

## 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물의 항관절염 효과

박미희<sup>1\*</sup> · 김철진<sup>1</sup> · 이진영<sup>1</sup> · 금창엽<sup>1</sup> · 김인선<sup>1</sup> · 진창현<sup>2</sup> · 지중구<sup>3</sup> · 김성규<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>(주)에스에프씨바이오

<sup>2</sup>한국원자력연구원

<sup>3</sup>중부대학교 바이오융합학부, 교수

(2020년 1월 8일 접수: 2020년 2월 25일 수정: 2020년 2월 26일 채택)

### Anti-Arthritic Effect of Radiation Mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrophala koidz.*

Mi Hee Park<sup>1</sup> · Chul Jin Kim<sup>1</sup> · Jin Young Lee<sup>1</sup> · Chang Yeop Keum<sup>1</sup> · In Seon Kim<sup>1</sup>  
Chang Hyun Jin<sup>2</sup> · Joong-Gu Ji<sup>3</sup> · Sung-kyu Kim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>SFC bio Co., LTD

<sup>2</sup>Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute

<sup>3</sup>Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University

(Received January 8, 2020; Revised February 25, 2020; Accepted February 26, 2020)

**요약** : 본 연구에서는 방사선 육종 차조기와 백출의 복합추출물의 항관절염 효능을 평가하였다. 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물이 세포에 미치는 독성을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에서 MTT 기법으로 세포 생존율을 평가하였다. 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물의 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물을 5, 10, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 후 ROS와 NO level, 염증성 사이토카인의 분비, 염증성 인자인 NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS 등의 발현을 측정하였다. 또한 type II collagen으로 유도한 관절염 모델 동물실험에서 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물을 33.5, 66, 133 mg/kg/day로 처리한 후 항관절염 효능을 확인하였다. 그 결과, 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물은 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도까지 세포독성이 없었으며, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 ROS 생성 및 NO의 생성을 5, 10, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 대조군 대비 유의성 있게 감소시켰으며, 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 생성을 유의성 있게 억제시키고, NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS의 발현을 유의성 있게 감소시켜 세포 내에서 뛰어난 항염증 효과를 보였다. 관절염 모델 동물실험에서는 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물이 66.5, 133mg/kg 농도에서 관절염을 유의성 있게 억제시키는 효능을 나타내었다. 본 연구는 방사선 육종 차조기와 백출 복합추출물이 뛰어난 항염증 효능을 나타내는 것을 제시하며, 관절염 질환을 개선하기 위한 건강기능식품 및 치료제의 원료로 개발될 수 있다는 것을 제시한다.

**주제어** : 차조기, 방사선 육종, 백출, 항염증, 관절염 동물모델

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: skkim@sfcbio.com)

**Abstract** : In this study, anti-arthritic effect of the mixed extract of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrophala koidz* was investigated. Cell viability was determined by MTT assay in RAW 264.7 cells. The anti-inflammatory effect of mixed extracts was determined through measurement of the levels of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), release of inflammatory cytokines and expression of NF- $\kappa$ B, COX-2 and iNOS in LPS-induced RAW 264.7 cells after treatment of mixed extracts (5, 10, 25  $\mu$ g/ml). We showed that the mixed extracts was not toxic in the dose of 5, 10, 25  $\mu$ g/ml, and significantly inhibited production of nitric oxide and ROS, cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and inflammatory proteins including NF- $\kappa$ B, COX-2 and iNOS in LPS-induced RAW 264.7 cells. Moreover, the mixed extract inhibited the type II collagen induced arthritis in DBA mice in the dose of 66.5 and 133mg/kg/day. Therefore, we suggest that mixed extract of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrophala koidz* can be developed as a raw material for health functional food and therapeutics to treat the inflammatory arthritis.

**Keywords** : *Perilla frutescens* var. *crispa*; Radiation mutant; *Atractylodes macrophala koidz*; Anti-arthritic effect, Type II collagen induced arthritis (CIA)

## 1. 서론

차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 일년생 초본식물로 항산화, 항염증, 항암, 항균, 항알레르기 등 다양한 생리활성 효능이 있는 것으로 알려져 있다 [1-3]. 차조기의 주요 성분으로는 rosmarinic acid, luteolin, apiogenin, caffeic acid, egomaketone, isogomaketone (IK), perillaketone 등이 있으며, 특히 IK는 essential oil계로서 차조기 특유의 향을 내는 방향성 성분으로 항염증, 항암 등에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다 [4-7]. 본 연구에서 사용한 차조기는 200 Gy의 감마선 조사 후 방사선 육종을 진행함으로써 기존 차조기가 가지고 있는 항염증성 물질인 isogomaketone 성분 함량을 10배 이상 높은 형질전환 품종이며, 이전 연구를 통해 메탄을 추출된 형질전환 차조기가 항염증 및 항비만 효과를 나타내는 것이 확인된 바 있다 [8-9]. 또한 초임계 추출을 활용하여 진행한 세포실험 및 동물모델 연구에서 항염증 작용이 뛰어난 것으로 확인되었다 [10-12].

백출은 국화과에 속한 *Atractylodes* 종식물로서 대한 약전에서는 삼주(*Atractylodes japonica Koidzumii*) 또는 백출(*Atractylodes macrocephala Koidzumii*)의 뿌리줄기로서 그대로 또는 주피를 제거한 것을 기원으로 하고 있으며, 중국 약전에서는 백출(*Atractylodes macrocephala Koidz*)의

근경을 기원으로 하고 있다 [13]. 백출은 항암, 항염증, 항산화 작용, 심혈관 작용, 당뇨, 간보호 작용, 제산력 효능, 위산운동작용, 항알러지, 항우울 효과 등이 보고되어 있다 [13-15]. 백출의 성분으로는 atractylon, atractylenolide I, II, III, 등의 essential oil성분과 atractyloside A, B 등 sesquiterpene glycoside 및 atractan A, B, C 같은 다당체가 보고되어 있다 [16-18]. 백출의 대표적인 효능지표물질은 atractylenolide I인 것으로 알려져 있다 [19-20].

