOH 분획물이 LPS 및 INF- γ 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다 (Figure 7).

6. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

녹나무의 80% MeOH 추출물과 EtOAc분획물들을 기존에 잘 알려져 있는 합성

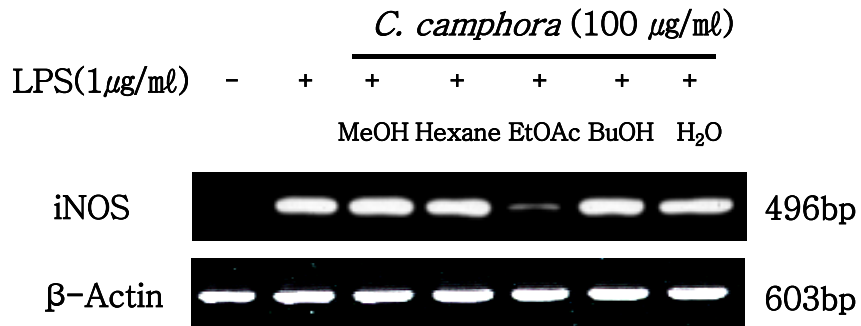


Figure 3. The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of iNOS in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of iNOS were determined from the 24 hr culture of cells stimulated by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of *C. camphora* (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

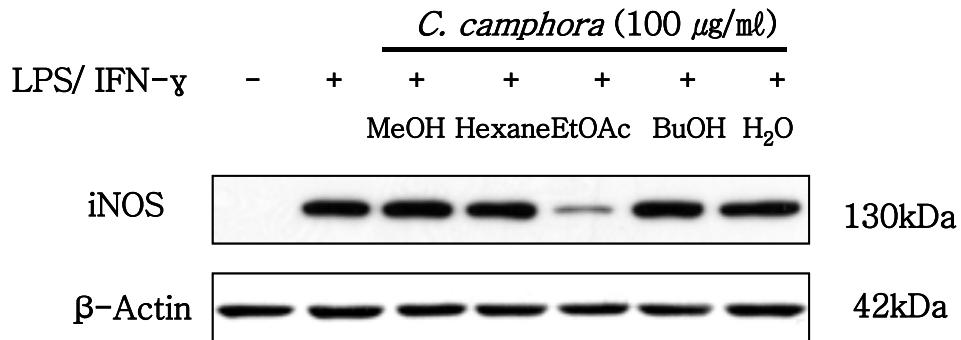


Figure 4. The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the level of iNOS in RAW264.7 cells. RAW 264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) plus IFN- γ ($50 \text{ U}/\text{ml}$) in the presence of *C. camphora* ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. iNOS protein was determined using immunoblotting method from the 24 hr cultures.

Table 3. The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the production of nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells

Fraction	NO Production (uM)
Medium	3.2 ± 0.8
LPS (1 µg/ml)	59.1 ± 6.0
MeOH	51.3 ± 4.3
Hexane	9.4 ± 3.0
EtOAc	9.3 ± 1.8
BuOH	51.3 ± 8.0
H ₂ O	45.9 ± 3.9

The productions of NO was assayed from culture medium of RAW264.7 (1.5×10^5 cells/ml) stimulated by LPS (1 µg/ml) in the presence of *C. camphora*.

