

사간 물 추출물의 항염증 효과

박성주 · 김수곤^{1*}

원광대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 강원대학교병원 방사선종양학과

Anti-inflammatory Effects of Belamcanda Chinensis Water Extract

Sung Joo Park, Soo Kon Kim^{1*}

*Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Department of Radiation Oncology, Kangwon National University Hospital*

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of aqueous extract from *Belamcanda chinensis* (BC) on the RAW 264.7 cells. To evaluate the anti-inflammatory effects of BC, we examined the cytokine productions including nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1b, IL-6 and tumor necrosis factor-a (TNF-a) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells and also inhibitory mechanisms such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa B (NF-kB) using Western blot. BC inhibited LPS-induced production of NO, IL-6 and TNF-a but not of IL-1b in RAW 264.7 cells. BC respectively inhibited the activation of MAPKs such as c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38 but not of extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) and NF-kB in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Taken together, Our results showed that BC down-regulated LPS-induced NO, IL-6 and TNF-a productions mainly through JNK and p38 MAPK pathway.

Key words : belamcanda chinensis (BC), lipopolysaccharide (LPS), inflammation, cytokine

서 론

射干은 붓꽃과(Iridaceae)에 속한 다년생 초본인 범부채(*Belamcanda chinensis* Leman)의 根莖으로, 봄 또는 가을에 채취하여 건조하여 사용한다. 射干的 성질은 차고, 맛은 쓰다. 射干的 효능은 清熱解毒·消痰·利咽이 있다¹⁾. 射干的 성분으로는 belamcandin, iridin, tectoridin, tectorigenin이 많이 알려져 있으며, 여기서 tectoridin와 tectorigenin은 항암 작용과 항염 작용이 있음이 널리 알려져 있다^{2,3)}. 射干的 성분과 메탄올 추출물에 대한 보고는 있으나⁴⁾, 射干的 물 추출물이 대식세포에서 항염증 작용을 나타내는 지에 대해서는 정확히 알려지지 않았다. 이에 우리는 射干的 물 추출물의 항염증 작용과 그 기전을 조사하였다.

염증 반응은 병리학적 상태에서 중요한 역할을 한다⁵⁾. 염증 반응 중에서 대식세포는 외부 침입 물질에 대한 방어 기전을 신속하게 보내는 역할을 한다. 대식세포가 활성화 되면, 대식세포는 많은 염증성 인자들을 생산하는데, 그 인자들에는 tumor necrosis factor-a (TNF-a), interleukin (IL), leukotrienes, nitric

oxide (NO) 등이 있다^{6,7)}. 이러한 cytokine의 과잉생산은 류마티스성 관절염, 천식, 호흡기 질환, 폐혈증 등의 질환을 유발하는 중요한 인자가 된다⁸⁾. 그리하여, 염증 반응을 억제하는 것은 염증성 질환을 치료하는 데 큰 도움이 된다.

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다⁹⁾. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포에 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO를 생성하게 된다¹⁰⁻¹⁴⁾. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. NO의 발현과 염증성 cytokine의 생산은 주로 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 통해 일어난다¹⁵⁾. MAPKs의 구성은 주요하게 3개로 이루어져 있다; extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun NH₂-terminal kinase (JNK), p38이 그 구성 인자들이다¹⁶⁾. MAPKs의 활성화는 대식세포에서 NO의 생산과 전염증성 cytokine의 발현을 초래한다¹⁵⁾. 따라서, 항염증성 약물의 개발은 MAPKs의 활성을 억제하는 물질의 개발로도 그 의미를 확대할 수 있으며, 이는 염증성 인자들의 생산의 억제에 영향을 줄 수 있음을 보여준다.