본 연구에서는 부작용이 없고 우수한 항염증 효능을 보유한 물질의 필요성이 대두되고 있는 최근 경향을 반영하여 천연물을 활용한 항염증 작용을 연구하고자 하였다. 사실, 항염증성 물질로서 가장 많이 사용되고 있는 천연 및 합성 코르티코스테로이드 제제는 혈압상승, 염 및 물의 정제, 신장손상, 칼륨 및 칼슘 분비의 증가를 비롯한 수많은 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다 [21, 22]. 이와 같은 스테로이드계 물질의 부작용을 극복하기 위해 비스테로이드계 항염증성 작용물질 (NSAID)들이 개발되어 왔으나 다량 투여시 호흡 촉진현상, 순환계 붕괴, 상복부 통증, 구토, 위장 출혈, 간손상, 혈소판 자해 등 다양한 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다 [23-25]. 그러므로 부작용을 최소화하고 항염증 약리 효능을 보유한 물질의 소재 개발의 필요성이 여전히 요구되고 있는 실정이다.

현재까지 식·의약 소재로 활용이 상대적으로 적합하고 부작용이 거의 없는 천연물인 방사선 육종 차조기와 백출 각각의 단독 추출물의 항염증작용은 연구되었지만, 해당 종의 초임계 유체 추출을 통한 복합추출물에 대한 항염증 작용은 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 형질전환 차조기의 초임계 유체추출물과 전통적인 의용약초인 백출의 초임계 유체 추출물의 복합물을 활용하여 관절염 예방 및 치료에 대한 가능성을 다각도로 확인하고자 세포독성이 없는 농도에서 다양한 염증성 매개체 확인을 과학적으로 진행한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료의 추출 및 조제

방사선 형질전환 차조기(이하, 육종 차조기)는 SFC바이오 (Korea, Seoul)에서 충남 예산에 계약 재배를 통하여 재배한 후 수확하였으며, 건조물을 제분하여 초임계 추출에 사용하였다. 백출은 광명당제약 (Korea, Seoul)에서 구입 후 제분하여 사용하였다. 초임계 유체 추출은 추출 (압력 400 bar, 온도 50°C), 분리 (압력 40 bar, 온도 40°C), CO<sub>2</sub> 유량 (550 ml / 12 min)의 조건에서 총 3 시간 동안 진행하였다. 추출 후 수분을 제거한 원료를 -4°C에서 냉장 보관하며 실험에 이용하였다. 차조기와 백출 복합추출물은 각각의 추출물을 혼합하여 제조하였으며, 차조기의 지표물질인 Isoegomaketone (IK)의 함량이 18-27 mg/g, 백출의 지표물질인 Atractylenolidel의 함량이 2.8-4.2 mg/g이 들어오도록 제조하여 사용하였다. 혼합물은 -18°C에서 냉동 보관하며 실험에 이용하였다.

### 2.2. 시약 및 실험기기

시약은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS : Welgene Co., Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., UK), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), CCK-8 (Dojindo, U.S.A), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin

(Hyclone Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.) 등을 사용하였다. 또한, 실험기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.), 유세포 분석기 (Flow cytometer, Becton Dickinson, Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

### 2.3. 세포 배양

한국세포주 은행 (Korea, Seoul)에서 구매한 RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin이 함유된 DMEM 배지에 넣어 부유시키고 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료를 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

### 2.4. 세포독성 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후, 방사선 육종 차조기와 백출의 복합추출물 (이하 차조기 복합추출물, mixed extract)을 5, 10, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10  $\mu\text{l}$ 의 CCK-8 solution을 첨가하여 세포배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 ELISA reader기를 이용하여 흡광도의 변화를 측정하고 후 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 2.5. 활성산소 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 차조기 복합추출물 5, 10, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도에 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA를 10  $\mu\text{M}$ 씩 처리하여 15분 동안 세포 배양기에서 반응시켰다. 염색 후 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 PBS 400  $\mu\text{l}$ 를 부유시켜 Flow cytometer를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분

석하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 활성산소 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

## 2.6. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

96 well plate에 RAW 264.7 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양한 후 복합추출물 5, 10, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도에 LPS를  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한 시료에서 NO 생성량을 측정하였다. 배양한 시료를 nitric oxide detection kit의 구성 물질인 N1 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하고 10분간 상온에서 반응시키고 N2 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 추가하여 10분간 다시 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 배양액에 LPS만을 처리한 대조군을 기준으로 NO 생성 저해 효능을 백분율로 표시하였다.

## 2.7. 염증성 사이토카인(cytokine) 측정

12 well plate에 RAW 264.7 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양한 후 복합추출물 5, 10, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도에 LPS를  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한 시료에서 cytokine을 측정하였다. 배양 시료를 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상등액과 cytokine kit의 스탠다드를 96 well plate에 25  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 assay buffer 및 matrix buffer, antibody-immobilized beads를 각 25  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 실온에서 반응시키고 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 25  $\mu\text{l}$ 의 detection antibody을 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시키고 추가로 25  $\mu\text{l}$ 의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액을 이용하여 2회 세척하였다. 세척 후 PBS를 150  $\mu\text{l}$ 를 넣고 5분간 shaking한 후 Luminex를 이용하여 cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  생성량을 측정하였다.

## 2.8. 유전자 발현 측정

### 2.8.1. RNA 추출

6 well plate에 RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 차조기 복합추출물 5, 10, 25 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도에

LPS를  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 배양 후, easy blue 1 ml와 chloroform 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합하여 원심분리한 상층액 400  $\mu\text{l}$ 에 binding buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 넣어 다시 반응시킨 뒤 반응액 700  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 원심분리하였다. 원심분리한 column에 washing buffer A와 B를 각각 700  $\mu\text{l}$ 씩 순차적으로 넣어 원심분리한 뒤 elution buffer를 50  $\mu\text{l}$  넣고 원심분리하여 추출된 total RNA를 확보하였다.