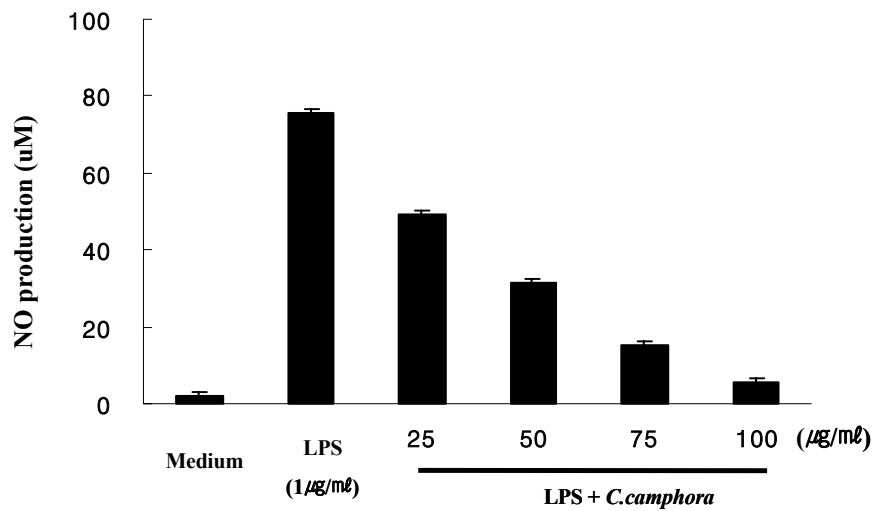


Figure 5. The inhibitory effect of the EtOAc fraction of *C. camphora* on NO production in RAW264.7 cells. The productions of NO was assayed from culture medium of RAW264.7 (1.5×10^5 cells/ml) stimulated by LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of *C. camphora*.

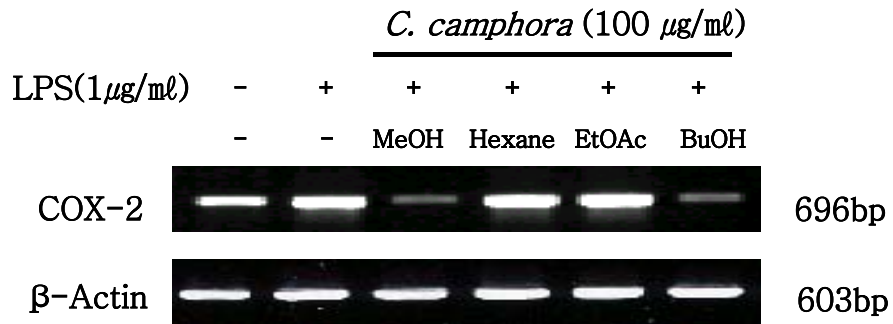


Figure 6. The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the mRNA expression of COX-2 in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of COX-2 were determined from the 24 hr culture of cells stimulated by LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of *C. camphora* (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

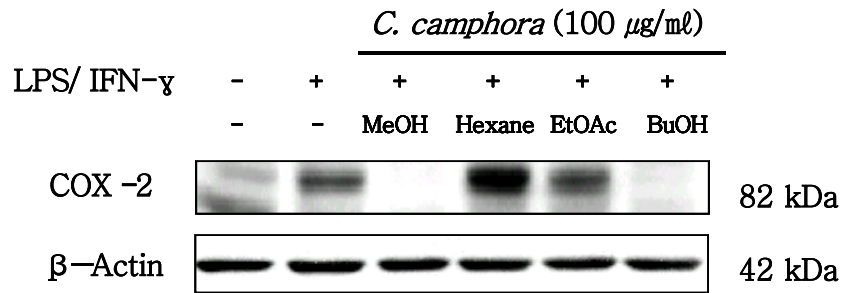


Figure 7. The inhibitory effect of solvent fractions of *C. camphora* on the level of COX-2 in RAW264.7 cells. RAW264.7 (1×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) plus IFN- γ ($50 \text{ U}/\text{ml}$) in the presence of *C. camphora* ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. COX-2 protein was determined by immunoblotting method from the 24 hr cultures.

항산화제인 butylated hydroxy anisole (BHA)와 천연 항산화제인 비타민 C, E 및 소나무 추출물인 pycnogenol을 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 실험결과 합성 항산화제인 BHA와 vitamine C, vitamine E, 소나무 추출물인 pycnogenol의 RC_{50} 값과 비교하였을 때 각각 $16.9 \mu\text{g/ml}$, $11.9 \mu\text{g/ml}$ 로 비슷한 항산화 활성을 보였다 (Table 4).



Table 4. Comparison DPPH radical-scavenging activities of several extracts of *C. camphora*

Sample	*RC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	DPPH radical scavenging effect
Vitamin C	3.0
Vitamin E	17.0
Pycnogenol	6.3
BHA	9.0
80 % MeOH Ext.	16.9
EtOAc fr.	11.9

The experiments were carried out according to the method of Blois (1958) with a slight modification. Briefly, a 2 mg of DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical solution in 15 ml ethanol was prepared and then, this solution was mixed 1 mg/ml of sample solution in ethanol. Finally, after 10 min, the absorbance was measured at 517 nm.