Nuclear factor kappa B (NF-kB)는 선천성 면역반응에서 병

* 교신저자 : 김수곤, 강원 춘천시 효자3동 강원대학교병원 방사선종양학과

· E-mail : parksj08@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6450

· 접수 : 2010/05/25 · 수정 : 2010/06/03 · 채택 : 2010/06/04

원성 미생물을 인식하여 Toll like receptor (TLR)을 통하여 활성화 된다¹⁷⁾. 특히 TLR4의 ligand인 LPS는 그람 음성 박테리아의 외부세포막의 구성성분으로 대식세포를 활성화시키며, 또한 endotoxic shock의 원인물질로써 알려져 있다. 대식세포를 LPS로 자극하면 TNF- α , IL-1, IL-6등과 같은 사이토카인 및 NO의 발현을 증가시킨다. LPS가 혈액에 있을 경우 즉각적으로 LBP (lipopoly-saccharide binding protein)와 결합하고 다시 CD14와 복합체를 형성하는데 이렇게 형성된 LPS/LBP/CD14 복합체가 세포표면에 작용하여 MAPK (mitogen-activated protein kinase)의 활성화 및 NF- κ B의 활성화를 일으킨다¹⁸⁻²⁰⁾.

이에 射干 물 추출물이 LPS로 유도한 대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 검증하고자 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 cell에서 NO와 전염증성 사이토카인(IL-1b, IL-6, TNF- α)의 발현에 대한 실험을 하였고, MAPKs family인 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) 및 p38에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 NF- κ B의 활성 지표가 될 수 있는 inhibitory kappa B α (Ik-B α)를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 약재

실험에 사용한 射干는 옴니허브에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 射干로서 확인을 받은 후 사용하였다. 射干 추출물을 얻기 위하여 물 1 L에 射干 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다

2. 시약

Fetal bovine serum (FBS), RPMI-1640, penicillin-streptomycin등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 배양조는 Corning(Rochester, USA)사에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 chloroform, Tri-zol, sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bisacrylamide, LPS, Tris-HCl 등은 SIGMA(St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체인 anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-Ik-B α , anti-phospho-JNK는 Cell signaling사에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

3. MTT 분석

RAW 264.7 cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT분석법으로 측정했다. 간단히 설명하면 지수 성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 射干을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함

으로서 결정했다.

4. NO 농도의 측정

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griess reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포들은 RPMI-1640배지에서 2×10^5 의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 射干을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 상층액 따서 96-well plate에 loading하였다. 100 μ l의 그리스 시약을 첨가하고, 그 혼합물을 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 스펙트로포토미터 (MD, U.S.A)로 540 nm에서 측정하였다. 일산화질소의 농도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

5. Cytokine (TNF- α , IL-1b, IL-6) 측정

LPS (500 ng/ml)로 RAW 264.7 cell을 자극하기 전 射干 추출물을 1시간동안 전 처리 하였다. Pro-inflammatory cytokine의 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS (500 ng/ml)로 자극한 후 24시간 뒤 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 ELISA법으로 정량하였다. ELISA는 BD pharmingen(USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-1beta, IL-6, TNF-alpha를 구입하여 시행하였다.

6. RNA 추출 및 Real-time RT-PCR

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 射干을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위의 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 μ l의 chloroform 용액을 가하고 두 세 번 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다. 추출한 RNA는 reverse transcriptase PCR의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 간단히 기술하자면 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg)에 0.5 mg의 oligo-(dT)을 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200Unit reverse transcriptase을 첨가하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 그 후에 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 30cycle 반복하였다. Forward (f)와 reverse (r) primer 및 TaqMan probe는 Applied Biosystems에서

합성하였다.

