

丹蔘 추출물의 항산화 효과에 의한 RAW264.7 cell에서의 항염증 작용

이세은[#], 조수인^{*}

부산대학교 한의학전문대학원

Anti-inflammatory effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* extract on RAW264.7 cell, via anti-oxidative activities

Se-Eun Lee[#], Su-In Cho^{*}

School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : It had been reported that herbal medicines containing polyphenol and flavonoid have been shown to be associated with decreased the cause of aging and variety of disease such as reactive nitrogen species and reactive oxygen species in several recent studies. *Salviae miltiorrhizae Radix*, originated from *Salvia miltiorrhiza* BGE., is one of popular traditional herbal medicines that is commonly used by traditional medicine practitioners. To this date, *Salviae miltiorrhizae Radix* has more than 2000-year history of mature application. This study was conducted to investigate whether the *Salviae miltiorrhizae Radix* methanol extract has an inhibitory effect association with oxidation or inflammation.

Methods : Cytotoxic activity of *Salviae miltiorrhizae Radix* methanol extract on RAW264.7 cells was evaluated by using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide solution. Nitric oxide production was measured using griess reagent system. Western blot analysis and measurement for changes of protein expression, nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, also performed.

Results : The medicinal plant, *Salviae miltiorrhizae Radix*, does not impair the cell viability in tested concentration (25-100 µg/ml). SMR showed anti-oxidative effects *in vitro* by decreasing electron donating ability, and also showed anti-inflammatory effects suppressing NO and COX-2 expressin in LPS induced RAW264.7 activation. SMR inhibited the generation of intracellular ROS production as dose dependant manner.

Conclusions : These results indicate that *Salviae miltiorrhizae Radix* methanol extract has an anti-inflammatory activities via anti-oxidative effects, and the anti-inflammatory effect was presentedd as dose dependant manner.

Key words : *Salviae Miltiorrhizae Radix*, Anti-oxidation, Anti-inflammatory, RAW264.7

서 론

丹蔘 (*Salviae miltiorrhizae Radix*, SMR)은 순형과 (꿀풀과; Labiatae)에 속한 다년생 초본인 단삼 (*Salvia miltiorrhiza* BGE.)의 뿌리 및 뿌리줄기를 건조한 것으로, 성질은 약간 차고 독성은 없으며 쓴 맛을 가지고 있는데, 활혈거어 (活血祛瘀), 양혈소옹 (涼血消癰), 제번안신 (除煩安神) 등의 효능으로 인해 월경부조 (月經不調), 경폐통경 (經閉痛

經), 징하적취 (癥瘕積聚), 흉복자통 (胸腹刺痛), 창양중통 (瘡瘍腫痛), 심번불면 (心煩不眠), 간비중대 (肝脾腫大), 교심통 (絞心痛) 등의 증상에 대한 치료 효과를 가진 약재이다¹⁾.

염증은 다양한 염증 매개 인자들이 대식세포에 인식되는 것으로부터 시작된다. 대식세포는 면역세포 중 하나이며, 모든 조직에 존재하고 체내 유입된 염증의 원인을 인식해 염증 매개물질을 생성해 다른 면역세포들의 활성화를 유도시켜 염증원인을 제거 복구하는 역할을 한다²⁾. 염증매개물질인

*Corresponding author : Su-In Cho, School of Korean Medicine, Pusan National University

· Tel : +82-51-510-8457 · E-mail : sicho@pusan.ac.kr

#First author : Se-Eun Lee, School of Korean Medicine, Pusan National University

· Tel : +82-10-2462-729 · E-mail : aewq2623@naver.com

· Received : 22 June 2015 · Revised : 17 July 2015 · Accepted : 20 July 2015

Lipopolysaccharide (LPS) 처리 시 대식세포는 세포표면에 있는 Toll like receptor (TLR)가 인식하여 Toll/IL-1 receptor (TIR)와 Myeloid Differentiation primary response gene 88 (MyD88)에게 신호 전달하고, 활성화된 MyD88 단백질은 Interleukin-1 receptor를 TLR에 결합시키고 Tumor Necrosis Factor receptor를 유도시킨다. TNF는 I kappaB kinase (IκBk)를 활성화시켜 Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) p65에 결합되어 있는 IκBα가 분해되어 전사인자인 NF-κB p65는 핵으로 이동하게 되고 따라서 염증성 사이토카인 및 염증성 효소인 Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6), anti-Nitric Oxide Synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시킨다³⁻⁵⁾.

