

RAW 264.7 Cell에서 세이지에 의한 염증성 Cytokine 및 iNOS 억제 효과

현은아 · 이혜자 · 윤원종 · 박수영 · 강희경 · 김세재* · 유은숙#
제주대학교 의과대학 약리학교실, *제주대학교 자연과학대학 생명과학과
(Received March 22, 2004; Revised April 19, 2004)

Inhibitory Effect of *Salvia officinalis* on the Inflammatory Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthesis in Murine Macrophage RAW264.7

Eun-A Hyun, Hye-Ja Lee, Weon-Jong Yoon, Soo-Young Park, Hee-Kyoung Kang, Se-Jae Kim* and Eun-Sook Yoo#
Department of Pharmacology, College of Medicine, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea
College of Natural Science, *Department of Life Science, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

Abstract — Primary pro-inflammatory cytokines are a trio : tumor necrosis- α (TNF- α), interleukine-1 β (IL-1 β), and interleukine-6 (IL-6). These cytokines initiate and regulate the acute-phase inflammatory response during infection, trauma, or stress and appear to play an important role in the immune process. Nitric oxide (NO) is a multi-functional mediator, which plays an important role in regulating various biological functions *in vivo*. NO production by inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages is essential for the defense mechanisms against microorganisms and tumor cells. However, over-expression of iNOS by various stimuli, resulting in over-production of NO, contributes to the pathogenesis of septic shock and some inflammatory and auto-immune disease. Solvent fractions of sage (*Salvia officinalis* L.), which is cultivated in Jeju Do, was assayed for their effects on TNF- α and IL-6 production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Hexane and ethylacetate (EtOAc) fraction of sage inhibited the protein and mRNA expression of TNF- α and IL-6 in LPS stimulated RAW 264.7 cells at the concentration of 100 μ g/ml. Also, incubation of RAW 264.7 cells with the fraction of hexane or EtOAc (50 μ g/ml) inhibited the LPS induced nitrite accumulation and the LPS/IFN- γ induced iNOS protein. And this inhibition of iNOS protein is concordant with the inhibition of iNOS mRNA expression. Above results suggest that extract of sage may have anti-inflammatory activity through the inhibition of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), iNOS and NO.

Keywords □ inflammation, *Salvia officinalis* L., tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide

최근, 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 염증질환과 류마티스관절염, 천식과 같은 만성 염증질환이 증가하는 추세이다. 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이다.¹⁾ 염증을 일으키는 요인 중에서 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다.²⁾ 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등과 같은 질환의 요인이 되기도 한다.

Gram-negative bacteria의 세포외막에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포외막으로부터 방출되어 gram-negative sepsis와 septic shock를 일으킨다. LPS는 RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 pro-inflammatory cytokine 인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6(IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)을 증가시키고, 특히 TNF- α , IL-1 β 는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현을 유도한다.

iNOS는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장 시간동안 다량의 nitric oxide(NO)를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.³⁻⁷⁾

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 064-754-3847 (팩스) 064-702-2687
(E-mail) eunsyoo@cheju.ac.kr

허브(Herb)는 라틴어의 herba에서 비롯된 '푸른 풀'이라는 뜻이지만 현대에 와서는 줄기, 잎, 꽃, 뿌리 등의 부위가 인간에게 유용하게 이용되는 식물의 총칭의 의미로 쓰이고 있다. 허브는 대략 2,500여종으로 꿀풀과, 국화과, 미나리과, 백합과 등이 있으며, 고대 이집트시대 이래 지금까지 서구에서 약초 혹은 향초로서 사용되어져 왔다.^{1,2)} 오래 전부터 허브는 소화촉진, 방부, 항균, 강장, 염증치료, 식욕부진, 살균, 노화방지, 감기치료, 혈액순환 촉진 등의 작용을 이용하여 요리에 첨가하기도 하고 민간요법, 아로마테라피로 이용되어 왔다.^{8,9)}