7. Western blot analysis

RAW 264.7 cell을 60 mm culture dish에 5×10^6 cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media (RPMI 1640)로 12시간 starvation 시킨 후 射干 (500 mg/ml)를 전처리 하고 1시간 뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 농도별로 cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리 (5,000 rpm, 5 min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer (lysis buffer 1 ml + phosphatase inhibitor $10 \mu\text{l}$ + protease inhibitor $10 \mu\text{l}$)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 5% skim milk로 2 시간 blocking 하였다. ERK, p38, JNK의 phosphorylation과 I κ -Ba을 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

8. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.D. 로 나타내었으며, 실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 射干 물 추출물의 RAW 264.7 cell에 대한 독성

射干的 세포독성에 관해 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에 射干를 농도 의존적으로 처리하여 24 시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 射干는 RAW 264.7 cell에 독성을 나타내지 않았다.

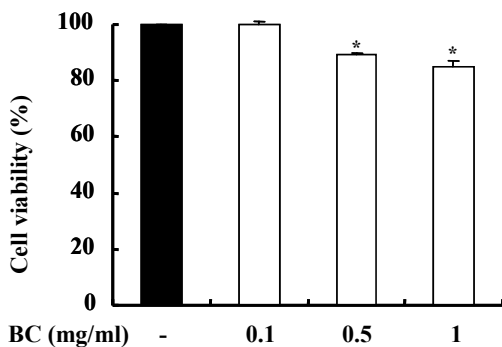


Fig. 1. Effect of BC on cytotoxicity in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with BC as indicated dose. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiment. *P < 0.05 : significant as compared to saline. The similar results were obtained from three additional experiments.

2. 射干 물 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

射干 물 추출물에서의 항염효과에 대해서 조사하기 위하여 먼저 射干가 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 射干를 다양한 농도로 전 처리하고 LPS로

자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정 한 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 射干 추출물을 전 처리한 군에서 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2).

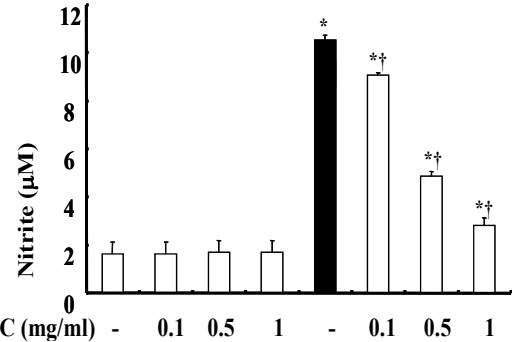


Fig. 2. The inhibitory effects of BC on LPS-induced NO production. The cells were treated with BC water extract as indicated concentration for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. NO release was measured by the method of Griess. *P < 0.05 : significant as compared to saline, †P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. 射干 물 추출물이 IL-1b, IL-6, TNF-a 발현에 대한 영향

RAW 264.7 cell에서 전염증성 인자들의 발현에 射干 물 추출물의 효과를 조사하기 위하여, 射干를 전 처리한 후 LPS로 자극하여 ELISA 방법으로 IL-1b, IL-6, TNF-a를 측정하였다. 전염증성 인자들의 발현을 조사한 결과 射干 물 추출물이 IL-1 beta의 생성은 억제하지 못하였으나, IL-6 와 TNF-a의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

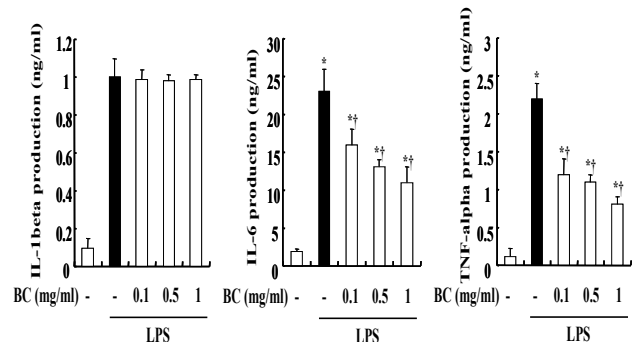


Fig. 3. Effect of BC on the productions of IL-1b, IL-6 and TNF-a in RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated BC as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, **P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. 射干 물 추출물의 IL-1b, IL-6, TNF-a mRNA 발현에 대한 영향

射干 물 추출물이 RAW 264.7 cell에서 전염증성 세포 활성 물질들 단백질 수준에서 억제하였음에 착안하여(Fig. 3), mRNA 수준에서도 전염증성 인자들을 억제함을 알아보기 위해 射干 물 추출물을 전 처리한 후 LPS로 자극하여 IL-1b, IL-6, TNF-a의 mRNA를 측정 한 결과, IL-6 와 TNF-a mRNA 발현은 현저히 억제하였으나, IL-1b mRNA 발현은 억제하지 못했다(Fig. 4).