i-NOS에 의해 생성된 산화 질소 (Nitric Oxide, NO)의 상향조절은 산화적 손상을 일으키는데 염증 및 신경질환등 다양한 질병과 관련이 있으며, COX-2는 세포 인지질에서 유래하고 불포화 지방산인 arachidonic acid를 Prostaglandin₂ (PGE₂)로 전환시켜 혈관확장과, 통증을 생성시키는 등^{6,7)} i-NOS와 COX-2는 만성염증과 자가면역질환의 원인이 된다^{8,9)}.

높은 수준의 NO들은 순환계 쇼크, 염증 및 암을 포함한 다양한 형태의 병리 생리학적으로 문제가 되고 있으며¹⁰⁾, 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물, 한약재를 포함한 다양한 약용식물들에서 생리활성 물질들을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 항산화제는 활성 산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)을 제거하고 지질과 산화를 통한 세포막의 변화, 항알러지, 항염증, 항돌연변이 및 항암 등에 효과가 있다고 한다¹¹⁾.

그에 따라 본 연구에서는 항산화제에 의한 산화적 스트레스가 차단될 경우 염증반응이 효과적으로 억제된다는 사실들^{10,11)}을 기반으로 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 mouse macrophage cell line을 이용하여 한약재 丹蔘의 메탄올 추출물이 나타내는 염증억제반응을 관찰하여, 丹蔘 추출물이 염증성 질환의 예방과 치료에의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 丹蔘은 광명당제약 (울산, 대한민국)으로부터 중국산을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 위해 丹蔘은 400 g을 적당량의 메탄올에 넣고 추출이 잘 되도록 2일 정도 잘 섞어 준 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, 일본) 및 speed vacuum을 이용하여 메탄올 추출물 (SMR)을 만들었으며, 이를 냉동실에 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 만들어 사용하였다. 사용된 동일한 한약재 시료 부산대학교 약재보관실 (시료 번호: 2014-DSM004)에 보관 중이다.

2) 시약

Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 Sodium carbonate, Diethylene glycol, 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl 등 이하 나머지 시약들은 Sigma-Aldrich, Co.,를 Dimethyl

sulfoxide (DMSO)와 30% hydrogen peroxide는 Junsei chemical Co.,에서 추출에 사용한 Methanol은 SK chemicals, 세포 배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM)은 wengine, Fetal bovine serum (FBS)과 Penicillin-streptomycin는 Gibco BRL (Grand Island, USA), 실험에 사용된 시약 중 Sodium Dodesyl Sulfate (SDS)는 Bioneer Co., 30% Acrylamide는 Bio-RAD, 단백질 정량에 사용한 Bovine serum albumin (BSA)는 Thermo scientific, Skim milk는 BD science에서 iNOS는 EMD Millipore Co.,에서 COX-2 및 Goat anti-rabbit IgG, pAb (HRP conjugate), Goat anti-mouse IgG, pAb (HRP conjugate)는 Enzo사에서, beta-actin은 Santa Cruz사 제품을 이용하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법¹²⁾을 참고하여 사용하였으며, 검량선 기준 물질로 탄닌산을 사용하였다. 샘플 100 μl, 1N Folin-ciocalteu's phenol reagent를 100 μl을 반응시킨 후 실온에서 3분간 방치하고, 2% 탄산나트륨을 2 ml을 넣어 30분 동안 반응시켰다. 아스코르브산을 양성대조군으로 사용하고, Fluorescence reader로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Diethylene glycol colorimetry 방법¹³⁾을 참고하여 사용하였으며, 검량선 기준 물질로 Naringin을 사용하였다. 샘플 100 μl에 diethylene glycol 1 ml을 반응시키고 이어서 1N NaOH 100 μl를 넣어준 뒤, 항온 수조에 1시간 반응시켰다. 아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하고, Fluorescence reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 항산화 효과