### 2.8.2. cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 total RNA 1  $\mu\text{g}$ 이 되도록 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하여 첨가하였다. 첨가 후  $45^\circ\text{C}$ 에서 60분 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분 동안 반응하여 M-MLV RT를 불활성화한 다음 합성이 완료된 cDNA를 유전자 발현량 측정에 사용하였다.

### 2.8.3. 유전자 발현량 측정

합성이 완료된 cDNA를 증폭을 위하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 진행하였으며, real-time quantitative 전용 tube에 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 각 primer 2  $\mu\text{l}$ , SYBR Green 10  $\mu\text{l}$ , DEPC-DW 5  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 다음과 같이 진행하였다.  $94^\circ\text{C}$ 에서 2분 동안 반응한 다음  $95^\circ\text{C}$ 에서 5초,  $65^\circ\text{C}$ 에서 30초를 40회 반복하여 진행하였고 이후 유전자 발현량은 대조군 대비 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 Table 1과 같다.

## 2.9. 관절염 효능 동물실험

### 2.9.1. 실험동물 및 사육관리

Japan SLC, Inc.(수입원: (주)중앙실험동물)에서 5주령의 건강한 수컷 [Mouse / DBA/1 mouse (specific pathogen free animal)] 80마리를 공급 받았으며, 시험에는 55마리를 사용하였다. 동물은 (주)큐베스트바이오 비임상평가센터 설치류 실험실 104호에서 사육하였으며, 시험기간 중동물실 환경은 온도  $20 \sim 24^\circ\text{C}$ , 습도 40~60%, 환기횟수 시간 당 최소 10회 및 12시간 자동조명(조명 08:00~20:00, 조도 150~300 Lux)으로 유지하였

Table 1. Primer sequence for qRT-PCR

Primer	size(bp)	F/R*	Sequences
NF- $\kappa$ B	115	F	GGATCACATTTGCTTTGTGTTGTT
		R	CACAACCTTACAGTAGATGGCTAGAAAGG
COX-2	130	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
		R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
iNOS	51	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
		R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
$\beta$ -actin	95	F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT
		R	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC

\* F : forward, R : reverse

으며, 시험의 결과에 영향을 줄 만한 환경요인은 없었던 것으로 판단되었다. 시험 중인 동물은 폴리카보네이트 재질 사육상자( [260W x 420L x 180H, mm)를 이용하여 순화기간 및 시험기간 동안 5마리씩 수용하였다. 순화기간의 사육관리는 사육상자 바닥에 방사선 조사된 깔짚(Comfort Bedding, (주)계룡과학)을 깔아 분, 뇨를 처리하였으며, 주 2회 깔짚을 교환하였다. 물병은 주 1회 멸균된 새것으로 교환하였다. 사료는 방사선 조사된 실험동물용 고품사료(Purina Rodent Chow 38057)를 자유섭취 시켰으며, 음수는 상수도수를 역삼투압 필터하여 물병을 통해 자유섭취 시켰다.

### 2.9.2. 시험물질의 제조 및 투여방법

시험물질 조제는 매일 투여 직전 무균작업대에서 조제하여 사용하였다. 시험물질을 상온에서 약 30분 정도 방치하여 부드러운 액상으로 만들어 준 후 3 mL 주사기를 이용하여 5 mL tube에 시험물질을 칭량하였다. 100% corn oil을 최종 조제 volume에 맞게 넣은 후 well suspension이 될 때까지 vortexing을 실시하였다. 시험물질은 가장 최근에 측정된 체중에 근거하여 개체 별 투여액을 환산(10 mL/kg)한 후 1회용 주사기에 disposable feeding needle을 장착하여 1일 1회, 4주간(총 28회) 강제경구 투여하였다. 대조물질은 개체 당 0.1 mL/head을 1회용 주사기(1 mL, 26G needle)로 취하여 투여하였다. 복강투여 시 주사부위에서 투여액이 유출되지 않는 것을 확인하였으며, 투여부위는 투여 전 알코올 솜을 이용하여 소독 후 실시하였다. 투여개시일을 시험 1일(Study Day 1)로 정의하였다.

### 2.9.3. 관절염 유도 및 시험물질 투여

DBA/1 마우스에 type II collagen과 Freund's adjuvant를 이용하여 관절염이 유발되기 전에 시험물질을 1일 1회, 4주간 경구(Oral gavage)로 투여하면서 시험물질의 항관절염 예방효력(preventive design)을 평가하기 위하여 실시하였다.

### 2.9.4. 시험군

실험군은 6개 군으로 나누어 실험을 진행하였으며, G1군은 관절염 유도하지 않은 마우스의 vehicle control군 (normal DBA/1 mouse, n=5), G2군은 CIA 유도한 mouse의 vehicle control (CIA DBA/1 mouse, n=10), G3은 CIA 유도한 mouse에 차조기 복합추출물 저용량 처리군 (33.3 mg/kg, n=10), G4는 CIA 유도한 mouse에 차조기 복합추출물 중용량 처리군 (66.5 mg/kg, n=10), G5는 CIA 유도한 mouse에 차조기 복합추출물 고용량 처리군 (133 mg/kg, n=10), G6은 CIA 유도한 mouse에 대조약물로 dexamethasone 0.25mg/kg을 처리한 군 (n=10)으로 나누어 실험을 진행하였다.