세이지(sage; *Salvia officinalis* L.)는 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 줄기는 30~90 cm로 자라며 포기 전체에 강한 향기가 있다. 그리고, 예로부터 민간에 널리 알려진 역사가 오래된 약용 식물이며, 지중해연안과 유럽남부에 분포하며 잎은 민간에서 약용 혹은 부향제로 사용된다. 세이지 잎은 강장작용 외에 신경계통이나 소화기계통에 뛰어난 약효가 있으며 방부, 항균, 항염 등 살균 소독작용이 있어 각종 염증에 소염제로 사용되었고, 또한 해열, 구풍, 정혈작용도 알려져 있다. 또한, 세이지를 육류요리에 넣으면 지방을 분해시키는 역할을 하고 소화를 촉진시킨다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 일반적으로 꿀풀과에 많이 포함되어 있는 천연 정유는 면역성증강, 항암 및 노화억제 등 약리적인 효과와 항균, 항산화 활성 등을 가지고 있어 의약, 식품 및 화장품업계에서 이를 이용하려는 연구들이 활발하게 이루어지고 있다.¹¹⁾ 그 중 세이지의 생리활성에 의한 연구는 항산화 활성 연구에 많이 치중되어 왔으나 항염증과 관련된 연구는 미약한 수준이다.¹²⁻¹⁶⁾ 따라서, 본 논문에서는 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 세이지 추출물에 대한 TNF- α , IL-6 및 NO 생성억제효과를 조사하였으며 또한 iNOS의 유전자와 단백질 발현을 검색하였다.

실험방법

시료추출

제주도에서 재배되고 있는 세이지 지상부를 채집하여 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료(65g)를 80% methanol(MeOH)로 2회 교반 추출 후 여과하여 감압농축하여 용매를 증발시켰다. 여기에서 얻은 MeOH 추출물(12.18 g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획(1.45 g), ethylacetate (EtOAc) 분획(1.73 g), butanol(n-BuOH) 분획(1.22 g), H₂O 분획(4.97 g)을 얻어 실험시료로 사용하였다(Fig. 1).

세포 및 시약

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하

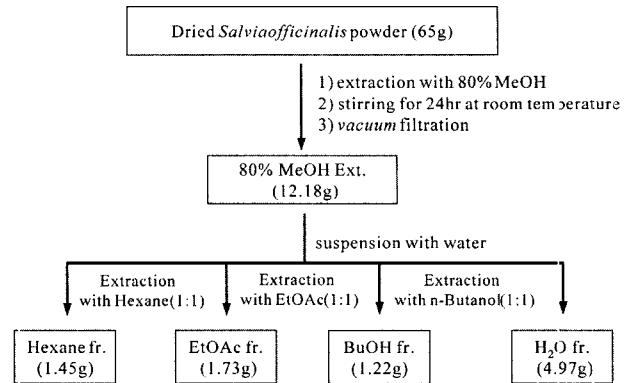


Fig. 1 - Systematic purification using solvent partitioning from *Salvia officinalis* L.

였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* serotype 0111 : B4)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, Interferon- γ (mIFN- γ , recombinant *E. coli*)는 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

In vitro cytokine 생성 및 정량

TNF- α , IL-6 정량은 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 24 microwell plate에 1.0×10^6 cells/ml로 넣고, 18시간 동안 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고, 시료와 LPS 최종농도(1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일조건에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻어 mouse ELISA kit(R&D Systemes, Inc., USA)를 이용하여 정량하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

RAW264.7 세포(1.5×10^6 cells/ml)를 18 시간 전 배양하고 실험 약물과 LPS(최종농도 1 μ g/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent(MRC)를 이용하여 분리하였으며, 모든 실험은 RNase-free한 조건 하에서 이루어졌다.

cDNA 합성은 Improm-IITM cDNA kit(Promega)를 이용하였고, 1 μ g의 total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP(0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70°C 5 min, 37°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 증시시켰다. Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 iNOS, β -actin를 증폭시키기 위하여 2 μ l cDNA, 4 μ M의 5'과 3' primer, 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Fromega, USA)를 섞고 distilled water로 최종 25 μ l로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였

Table I – Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
TNF- α	F 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'	364
	R 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-6	F 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
IL-1 β	F 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	447
	R 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	
iNOS	F 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
β -Actin	F 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 58°C/45초, 72°C/60초 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table I과 같다.