* RC₅₀ : Concentration for 50% radical-scavenging

IV . 고 찰

Monocyte 및 macrophage는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 한다. LPS에 의한 macrophage의 활성화는 다양한 염증 매개물질 (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 등을 유도하며, 이러한 염증 매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다 (Kim *et al.*, 2002). 이에 본 실험에서는 이러한 과정을 설명하기 위해 RAW264.7 세포를 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하는 염증 반응의 주체가 되는 단핵 식세포 모델에서 녹나무 추출물이 pro-inflammatory cytokine 생성과 iNOS, COX-2 및 NO의 발현을 억제하는지 조사하였다.

RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하여 뚜렷하게 TNF- α 가 증가되는 것을 확인하였으며, 세포 독성이 없는 농도로 녹나무 80% MeOH 추출물을 처리하였을 때 농도의존적으로 TNF- α 생성이 억제되었다. TNF- α 이외의 다른 cytokine 생성에서도 LPS 단독 처리군에 비해 용매 분획물 처리시에 억제되는 현상을 관찰하였다. 염증 전구물질인 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 (Feldmann *et al.*, 1996), 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다 (Harada *et al.*, 1994). mRNA 수준과 protein 수준에서 녹나무의 80% MeOH 추출물과 EtOAc 분획물에 의하여 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 유의적으로 억제된 것은 이러한 사실을 뒷받침해 준 것이라 할 수 있다.

일부 세포에서 LPS 및 cytokine, 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다 (Ohshima, 1994). 대식세포에 LPS를 처리하여 24시간 노출시키게 되면 NO가 생성되는데 녹나무의 EtOAc 분획물 처리에 의하여 현저히 그 생성이 억제되었다. Western blot으로 분석한 LPS에 의한 iNOS의 발현과 세포내의 NO 형성이 EtOAc 추출물에 의해 억제됨이 유사한 경향으로 나타남으로서 NO의 억제는 iNOS의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었으며 (Kim *et al.*, 2002), cytokine 생성 결과와도 연관됨을 보였다.

다수의 항염증제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성화저해에 의한 것이다. COX는 COX-1과 COX-2로 나뉘어 지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장기능의

유지, 혈소판의 형성에 필요한 prostaglandin의 합성에 작용한다. 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다 (Seibert *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 1994). 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있다. LPS로 자극된 대식세포에 녹나무의 추출물을 처리하였을 때 녹나무의 80% MeOH 추출물과 BuOH 분획물에서 COX-2의 발현이 억제되는 것으로 보아 염증성 전구물질의 형성 억제와 유사함을 보였다.

산소는 식물을 포함하여 호기성 유기체의 대사과정을 위해서 필수적이나 생체조직 내 과잉의 세포질 내에서 superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($OH\cdot$) 등과 같은 반응성이 높은 유해산소종 (active oxygen species)을 생산하게 된다 (Hewitt *et al.*, 1990). 활성 산소종은 강한 산화력이 있어 광합성 억제, 엽록체 파괴를 일으키며, 세포막 분해, 단백질 분해, 지질산화, DNA 손상, 돌연변이, 발암, 노화 등의 심각한 생리장해를 유발하여 (Tottenpudi *et al.*, 1995) 심장병, 파킨스씨병, Alzheimer's disease, 암 등이 유발된다고 알려져 있다 (Aruoma *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 2003). 생체는 이러한 활성 산소종의 독성으로부터 자기를 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화 효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione 등의 항산화물질을 생산한다 (Jeong *et al.*, 1996; Hahm *et al.*, 1993). 염증성 mediator 생성 억제 효과에서 좋은 결과를 보였던 녹나무 80% MeOH 추출물과 EtOAc 분획물을 기존에 잘 알려져 있는 합성 항산화제인 BHA와 천연 항산화제인 vitamin C, E 및 소나무 추출물인 pycnogenol을 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 실험 결과 80% MeOH 추출물과 EtOAc 분획물에서 각각 16.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 11.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 vitamin E 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pycnogenol 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 비슷한 수준으로 항산화 활성을 보였다.