### 2.8.5. 관절염 스코어

#### (Clinical Arthritis Scoring)

CIA 유발 후 시점부터 주 2회 개체 별로 전지 및 후지의 육안적 소견에 대하여, 관절염스코어 기준에 따라 0점부터 4점/paw (총점 16점)으로 나누어 평가하였으며, 각 단계별로 0.5, 1.5, 2.5, 3.5를 두어 등급을 세분화하였다. 관절염 스코어는 증상이 없는 경우 0점, 1개 관절에 부종 및

발적이 있는 경우 1점, 2개 관절에 부종 및 발적이 있는 경우 2점, 3개 관절에 부종 및 발적이 있는 경우 3점, 4개 이상 관절에 부종 및 발적이 있거나 발 전체 부종이 있는 경우 4점으로 평가하였다.

#### 2.8.6. 발 두께 (Paw thickness) 측정

관절염 유발 후 시점부터 주 2회 개체 별로 electric caliper (Mitutoyo Corp)를 사용하여 paw thickness를 측정하였다.

#### 2.8.7. 통계처리

세포실험의 모든 실험결과는 3회 반복 측정하였으며 평균값±표준편차(mean±S.D)로 표시하였다. 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). 동물 실험의 Clinical Arthritis Scoring 및 Paw Thickness 데이터는 Bartlett's test를 이용하여 유의수준  $\alpha = 0.05$ 로 검정하고, 검정결과 유의성이 없는 데이터들은 일원배치분산분석 (one-way analysis of variance)을 사용하여 유의수준  $\alpha = 0.05$ 로 검정하였고, 유의성이 있는 데이터들은 Kruskal-Wallis test를 사용하여 유의수준  $\alpha = 0.05$ 로 검정하였다. 일원배치분산 검정결과 유의성이 인정된 데이터들은 부형제 투여군(G1 또는 G2)과 시험물질 투여군 (G3~G6)간에 유의한 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's test를 실시하였으며, Kruskal-Wallis test 결과 유의성이 인정된 데이터들은 다중비교법인 Dunn's test를 실시하였다. 통계처리는 GraphPad PRISM ® Version 5.0 (GraphPad Software, USA)을 사용하여 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 차조기 복합추출물이 세포생존율에 미치는 영향

차조기 복합추출물이 RAW264.7 대식세포주의 세포생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT assay를 이용하여 분석하였다. Raw264.7 세포에 차조기 복합추출물을 5, 10, 25ug/ml의 농도로 처리한 후 24시간동안 배양한 후 분석한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 5,

10, 25ug/ml의 농도에서는 Raw264.7 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

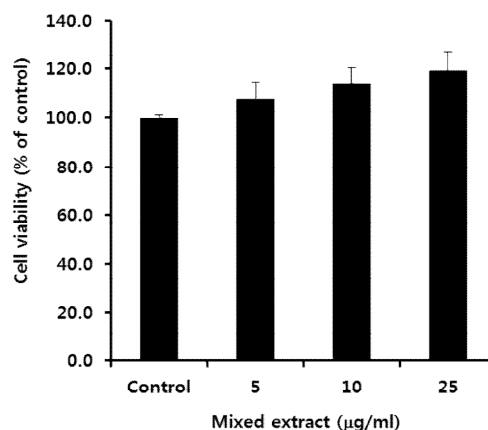


Fig. 1. Effect of mixed extract on cell viability in RAW 264.7 cells. Raw264.7 cells were treated with the mixed extract of 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  for 24hr at 37°C. After then, the cell viability was measured by MTT assay. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

#### 3.2. 차조기 복합추출물의 활성산소 (ROS) 및 NO 생성 저해효과

차조기 복합추출물의 세포독성을 나타내지 않는 농도인 5, 10, 25ug/ml 농도에서 항염증 실험을 수행하였다. 활성산소가 체내에서 과도하게 발생하면 염증, 암, 노화, 심혈관계 질환 등을 유발하게 된다 [26]. 본 연구에서 차조기 복합추출물에 대한 활성산소 저해 효능을 확인한 결과, 5, 10, 25 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 대조군 대비 약 9.1%, 23.9%, 34.3%의 유의성 있는 감소가 나타났다 (Fig. 2A). 이와 같은 결과는 차조기 복합추출물이 활성산소를 효과적으로 제거한다는 가능성을 제시하였다. 과생성된 NO는 ROS와의 결합을 통해 인체 내 분자를 산화시켜 질환 발병이 가속화되는 것으로 알려져 있으므로 [27]. 본 연구에서는 차조기 복합추출물에 의해 NO 생성량이 억제되는지 확인하였다. 연구결과 5, 10, 25ug/ml의 농도에서 대조군 대비 약 6.87%, 12.01%, 36.32%의 유의성 있는 감소가 나타났다 (Fig. 2B). 이와 같은 결과는 과생성된 NO를 대식세포

가 제거 시 육종 차조기 추출물이 효과적인 도움을 주는 원료임을 제시한다. 과생성된 활성산소와 과생성된 NO를 차조기 복합추출물에서 유의적으로 저해시키는 본 결과를 바탕으로 활성산소에 의해 발생한다고 알려진 염증성 질환. 암, 심혈관계 질환, 노화 등의 질환에 활용할 수 있는 원료로서의 가능성을 제시하고 있다.