Immunoblotting

RAW264.7 세포(1.0×10^6 cells/ml)를 18시간 전 배양을 하고, LPS(1 μ g/ml)/IFN- γ (50 U/ml)로 자극을 주고 시료(50 μ g/ml)를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 300 μ l의 lysis buffer[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1% Nonidet P40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]을 첨가, 30분~1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 세포막 성분을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ g의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse iNOS (1 : 1000)(Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG(Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 5~10분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

Nitric oxide 측정

RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess

reagent로 측정하였다. RAW264.7 세포(1.5×10^5 cells/ml)를 24 microwell plate에 넣고 18시간 전 배양을 하였다. 이 후 배지를 제거하고, 시료와 LPS(1 μ g/ml)가 함유된 배지를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 100 μ l의 배양액을 96 microwell plate에 넣고 동량의 Griess reagent[0.1% (w/v) N-1-naphthylethylen deamine, 1%(w/v) sulfanilamide in 2.5%(v/v) H₃PO₄]를 첨가하고 10분간 실온에서 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 정량하였다. 표준농도곡선은 NaNO₂를 serial dilution하여 얻었다.

실험결과

Sage 용매분획 추출물의 TNF- α 및 IL-6 억제효과

RAW264.7 세포에 1 μ g/ml의 LPS와 100 μ g/ml의 세이지 용매분획 추출물을 동시 처리하여 염증성 cytokine 억제 효과를 mouse ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- α 를 각각 71.0%, 33.1%, IL-6를 각각 78.1%, 70.2% 억제하였다(Table II). 또한 실험에 사용된 농도는 세포독성 평가에서 독성을 나타내지 않았다(결과는 나타내지 않음).

Sage 용매분획 추출물의 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에서 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6와 IL-1 β 를 mRNA 수준에서 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 1 μ g/ml의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을 100 μ g/ml 농도로 처리하였을 때 hexane, EtOAc 분획물이 TNF- α 와 IL-6 발현을 강하게 억제하였으며, hexane 분획물이 IL-1 β 발현을 강하게 억제하였고, EtOAc 분획물은 약한 IL-1 β 발현 억제 효과를 보였다(Fig. 2).

Sage 용매분획 추출물의 iNOS의 mRNA 발현 및 protein level에 미치는 영향

RAW264.7 세포에서 iNOS의 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으

Table II – The effect of solvent fractions of *S. officinalis* on LPS induced TNF- α and IL-6 release in RAW264.7 cells

Fraction	Inhibition (%)	
	TNF- α	IL-6
MeOH	33.72	33.65
Hexane	71.03	78.05
EtOAc	33.09	70.24
BuOH	-	-
H ₂ O	2.29	2.28

The productions of TNF- α and IL-6, were assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells (1.0×10^6 cells/ml) stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of testing samples (100 μ g/ml).



Fig. 2 – Inhibitory effects of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) in LPS (1 μ g/ml) stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 Cells (1.5×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines were determined from the 6 hr culture of cells stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of testing samples (100 μ g/ml).