본 실험 결과를 요약하면, 녹나무 80% MeOH 추출물과 그의 EtOAc 분획물, BuOH 분획물이 높은 항산화 효과, TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO 형성억제 및 iNOS, COX-2의 발현억제를 나타냈으며, 이러한 결과는 녹나무의 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구, 예방 또는 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

V . 참 고 문 헌

- A. Harada, N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida and K. J. Matsushima. 1994. Essential Involvement of Interleukin-8 (IL-8) in Acute Inflammation. *J Leukoc Biol.* **56**: 559 - 564
- A. Kast and S. P. Hauser. 1990. Helixor-mistletoe Preparation for Cancer Therapy, Documentation No.19, *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, **79**: 291 - 295
- A. Tolonen, T. Joutsamo, S. Mattila, T. Kamarainen and J. Jalonen. 2002. Identification of Isomeric Dicafeoylquinic Acids from *Eleutherococcus Senticosus* Using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR Methods. *Phytochem Anal.* **13**: 316 - 328
- B. C. Cha, H. W. Lee and T. J. Rhim. 2003. Antioxidative Constituents and Activities of Acorn Hull and Chestnut Hull. *Yakhak Hoeji.* **47**: 212 - 217
- B. H. Han. 2003. Self-Medication and the Pharmacy Profession. *Yakhak Hoeji.* **47**: 252 - 259
- B. Klaus. 1988. Interleukin 1, Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor in Infection, Inflammation and Immunity. *Immunol Lett.* **19**: 183 - 192
- B. M. Choi, H. J. Kwak, C. D. Jun, J. S. Rim, S. D. Park and H. T. Chung. 1996. Regulatory Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase by Antisense TGF- β 1 Oligodeoxynucleotides During Wound Healing. *Kor J Immunol.* **18**: 551 - 558
- B. Mockel, T. Schwarz, H. Zinke, J. Eck, M. Langer and H. Lentzen. 1997. Effects of Mistletoe Lectin 1 on Human Blood Cell Lines and Peripheral Blood Cells. *Arzneimittelforschung.* **47**: 1145 - 1151
- C. H. Hong, S. K. Hur, O. J. Oh, S. S. Kim, K. A. Nam and S. K. Lee. 2002. Evaluation of Natural Products on Inhibition of Inducible Cyclooxygenase (COX-2) and Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Cultured Mouse Macrophage Cells. *J thnopharmacol.* **83**: 153 - 159

- D. J. Stuber, H. J. Cho and N. S. Kwon. 1991. Purification and Characterization of The Cytokine of The Cytokine-Induced Macrophage Nitric Oxide Synthase: an FAD and FMN-Containing Flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 7773 - 7777
- C. Nathan. 1992. Nitric Oxide As a Secretory Product of Mammalian Cells. *EASEB J*. **6**: 3051 - 3064
- D. Schilling, T. Beibert, M. J. Fenton and K. Nixdorff. 2001. Negative Regulation of IL-1 β Production at The Level of Transcription in Macrophages Stimulated with LPS. *cytokine*. **16**: 51 - 61
- D. Schilling, J. Brauburger, W. Ruiner and K. Nixdorff. 1997. Modulation of Interleukin 1 β Production in Macrophages Stimulated with Lipopoly-saccharide by The Protein Kinase Inhibitor Staurosporine. *J Endotoxin Res*. **4**: 251 - 260
- G. Ellis and M. J. Parnham. 1994. Advances in Inflammation *Drug News & Perspec*. **7**: 25 - 26
- G. Kuttan, L. G. Menon and R. Kuttan. 1996. Prevention of 20-Methylcholanthrene Induced Sarcoma by a Mistletoe Extract Iscador. *Carcinogenesis*. **17**: 1107 - 1109
- G. Ribereau-Gayon, S. Dumont, C. Muller, M. L. Jung, P. Poindron and R. Anton. 1996. Mistletoe Lectins I, II and III Induce the Production of Cytokines by Cultured Human Monocytes. *Cancer Lett*. **109**: 33 - 38
- G. Y. Yang, J. Liao, K. Kim, E. J. Yurkow and C. S. Yang. 1998. Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Human Cancer Lines by Tea Polyphenols. *Carcinogenesis*. **19**: 611 - 616
- H. Bantel, I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff and S. Wesselborg. 1999. Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug Induced Apoptosis, *Cancer Res*. **59**: 2083 - 2090
- H. J. Jeong, 1996. The Effect of Cultivated Environments in The Antioxidant

