

LPS로 유도된 마우스 복강 대식세포에서 차가버섯 열수 추출물의 염증 억제 효과

고속경^{1,2} · 표명윤^{1*}

¹숙명여자대학교 약학대학, ²서울시보건환경연구원

Anti-inflammatory Effect of *Inonotus obliquus* Extracts in Lipopolysaccharide-induced Mouse Peritoneal Macrophage

Suk-kyung Ko^{1,2} and Myoung-yun Pyo^{1*}

¹College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

²Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon-si, 427-070, Korea

Abstract – Macrophages play a vital role in the innate immune system involving defensive cytokines such as TNF (tumor necrosis factor)- α and nitric oxide (NO). Therefore, we try to elucidate the anti-inflammatory activity of Chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*, IO) in murine macrophages. Raw 264.7 cells and peritoneal macrophages of mice were cultured with or without LPS/LPS + IFN- γ in the presence of IO aqueous extracts (IOE 0.2, 2, 20, 100 μ g/mL) for 24 hr and 48 hr, respectively. Exposure of IOE caused the decrease of NO production and increase of TNF- α production in dose-dependent manner in activated peritoneal macrophage *in vitro*. To further investigate anti-inflammatory effects of IO *ex vivo*, we orally administrated capsaicin (PC, 3 mg/kg/day) and IOE (100, 200, 400 mg/kg/day) for 4 consecutive days to C57BL/6 mice (7~9 weeks old, female), then observed the NO secretion and cytokine (TNF- α) production of LPS/LPS + IFN- γ -stimulated peritoneal macrophages. IOE inhibits NO secretion in dose-dependent manner both *ex vivo* and *in vitro* and increases the production of TNF- α *in vitro*. In addition, we found that IOE possessed suppressive effects of LPS-stimulated TNF- α , IL-1 β , COX-2, as well as iNOS expressions in Raw 264.7 cells. These findings indicate that IOE suppress not only the LPS-induced NO overproduction of murine peritoneal macrophages, but also iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-1 β overexpression of LPS-induced Raw 264.7 cells. Consequently, our results suggest that IO may have the anti-inflammatory effects via suppression of the inflammatory cytokines and mediators, and be useful for the treatment of inflammatory diseases.

Key words – *Inonotus obliquus*, Anti-inflammatory, Macrophages, NO, TNF- α , iNOS, COX-2, IL-1 β

대식세포는 다양한 염증반응, 면역, 숙주 방어와 조직회복에 중요한 역할을 한다. 그러나 LPS나 IFN- γ 에 의해 자극되면 염증유발 사이토카인, 케모카인, NO, 프로테아제를 분비하고 아포토시스를 유발한다. 또한 대식세포는 아포틱 세포를 식세포 작용으로 제거하고 상처를 치유하고 회복하는 항염증 매개물질과 성장인자를 분비하기도 한다. 이처럼 대식세포는 그들의 활성 정도에 따라 염증을 유발하기도 하고 경감하기도 하는 양면성을 가지고 있다. 이런 두 가지의 성질의 적절한 균형이 치유와 회복에 필요하다. 그러나 대식세포의 활성화가 지속적으로 과도하게 일어나면 비정상인 세포 사멸, 중년 여성에서 호발하는 류마티스 관절염, 신

사구체염, 죽상 동맥경화증, 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키기도 한다.¹⁻⁴⁾ 따라서 대식세포가 관여하는 염증반응을 어떻게 얼마나 조절하는가가 이런 염증성 질환의 새로운 치료적 접근방법으로 제시되고 있다.

심혈관 질환 및 암, 당내성과 같은 만성질환에 걸릴 위험성은 전신적 염증반응과 관련 있다는 증거가 많아지고 있다.⁵⁻⁹⁾ 작용기전은 대식세포와 T 림프구의 활성뿐만 아니라 염증작용을 증폭하는 염증 유발 사이토카인의 분비와 관련 있다. 염증은 염증 유발 매개물질인 TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-18, NO와 CAM (cell adhesion molecules)들에 의해 매개되고, 또한 이런 매개물질들은 선천성 면역반응을 도와준다. 이런 매개물질들 중 NO는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 역할을 하지만, 병리적 원인에 의해 과도