각 농도별 추출물을 0.2 ml, 1.5×10^{-4} M 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl (DPPH) 용액 1.8 ml을 혼합하여 암실에서 30분간 반응 시켜 Fluorescence reader를 이용해 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 위 실험은 Blois의 방법¹⁴⁾을 응용하였다. 전자공여능은 시료 첨가한 샘플과 첨가하지 않은 샘플 차이를 백분율로 구하였으며, EDA를 50% 감소시키는데 필요한 농도를 Inhibition concentration 50% (IC₅₀) 값으로 계산하여 구하였다. 양성대조군으로서 아스코르브산과 Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT)를 이용하였다.

4) 세포배양

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

5) RAW264.7 세포의 세포 독성 시험 및 사이토카인의 측정

추출물에 대한 세포 생존율과 사이토 카인을 측정하기 위해 세포 개수를 세어 well 당 2×10^5 cells가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 이 후 부착된 각 세포들에 추출물을 농도별로 처리하고, 1시간 뒤 5µg/ml의 농도인 LPS를 처리하여 24시간 treat 하였다. 약물 처리 후 NO를 측정하기 위해 상층액을 다른 plate에 옮겨 Griess reagent (1% (w/v) sulfanilamide, 1% (w/v) naphthylethylendiamine in 30% acetic acid)와 동량 반응 시켜 Fluorescence reader를 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

동시에 SMR이 RAW264.7 세포주에 대해 독성이 있는지 측정하기 위해

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법으로 분석하였다. 이는 Carmichael 등의 방법¹⁵⁾을 응용하였다. 세포가 부착되어 있는 plate에 MTT solution (1 mg/ml)을 동량반응 시켜 2시간 동안 incubator에서 반응시키고 상층액을 제거 한 후 남아 있는 formazan을 용해시켜 Fluorescence reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 데이터들은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Percent values (\%)} = [1 - (\text{Control Abs} - \text{Sample Abs}) / \text{Control Abs}] \times 100$$

6) DCFH-DA에 의한 intracellular ROS 측정

각 추출물에 대한 산화적 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위해 세포를 2×10^5 cells가 되도록 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 18시간 배양하였다. 이 후 부착된 각 세포들에 추출물을 농도별로 처리하고, 1시간 뒤 5 µg/ml의 농도인 LPS를 처리하여 24시간 treat 하였다. 약물 처리 후 배지를 제거한 다음, Phosphate Buffer Saline (PBS)로 희석된 10µM 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 가하고, 30분간 배양하였다. PBS로 1회 washing 한 다음 5mM Hydrogen peroxide (H₂O₂)를 가하고, 30분 배양한 뒤에 Fluorescence reader를 이용해 excitation 485nm, emission 530nm에서 형광강도를 측정하였다. DCF 형광강도의 증가율은 대조군과 비교하여 배수 (fold)로 계산하였다.

7) Western blot

단백질의 발현 수준은 Western blot 분석을 통해 확인하였다. 차가운 PBS으로 2회 세척한 후, pro-prep (iNtRON Biotech, Seongnam, Korea)을 이용하여 용해된 세포들을 수득하였다. 각 시료의 단백질 농도는 BCA assay를 이용하여 정량 하였고, 각 단백질의 동등한 양을 변성시킨 뒤 SDS-polyacrylamide gels을 통해 분리 한 다음 nitrocellulose membranes을 통해 전달 시킨 뒤, Membrane을 실온에서 1시간 동안 5% skim milk에 블로킹시켰다. 1차 항체 i-NOS (1:2000), COX-2 (1:1000), beta-actin (1:1000)을 저온 실에 하루 보관 시키고, TBST 완충액으로 세척한 후, HRP conjugated a goat anti-mouse IgG, pAb (1:3000), HRP conjugated a goat anti-rabbit IgG, pAb (1:5000)을 이용하여 1시간 실온에서 반응시켜 주었다. 반응 시킨 뒤 다시

TBST 완충액으로 세척한 후 West-Q Chemiluminescent Substrate Kit, Plus (GenDEPOT)에 의해 활성화 된 단백질 밴드를 LAS (Luminescent Analyzeer system)를 사용하여 시각화 하였다.