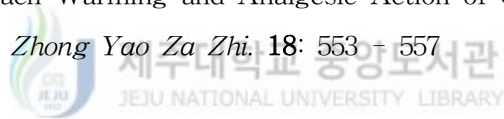
- Enzyme Activities of Codonopsis Lanceolata. *Kor J Plant Res.* **9**: 203 - 223
- H. L. Park, J. M. Suh, K. S. Park, H. S. Chang, S. J. Nam, J. W. Bae, K. P. Lee, J. H. Yang and B. H. Koo. 2001. Diallyl Disulfide from Garlic Induces Apoptosis through a Caspase Dependent Pathway in Human Breast Cancer Cell Line, MCF-7. *J Kor Surg Soc.* **61**: 119 - 121
- H. Oshima and H. Bartsch. 1994. Chronic Infectious and Inflammation Process as Cancer Risk Factors: Possible Role of Nitric Oxide in Carcinogenesis. *Mutat Res.* **305**: 253 - 264
- 홍성천 외. 1987. 한국수목도감. 계명사
- J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim and Y. K. Kim. 2003. Inhibitory Activity of Plant Extracts on Nitric Oxide Synthesis in LPS-Activated Macrophage. *Phytother Res.* **17**: 485 - 489
- J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson and K. Seibert. 1994. Selective Inhibition of Inducible Cyclooxygenase 2 in vivo is Antiinflammatory and Nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 3228 - 3232
- K. H. Cho, S. M. Choi, B. C. Kim, M. K. Kim, E. J. Sohn and J. H. Man. 2001. An Open, Comparative Study of the Inhibitory Effect on Platelet Aggregation and Safety of Clopidogrel(Plavix) and Aspirin in Patients with Ischemic Stroke. *Kor J Clin Oharmacol Ther.* **9**: 197 - 205
- K. Hartmut, E. Christuan, I. B. Irmgard and F. Ulrich. 1996. In Murine 3T3 Fibroblasts, Different Second Messenger Pathways Resulting in the Induction of NO Synthase-II (iNOS) Converge in the Activation of Transcription Factor NF- κ B. *J Biol Chem.* **271**: 6039 - 6044
- K. M. Ashutosh, A. Amita and N. Sita. 2002. Gold Sodium Thiomalate (GSTM) Inhibits Lipopolysaccharide Stimulated Tumor Necrosis Factor- α Through Ceramide Pathway. *Cell Immunol.* **219**: 1 - 10
- K. M. Cho and K. D. Suk. 2002. The Inhibitory Action of Free Radical and Arachidonic Acid Production and Cytotoxic Effects of Pini Resina. *Yakhak Hoeji.* **46**: 348 - 351