*교신저자 (E-mail): mypyo@sookmyung.ac.kr
(Tel): +82-2-710-9573

하게 생성, 분비되면 염증을 유발시키게 되며, 조직 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으키는 것으로 알려졌다.¹⁰⁻¹¹⁾ 이처럼 분비되는 양에 따라 세포 기능 유지에 중요한 역할을 하기도 하고, 세포독성을 일으키기도 한다. NO의 합성 효소는 eNOS, nNOS, iNOS가 있는데 이중 iNOS는 칼슘의 농도에 상관없이 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 와 같은 염증성 자극에 의해 유도되는 것으로 알려졌으며 특히 LPS처리시 다량 생성되는 것으로 알려졌다. TNF- α 는 염증과 면역반응의 중요한 매개물질이며, 다양한 세포의 성장과 분화를 조절하는 것으로 알려졌다. 또한 세포에 독성을 일으키고, 혈관 형성, 골 흡수, 혈전 생성을 촉진하고 lipogenetic 대사를 억제하는 것으로 알려졌다.¹²⁾ 이러한 TNF- α 를 포함한 매개물질인 사이토카인 IL-6와 IL-1 β 는 NF- κ B를 통해 활성화되고 또한 NF- κ B를 활성화시켜서 cytokine cascade를 증폭하고 염증상태를 확장한다.¹³⁾ 이처럼 사이토카인은 염증과정에 주도적인 역할을 하기 때문에 효과적으로 이들의 비정상적인 생성을 조절하는 것이 염증성 질환을 치료 방법으로 제시되고 있다. COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 대식세포, 단핵구, 혈관내피세포, 연골세포, 조골세포, 활막세포 등에서 분비된다. 이러한 COX-2에 의해 아라키돈산으로부터 PGE₂가 합성되고 조직손상부위에서 합성된 PGE₂는 통증유발에 관여한다.¹⁴⁾ 따라서 항염증제의 식이성분의 응용을 통해 염증과 관련된 만성질환의 예방 및 치료에 최근 관심이 집중되고 있다.¹⁵⁻²⁰⁾

차가버섯의 연구는 대부분 러시아를 중심으로 진행되었으며, 러시아 서부 캅차카반도 및 시베리아 지역에서 전통적으로 위장암, 심혈관계 질환, 결핵 등을 치료하는 민간약으로 사용되었다. 숙주나무가 완전히 죽은 후에 나타나는 자실체는 전통적으로 시베리아, 캐나다, 스칸디나비아, 미국, 러시아에서 다양한 암을 치료하는데 사용해왔는데, 현대에는 러시아에서 암 치료 약초로 공인되고 있다. 추출물이 다양한 암세포에 대한 직접 독성을 나타낸다고 보고 되어 있으나 그 성분은 밝혀져 있지 않다. 차가버섯의 폴리사카라이드 성분이 면역 체계를 활성화하여 간접적으로 항암작용을 나타낸다는 보고가 있다.²¹⁾ 기타 작용으로는 혈당강화작용,²²⁻²³⁾ 항산화작용,²⁴⁻²⁵⁾ 및 항염증작용²⁶⁻²⁷⁾에 관한 연구가 보고 되었다.

기존의 연구들이 차가버섯 추출물의 항산화작용은 SOD의 항산화능 측정 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 통해 이루어졌다.^{25, 28-29)} 본 연구자는 LPS 또는 IFN- γ 로 자극된 마우스의 대식세포를 타겟 세포로 하여 차가버섯 추출물 (IOE)을 가하여 염증 유발 매개물질의 변화를 관찰하고 이들의 mRNA의 발현 정도를 살펴 차가버섯의 항염증작용을 세포분자적 수준에서 이해함으로써 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 기능성 소재 개발로의 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

정상마우스의 복강 대식세포와 Raw 264.7 세포주 - 정상 마우스 복강 내의 세포액 중 적혈구를 용혈 시키고, 원심 분리한 후 세포액 내의 복강대식세포를 2 mM glutamine, 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin을 함유한 10% FBS-DMEM에 부유시켜 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.

Raw 264.7 세포주는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며 2 mM glutamine, 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin을 함유한 10% FBS-DMEM을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.

Cell viability와 proliferation - 정상 마우스의 복강대식세포와 Raw 264.7 세포의 약물에 대한 cell viability는 trypan blue를 사용한 exclusion assay로 측정하고, cell proliferation은 MTT assay³⁰⁾로 측정한다. 세포를 96 well plate에 분주한 뒤 약물을 일정시간 동안 처리한 후에, 100 μ l의 MTT reagent를 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하여 crystal violet을 형성하게 한다. 배양이 끝난 후에 100 μ l의 DMSO를 넣고 37°C에서 30분간 배양하여 formazan을 용해시킨 뒤 ELISA Microplate Reader를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

Nitrite quantification - Nitric oxide (NO)는 Griess 시약 (0.2% naphthylethylenediamine 수용액 (A액)과 2% sulfanilamide의 인산 용액 (B액)을 사용 직전에 동량 혼합하여 제조)을 사용하여 NO의 안정된 산화물인 nitrite (NO₂)량으로 측정한다.³¹⁾ 표준물질인 NaNO₂의 최종농도가 각각 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 nmol/ml되도록 10% FBS-DMEM배지에 희석시킨 후 96 well plate에 가하고 검체 (세포배양 상등액)도 각각 100 μ l 가한 후 Griess 시약 100 μ l 반응시키고 10분 후 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였고 세포배양액 중의 NO는 검량선을 이용하여 세포액 ml 당 NO₂ nmol로 계산하였다.