8) 통계 분석

모든 실험은 3번 반복하고, 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 통계 프로그램 SIGMAPLOT 12.0 version을 사용하고, 제어 및 실험군 간의 통계적 유의성을 비교한 표본 t검정(t-test) 및 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 의해 확인되었다. 모든 그래프에서 p 값은 0.05이하일 때 통계적으로 유의 한 것으로 간주 하였다.

결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

SMR의 총 폴리페놀 함량은 Tannic acid를 이용하여 표준 곡선으로 mg/g TAE (Tannic Acid Equivalent) 단위로 나타내었고, 플라보노이드 함량은 Naringin을 이용한 표준곡선으로 mg/g NE (Naringin Equivalent)를 구하였다. 그 결과는 Table 1과 같은데 SMR에서의 함량은 그리 높지 않은 것으로 나타났다.

2. 전자 공여능 확인

산화적 Free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키게 하는 방법으로서 항산화효과를 보는 것을 목적으로 하였다. 항산화능은 페놀화합물의 양과 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며^{17,18)}, 본 연구에서 SMR과 양성대조군의 전자공여능을 농도별로 측정하여 비교한 결과 SMR의 활성이 비교적 높은 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. The contents of total polyphenol, flavonoid and electron donating ability of Salviae miltiorrhizae Radix methanol extract.

Scientific name	Total polyphenol (mgTAE/g)	Total flavonoid (mgNE/g)	EDA IC ₅₀ (µg/ml)
Ascorbic acid	-	-	5,7162 ± 0,6743 ^{**}
BHA	-	-	12,4432 ± 0,4964 ^{***}
BHT	-	-	38,2819 ± 7,1111 [*]
SMR	0,3836 ± 0,0096 ^{***}	0,2521 ± 0,058 ^{***}	55,9991 ± 1,5908 ^{***}

The values represent mean ± STDEV of triplicate independent experiments.
 1) Values were mean ± STDEV analyzed using tannic acid as standard.
 2) Values were mean ± STDEV analyzed using naringin as standard. Asterisk indicates a significant difference at ^{***}p < 0.001, ^{**}p < 0.01, ^{*}p < 0.05 level.

3. 세포 독성 측정

SMR에 의한 대식세포의 독성을 MTT assay에 의해 확인한 결과 농도별 약물을 주입하였을 때 각 농도에서 대식세포에 대한 독성을 일으키지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1).

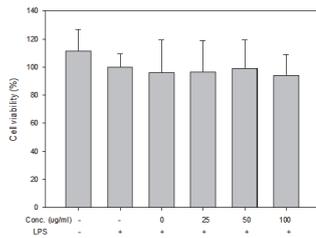


Fig. 1. Effect of *Salviae miltiorrhizae* Radix extract on the cell viability of RAW264.7 cells. The values represent mean \pm STDEV of triplicate independent experiments. Cell viability expressed as a percentage of the control. The values of graph is a one-way ANOVA was not statistically significant difference.

4. Nitric oxide 측정

RAW264.7 cell의 NO 생성 억제 정도를 측정하기 위해 SMR을 농도별로 처리하여 결과를 Fig. 2A에 나타내었다. 생성된 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 세포 상등액과 반응하였으며, LPS만 처리한 군에서 염증발현이 최대치임을 알 수 있었고, 추출물들의 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다.