### 3.3. 차조기 복합추출물에 의한 염증성 사이토카인 생성량의 저해효과

사이토카인이란 백혈구에서 분비되는 활성 물질로 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등은 염증 발생에 관여하는 염증성 사이토카인이다 [28]. IL-1 $\beta$ 는 급성기 질환에서, IL-6와 TNF- $\alpha$ 는 만성기 질환에서 높은 생성량을 보인다 [29, 30]. 본 연구에서 차조기 복합추출물에 대한 염증성 사이토카인 생성량을 확인한 결과, IL-1 $\beta$ 는 10, 25 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 농도에서 유의성 있는 감소를 보였으며 (Fig.3A), IL-6와 TNF- $\alpha$  생성량은 모든 농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다 (Fig. 3B, C). 이와 같은 결과는 차조기 복합추출물이 급성 및 만성단계의 염증성 질환에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 3.4. 차조기 복합추출물에 의한 염증 매개 단백질 생성량의 저해효과

Nuclear transcription factor-kappa-B (NF- $\kappa$ B)는 염증반응과 관련된 여러 유전자 발현에 가장 중요한 역할을 하는 대표적인 전사인자이며, NF- $\kappa$ B의 활성화에 의해 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등 염증 매개물질의 발현이 일어나며, 이를 통하여 다양한 만성 염증 질환이 유발된다 [31, 32]. 본 연구에서 차조기복합추출물에 대한 NF- $\kappa$ B와 COX2, iNOS의 유전자 발현을 확인한 결과 5, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 유의성 있는 감소가 나타났다. NF- $\kappa$ B는 10, 25 농도에서 대조군 대비 10%, 20%의 감소를 보였으며 (Fig.4A), COX-2는 5, 10, 25 농도에서 대조군 대비 11%, 31%, 59%의 감소 결과를 나타내었다 (Fig.4C). 이와 같은 결과는 앞선 염증 매개체의 감소가 전사체인 NF- $\kappa$ B의 감소를 통해 발생한 결과임을 보여주고 있어 차조기 복합추출물의 항염증 효능이 기전적으로 설명되고 있으며, COX-2의 감소결과 역시 앞선 염증 질환에 대한 효과적 원료로서의 활용 가능성을 제시하고 있다. 또한 iNOS의 발현 또한 5,

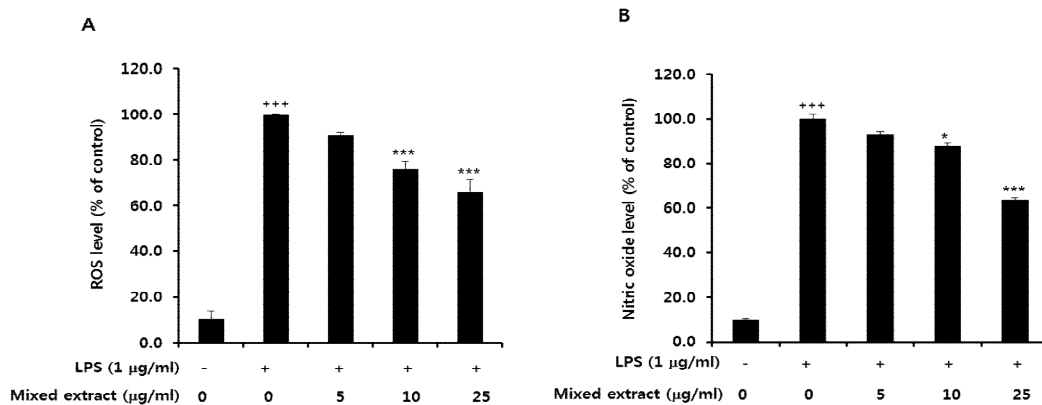


Fig. 2. Effect of mixed extract on the level of ROS and nitric oxide in Raw264.7 cells. A, Raw264.7 cells were stimulated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and treated with the mixed extract 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  for 24hr at 37°C. And then, the ROS level was measured by DCF-DA using flow cytometry. B, Raw264.7 cells were stimulated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) and treated with the mixed extract 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  for 24hr at 37°C. then the nitric oxide level was measured by nitric oxide detection kit as described in materials and methods. The results were expressed as mean $\pm$ S.D. Significance of results, \*\*\* $p$ <0.001 compare to normal, \*\*\* $p$ <0.001 compare to control from three independent experiments.

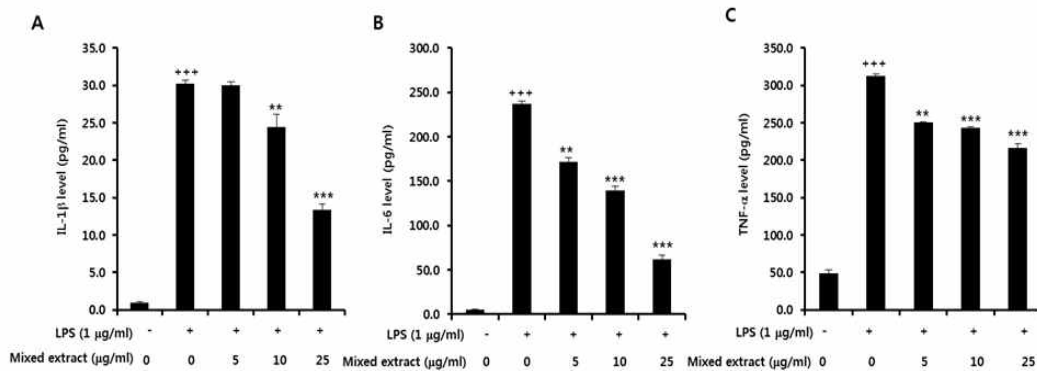


Fig. 3. Effect of mixed extract on the release of inflammatory cytokines in Raw264.7 cells. Raw264.7 cells were stimulated with LPS (1 μg/ml) and treated with the mixed extract 5, 10, 25 μg/ml for 24hr at 37°C, then, the level of cytokines including IL-1β (A), IL-6(B) and TNF-α (C) were measured by ELISA as described in materials and methods. The results were expressed as mean±S.D. Significance of results,  $^{+++}p<0.001$  compare to normal,  $^{***}p<0.001$ ,  $^{**}p<0.01$  compare to control from three independent experiments.