Cytokine assay - 정상 마우스의 복강대식세포 (4 \times 10⁶ cells/ml) 또는 Raw 264.7 세포 배양액 (2 \times 10⁵ cells/ml)을 48 well plate에 250 μ l/well를 가하고 4시간 또는 overnight (37°C, 5% CO₂)한 차가버섯 추출물 (IOE)을 가하고 LPS 또는 LPS와 IFN- γ 를 가하여 배양하고 48시간, 또는 24시간 후에 취한 세포배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액 중의 사이토카인 (TNF- α)은 시중에서 구입한 sandwich ELISA kit (BD PharMingen)를 이용하여 그 농도를 측정한다.

RT-PCR - 차가버섯 추출물 (IOE)이 정상 마우스의 복강대식세포와 Raw 264.7 세포에서 염증유발 사이토카인과 매개물질의 mRNA발현 정도에 미치는 영향을 측정하기 위하여 세포에서 total RNA를 분리하고 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 만들고 primer (Table I)와 반응시켜 세

Table I. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence	Product size (bp)
COX-2	Sense	5'-CATG AC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'	696
	Antisense	5'-CTC CTG CTT GAG TAT -3'	
iNOS	Sense	5'-TGG TGG TGA CAA GCA CAT TT-3'	229
	Antisense	5'-CTG AGT TCG TCC CCT TCT CTC C-3'	
TNF- α	Sense	5'-CTC CCA GGT TCT CTT CAA GG-3'	195
	Antisense	5'-TGG AAG ACT CCT CCC AGG TA-3'	
IL-1 β	Sense	5'-AAG CTC TCA CCT CAA TGG A-3'	302
	Antisense	5'-TGC TTG AGA GGT GCT GAT GT-3'	
β -actin	Sense	5'-ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG-3'	285
	Antisense	5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3'	

포가 발현한 사이토카인의 mRNA의 양을 gel running 통해 확인한다.

통계처리 - 본 실험에서 얻은 실험결과는 mean \pm S.D. 값으로 표시하였고, 실험군간의 데이터는 student's t-test로 분석하여 유의성을 검정하였고 p값이 0.05 이하인 것만을 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

차가버섯 추출물이 생쥐의 복강 대식세포와 Raw 264.7 세포 생존률에 미치는 영향 - 차가버섯 추출물 (IOE)을 다양한 농도로 Raw 264.7 세포와 생쥐의 복강 대식세포에 24시간, 48시간 처리하고 MTT assay를 실시해 세포 생존률을 살펴보았다. 무처리군을 대조군으로 하여 100%로 나타냈을 때, 차가버섯 추출물 (IOE) 2~100 μ g/ml 농도 사이에서 세포 생존률에 큰 영향을 미치지 않았다 (Table II).

Table II. Effects of IOE on cell viability in Raw 264.7 cells and mouse peritoneal macrophages

Concentration (μ g/ml)	Cell Viability (%)	
	Raw 264.7	Peritoneal Macrophages
0	100.00 \pm 4.49	100.00 \pm 10.62
2	107.18 \pm 6.09	110.93 \pm 14.41
5	99.98 \pm 4.32	100.72 \pm 4.61
10	97.03 \pm 1.36	97.92 \pm 7.55
20	92.19 \pm 2.28	94.16 \pm 20.02
50	99.25 \pm 6.06	96.79 \pm 11.80
100	101.57 \pm 4.75	103.30 \pm 17.80

The cells were treated with various concentrations of IOE for 24/48 hours respectively. Cell viability was measured by MTT assay.