5. RAW264.7 세포에서 i-NOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향

SMR이 LPS에 의해 유도된 RAW264.7 cell에서의 i-NOS와 COX-2의 발현에 영향을 미치는 것을 Western blot을 통해 확인하기 위하여 LPS 처리 후 SMR을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하였으며, 그 결과 LPS 처리한 군에서 발현이 증가하였던 COX-2의 활성이 SMR 100 µg/ml의 농도치리에 의해 유의적인 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B, C).

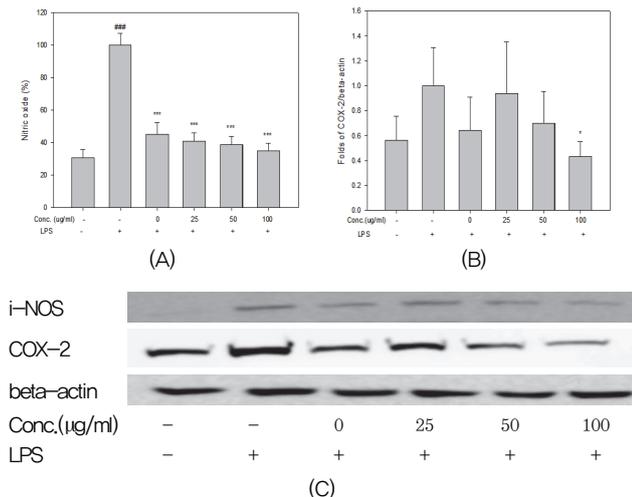


Fig. 2. Scavenging activities of *Salviae miltiorrhizae* Radix extract on Nitric oxide (A) and effects of i-NOS, COX-2 protein expression (B, C) in LPS-induced RAW264.7 cells. The NO production was measured by Griess Reagent system, the densitometry values of three independent experiments were COX-2/beta-actin (B), and the expression levels of i-NOS and COX-2 were determined by Western blotting (C). The values represent mean \pm STDEV of triplicate independent experiments. Compared with the sharp symbol were untreated groups, asterisk is shown in the treatment groups. Sharp symbol and asterisk indicates a significant difference at ###,*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ level.

6. Intracellular ROS 생성 저해

LPS 처리에 의해 수치가 상승되었던 세포 내 ROS가 SMR 처리에 의해 유의하게 감소함을 확인하였고, 이러한 감소는 SMR의 농도에 의존적으로 나타났다(Fig. 3).

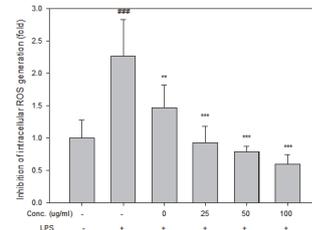


Fig. 3. *Salviae miltiorrhizae* Radix suppresses intracellular ROS generation in LPS-stimulated Macrophages. The values represent mean \pm STDEV of triplicate independent experiments. Compared with the sharp symbol were untreated groups, asterisk is shown in the treatment groups. Sharp symbol and asterisk indicates a significant difference at ###,*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ level.

고찰

丹參의 효능이 활혈거어 (活血祛瘀), 양혈소옹 (涼血消癰) 등에 치우쳐 있으며, 이러한 효능으로 인해 경폐통경 (經閉痛經), 창양종통 (瘡瘍腫痛), 간비종대 (肝脾腫大) 등의 증상에 이용되어져 왔는데¹⁾ 이러한 丹參의 효과는 현대적인 의미로 염증 질환에 효과가 있을 것으로 유추할 수 있다.

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물, 한약재를 포함한 다양한 약용 식물들로부터 생리활성 물질들을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 여러 연구자들에 의해 resveratrol을 포함한 다양한 플라보노이드들이 염증에 대한 억제 효과가 있으며, 결과적으로 다양한 조직에서 carcinogenesis의 억제를 통해 많은 천연물질들이 항염증 및 항암 활성을 가질 수 있을 것으로 보고한 바 있다^{10,11)}.