- K. P. Tottenpudi, D. A. Narc and R. S. Cecil. 1995. Localization and Characterization of Peroxidases in The Mitochondria of Chilling Acclimated Maize Seedlings. *plants physiol.* **108**: 1597 - 1605
- K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, S Hauser, J. Masferrer, W. Perkins, L. Lee and P. Isakson. 1994. Pharmacological and Biochemical Demonstration of The Role of Cyclooxygenase 2 in Inflammation and Pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 12013 - 12017
- L. C Green, D. A. Wagner and J. Glogowski. 1982. Analysis of Nitrate, Nitrite and [¹⁵N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem.* **126**: 131 - 138
- M. Davydov and A. D. Krikorian. 2000. Eleutherococcus Senticosus (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) As an Adaptogen: a Closer look. *J Ethnopharmacol.* **72**: 345 - 393
- M. Feldmann, F. M. Brennan and R. N. Maini. 1996. Role of Cytokine in Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Immunol.* **14**: 397 - 440
- M. G. Scott and R. E. Hancick, 2000. Cationic Antimicrobial Peptides and Their Multi-functional Role in The Immune System. *Crit Rev Immunol.* **20**: 407 - 431
- M. L. Jung, S. Baudino, G. Ribereau-Gayon and J. P. Beck. 1990. Characterization of Cytotoxic Proteins from Mistletoe(*Viscum album L.*). *Cancer Lett.* **51**: 103 - 108
- M. Miyazawa, Y. Hashimoto, Y. Taniguchi and K. Kubota. 2001. Headspace Constituents of The Tree Remain of *Cinnamomum camphora*. *Nat Prod Lett.* **15**: 63 - 69
- N. H. Lee, S. J. Lee, D. S Jung, H. J. Bu, H. C Yang and K. J. Riu. 2001. Screening of the Tyrosinase Inhibition and Hyaluronidase Inhibition Activities and Radical Scavenging Effects of Plants in Cheju. *Kor J Pharmacogn.* **32**: 175 - 180
- N. Hewitt, G. Kok and R. Fall. 1990. Hydroperoxide in Plants Exposed to Ozone Mediates Air Pollution Damage to Alkene Emitters. *Nature.* **344**: 56 - 57
- N. Y. Kim and J. H. Ryu. 2003. Butanolides from *Machilus Thunbergii* and Their Inhibitory Activity on Nitric Oxide Synthesis in Activated Macrophages.

- Phytother Res.* **17**: 372 - 375
- P. E. Wakefield, W. D. James, C. P. Samlaska and M. S. Metztes. 1991. Tumour Necrosis Factor. *J Am Acad Dermatol.* **24**: 675 - 685
- P. F. Piguet, G. E. Grau, C. Houser and P. Vassalli. 1991. Tumor Necrosis Factor is Critical Mediators in Hepten-induced Irritant and Contact Hypersensitivity Reaction. *J Exp. Med.* **173**: 673 - 679
- R. G. Kim, K. M. Shin, S. K. Chun, S. Y. Ji, S. H. Seo, H. J. Park, J. W. Choi and K. T. Lee. 2002. *In vitro* Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Yakhak Hoeji.* **46**: 343 - 347
- R. Ishii, M. Horie, K. Saito, M. Arisawa and S. Kitanaka. 2003. Inhibition of Lipopoly-saccharide Induced Pro-Inflammatory Cytokine Expression via Suppression of Nuclear Factor- κ B Activation by *Mallotus japonicus* Phloroglucinol Derivatives. *Biochim Biophys Acta.* **1620**: 108 - 118
- R. Krauspenhaar, S. Eschenburg, M. Perbandt, V. Kornilov, N. Konareva, I. Mikailova, S. Stoeva, R. Wacker, T. Maier, T. Singh, A. Mikhailov, W. Voelter and C. Betzel. 1999. Crystal Structure of Mistletoe Lectin I from *Viscum Album*, *Biochem Biophys Res Commun.* **257**: 418 - 424
- R. Singh, S. Ahmed, N. Islam, V. M. Goldberg and T. M. Haqqi. 2002. Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Interleukin-1 β -Induced Expression of Nitric Oxide Synthase and Production of Nitric Oxide in Human Chondrocytes: Suppression of Nuclear Factor κ B Activation by Degradation of The Inhibitor of Nuclear Factor κ B *Arthritis Rheum.* **46**: 2079 - 2086
- R. Singh, S. Ahmed, C. J. Malesud, V. M. Goldberg and T. M. Haqqi. 2003. Epigallocatechin-3-gallate Selectively Inhibits Interleukin-1 β -Induced Activation of Mitogen Activated Protein Kinase Subgroup c-Jun N-terminal Kinase in Human Osteoarthritis Chondrocytes. *J Orthop Res.* **21**: 102 - 109
- R. W. Groves, M. H. Allen and E. L. Ross. 1994. Tumour Necrosis Factor α is Pro-inflammatory in Normal Human Skin and Modulates Cutaneous Adhesion Molecule Expression. *Br J Dermatol.* **32**: 345 - 352