차가버섯 추출물이 LPS로 유도된 Nitric oxide (NO)와 TNF- α 의 생성에 미치는 영향 - 차가버섯 추출물 (IOE)이 Raw 264.7 세포와 마우스의 복강에서 분리한 마크로파아지에서 LPS의 유도에 의한 NO와 TNF- α 생성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여, Raw 264.7 세포 (1×10^6 cells/ml)와 복강내 마크로파아지 (4×10^6 cells/ml)에 25 μ M capsaicin, 차가버섯 추출물 (IOE) 100 μ g/ml 이하의 농도로 1시간 동안 전처리 한 다음, LPS (1 μ g/ml) 또는 LPS (1 μ g/ml) + IFN- γ (1 ng/ml)를 처리하여 24시간, 48시간 각각 배양하였다. Raw 264.7 세포를 이용한 실험에서 정상 세포에 비해 LPS (1 μ g/ml) 또는 LPS (1 μ g/ml)와 IFN- γ (1 ng/ml)만 처리한 대조군에 NO 생성량이 각각 2.7배, 8.0배 증가하였다. 따라서 LPS 또는 LPS 와 IFN- γ 를 함께 가함으로써 대식세포의 반응을 증가시켰음을 확인할 수 있었다.³²⁾ 그람 음성 세균의 세포 외막 성분인 LPS는 대식세포에서 면역기능을 조절하는 여러 인자 즉, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 및 아라키돈산의 대사산물을 분비하도록 세포를 자극하여 염증반응을 유발하는 물질로 항염증 효과를 연구할 때 많이 사용된다.^{15-20, 26, 33)} 차가버섯 추출물 (IOE) 처리군에서 농도의존적으로 NO생성이 억제 되었으며 양성 대조군으로 사용한 25 μ M capsaicin³³⁾와 비교했을 때, 차가버섯 추출물 (IOE) 처리군 100 μ g/ml의 NO생성을 40% 정도 감소시켰으므로 차가버섯의 NO생성 억제효과가 큰 것으로 알 수 있었다. 특히 차가버섯 추출물 (IOE)과 LPS와 IFN- γ 를 동시에 처리한 실험군에서 NO생성 억제효과를 확실하게 볼 수 있었는데 20, 100 μ g/ml 처리군에서 NO생성량이 약 30%, 75% 감소함을 알 수 있었다. 다음은 정상마우스의 복강 대식세포를 가지고 한 실험에서 역시 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 LPS (1 μ g/ml) 또는 LPS (1 μ g/ml) 와 IFN- γ (1 ng/ml)만 처리한 대조군에 NO생성량이 각각 6.6배, 8.5 배 증가 함을 확인하였다. 특히 LPS 로 유도된 NO생성을 차가버섯 추출물 (IOE) 처리로 60% 정도까지 억제함을 알 수 있었고 LPS와 IFN- γ 로 유도된 NO생성 역시 차가버섯