본 연구에서는 丹參의 메탄을 추출물인 SMR에 포함된 플라보노이드 함량이 그다지 높은 편이 아닌데도 일부 양성 대조군에 크게 뒤지지 않은 항산화 활성을 보였고, 연구 재료로 사용된 RAW264.7 세포에서 100 µg/ml 농도에서까지 세포 독성을 전혀 보이지 않았으므로 향후 SMR이 다양한 세포주를 이용한 연구에 활용될 수 있음을 보였다.

RAW264.7 세포에 염증을 유발하기 위해 사용한 LPS는 내독소로 잘 알려져 있으며, 그람 음성 균인 macrophage나 monocyte에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β (interleukin-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. NO는 Reactive nitrogen species (RNS)라고 불리며 활성산소종 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 본 연구에서 LPS 단독으로 처리한 경우 염증 발현이 상승함을 확인하였고 SMR은 농도에 의존적으로 이러한 염증 반응을 감소시켰으며, 이러한 과정에 NO 및 COX-2 발현의 억제가 관여함도 확인할 수 있었다.

ROS는 산화 촉진 물질 (prooxidant)과 산화 억제 물질 (antioxidant)이 불균형을 이룰 때에 산화적 스트레스를 유발 시키며, 이 과정 중에서 과산화 유리기 (peroxyl radicals)는 DNA 손상과 단백질 변형에 관여하게 되며 세포독성 및 발암

등의 병리적 질환을 일으키게 된다^{22,23}. DCFH-DA는 산화적 손상을 조사하기 위해 사용되어 왔는데, 세포에 전처리하면 세포 안으로 들어가, H₂O₂와 반응하면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 형광강도를 측정하면 세포내 ROS 생성량을 측정할 수 있다. 본 실험에서 역시 LPS에 의해 유도된 ROS 생성이 SMR 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것이 확인되었다.

따라서 丹蔘 메탄을 추출물인 SMR은 활성 산소를 억제하는 항산화 활성뿐만 아니라 항염증 활성도 가지고 있었으며, 이러한 결과는 염증성 질환인 간 섬유증²⁴, 골다공증²⁵, 천식²⁶, 류마티스성 관절염²⁷, 대장염²⁸ 등에 효과가 있는 것으로 보고된 다른 연구자들의 실험 결과와도 관련성이 매우 높은 것으로 생각된다.

위의 내용을 종합하면 본 연구를 통해 丹蔘의 메탄을 추출물인 SMR이 항산화 작용과 함께 항염증 효과도 가지고 있으며, 현재까지 다양한 천연물을 대상으로 항산화 활성이 보고된 것을 감안하면 향후 이러한 재료들을 대상으로 추가적인 항염증 활성 또는 항암 활성 등에 대한 접근이 가능할 것으로 보인다.

결론

丹蔘 메탄을 추출물 (SMR)의 항산화 활성이 마우스 대식 세포에서의 항염증, 세포 내 활성 산소를 억제하는 연구를 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 양성대조군들에 비해 뛰어난 항산화 효과는 나타내지 않았지만 RAW264.7 세포주에서의 RNS와 ROS를 억제하는 효과를 얻을 수 있었다.
2. 추출물의 세포 독성 여부를 확인하여 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도 (-100 µg/ml)를 선정하였으며, 세포 내 NO를 억제하는 것을 확인한 결과 각 농도에서 염증 억제 반응을 나타내었고 ($p < 0.001$), 이 결과로 인해 SMR은 LPS로 자극된 염증인자인 NO 생성 전구 물질인 i-NOS와 COX-2의 발현도 저해하는 결과를 단백질 수준에서도 확인하였다.
3. 세포내 ROS 억제 실험을 한 결과, 5 mM의 Hydrogen peroxide와 LPS를 자극시켜 세포 내 ROS를 유도한 결과 농도 의존적으로 ($p < 0.001$) ROS의 생성을 저해하였다.