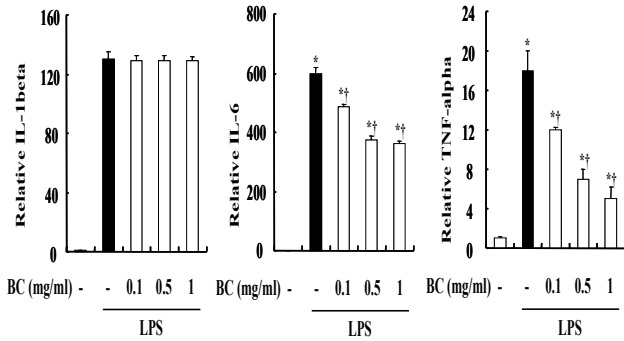


Fig. 4. Effect of BC on the mRNA expression of IL-1b, IL-6 and TNF- α . The cells were pre-treated BC water extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 500 ng/ml LPS for 24 h. Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

5. 射干 물 추출물에 의한 MAPKs의 발현억제 효과

MAPKs는 세포활성물질의 생성 조절 및 다양한 생물학적 기능을 조절한다¹⁹). LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell에서는 ERK, JNK, p38 의 활성이 증가하지만, 射干를 전 처리 했을 경우 JNK와 p38의 활성이 억제되었다(Fig. 5).

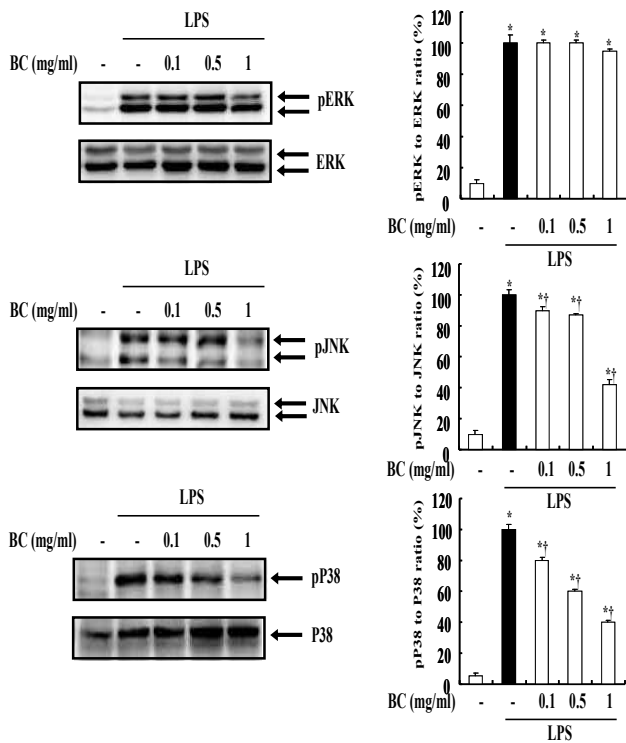


Fig. 5. Effects of BC on the activation of MAP kinase on LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with BC aqueous extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for 15 min. Right panels mean the density of left panel (western blot). Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

6. 射干 물 추출물에 의한 NF-kB의 활성억제 효과

LPS는 NF-kB를 활성화 시켜서 각종 염증성 cytokine을 분

비한다¹⁷). 또한 NF-kB의 활성은 inhibitory kappa B alpha (Ik-B α)의 분해에 의존하게 된다¹⁷). Fig. 6에서 나타난 바와 같이 射干 물 추출물이 LPS에 의한 Ik-B α 의 분해를 억제하지 못했다. 즉 射干 물 추출물이 NF-kB의 활성을 억제하지 못하고 있다는 것을 보여준다.