- S. Ahmed, A. Rahman, A. Hasnain, M. Lalonde, V. M. Goldberg and T. M. Haqqi. 2002. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate Inhibits The IL-1 beta-Induced Activity and Expression of Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide Synthase-2 in Human Chondrocytes. *Free Radic Biol Med.* **15**: 1097 - 1105
- S. Antony, R. Kuttan and G. Kuttan. 1997. Effect of *Viscum Album* in The Inhibition of Lung Metastasis in Mice Induced B16F10 Melanoma Cells, *J Exp Clin Cancer Res.* **16**: 159 - 162
- S. C. Kim, S. Y. Park, K. H. Her, S. J. Kim and H. K. Kang. 2001. Effect of Extracts of *Trichosanthes kirilpui* var. japonica on The Growth of HL-60 Leukemia Cells. *Cheju J Life Sci.* **4**: 95 - 102
- S. Fisher, A. Scheffler and D. Kabelitz. 1997. Stimulation of These Specific Immune System by Mistletoe Extracts. *Anticancer Drugs.* **8**: 33 - 37
- S. Iida, H. Oshima and S. Oguchi. 1992. Identification of Inducible Calmodulin-Dependent Nitric Oxide Synthase in The Liver of Rats. *J Biol Chem.* **267**: 25385 - 25388
- S. J. An, H. O. Pae, G. S. Oh, B. M. Choi, S. Jeong, S. I. Jang, H. Oh, T. O. Kwon, C. Song and H. T. Chung. 2002. Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 Production in Lipopolysaccharide-activated RAW264.7 Macrophage by Catalposide, an Iridoid Glycoside Isolated from *catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol.* **2**: 1173 - 1181
- T. A. Khwaja, C. B. Dias and S. Pentecost. 1986. Recent Studies on The Anticancer Activities of Mistletoe (*Viscum album*) and Its Alkaloids. *Oncology.* **43**: 42 - 50
- T. J. Yoon, Y. C. Yoo., T. B. Kang., K. Shimazaki, S. K. Song, K. H. Lee, C. H. Park, I. Azuma and J. B. Kim. 1999. Lectins Isolated from Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) Induce Apoptosis in Tumor Cells. *Cancer Lett.* **136**: 33 - 40
- W. B. Park, Y. J. Ju and S. K. Han. 1998. Isolation and Characterization of β -galactoside Specific Lectin from Korean Mistletoe (*Viscum album* var.

- coloratum) with Lactose-BSA-Sepharose 4B in Changes of Lectin Conformation. *Arch. Pharm Res.* **21**: 429 - 435
- W. Gaby, P. Jose and K. Dieter. 1997. Mechanism of Suppression of Inducible Nitric -Oxide Synthase(iNOS) Expression in Interferon (INF)- γ -stimulated RAW 264.7 cells by Dexamethasone. *J Biol Chem.* **272**: 11679 - 11687
- 우원석. 1995. *천연물화학 연구법*. 민음사. pp. 9-15.
- Y. H. Yang and C. K. Song. 2002. Flora and Medicinal Plant in Jeju Island. *Kor J Med Crop Sci.* **10**: 20 - 66
- Z. A. Weis, L. Cicatiello and H. Esumi. 1996. Regulation of The Mouse Inducible -Type Nitric Oxide Synthase Gene Promoter by Interferon-gamma, Bacterial Lipopolysaccharide and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* **316**: 209 - 215
- Z. P. Zhu, M. F. Zhang, Y. Q. Shen and G. J. Chen. 1993. Pharmacological Study on Spleen-Stomach Warming and Analgesic Action of Cinnamomum cassia Presl *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **18**: 553 - 557



VI. 적 요

본 연구에서는 천연물로부터 효능이 뛰어난 염증억제 활성물질을 찾기 위하여 제주도에서 자생하고 있는 녹나무를 채집하여 계통적인 방법에 의하여 추출하고 그 추출물에 대하여 염증성 생체지표 인자에 대한 억제효과를 조사하였다. 녹나무는 한국에서도 제주도에서만 자생하는 식물로 알려져 있으며, 민간에서는 오래전부터 신염, 관절, 신경쇠약 등에 이용되어져 왔다. 그러나 그러한 성분의 생리 활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 세포에 lipopolysaccharide (LPS)로 자극을 주고 녹나무 추출물을 처리하여 pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6 그리고 IL-1 β) 생성 억제 정도와 iNOS, COX-2의 발현 억제 정도를 알아보았다.