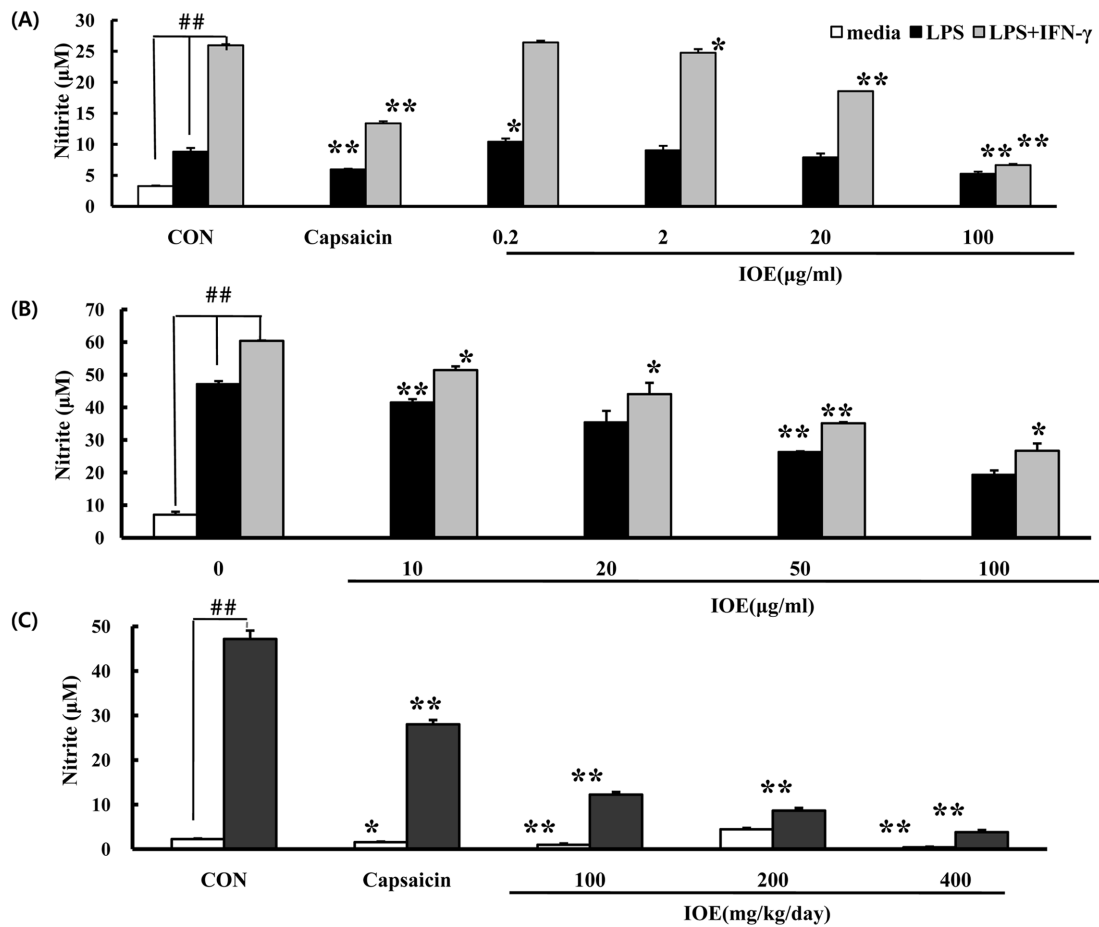


Fig. 1. Suppressive effects of IOE on NO production

Raw264.7 cells (A) and mouse peritoneal macrophages (B) were pre-treated with various concentrations of IOE, 25 µM of capsaicin, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) or LPS + IFN-γ (1 ng/ml) for 24 (A) and 48 (B) hours respectively. (C) showed NO production of IOE-administered mice peritoneal macrophages *ex vivo*. Mice were administered with various concentrations of IOE, 3 mg/kg/day of capsaicin. Cells were collected and stimulated with LPS (1 µg/ml)/ LPS + IFN-γ (1 ng/ml) for 48 hours. Values are expressed as mean ± S.D. of the values from independent experiments (##: $p < 0.05$ VS. negative control, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ VS. LPS- or LPS + IFN-γ-treated control).

추출물 (IOE) 처리로 약 56% 감소한 것을 볼 수 있었다. 이상의 *in vitro* 실험을 통해 차가버섯 추출물 (IOE)이 대식세포에 작용해 NO생성을 효과적으로 억제 할 수 있을 것으로 생각된다. 이는 차가버섯 메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 NO생성을 억제한다는 보고²⁷⁾와 일치한 결과이다. 또한 마우스에 3 mg/kg capsaicin, IOE 100, 200, 400 mg/kg을 4일 동안 각각 연속적으로 경구 투여한 후 복강 세포를 분리하여 NO생성능을 살펴본 결과, LPS로 유도된 NO 생성이 capsaicin 투여군에서 유의적으로 41% 정도 감소하였다. 또한 차가버섯 추출물 (IOE) 100, 200, 400 mg/kg 처리군에서 용량의존적으로 유의적으로 NO 생성이 각각 약 74%, 81%, 92% 감소하였다 (Fig. 1). 이러한 연구결과에서 차가버섯의 항염증작용을 예측할 수 있었다. 또한 Raw 264.7세포에서 LPS (1 µg/ml) 또는 LPS (1 µg/

ml) + IFN-γ (1 ng/ml)로 활성화된 TNF-α 생성에 capsaicin이나 차가버섯 추출물 (IOE) 처리가 그다지 영향을 미치지 못하였다. 오히려 100 µg/ml 처리군에서 136% 증가하였다. 마우스 복강내 마크로파지의 경우는 100 µg/ml 차가버섯 추출물 (IOE) 처리군에서 TNF-α 생성이 130% 증가하였다. *Ex vivo* 실험에서는 100 mg/kg 투여군에서는 그다지 영향이 없었으나 200, 400 mg/kg 투여군에서 각각 40%, 110% 증가하였다 (Fig. 2).

차가버섯 추출물이 LPS로 유도된 염증관련 매개물질과 사이토카인 발현에 미치는 영향 - Raw 264.7 세포에 차가버섯 추출물 (IOE)을 처리하여 LPS로 유도된 염증관련 매개물질과 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RT-PCR을 실시하였다. 염증 발현에 중요한 매개물질인 iNOS의 발현 정도는 농도 의존적으로 감소하였다. COX-2

