

비쑥 추출물에 대한 항산화 활성 및 염증억제 효과

윤원종 · 이정아 · 김지영 · 오대주 · 정용환 · 이육재 · 박수영*
(재)제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소

Anti-oxidant Activities and Anti-inflammatory Effects on *Artemisia scoparia*

Weon-Jong Yoon, Jung-A Lee, Ji-Young Kim, Dae-Ju Oh,
Yong-Hwan Jung, Wook Jae Lee, and Soo-Yeong Park*

Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute 4-8 Ara-1, Jeju 690-121, Korea

Abstract – We investigated the antioxidant activities such as DPPH radical scavenging capacity, xanthine oxidase inhibitory activity, and superoxide radical scavenging capacity of the aqueous EtOH extract and its solvent fractions of *Artemisia scoparia*. The ethylacetate fraction showed high antioxidant activity, compared to positive controls such as ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA), trolox, and allopurinol in these assay systems. Moreover, we examined the inhibitory effect of solvent fractions of *A. scoparia* on the production of pro-inflammatory factors that the nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE₂) production activated with LPS (1 µg/ml) in murine macrophage cell line RAW264.7. The amounts of protein levels were determined by immunoblotting. In the sequential fractions of hexane and dichloromethane inhibited the NO and PGE₂ production and the protein level of iNOS and COX-2. These results suggest that *A. scoparia* may have anti-inflammatory activity through the antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory factors.

Key words – *Artemisia scoparia*, NO, iNOS, COX-2, PGE₂

쑥은 국화과 (Compositae) 쑥속 (*Artemisia*)에 속하며, 흔히 쑥이라 불리울 수 있는 식물로는 지구 북반구에 200여 종이 있고 국내에는 38 종이 보고되고 있으나, 흔히 통칭하는 쑥은 종이 명확하지가 않고 쑥속 (*Artemisia*)과 유사종인 뽕쑥 (*Gnaphalium*)과 쑥부쟁이 (*Aster*)로 구별할 수 있다. 이들 쑥에 속하는 식물들은 독특한 향기와 맛을 가지고 있어 종래로 부터 식용 또는 약용으로 널리 사용되어 왔다.¹⁾ 쑥에는 사람에게 유익한 성분이 다수 포함되어 있어 예로부터 널리 이용 되어 왔으며, 쑥에 포함된 유효 성분을 생약학적 방법으로 연구한 결과 쑥에 포함된 다양한 유효성분들이 혈액순환촉진, 이뇨작용, 강장작용, 지혈, 피부질환 치료, 건위, 황달치료, 항암작용 등의 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.²⁾

Oxidative stress는 수많은 생리학적 병리학적 현상에서 중요한 역할을 하는데 oxidative stress에 수반되는 활성 산소종

(reactive oxygen species; ROS)으로서 oxygen (¹O₂), superoxide (O₂⁻), hydroxy radical (HO), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 있으며, 이러한 활성 산소종들은 염증 반응에 관여한다.³⁾ 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다.⁴⁾ 염증 반응 동안 수반되는 혈관 확장, 세포막 유동성 증가, 부종 등의 현상은 세포외로 유리된 화학적 매개 인자에 의해 더욱 증진되며 염증 매개 인자의 자극에 의해 세포 간극 활성 산소종의 생성도 급격히 증가된다. 염증반응에 관여하는 세포종으로서 대식세포, 임파구, polymorphonuclear leukocyte (PMN), 단구, 비만세포, 혈소판, 섬유아세포 등이 있으며 염증 매개 인자에는 염증 반응으로 인한 자극을 통하여 유리되는 물질과, 생

*교신저자(E-mail) : user111@jejuhidi.or.kr
(FAX) : 064-720-2301

성되는 물질로 크게 나뉘어 지는데 전자는 비만 세포에서 분비되는 혈관 확장성 아민류로서 히스타민, 세로토닌, 후자는 비만세포와 PMN에서 생성되는 arachidonic acid 대사체, 단구에서의 사이토카인, 대식세포와 호중구에서 생성되는 활성 산소종 등이 있다.⁵⁾ 이러한 활성 산소종들은 생체 내에서 많은 세포 구성 요소와 반응하여 광과민성 피부질환, 급성 용혈성 빈혈, 류마티성 관절염, 다발성 경화증, 파킨슨 질환, 노인성 치매 그리고 blood's syndrome을 비롯하여 변이, 노화, 발암 등과 같은 심각한 손상을 일으킨다.⁶⁾

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹¹⁾ 또한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A₂의 활성으로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin (PG)으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다.^{12,13)} 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만,¹⁴⁾ 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.^{15,16)}