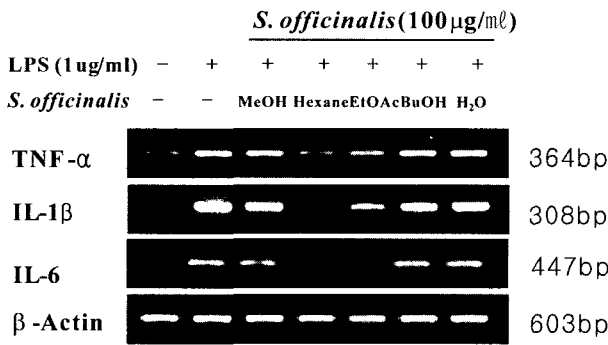


Fig. 3 – Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of iNOS in LPS (1 μ g/ml)-stimulated RAW264.7 cells. RAW264.7 cells (1.5×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of iNOS were determined from the 24 hr culture of cells stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of testing samples (50 μ g/ml).

로 조사하였다. 1 μ g/ml의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을 50 μ g/ml 농도로 처리하였을 때, hexane 분획물이 가장 강한 발현 억제효과를 나타내었고, EtOAc 분획물과 BuOH 분획물에서도 iNOS 발현이 현저하게 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 그리고, iNOS의 protein level에 미치는 억제효과를 Immunoblot 방법으로 분석하였다. Hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 iNOS 단백질이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

Sage 용매분획 추출물의 NO 생성억제 활성 측정

세이지 용매분획 추출물이 iNOS의 산물인 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 NO 생성량을 측정하였다. 1 μ g/ml의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을 50 μ g/ml

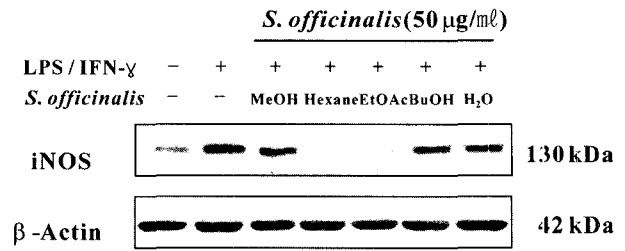


Fig. 4 – Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the protein level of iNOS activated with LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (50 U/ml) in murine macrophage cell line RAW264.7. RAW264.7 cells (1.0×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (50 U/ml) in the presence of testing samples (50 μ g/ml) for 24 hr.

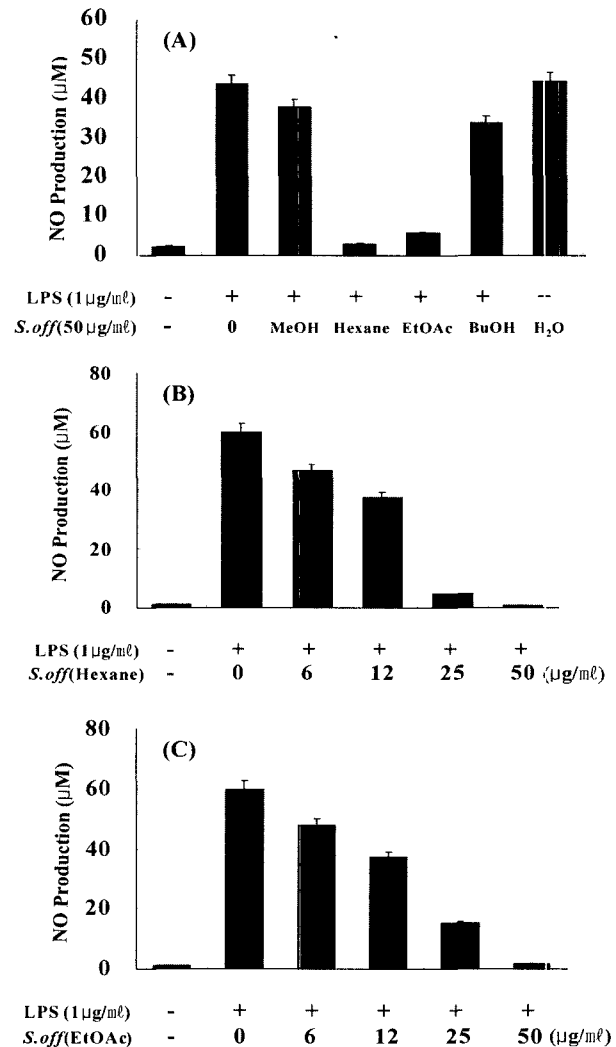


Fig. 5 – The effect of solvent fractions (A), hexane fraction (B) and EtOAc fraction (C) of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells. The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells (1.5×10^5 cells/ml) stimulated by LPS (1 μ g/ml) in the presence of testing samples.