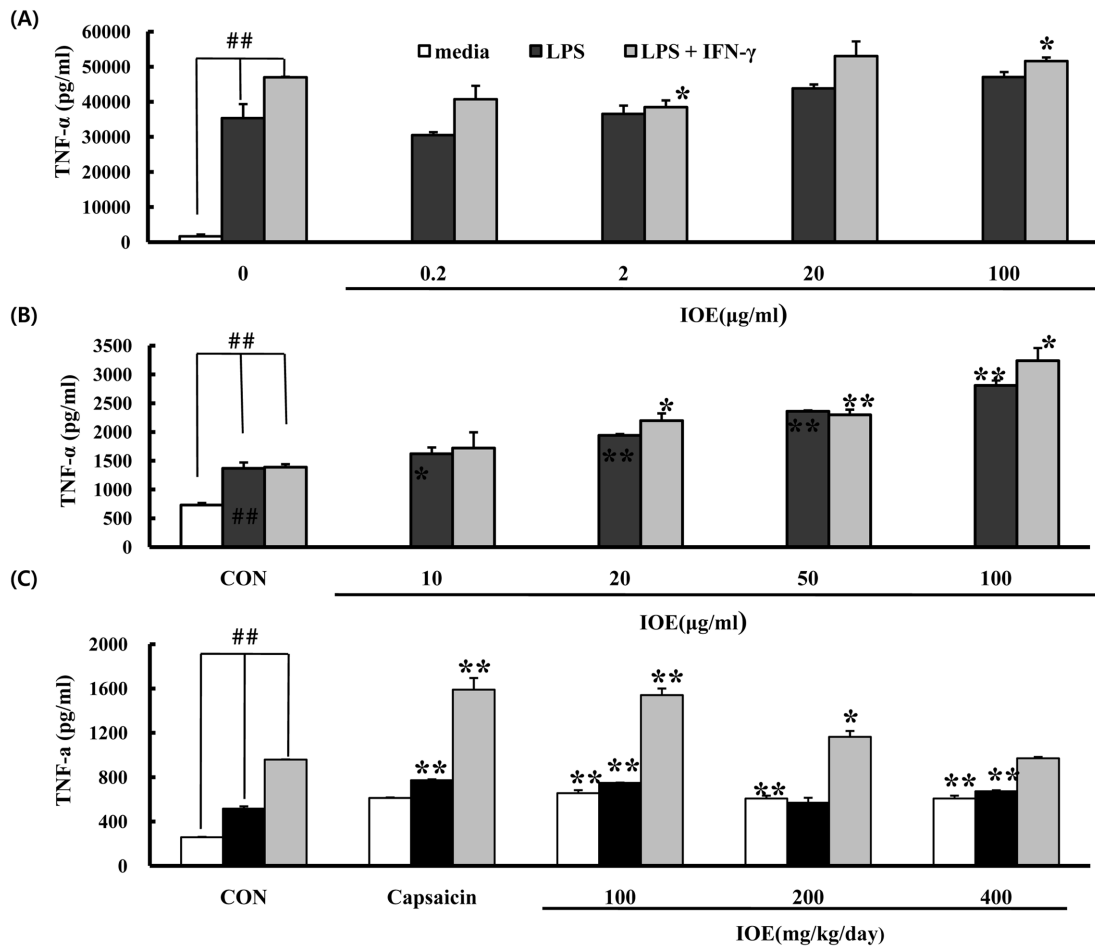


Fig. 2. Effects of IOE on the TNF-α production

Raw 264.7 cells (A) and mouse peritoneal macrophages (B) were pre-treated with various concentrations of IOE, and then stimulated with LPS (1 µg/ml) or LPS + IFN-γ (1 ng/ml) for 24 (A) and 48 (B) hours respectively. (C) shows TNF-α production by peritoneal macrophages *ex vivo*. Mice were administered with various concentrations of IOE, 3 mg/kg/day of capsaicin. Cells were collected and stimulated with LPS (1 µg/ml)/ LPS + IFN-γ (1 ng/ml) for 48 hours. Values are expressed as mean ± S.D. of the values from independent experiments (##: p<0.05 VS. negative control, *: p<0.05, **: p<0.01 VS. LPS- or LPS + IFN-γ-treated control).

는 차가버섯 추출물 (IOE) 20 µg/ml 처리시 그 발현 정도가 LPS 단독 처리시보다는 약간 증가하였으나, 차가버섯 추출물 (IOE) 100 µg/ml 처리시 감소 되었다. 또한 배양 시간에 따른 영향을 살펴보면, iNOS는 처리 6시간 후에 측정된 결과 100 µg/ml 처리군의 억제효과가 뚜렷하였고 시간이 지나면서 억제효과가 미미해짐을 알 수 있었고 COX-2는 그 양상이 처리시간에 별로 영향을 받지 않았다. 염증과 면역 반응 발현 및 조절에 중요한 역할을 담당하는 사이토카인인 TNF-α는 100 µg/ml 처리에 의해 약간 감소하였고 IL-1β는 처리 6시간 후에 측정된 결과에서 발현이 뚜렷하게 감소함을 알 수 있었다. 이처럼 차가버섯 추출물 (IOE) 처리로 염증 매개물질 합성 효소인 iNOS와 COX-2, 염증 매개 사이토카인 TNF-α와 IL-1β의 mRNA 발현 정도가 감소됨을 관찰하였다 (Fig. 3). 이는 2005년 박 등²⁷⁾이 차가버섯

메탄올 추출물이 LPS 유도 Raw 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 protein과 mRNA 발현을 억제한다는 보고와 일치된 결과이다.