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다.^{17,25)} COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며,¹⁸⁾ COX-2는 염증매개물질인 PGE₂를 형성시킨다. PGE₂는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾

비쭉 (*Artemisia scoparia*)은 바닷가 모래땅에서 자라는 다년초로서 사철쭉과 닮았으나 냄새가 다르다. 사철쭉은 줄기가 나무처럼 되어 있어 겨울철에도 죽지 않지만 비쭉은 겨울철에 줄기가 완전히 말라 죽는 것이 특징이다. 비쭉은 한 방에서는 거의 쓰지 않는 희귀한 풀이며, 인진쭉(사철쭉) 및 큰비쭉 등과 같은 종류의 쭉에 비해 연구가 거의 이루어지지 않았다. 이에 본 연구는 비쭉의 추출물 및 분획물로부터 항산화 활성과 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성억제 효과 및 iNOS, COX-2와 PGE₂ 생성 및 활성 억제제를 조사하여 기능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 - 제주도 해안가에 자생하고 있는 비쭉을 5월에 채집하여 동결건조 한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료 (50 g)를 80% ethanol (EtOH)로 3회 교반 추출 후 여과하여 감압 농축하여 용매를 증발시켰다.

여기에서 얻은 ethanol 추출물 (10 g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획 (0.9006 g), dichloromethane (CH₂Cl₂) 분획 (1.3462 g), ethylacetate (EtOAc) 분획 (1.3929 g), butanol (n-BuOH) 분획 (2.4916 g) 및 water 분획 (4.8026 g)을 얻어 실험시료로 사용하였다.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색 - 항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 시료의 라디칼 소거효과 (radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용 하였다.²⁰⁾ DPPH 약 2 mg을 ethanol 15 ml에 녹여 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 12 ml에 DMSO 6.25 ml를 첨가한 후, 517 nm의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 ethanol로 희석하여 10 초간 진탕 시켰다. 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 ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA) 및 trolox를 사용하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성 검색 - Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고 superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법에 의해 측정하였다.^{21,22)} 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine 와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 μ l에서 준비하였고 50 mU/ml xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응 시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하여 평균값을 구하였다.

세포 및 시약 - Murine macrophage cell line RAW 264.7 세포를 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3~4일에 한번씩 계대배양을 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111: B4)를 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

세포독성평가 - RAW 264.7 세포 (1.5 \times 10⁵ cells/ml)를 DMEM 배지에 시험 약물과 LPS (1 μ g/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) 활성을 non-radioactive cytotoxicity assay kit (promega, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심분리하여 얻은 배양 배

지 50 μ 와 reconstituted substrate mix를 50 μ 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μ 의 stop solution을 넣어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

Nitric oxide 측정 - RAW 264.7 세포 (1.5×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS (1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ 와 Griess시약 [1% (w/v) sulfani-lamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 μ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution(연속 희석)하여 얻었다 (1-100 μ M).

Immunoblotting - RAW 264.7 세포 (1.0×10^6 cells/ml)를 18시간 전 배양을 하고, LPS (1 μ g/ml)로 자극을 주고 시료 (50 μ g/ml)를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2-3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 300 μ 의 lysis buffer를 첨가, 30분~1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 15 min)하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량 하였다. 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 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS와 COX-2의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse iNOS (Calbiochem)와 anti-goat COX-2 (BD biosciences)를 TTBS 용액에서 희석 (1:1000)하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-goat IgG (Amersham Co.)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, TTBS로 4회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 및 정량 - RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10배 농도 (1 mg/ml)로 조절된 시험물질 50 μ 와 450 μ 의 LPS 최종농도 (1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 Prostaglandin E₂ (PGE₂)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)

하여 상층액을 얻었다. PGE₂의 정량은 PGE₂ ELISA kit (R&D Systemes, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색 - 항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성라디칼 (free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH는 안정한 유리기로 cysteine, glutathione과 같은 황함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine (p -phenylenediamine, p -aminophenol) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 많이 이용되고 있다.²³⁾ 비썬의 조추출물과 각각의 용매분획물을 기존에 잘 알려져 있는 합성 항산화제인 ascorbic acid, butylated hydroxy anisole (BHA) 및 trolox를 대조군으로 하여 DPPH 라디칼 소거법에 의한 항산화활성 실험을 실시하였다. 실험 결과 DPPH 활성라디칼 소거활성으로 비썬 추출물 및 분획물 시료의 항산화 활성을 측정할 결과, 조추출물과 ethylacetate 및 buthanol 분획물에서 다른 용매 분획물에 비해 높은 라디칼 소거 활성을 나타냈으며, 그 중 ethylacetate 분획물에서 매우 높은 라디칼 소거 활성을 보여주었다. DPPH의 활성라디칼 소거활성이 매우 높게 나타난 ethylacetate 분획물의 IC₅₀ 값은 9.27 μ g/ml로 나타났다 (Table I).