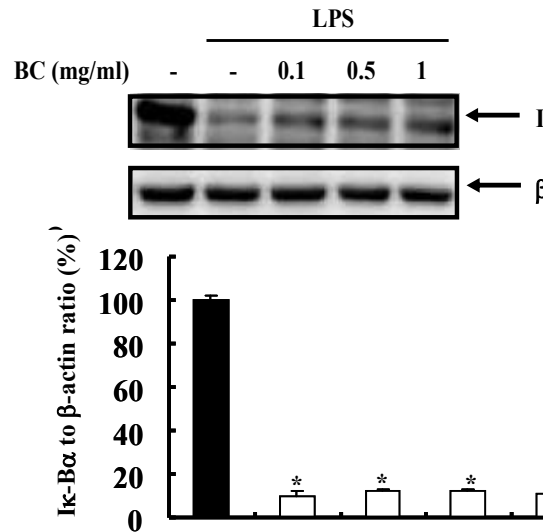


Fig. 6. Effects of BC on the activation of NF-kB on LPS-stimulated of RAW 264.7 cells. The cells were pre-treated with BC aqueous extract as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with 500 ng/ml of LPS for 15 min. Lower panel means the density of upper panel (western blot). Detail methods were described Materials and Methods. *P < 0.05 : significant as compared to saline, † P < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

고 찰

현재 많은 항염증 약물이 많이 발견되었지만, 그 약효는 한정 되어있고, 이제 그 약물조차도 내성과 독성으로 인해 대안이 필요한 것이 현실이다. 그 대안으로 떠오르는 것이 천연물 신약이며, 이에 이 논문에서는 射干 물 추출물을 이용하여, 항염증 작용을 알아보았다. 射干는 한국과 일본 등지의 동남아시아에서 자라며, 중국에서는 다양한 염증질환을 치료하는 데 이용되고 있다^{21,22}). 특히 射干的 작용은 항산화 작용과, 퇴행성 질환 억제 작용이 뛰어난 것으로 보고되어있다^{2,3}). 성분에 대한 조사는 많이 이루어지지 않았지만, tectoridin와 tectorigenin와 같은 성분은 항암 작용과 에스트로겐 촉진 작용에 대해 조사가 이루어져 있다^{23,24}). 하지만 이러한 射干的 작용은 메탄올 추출물에 한정되어 있다. 일반적으로 추출 용매에 따라 그 추출성분이 달라지는데, 메탄올은 유기용매로서 일반적으로 무극성으로 타나내어 무극성 분자를 가진 성분이 주로 추출되게 된다. 하지만 물을 용매로 사용하였을 때는 극성 분자를 가진 성분이 주로 추출 되게 된다. 이는 물 추출과 메탄올 추출의 유효성분이 다를 수 있음을 보여준다. 이에 이 논문에서는 射干的 물 추출물을 이용해 그 유효한 성분의 작용과 효과를 밝혀냈다.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 L-arginine이 변성되어 생성되는 NO는 염증성 매개체로서 대식세포의 증양,

박테리아 파괴 능력과 같은 면역반응에 중요한 역할을 한다¹⁹. 또한 장기 기능에 미치는 LPS의 유독한 작용의 원인은 NO이다¹⁹. iNOS에 의한 NO의 지나친 생산은 폐혈증과 류머티즘과 같은 면역질환을 야기할 수 있다²⁵. 射干 물 추출물은 NO를 유의적으로 억제하여 염증 반응을 억제하였음을 보여준다(Fig. 2).