m/ 농도로 처리하였을 때 LPS 단독 처리군에서 43.36 μ M로 생성되었으나 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 각각 NO 생성량이 2.93 μ M, 5.54 μ M로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5(A)). Hexane 분획물과 EtOAc 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5(B), 5(C)). Hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서의 NO 생성 억제율에 대한 IC₅₀ 값은 각각 16 μ g/ml, 18 μ g/ml이었다.

고찰 및 결론

Monocyte 및 macrophage는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 한다. Gram-negative bacteria의 세포외막에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포외막으로부터 방출되어 gram-negative sepsis와 septic shock를 일으킨다. LPS는 RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte로부터 pro-inflammatory cytokine으로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6(IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)을 증가시킨다. TNF- α 와 같은 다기능성 cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변과정에서 그 발현 정도가 증가되며 피부염증, 류마티스 관절염과도 관련이 있다.¹⁷⁻²⁰⁾

Nitric oxide(NO)는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 무기 저분자 라디칼로서 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절 및 중앙세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 등에 관여하고 있다.²¹⁾ NO를 생성하는 효소(NOS : nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS(c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS(iNOS)로 두 가지로 크게 분류된다. 하지만, 염증반응 등에 의해 생성되는 NO는 lipopolysaccharide(LPS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 또는 interferon- γ (IFN- γ)에 의해 자극 받은 대식세포, 간세포, 신장세포에서 생성되는 iNOS에 의해 유도된다.²²⁾

Inducible nitric oxide synthase(iNOS)는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이렇게 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라, cyclooxygenase(COX)를 활성화하여 prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. iNOS에 의한 NO 생성은 iNOS 유전자의 발현에 의존하므로 iNOS 유전자의 발현에 영향을 주는 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 cytokine이나 다른 chemical을 억제시킴으로서 조절할 수 있다.

이러한 과정을 설명하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS(1 μ g/ml)로 자극시켜 세이지(Sage; *Salvia officinalis* L.)의 용매분획 추출물을 세포독성이 없는 농도에서 처리하여 TNF- α , IL-6 생성을 관찰한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- α 생성과 IL-6 생성을 LPS 단독처리 군에 비하여 생성 억제효과를 나타내었다. 또한 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현을 LPS 단독처리 군에 비하여 현저하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 염증 전구물질인 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다.^{23,24)} 분자적 수준에서 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6을 유의적으로 억제하는 것은 이러한 사실을 뒷받침해 주는 것이라 할 수 있다.

그리고, LPS에 의한 iNOS의 발현 정도를 mRNA 수준과 단백질 수준에서 관찰한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 LPS 단독처리 군에 비하여 iNOS 발현을 현저하게 억제시키는 것을 확인 할 수 있었고, iNOS의 산물인 NO 생성량도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, NO의 생성 억제는 iNOS의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.²⁵⁾ 이러한 iNOS 발현에는 NF- κ B가 promoter로 작용하여 발현을 조절함으로써 이러한 유전자의 발현 조절물질 등의 활성화 연구되어야 한다.