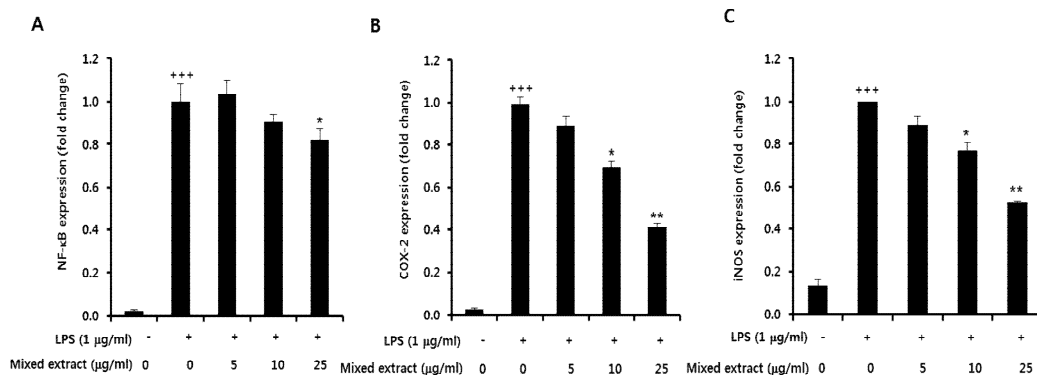


Fig. 4. Effect of mixed extract on the expression of inflammatory proteins. A, Raw264.7 cells were stimulated with LPS (1 μg/ml) and treated with the mixed extract 5, 10, 25 μg/ml for 24hr at 37°C. Then, the mRNA expression of inflammatory proteins including NF-κB (A), COX-2 (B) and iNOS (C) was measured by qRT-PCR. The results were expressed as mean±S.D. Significance of results,  $^{++}p<0.01$  compare to normal,  $^{**}p<0.01$ ,  $^{*}p<0.05$  compare to control from three independent experiments.

10, 25 농도에서 대조군 대비 11%, 23%, 47%의 농도 의존적으로 감소하는 것으로 보아 차조기 복합추출물의 항염증 작용을 억제하는 것으로 판단할 수 있다.

### 3.5. Type II collagen-induced arthritis (CIA) 마우스 모델에서 차조기 복합추출물에 의한 관절염 억제효과

차조기 복합추출물의 항관절염 효능실험을 하기 위해 DBA/1 마우스에 type II collagen으로 유도된 관절염 동물모델에서 효능을 평가하였다.



Type II collagen과 Freund's adjuvant를 이용하여 관절염을 유발하였으며, 관절염 유발 전부터 후까지 시험물질을 1일 1회, 4주간 경구(Oral gavage)로 투여하면서 시험물질의 항관절염 예방 효력(preventive design)을 평가하였다. 실험결과, paw thickness의 경우 부형제 투여군(G2)와 비교하여 큰 차이가 나는 시험군은 없었으나, 대조물질 투여군(G6)에서 후지의 두께가 가장 감소하였으며, Day 4부터 Day 29까지 유의한 변화가 지속되었다. 시험물질 증용량(G4) 및 고용량 투여군(G5)의 경우 Day 18부터 Day 29까지 후지의 두께가 감소하였으며, 유의한 변화가 관찰되었다 (Fig.5A). Clinical arthritis scoring의 경우 부형제 투여군(G2)와 비교하여 Day 4부터 Day 18까지 시험물질 투여군 (G3~G5) 및 대조물질 투여군(G6)에서 감소하였으나, 시험물질 저용량 투여군(G3)의 전지가 Day 22부터 붓기 시작하여

점수가 크게 상승하여 이후로는 부형제 투여군 (G2)와 비교하여 차이가 나질 않았다. 시험물질 증용량(G4) 및 고용량 투여군(G5)의 경우 시기별로 차이는 있었으나 전반적으로 유사한 clinical arthritis scoring이 관찰되었으며, 대조물질 투여군(G6)의 scoring 감소가 가장 컸고, 다음으로 G5 및 G4의 순으로 관찰되었다 (Fig.5B). 이상의 결과를 종합하였을 때, clinical arthritis scoring 및 Paw Thickness의 경우 대조물질 투여군(G6)에서 유의한 변화와 함께 가장 감소하였으며, 다음으로 시험물질 증용량(G4) 및 고용량 투여군 (G5)의 순으로 관찰되었다. 결론적으로 차조기복합추출물의 항관절염 효능을 평가한 결과, 차조기 복합추출물 66.5, 133.0 mg/kg/day에서 항관절염 예방효력이 있는 것으로 사료된다.

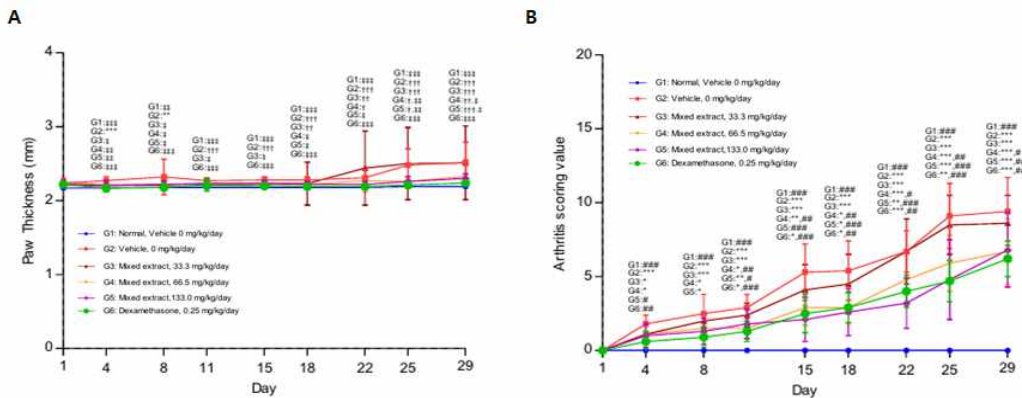


Fig. 5. Effect of mixed extract on Type II collagen-induced arthritis (CIA) mouse model. Type II collagen and Freund's adjuvant were injected in DBA/1 mice to induction of arthritis. Mixed extract was orally administrated and dexamethasone (positive control) was ip injected in mice before and after induction of arthritis for 4weeks every day. A, Clinical arthritis score was measured twice a week after induction of CIA as described in materials and methods. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, vs G1. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test, †: p<0.05, ††: p<0.05, †††: p<0.001, vs G1. Statistics by Kruskal-Wallis Test and Dunn's Multiple Comparison Test, ‡: p<0.05, ‡‡: p<0.01, ‡‡‡: p<0.001, vs G2. Statistics by Kruskal-Wallis Test and Dunn's Multiple Comparison Test. B, Paw thickness was measured with electric caliper twice a week after induction of CIA. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, vs G1. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test #: p<0.05, ##: p<0.01, ###: p<0.001, vs G2. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test.