이 논문에서는 또한 射干 물 추출물이 cytokine 생성에도 영향을 주는지 알아보았다. 기존의 보고와 같이, LPS는 TNF-a, IL-1b, IL-6와 같은 전염증성 cytokine의 생성을 유도하였다⁶. 이러한 전염증성 인자들은 면역세포를 활성화시켜서 세균의 침입을 효과적으로 방어하도록 도와준다. 특히 이들 중에서 TNF-a와 IL-6는 염증성 질환 등에서도 주요한 작용을 하며, 실제로 폐혈증과 같은 염증성 질환이 일어났을 때, 신체 내에서 고농도로 발현이 되고, 이는 장기로 유입되어서 장기 손상과 부전을 일으킨다고 보고되어있다^{26,27}. 이 연구에서는 射干 물 추출물이 LPS로 유도한 TNF-a와 IL-6의 생성을 억제하였음을 보여줬다. 이러한 결과로 보아 射干 물 추출물의 유효한 성분이 항염증 작용을 가지고 있음을 보여준다(Fig. 3 & 4).

LPS는 MAPKs와 NF-kB를 활성화시켜서 NO 및 전염증성 cytokine을 생성한다²⁸⁻³¹. ERK 1/2, JNK, p38의 활성화는 ERK 1/2, JNK, p38의 인산화에 의해서 나타난다. IKK의 활성화는 NF-kB Rel A와 Iκ-Ba의 인산화와 유비퀴티네이션과 프로테오솜 분해를 촉진하며, NF-kB 조합체는 핵으로 전사되어, NF-kB의 서브 유닛인 RelA와 kB 의존적인 유전자 발현을 활성화 한다^{32,33}. 그리하여 NF-kB 활성화는 Iκ-Ba의 감소를 통해 알아낼 수 있다. 射干 물 추출물이 JNK와 p38 인산화를 억제하였으나, ERK 1/2의 인산화와 Iκ-Ba의 분해를 억제 하지 못하였다.

이러한 실험 결과들은 射干 물 추출물이 대식세포에서 JNK와 p38의 인산화를 저해하여서 IL-6, TNF-a와 NO의 생산을 억제하였다고 생각된다. 射干 물 추출물의 이와 같은 작용은 친식, 류마티스 관절염 같은 자가 면역 질환과 소화 질환 염증, 예를 들어 췌장염, 지방간, 대장염 등과 염증에 효과적일 것이라고 생각되어진다. 위와 같은 射干 물 추출물의 효능을 이용하여, 추가적인 마우스나 랫트에서 in vivo 실험이 이루어져야 할 것이다.

결 론

마우스 대식 세포 주인 RAW 264.7 cell을 LPS로 자극하였을 때 射干 물 추출물의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

射干 물 추출물은 세포독성이 거의 나타나지 않았으며 농도 의존적으로 NO 생산을 억제하였고, IL-6와 TNF-a의 생성을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 억제하였다. 射干 물 추출물은 JNK, p38의 활성을 억제하였으나, ERK와 NF-kB 활성을 억제하지 못했다.

이와 같은 결과로 보아 射干 물 추출물은 대식세포에서 염증을 발생 하였을 때, NO 및 IL-6, TNF-a의 발현을 억제하고, 이는 JNK, p38 MAPKs의 활성을 억제함을 통해 일어남을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아 射干 물 추출물에서도 유효한 성분