본 실험 결과를 요약하면, 세이지의 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 iNOS의 발현 및 NO 생성 그리고 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성을 강하게 억제되는 것을 알 수 있었으며, 세이지의 유효 성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구와 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 지정 제주대학교 아열대원산업연구센터 지원으로 수행되었기에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Park, S. Y., Lee, H. J., Hyun, E. A., Moon, J. Y., Yang, H. C., Lee, N. H., Kim, S. J., Kang, H. K. and Yoo, E. S. : Inhibitory effect of eurya emarginata on the production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage RAW264.7. *Yakhak Hoeji* **47**, 5 (2003).
- 2) Willoughby, D. A. : Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34** (1971).
- 3) Scott, M. G. and Hancock, R. E. : Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20** (2000).

- 4) An, S. J., Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Jeong, S., Jang, S. I., Oh, H., Kwon, T. O., Song, C. E. and Chung, H. T. : Inhibition of TNF- α , IL-1 β and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int. Immunopharmacol.* **2** (2002).
- 5) Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y. and Ryu, J. H. : Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **42**, 5 (1998).
- 6) Axtelle, T. and Pribble, J. : IC14, a CD14 specific monoclonal antibody is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J. Endotoxin Res.* **7** (2001).
- 7) Mukai, N., Ishikawa, Y., Ikeda, N., Fujioka, N., Watanabe, S. and Kuno, K. : Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock; biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* **59** (1995).
- 8) Ryoo, J. W. and Cha, B. C. : Mineral content and antioxidative activity in some herb plants. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **6**, 1 (1998).
- 9) Chung, H. Y. and Kim, H. B. : *In vitro* studies on the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 3 (2000).
- 10) 최영전 : 허브와 스파이스 가이드북. 도서출판 예가 p. 258 (1998).
- 11) Song, E. S., Ku, C. S., Mun, S. P., Ryu, J. S., Kim, D. H., Choi, J. S. and Choi, Y. G. : Volatile aroma compounds and their characteristics of Labiatae by solid-phase microextraction (SPME). *Kor. J. Med. Crop Sci.* **10**, 2 (2002).
- 12) Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M. J. : Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* **83** (2003).
- 13) Cuppett, S. L. and Hall, C. A. : Antioxidant activity of the Labiatae. *Adv. Food Nutr. Res.* **42** (1998).
- 14) Bandonien, D., Venskutonis, P. R., Gruzdien, D. and Murkovic, M. : Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** (2002).
- 15) Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. : Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science* **162** (2002).
- 16) Hohmann, J., Rdei, D., Mth, I. and Blunden, G. : Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **31** (2003).
- 17) Ashutosh, K. M., Amita, A. and Sita, N. : Gold sodium thimalaate (GSTM) inhibits lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor- α through ceramide pathway. *Cell. Immunol.* **219** (2002).
- 18) Groves, R. W., Allen, M. H. and Ross, E. L. : Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br. J. Dermatol.* **32** (1994).
- 19) Wakefield, P. E., James, W. D., Samlaska, C. P. and Metzges, M. S. : Tumour necrosis factor. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24** (1991).
- 20) Ishii, R., Horie, M., Saito, K., Arisawa, M. and Kitanaka, S. : Inhibition of lipopolysaccharide induced pro-inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor- κ B activation by *Mallotus japonicus* phloroglucinol derivatives. *Biochim. Biophys. ACTA* **1620** (2003).
- 21) Korean society of medical biochemistry and molecular biology : Trends in medical research. *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology* **64** (1998).
- 22) Tezuka, Y., Irikawa, S., Kaneko, T., Banskota, A. H., Nagaoka, T., Xiong, Q., Hase, K. and Kadota, S. : Screening of chinese herval drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. *J. Ethnopharmacol.* **77** (2001).
- 23) Feldmann, M., Brennan, F. M. and Maini, R. N. : Role of cytokine in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14** (1996).
- 24) Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N. and Matsushima, K. J. : Essential involvement of interleukin-8 in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 5 (1994).
- 25) Kim, R. G., Shin, K. M., Chun, S. K., Ji, S. Y., Seo, S. H., Park, H. J., Choi, J. W. and Lee, K. T. : *In vitro* antiinflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **46**, 5 (2002).