이상의 연구결과를 통해 차가버섯이 항염증 활성을 가지고 있는 것을 확인하였고, 앞으로 염증성 질환 동물모델을 이용하여 적응증을 구명하고자 한다.

결론

차가버섯 추출물의 항염증 작용을 알아보기 위해 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포와 마우스 복강내 마크로파지의 NO와 TNF-α의 생성 정도를 살펴본 결과 TNF-α 보다는 뚜렷한 NO 생성 억제 효과를 확인하였다. 염증 관련매개물질의 합성효소인 iNOS와 COX-2, 염증성 사이토카인인 TNF-

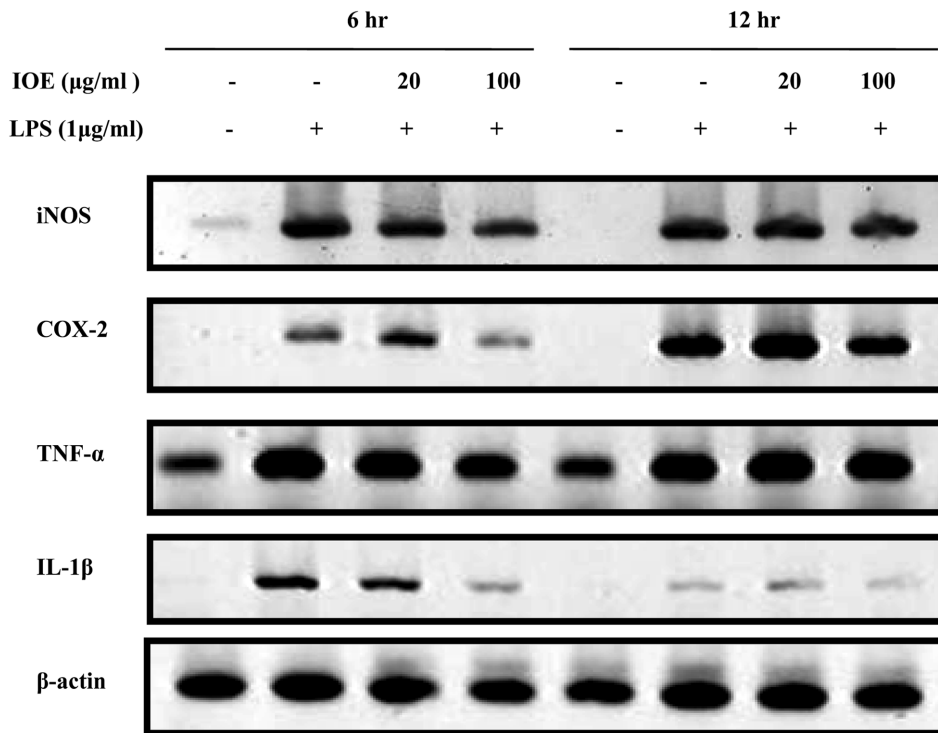


Fig. 3. Effects of IOE on pro-inflammatory mediators and cytokines expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells
Raw 264.7 cells were pretreated with 20 and 100 µg/ml of IOE for 1 hr, and then stimulated with LPS(1 µg/ml) for 6 and 12 hr. The levels of iNOS, COX-2, TNF-α, and IL-1β mRNA were determined by PCR.

α와 IL-1β 발현 정도를 살펴본 결과 차가버섯 추출물 처리 시간, 처리농도에 따라 발현 억제정도는 달랐으나 차가버섯 추출물 (IOE) 100 µg/ml 처리군에서 iNOS와 COX-2, TNF-α와 IL-1β의 뚜렷한 억제 효과를 확인하였다. 이러한 연구결과에 의해 차가버섯 추출물이 염증성 질환을 예방하거나 치료할 가능성을 가지고 있다.

사 사

본 연구는 숙명여자대학교 2011 학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Behrens, E. M. (2008) Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmunity Reviews* **7**: 305-308.
- Hotta, O., Yusa, N., Kitamura, H. and Taguma, Y. (2000) Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clinica Chimica Acta* **297**: 123-133.
- Saha, P., Modarai, B., Humphries, J., Mattock, K., Waltham, M., Burnand, K. G. and Smith, A. (2009) The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* **9**: 109-118.
- Tuppo, E. E. and Arias, H. R. (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 289-305.
- McLaren, J. E., Michael, D. R., Ashlin, T. G. and Ramji, D. P. (2011) Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research* **50**: 331-347.
- Prieur, X., Roszer, T. and Ricote, M. (2010) Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**: 327-337.
- Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Grazia Totaro, M., Allavena, P., Mantovani, A. and Sica, A. (2009) Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* **214**: 761-777.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* **49**: 1603-1616.
- Wang, H., Brown, J. and Martin, M. (2011) Glycogen synthase kinase 3: A point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* **53**: 130-140.
- Marn, J. and Rodriguez-Martinez, M. A. (1997) Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological condi-