References

1. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine, Text book of Herbology, Seoul : Younglimsa, 2000 : 419-20.
2. Medzhitov R, Origin and physiological roles of inflammation, Nature, 2008 ; 454(7203) : 428-35.
3. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa

- JR, Sims JE, The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family 1, FEBS Lett, 1997 ; 402(1) : 81-4.
4. Kawai T, Akira S, Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors, Trends Mol Med, 2007 ; 13(11) : 460-9.
5. Tak PP, Firestein GS, NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, J Clin Invest, 2001 ; 107(1) : 7-11.
6. Kang CH, Choi YH, Choi IW, Lee JD, Kim GY, Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced iNOS, COX-2, and TNF- α Expression by Aqueous Extract of Oryza Japonica in RAW 264.7 Cells via Suppression of NF-kB Activity, Trop J Pharm Res, 2011 ; 10(2) : 161-8.
7. Nakanishi M, Rosenberg DW, Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer, Semin Immunopathol, 2013 ; 35(2) : 123-37.
8. Bae DS, Kim YH, Pan CH, Nho CW, Samdan J, Yansan J, Lee JK, Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages, BMB Rep, 2012 ; 45(2) : 108-13.
9. Cerella C, Sobolewski C, Dicato M, Diederich M, Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy, Biochem Pharmacol, 2010 ; 80(12) : 1801-15.
10. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK, Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, Carcinogenesis, 1999 ; 20(10) : 1945-52.
11. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK, Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol, Br J Pharmacol, 1999 ; 126(3) : 673-80.
12. Veliloglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, J Agric Food Chem, 1998 ; 46(10) : 4113-7.
13. NFRI, Manuals of quality characteristic analysis for food quality evaluation (2), Skuba : National Food Research Institute, 1990 : 61.
14. Blois MS, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, Nature, 1958 ; 181(4617) : 1199-200.
15. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity, Cancer Res, 1987 ; 47(4) : 943-6.
16. Kandaswami CE, Middleton E Jr, Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids, Adv Exp Med Biol, 1994 ; 366 : 351-76.

17. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*. 2002 ; 50(10) : 3050–5.
18. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, Wu P, Shiao MS. Increase of Vitamin E Content in LDL and Reduction of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits by a Water-Soluble Antioxidant-Rich Fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 ; 18(3) : 481–6.
19. Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee EK, Jahng YD, Lee SH, Son JK, Baek SH, Chang HW. 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*. 2004 ; 27(5) : 617–20.
20. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991 ; 91(3C) : 31S–8S.
21. Choi HS, Seo HS, Kim SR, Choi YK, Jang BH, Shin YC, Ko SG. Anti inflammatory and anti proliferative effects of *Rhus verniciflua* Stokes in RAW264, 7 cells. *Mol Med Rep*. 2014 ; 9(1) : 311–5.
22. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 ; 160(1) : 1–40.
23. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 1989 ; 264(14) : 7761–4.
24. Luk JM, Wang X, Liu P, Wong KF, Chan KL, Tong Y, Hui CK, Lau GK, Fan ST. Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation. *Liver Int*. 2007 ; 27(7) : 879–90.
25. Guo Y, Li Y, Xue L, Severino RP, Gao S, Niu J, Qin LP, Zhang D, Brömme D. *Salvia miltiorrhiza*: An ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs. *J Ethnopharmacol*. 2014 ; 155(3) : 1401–16.
26. Li D, Xiong SD, Du DB. Inhibitory effects of *Salvia miltiorrhiza* injection coordinated with dexamethasone on interleukin-13 and eotaxin expression in lung of asthmatic rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2006 ; 26(11) : 1007–10.
27. Liu QS, Luo XY, Jiang H, Xing Y, Yang MH, Yuan GH, Tang Z, Wang H. *Salvia miltiorrhiza* injection restores apoptosis of fibroblast-like synoviocytes cultured with serum from patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2015 ; 11(2) : 1476–82.
28. Wen XD, Wang CZ, Yu C, Zhang Z, Calway T, Wang Y, Li P, Yuan CS. *Salvia miltiorrhiza* (dan shen) significantly ameliorates colon inflammation in dextran sulfate sodium induced colitis. *Am J Chin Med*. 2013 ; 41(5) : 1097–108.