Xanthine oxidase 억제 - Xanthine oxidase는 산화적 환경에서 xanthine dehydrogenase로부터 생성된다. Xanthine oxidase는 hypoxanthine을 산화시켜 최종적으로 uric acid와 산소를 생성하며 산소유리기와 수소과산화기가 이 산소로부터 발생하게 된다. Uric acid의 축적은 고요산혈증과 통풍을 유발시키며 uric acid 형성의 억제제가 이들 질환을 위한 치료 물질로서 유용할 것이다. 게다가 xanthine oxidase에 의해 생성된 산소유리기는 세포의 손상을 초래한다.²³⁾ 비썬 추출물 및 분획물 시료의 농도별 xanthine oxidase 활성 억제에 대한 결과는 dichloromethane 분획물이 높은 xanthine oxidase 활성 억제를 나타냈으며 ethylacetate 분획물에서도 비교적 높은 활성억제력을 보여주었다. Xanthine oxidase 활성 억제가 높은 dichloromethane 분획물의 IC₅₀ 값은 93.01 μ g/ml로 나타났다 (Table I).

Superoxide 소거 활성 - 정상적인 산화적 인산화의 과정 동안 소모되는 전체 산소의 0.4-4% 정도는 free radical superoxide ($\bullet O_2^-$)로 전환되며 생성된 $\bullet O_2^-$ 는 다른 reactive oxygen species (ROS)로 전환되어 직접적 또는 간접적으로 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 정상적으로는 $\bullet O_2^-$ 는 내인성 항산화 방어기전에 의해 superoxide dismutase (SOD)에 의해 빠르게 과산화수소로 전환된다.²⁴⁾ 그러나 이

Table I. Comparison of antioxidant potential on EtOH extract and solvent fractions of *Artemisia scoparia*

Treatment	IC ₅₀ (μg/ml) ^{a)}		
	DPPH radical scavenging activity	Xanthine oxidase inhibitory activity	Superoxide radical scavenging activity
80% EtOH	48.38±1.68	311.81±2.49	> 1000
hexane fr.	> 1000	320.34±2.50	192.57±2.28
CH ₂ Cl ₂ fr.	149.67±2.17	93.01±1.96	419.46±2.62
EtOAc fr.	9.27±0.96	147.02± 2.16	16.97±1.22
BuOH fr.	40.53±1.60	> 1000	17.88±1.25
Water fr.	342.76±2.53	381.67±2.58	34.48±1.53
BHA ^{b)}	22.70±0.61	NA ^{c)}	NA ^{c)}
Ascorbic acid	3.90±3.22	NA ^{c)}	NA ^{c)}
Trolox	8.62±2.20	288.60±4.4	189.9±2.03
Allopurinol	NA ^{c)}	3.12±0.17	22.65±0.35

^{a)}IC₅₀ values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

^{b)}Butylated hydroxy anisole.

^{c)}NA: not available method.

내인성 항산화 방어체계가 세포내 산화-환원 균형을 유지하는데 문제가 생길 경우 결과적으로 산화스트레스가 일어나게 되며 이 산화스트레스는 직접적으로 세포내 거대분자의 손상을 일으키거나 세포손상을 일으키는데 중요한 역할을 한다.²⁴⁾ 따라서 산소 유리기의 자유기를 소거할 수 있는 물질 또한 산화적 손상의 예방에 유용할 것으로 사료된다. Superoxide radical 소거활성에 대한 결과는 ethylacetate과 buthanol 분획물에서 높은 superoxide radical 소거활성을 나타냈으며 hexane 분획물에서도 비교적 높은 superoxide radical 소거활성을 보여주었다. Superoxide radical 소거활성이 높게 나타난 ethylacetate 분획물의 IC₅₀ 값은 16.97 μg/ml로 나타났다 (Table I).