이 작용하여 항염증 작용을 보여줄 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 한국보건진흥원(B08-0013-0902-0000300)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, p 489, 2002.
2. Pan, C.H., Kim, E.S., Jung, S.H., Nho, C.W., Lee, J.K. Tectorigenin Inhibits IFN- γ /LPS-induced Inflammatory Responses in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. Arch Pharm Res, 31: 1447-1456, 2008.
3. Thelen, P., Scharf, J.G., Burfeind, P., Hemmerlein, B., Wuttke, W., Spengler, B., Christoffel, V., Ringert, R.H., Wuttke, D.S. Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer. Carcinogenesis, 26: 1360-1367, 2005.
4. Woeniaka, D., Oszmia-skib, J., Matkowski, A. Antimutagenic and antioxidant activity of the extract from *Belamcanda chinensis* (L.) DC, Acta Poloniae Pharmaceutica, 63: 213-218, 2006.
5. Kundu, J.K., Surh, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer, Mutat Res 659: 15-30, 2008.
6. Guha, M., Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cellular Signal, 13: 85-94, 2001.
7. Kubes, P., Mccafferty, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. American J Medicine, 109: 150-158, 2000.
8. Lin, W.W., Karin, A. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest, 117: 1175-1183, 2007.
9. Nathan, C., Xie, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem, 269: 13725-13728, 1994.
10. Kwqamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., Terasawa, K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. Am J Chin Med 28: 217-226, 2000.
11. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur J Pharmacol 406: 301-309, 2000.
12. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages

- stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol* 35: 21-28, 2000.
13. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 69: 625-635, 2001.
 14. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin, M.K., Chai, K.Y., Chung, H.T. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 76: 119-123, 2001.
 15. Chan, E.D., Riches, D.W. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 mapk in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C441-C450, 2001.
 16. Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*, 25: 7-9, 2000.
 17. Celec, P. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother*, 58: 365-371, 2004.
 18. Zhao, Q., Shepherd, E.G., Manson, M.E., Nelin, L.D., Sorokin, A., Liu, Y. The role of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem*, 280: 8101-8108, 2005.
 19. Ajizian, S.J., English, B.K., Meals, E.A. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis*, 179: 939-944, 1999.
 20. Dong, Z., O'Brian, C.A., Fidler, I.J. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. *J Leukoc Biol*, 53: 53-60, 1993.
 21. Zhu, Y.P. *Chinese Materia Medica*. Amsterdam Harewood Academic Publisher, pp 127-135, 1998.
 22. Shin, K.H., Kim, Y.P., Lim, S.S., Lee, S., Ryu, N., Yamada, M., Ohuchi, K. Inhibition of prostaglandin E2 production by the isoflavones tectorigenin and tectoridin isolated from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. *Planta Med*, 65: 776-777, 1999.
 23. Wang, Q.L., Lin, M., Li, G.T. Antioxidative activity of natural isorhapontigenin. *Jpn J Pharmacol* 87: 61-66, 2001.
 24. Jung, S.H., Lee, Y.S., Lee, S., Lim, S.S., Kim, Y.S., Ohuchi, K., Shin, K.H. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. *Planta Med* 69: 617-622, 2003.
 25. Bryan, N.S. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems based review. *Free Radic Biol Med*, 41: 691-701, 2006.
 26. Tracey, K.J., Cerami, A. Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Reviews of Medicine*, pp 45, 491-503, 1994.
 27. Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolper, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, J.J., Zentella, A., Albert, J.D. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, pp 232, 977-980, 1986.
 28. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 211-218, 1999.
 29. Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H., Kim, K.H. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *lab Invest*, 84: 49-62, 2004.
 30. Lee, A.K., Sung, S.H., Kim, Y.C., Kim, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase. TNF- α and COX-2 expression by suchinone effects on I- κ B α phosphorylation. C/EBP and AP-1 activation. *British J Pharmacol*, 139: 11-20, 2003.
 31. Meng, F., Lowell, C.A. Lipopolysaccharide(LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinase Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med*, 185(9):1661, 1997.
 32. Kao, S.J., Lei, H.C., Kuo, C.T., Chang, M.S., Chen, B.C., Chang, Y.C. Lipoteichoic acid induce nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology*, 115: 366-374, 2005.
 33. Meyer, C.F., Wang, X., Chang, C., Templeton, D., Tan, T.H. Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase 1 signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation. *J Biol Chem*, 271: 8971-9876, 1996.