#### 4. 결론

본 연구는 방사선 육종 차조기와 백출의 초임계 유체 추출 혼합물 (이하 차조기 복합추출물)의 항관절염 소재로써 안전성과 가능성을 검증하고자 세포에서의 세포독성 및 항산화, 항염증 등과 관련된 대표 매개체의 연구 및 동물에서의 항관절염 연구를 진행하였으며, 결과는 다음과 같다.

1. 차조기 복합추출물은 RAW 264.7 세포에서 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않은 것이 확인되었다.
2. 차조기 복합추출물은 과생성된 활성산소 (ROS)의 생성을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 약 9.1%, 23.9%, 34.3%로 유의성 있게 감소시켰으며, 일산화질소 (NO) 생성을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 약 6.87%, 12.01%, 36.32%로 유의성 있게 감소시켰다.
3. 차조기 복합추출물은 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ 의 생성을 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 19.2%, 55.7% 감소시켰으며, IL-6의 생성을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 27.5%, 41.4%, 74% 감소시켰으며, TNF- $\alpha$ 의 생성을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 20%, 22.4%, 30.7%로 유의성 있게 감소시켰다.
4. 차조기 복합추출물은 NF- $\kappa$ B 발현을 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 각각 10%, 20% 감소시켰으며, COX-2의 발현을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 11%, 31%, 59%의 감소를 나타내었다. 또한 iNOS의 발현을 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군 대비 11%, 23%, 47%의 감소를 나타내었다.
5. 차조기 복합추출물은 type II collagen induced arthritis (CIA) 동물모델에서 66.5와 133mg/kg/day 농도에서 항관절염 효능을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 차조기 복합추출물은 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 활성산소 및 염

증 매개체의 감소가 효과적인 것으로 나타났으며, 66.5와 133 mg/kg/day 농도에서 항관절염 효능을 나타낸 것으로 보아 관절염에 임상적으로도 효과가 있을 것으로 판단된다. 따라서 관절염 식의약품 소재로 충분히 개발 가능성이 있는 가능성을 과학적으로 증명하였다.

#### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 2020년 광역협력권산업육성사업 (P0006184)으로 수행된 연구결과입니다.

#### References

1. H. I. Jun, B. T. Kim, G.S Song, Y.S Kim. "Structural characterization of phenolic antioxidants from purple perilla (*Perilla frutescens* var. *acuta*) leaves". *Food Chem*, Vol.148, pp. 367-372, (2014).
2. Y. Peng, J. Ye, Y. J. Kong, "Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection". *J Agric Food Chem*, Vol.53, No.21, pp. 8141-8147, (2005).
3. H. U. Son, J. C. Heo, M. S. Seo, S. H. Lee, "Effects of *Perilla frutescens* L. on anti-oxidant and anti-inflammation activity", *Korean J Food Preserv*, Vol.17, No.5. pp. 757-761, (2010).
4. J. H. Lee, K. H. Park, M. H. Lee, H. T. Kim, W. D. Seo, J. Y. Kim, I.Y. Beak, J.D. S. Jang, T. J. Ha, "Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars", *Food Chem*, Vol.136, No.2, pp. 843-852, (2013).
5. X. J. Zhou, L. L. Yan, P. P. Yin, L. L. Shi, J. H. Zhang, Y. J. Liu, C. Ma, "Structural characterisation and antioxidant activity evaluation of phenolic compounds