세포 독성에 미치는 영향 - LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. RAW264.7 세포 (1.5×10⁵ cells/ml)에 시험 약물과 LPS (1 μg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, LDH assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인한 결과, hexane 분획물에서 독성이 나타났으며 다른 분획물에서는 거의 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

Nitric oxide 생성억제 효과 - 활성산소 중 하나이며, 최근 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO) 생성에 대한 비숙 추출물과 분획물의 효과를 알아보았다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 실험결과 hexane, dichloromethane 및 ethylacetate 분획물에서 대조군인 LPS 단독처리군에 비해 강력한 NO 생성 억제효과를 관

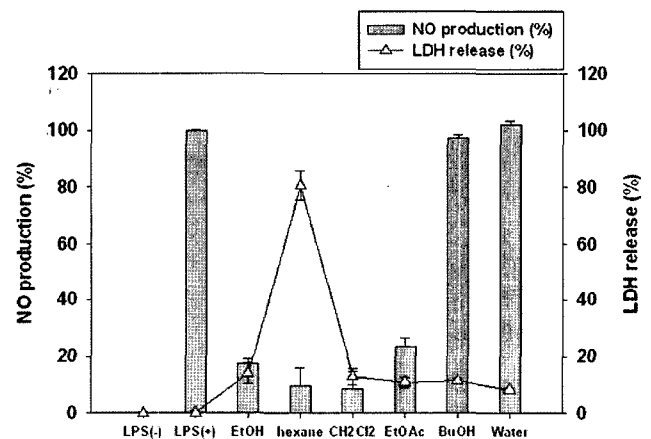


Fig. 1. Inhibitory effect of EtOH extract and solvent fractions of *A. scoparia* on the nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells stimulated with LPS (1 μg/ml) in the presence of EtOH extract and solvent fractions of *A. scoparia* (50 μg/ml). NO production was determined by ELISA method. Cell cytotoxicity was determined using LDH method. The data represent the mean S.D. of three determinations.

찰할 수 있었다 (Fig. 1).

iNOS와 COX-2 생성에 미치는 영향 - iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로

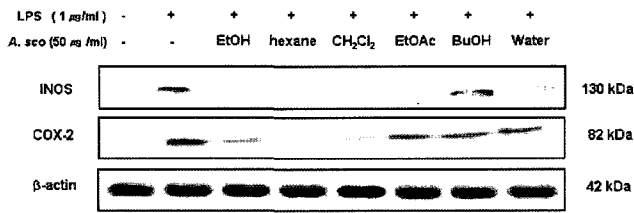


Fig. 2. Inhibitory effect of EtOH extract and solvent fractions of *A. scoparia* on the iNOS and COX-2 protein level in RAW 264.7 cells. The protein level of iNOS and COX-2 was determined from the 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 µg/ml) in the presence of EtOH extract and solvent fractions of *A. scoparia* (50 µg/ml). The iNOS and COX-2 protein level was determined using immunoblotting method.

알려져 있다.^{25,26)}

RAW264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 비썬 추출물과 분획물을 처리하여 단백질 생성에 대한 억제 정도를 immunoblotting을 통해 알아보았다. 그 결과 단백질 수준에서도 hexane, dichloromethane 및 ethylacetate 분획물이 LPS 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 NO의 생성 억제가 iNOS 발현 억제를 통한 것으로 여겨진다.

COX-2 발현에 미치는 영향 - 다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 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 작용하며, 상대적으로 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 부위에서 발현된다.^{17,27)} 따라서 COX-2에 의한 prostaglandin의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨진다. RAW 264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)로 자극을 주고 비썬 추출물과 분획물을 처리하여 확인한 결과, hexane과 dichloromethane 분획물에서 강한 억제 효과를 보였다 (Fig. 2).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성에 미치는 영향 - Macrophage RAW 264.7 세포에서 염증성인자인 PGE₂ 억제 효과를 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과 PGE₂ 생성 억제는 dichloromethane 분획물에서 높은 억제 효과를 나타내었으며, 비썬의 dichloromethane 분획물이 LPS에 의해 발현되는 PGE₂ 억제에 영향을 준다는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 COX-2의 생성 억제가 PGE₂ 생성 억제를 통한 것으로 여겨진다.

결 론

비썬 추출물을 가지고 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색결과 EtOH extract과 ethylacetate, butanol 분