- tions. *Pharmacology & Therapeutics* **75**: 111-134.
11. Rodeberg, D. A., Chaet, M. S., Bass, R. C., Arkovitz, M. S. and Garcia, V. F. (1995) Nitric oxide: An overview. *The American Journal of Surgery* **170**: 292-303.
 12. Aggarwal, B. B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* **3**: 745-756.
 13. Hanada, T. and Yoshimura, A. (2002) Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **13**: 413-421.
 14. Rocca, B. and FitzGerald, G. A. (2002) Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol.* **2**: 603-630.
 15. Luo, Y., Liu, M., Yao, X., Xia, Y., Dai, Y., Chou, G. and Wang, Z. (2009) Total alkaloids from Radix Linderae prevent the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing NF- κ B and MAPKs activation. *Cytokine* **46**: 104-110.
 16. Chuang, W. L., Haugland, O., Pan, B. S. and Evensen, O. (2008) Isoflavone-rich extracts from woolly glycine *Glycine tomentella* inhibits LPS-induced TNF- α expression in a macrophage cell line of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol Immunol.* **45**: 3956-3964.
 17. Hwang, J. S., Lee, S. A., Hong, S. S., Han, X. H., Lee, C., Kang, S. J., Lee, D., Kim, Y., Hong, J. T., Lee, M. K. and Hwang, B. Y. (2010) Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and their inhibition of the LPS-induced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**: 3785-3787.
 18. Rafi, M. M., Yadav, P. N. and Reyes, M. (2007) Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *J Food Sci.* **72**: S069-074.
 19. Ruimi, N., Rwashdeh, H., Wasser, S., Konkimalla, B., Efferth, T., Borgatti, M., Gambari, R. and Mahajna, J. (2010) *Daedalea gibbosa* substances inhibit LPS-induced expression of iNOS by suppression of NF- κ B and MAPK activities in RAW 264.7 macrophage cells. *Int J Mol Med.* **25**: 421-432.
 20. Wu, M. J., Wang, L., Ding, H. Y., Weng, C. Y. and Yen, J. H. (2004) *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by down-regulating LPS-induced NF- κ B. *J Biomed Sci.* **11**: 186-199.
 21. Kim, Y. O., Park, H. W., Kim, J. H., Lee, J. Y., Moon, S. H. and Shin, C. S. (2006) Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences* **79**: 72-80.
 22. Cha, J. Y., Jun, B. S., Kim, J. W., Park, S. H., Lee, C. H. and Cho, Y. S. (2006) Hypoglycemic effects of fermented chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) in the diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. *Food Science and Biotechnology* **15**: 739-745.
 23. Lee, K. W., You, H. J., Park, S. Y., Ryu, O. H., Kim, H. Y., Seo, J. A., Lee, Y. J., Kim, S. G., Kim, N. H., Choi, K. M., Choi, D. S. and Baik, S. H. (2006) Hypoglycemic activity of beta-glucans from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Diabetes* **55**: A472-A472.
 24. Cui, Y., Kim, D. S. and Park, K. C. (2005) Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol.* **96**: 79-85.
 25. Lee, I. K., Kim, Y. S., Jang, Y. W., Jung, J. Y. and Yun, B. S. (2007) New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorg Med Chem Lett.* **17**: 6678-6681.
 26. Kim, H. G., Yoon, D. H., Kim, C. H., Shrestha, B., Chang, W. C., Lim, S. Y., Lee, W. H., Han, S. G., Lee, J. O., Lim, M. H., Kim, G. Y., Choi, S., Song, W. O., Sung, J. M., Hwang, K. C. and Kim, T. W. (2007) Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food.* **10**: 80-89.
 27. Park, Y. M., Won, J. H., Kim, Y. H., Choi, J. W., Park, H. J. and Lee, K. T. (2005) *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol.* **101**: 120-128.
 28. Nakajima, Y., Sato, Y. and Konishi, T. (2007) Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga). *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **55**: 1222-1226.
 29. Hu, H., Zhang, Z., Lei, Z., Yang, Y. and Sugiura, N. (2009) Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **107**: 42-48.
 30. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65**: 55-63.
 31. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* **126**: 131-138.
 32. Doe Wf and Henson, P. M. (1978) Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect on tumor target cells. *J Exp Med.* **148**: 13.
 33. Kim, C. S., Kawada, T., Kim, B. S., Han, I. S., Choe, S. Y., Kurata, T. and Yu, R. (2003) Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling* **15**: 299-306.

(2011. 8. 12 접수; 2011. 9. 26 심사; 2011. 9. 26 게재확정)