그 결과, LPS 자극과 함께 각각 다른 농도의 80 % MeOH 추출물을 처리하였을 때 TNF- α 생성에서 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 단독처리군에 비해 농도 의존적인 억제 효과를 보였으며, 용매 분획별 처리시 TNF- α , IL-6, IL-1 β 생성에서는 EtOAc 분획이 높은 억제 효과를 나타내어 녹나무 추출물이 LPS에 의해 발현되는 pro-inflammatory cytokine 억제에 중요한 작용을 함을 알 수 있었다. 최근 염증 유발에 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 inducible nitric oxide synthase 과 cyclooxygenase (COX-2)의 발현에 대한 억제 정도를 알아보기 위하여 LPS 로 자극을 주고 녹나무 용매 분획물을 처리하여 실험한 결과 EtOAc 분획물이 iNOS의 발현을 LPS 단독 처리군에 비해 현저히 억제시키는 것을 보였으며, nitric oxide (NO) 생성 억제에서도 강한 억제 효과를 보였다. 또한, BuOH 분획물에서는 COX-2 발현을 현저히 억제함을 보였다.

이러한 결과는 녹나무의 약리활성 성분이 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물 두 층에 공존하는 것으로 여겨지며, 녹나무 추출을 통한 항염증 물질의 연구, 예방 또는 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

Key word: 녹나무, LPS, pro-inflammatory cytokines, iNOS, COX

감사의 글

2년의 대학원 생활동안 참 많은 걸 배웠습니다. 조금 더 발전하기 위한 과정이었다는 생각을 하며, 아직도 배워야 할 것들이 많다는 걸 새삼 느낍니다.

본 논문이 완성되기까지 참 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 이 지면을 빌어 감사의 말씀을 드립니다. 우선, 바쁘신 와중에도 많은 관심 가져주시고 격려해주신 유은숙 교수님께 감사드립니다. 앞으로도 많은 조언 부탁드립니다 항상 건강하십시오. 또한 논문의 부족한 부분들을 지적해 주시고 점검해 주신 강희경 교수님, 현진원 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 대학원 과정동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길로 이끌어 주신 이영기 교수님, 이봉희 교수님, 정영배 교수님, 박덕배 교수님, 조문제 교수님, 고영상 교수님, 이상이 교수님, 홍성철 교수님, 염재범 교수님, 조수현 교수님, 강현욱 교수님, 김명주 교수님, 강지훈 교수님께도 감사드립니다.

실험의 과정에서 관심과 조언으로 많은 도움을 주셨던 박수영 선생님, 한상현 선생님, 강신해 선생님, 박지권 선생님, 영미 언니, 희경 언니에게 감사드립니다. 특히, 저 때문에 고생 많았던 약리학 교실 상철오빠, 원종오빠, 은아, 재희에게 감사의 마음을 전합니다. 힘들 때마다 다독여주고 용기를 주었던 화학과 친구들과 혜정이에게도 고마운 마음을 전합니다. 또한 생명과학과 분자생물학 실험실 정형복, 진영준, 최진영 대학원생, 그리고 경희 언니, 지훈 오빠, 경아, 윤지현, 강윤석, 김은희, 오근희, 이정희, 김재우 선생님을 비롯한 여러 선생님들께도 감사의 마음을 전합니다. 아울러 논문이 완성 될 수 있도록 도와주신 한라수목원 김철수 소장님과 병석오빠에게도 감사의 뜻을 전합니다.

끝으로 부족한 작은 딸을 믿고 옆에서 지켜봐주신 부모님과 동생들, 그리고 언니, 형부에게도 말로 다 표현할 수 없는 고마움과 사랑의 마음을 전하며, 이 논문을 바칩니다. 감사합니다.