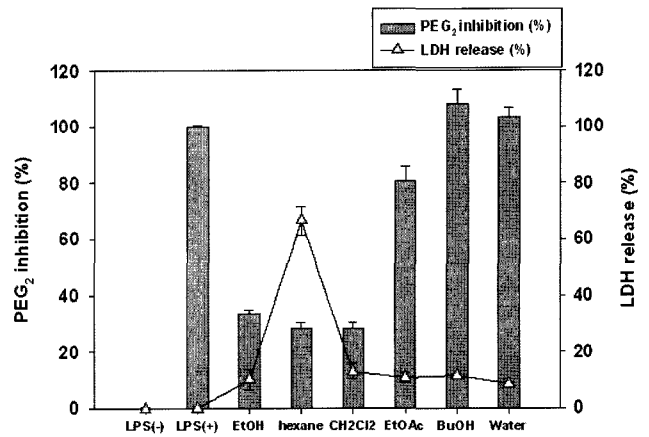


Fig. 3. Inhibitory effect of EtOH extract and solvent fractions of *A. scoparia* on the PGE₂ production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.5×10⁵ cells/ml) were stimulated by LPS (1 µg/ml) with EtOH extract and solvent fractions (50 µg/ml) from *A. scoparia* for 24 hr. Supernatants were then collected after 24 hr and PGE₂ concentration from supernatants was determined by ELISA method. The data represent the mean S.D. of three determinations.

획물에서 높은 radical 소거 활성을 나타냈으며, xanthine oxidase 억제효과는 dichloromethane과 ethylacetate 분획물에서, superoxide 소거 활성은 hexane, ethylacetate 및 butanol 분획물에서 각각 나타났다.

RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 비썬 추출물을 처리하여 확인해본 결과, hexane, dichloromethane 및 ethylacetate 분획물에서 NO와 iNOS 생성 억제 효과가 나타났으며, hexane과 dichloromethane 분획물에서 COX-2와 PGE₂ 생성 억제 효과가 나타났다. 하지만 hexane 분획물에서는 세포독성이 나타난 것으로 보아 세포독성에 의해 저해 활성이 나타난 것으로 추정된다.

본 실험 결과를 요약하면, 비썬 추출물과 분획물에서 높은 항산화 효과 및 NO, iNOS, COX-2 및 PGE₂의 생성 억제 효과가 나타났으며, 이러한 결과는 비썬에서 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다. 또한 비썬 추출물로부터 염증 억제 성분을 도출하고자 활성분획인 dichloromethane과 ethanol 분획물에 대하여 분리를 진행 중에 있다.

사 사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업 (RTI04-02-07) 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

1. 한국식품성분표 (1996) 90-91. 보건복지부 식품의약품 안전본부.
2. Tan, R. X., Zheng, W. F. and Tang, H. Q. (1998) Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.*, **64**: 295-302.
3. McCord, J. M. (1974) Free radicals and inflammation: protection of synorial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**: 529-531.
4. Willoughby, D. A. (1975) Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.*, **34**: 471-478.
5. McCord, J. M., Wong, K., Stokes, S. H., Petrone, W. F. and English, D. (1980) Superoxide and inflammation: A mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand Suppl.*, **492**: 25-30.
6. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**: 1-14.
7. Axtelle, T. and Pribble, J. (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin. Res.*, **7**: 310-314.
8. Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**: 617-620.
9. Mukaida, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S. and Kuno, K. (1996) Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, **59**: 145-151.
10. Lazarov, S., Balutsov, M. and Ianev, E. (2000) The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic(endotoxin) shock. *Vutr. Boles.*, **32**: 33-40.
11. Scott, M. G. and Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.*, **20**: 407-431.
12. Vane, J. A. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.*, **23**: 232-235.
13. Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.*, **5**: 2304-2312.
14. Weis, Z. A., Cicatiello, L. and Esumi, H. (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.
15. Ryu, J. H. Ahn, H. Kim, J. Y. and Kim, Y. K. (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res.*, **17**: 485-489.
16. Mu, M. M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yoshida, T. and Yokochi, T. (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res.*, **7**: 431-438.
17. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 3228-3232.
18. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12013-12017.
19. Kim, J. Y., Jung, K. S. and Jeong, H. G. (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Letters*, **569**: 321-326.
20. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**: 1198-1200.
21. Nishikimi, M., N.A. Roa, K. Yagi (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 849-854.
22. Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**: 4053-4057.
23. Cheng, Z. J., Kuo, S. C., Chan, S. C., Ko, F. N. and Teng, C. M. (1998) Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta*, **1392**: 291-299.
24. Korycka-Dahl, M., Richardson, T. and Hicks, C. (1979) Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk Serum, *J. Food Protection*, **42**: 867-871.
25. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.*, **160**: 1025-1032.
26. Tesuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A. H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K. and Kadota, S. (2001) Screening of chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *J. Ethnopharmacol.*, **77**: 209-217.
27. Hyun, E. A., Lee, H. J., Yoon, W. J., Park, S. Y., Kang, H. K., Kim, S. J. and Yoo, E. S. (2004) Inhibitory Effect of *Salvia officinalis* on the Inflammatory Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase in Murine Macrophage RAW 264.7. *YAKHAK HOEJI*, **48**: 159-164.

(2006년 8월 17일 접수)