- from cold-pressed *Perilla frutescens* var. *arguta* seed flour", *Food Chem*, Vol.164, pp. 150-157, (2014).
6. C. H. Jin, H. J. Lee, Y. D. Park, D. S. Choi, D. S. Kim, S. Y. Kang, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon- $\beta$ -STAT-1 pathway", *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol.58, No.2, pp. 860-867, (2009).
  7. B. O. Cho, C. H. Jin, Y. D. Park, H. W. Ryu, M. W. Byun, K. I. Seo, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone induces apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways in human DLD1 cells", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Vol.75, No.7, pp. 1306-1311, (2011).
  8. Y. K. So, Y. H. Jo, B. M. Nam, S. Y. Lee, J. B. Kim, S. Y. Kang, C. H. Jin, "Anti-obesity effect of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* (L.) Britt. cv. Leaves", *Korean J. Pharmacogn*, Vol.46, No.1, pp. 1-6, (2015).
  9. Y. D. Park, Y. M. Lee, M. A. Kang, H. J. Lee, C. H. Jin, D. S. Choi, I. Y. Jeong, "Phytochemical profiles and in vitro anti-inflammatory properties of *Perilla frutescens* cv. Chookyoupjaso mutants induced by mutagenesis with  $\gamma$ -ray", *Food science and biotechnology*, Vol.19, No.2, pp. 305-311, (2011).
  10. C. H. Jin, H. C. Park, Y. So, B. Nam, S. N. Han, J. B. Kim, "Comparison of the Anti-Inflammatory Activities of Supercritical Carbon Dioxide versus Ethanol Extracts from Leaves of *Perilla frutescens* Britt. Radiation Mutant", *Molecules*, Vol.22, No.2, pp. E311, (2017).
  11. B. Nam, Y. So, H. Y. Kim, J. B. Kim, C. H. Jin, A. R. Han, "A New Monoterpene from the Leaves of a Radiation Mutant Cultivar of *Perilla frutescens* var. *crispa* with Inhibitory Activity on LPS-Induced NO Production", *Molecules*, Vol.22, No.9, pp. E1471, (2017).
  12. C. H. Jin, Y. So, H. Y. Kim, S. N. Han, J. B. Kim, "Anti-Arthritic Activities of Supercritical Carbon Dioxide Extract Derived from Radiation Mutant *Perilla frutescens* Var. *Crispa* in Collagen Antibody-Induced Arthritis", *Nutrients*, Vol.11, No.12, pp. E2959, (2019).
  13. B. R. Yun, J. B. Weon, B. Lee, J. Lee, M. R. Eom, J. M. Choong, "Quantitative Analysis of Atractylenolides I and III in *Atractylodes japonica*", *Kor. J. Pharmacogn*, Vol.44, No.1, pp. 53-59, (2013).
  14. J. H. Han, J. H. Kim, S. G. Kim, S. H. Jung, D. H. Kim, G. E. Kim, W. K. Whang, "Anti-oxidative Compounds from The Aerial Parts of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi", *YAKHAK HOEJI*, Vol.51, No.2, pp. 88-95, (2007).
  15. S. O. Lee, J. H. Seo, J. W. Lee, M. Y. Yoo, "Inhibitory effects of the rhizome extract of *Atractylodes japonica* on the proliferation of human tumor cell lines", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.36, No.3, pp. 201-204, (2005).
  16. J. H. Kim, "Volatile terpenes from genus *Atractylodes* rhizomes identified by gas chromatography-mass spectrometry", *Korean Herb Med Inf*, Vol.6, No.1, pp. 1-17, (2018).
  17. K. Junichi, K. Akane, I. Toru, T. Akihito, F. Tatsuo, I. Susumu, I. Yoshiteru, "Glycosides of *Atractylodes japonica*", *Chem. Pharm. Bull*, Vol. 51, pp. 152-157, (2003).
  18. S. Xu, X. Qi, Y. Liu, Y. Liu, X. Lv, J. Sun, Q. Cai, "UPLC-MS/MS of Atractylenolide I, Atractylenolide II, Atractylenolide III, and Atractyloside A in Rat Plasma after Oral Administration of Raw and Wheat Bran-Processed *Atractylodis Rhizoma*.", *Molecules*, Vol.23, No.12 pp. pii: E3234, (2018).
  19. S. Hoang le, M. H. Tran, J. S. Lee, Q.

- M. Ngo, M. H. Woo, B. S. Min, "Inflammatory Inhibitory Activity of Sesquiterpenoids from *Atractylodes macrocephala* Rhizomes", *Chem Pharm Bull*, Vol.64, No.5, pp. 507-511, (2016).
20. H.L. Huang, T.W. Lin, Y.L. Huang, R.L. Huang, "Induction of apoptosis and differentiation by atractylenolide-1 isolated from *Atractylodes macrocephala* in human leukemia cells", *Bioorg Med Chem Lett*, Vol. 26, No.8, pp. 1905-1909, (2016).
21. C.H. Jeon, "Adverse Events of Glucocorticoids and Their Prevention", *J Korean Med Assoc*, Vol.51, No.2, pp. 189-196, (2008).
22. T.P. Warrington, J.M. Bostwick, "Psychiatric adverse effects of corticosteroids", *Mayo Clin Proc*, Vol.81, pp. 1361-1367, (2006).
23. D.S. Kim, "The duplication of NSAIDs and management plan", *HIRA Policy Trend*, Vol.7, No.4, pp. 7-8, (2013).
24. S.C. Park, H.J. Chun, C.D. Kang, D. Sul, "Prevention and management of non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced small intestinal injury", *World J Gastroenterol*, Vol.17, pp. 4647-4653, (2011).
25. K. Takeuchi, H. Satoh, "NSAID-induced small intestinal damage--roles of various pathogenic factors", *Digestion*, Vol.91, pp. 218-232, (2015).
26. H. S. Jung, K. H. Noh, H. Y. Cho, J. Y. Park, C. Y. Choi, T. W. Kwon, Y. S. Song, "Effect of buchu (*Allium tuberosum*) on lipid peroxidation and antioxidative defense system in streptozotocin-induced diabetic rats", *Korean J Life Sci*, Vol.13, No.3, pp. 333-342, (2003).
27. I. P. Choi, "Oxygen free radical and Cancer", *Hanyang Medical Reviews*, Vol.33, No.2, pp. 118-122, (2013).
28. J. Furuzawa-Carballeda, M. I. Vargas-Rojas, A. R. Cabral, "Autoimmune inflammation from the Th17 perspective", *Autoimmun Rev*, Vol.6, No.3, pp. 169-175, (2007).
29. L. Koelman, O. Pivovarova-Ramich, A. F. H. Pfeiffer, T. Grune, K. Aleksandrova, "Cytokines for evaluation of chronic inflammatory status in ageing research: reliability and phenotypic characterisation", *Immun Ageing*, Vol.16, pp. 11, (2019).
30. A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill, Cancer-related inflammation. *Nature*, Vol.454, pp. 436-444, (2008).
31. S. J. Park, J. S. Shin, W. Cho, Y. W. Cho, E. M. Ahn, N. I. Baek, K. T. Lee, "Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by kaempferol-3-O- $\beta$ -D-sophoroside through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 cells", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.39, No.2, pp. 95-103, (2008).
32. S. F. Liu, A. B. Malik, "NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation", *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol.290, No.4, pp. 622-645, (2006).