

## LPS 주사한 BALB/c 마우스에서 Genistein의 산화적 스트레스 억제효과 및 항염증 효과

조혜연<sup>1</sup> · 노경희<sup>2</sup> · 조미경<sup>2</sup> · 장지현<sup>2</sup> · 이미옥<sup>3</sup> · 김소희<sup>4</sup> · 송영선<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의과대학 백인제기념 임상의학연구소

<sup>2</sup>인제대학교 BK21 식의약생명공학과, 식품과학연구소 및 바이오헬스소재연구센터

<sup>3</sup>영산대학교 한국식품조리학과, <sup>4</sup>동주대학 외식조리제과과계열

## Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Genistein in BALB/c Mice Injected with LPS

Hye-Yeon Cho<sup>1</sup>, Kyung-Hee Noh<sup>2</sup>, Mi-Kyung Cho<sup>2</sup>, Ji-Hyun Jang<sup>2</sup>,  
Mi-Ok Lee<sup>3</sup>, So-Hee Kim<sup>4</sup>, and Young-Sun Song<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Paik Inje Memorial Clinical Research Institute, School of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea

<sup>2</sup>BK21 Center of Smart Foods and Drugs, Food Science Institute, and Biohealth

Product Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

<sup>3</sup>Korean Food & Culinary Arts Department, Youngsan University, Busan 612-743, Korea

<sup>4</sup>School of Culinary Art & Baking Technology, Dong-Ju College, Busan 604-080, Korea

### Abstract

This study was carried out to investigate the anti-oxidative and anti-inflammatory actions of genistein in BALB/c mice injected with lipopolysaccharide (LPS), called endotoxin. Mice (10 weeks of age) weighing approximately 20 g were divided into 4 groups. Endotoxin shock was induced by intraperitoneal injection of LPS (100 mg/kg BW). LPS and genistein+LPS groups were injected with LPS 30 min after phosphate buffered saline (PBS) solution and genistein (200 mg/kg BW) injections, respectively. Genistein group was injected with genistein, followed by PBS, while PBS group received two injections of PBS. Superoxide anion generation of peritoneal macrophage cells was significantly ( $p<0.05$ ) lower in the genistein+LPS group than in the LPS injection group at 8 h after intraperitoneal injection, while SOD activity was significantly higher in genistein+LPS group than LPS group. Tumor necrosis factor- $\alpha$  levels of plasma were significant lower ( $p<0.05$ ) in the genistein+LPS injection group than LPS group at 8 h after intraperitoneal injection. Plasma TBARS was lower in genistein+LPS group than LPS group, while hepatic TBARS were not different among groups. Hepatic glutathione concentrations and antioxidant enzyme activities were significantly higher in the genistein+LPS group than in the LPS group at 1 h and 8 h after intraperitoneal injection. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) transactivation was significantly ( $p<0.05$ ) inhibited in LPS group. These results demonstrate genistein may ameliorate inflammatory diseases through inhibition of NF- $\kappa$ B transactivation and oxidative stress, which may be mediated partially by anti-oxidative effect of genistein.

**Key words:** anti-oxidative and anti-inflammatory effects, LPS, genistein, NF- $\kappa$ B, BALB/C mice

### 서 론

대두에 다량 함유된 이소플라본은 페놀화합물로 aglycone 형태인 genistein, daidzein, glycitein 등과 이들의 배당체인 genistin, daidzin, glycitin 등이 있다(1). Aglycone 형태의 이소플라본은 구조적으로 에스트로겐과 유사하여 에스트로겐 활성을 나타내어 phytoestrogen으로 분류된다(2). 또한 이소플라본은 항산화 활성(3,4)과 자유라디칼 소거능이 있어(5) LDL-콜레스테롤 산화를 억제하고(6) 세포내 산

화적 스트레스에 대한 방어효과가 보고되었으며(7,8) *in vivo*에서는 혈중 과산화물 저하와 간세포에서의 catalase 활성 증가가 보고되었다(9-11). 그러나 이소플라본의 항산화 작용에 대한 기작은 아직 확실히 규명되지 않았으나 여러 임상시험결과와 meta analysis는 이소플라본이 항산화효과를 통하여 항동맥경화효과를 나타낸다고 보고하고 있다(12-16). Genistein(5,7,4'-trihydroxyisoflavone)은 대두에 3 mg/g 수준으로 존재하며(17), LDL의 지질과산화를 억제하는 효과가 있고(18), tyrosine kinase의 발현과 human can-

\*Corresponding author. E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr  
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

cer cell lines의 증식을 저해하는 것으로 보고되었다(19,20). 또한 genistein의 심장보호 기능과 골다공증 예방능 역시 항산화 효과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(21-24).

산화적 스트레스는 노화의 일반적인 과정일 뿐 아니라 여러 질병을 야기하는 1차적인 요인으로 알려지고 있다. 활성 산소종과 염증성 cytokine은 산화적 스트레스와 관련이 있다고 알려져 왔으며, 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 병리학적 측면에서 매개체로서 중요한 역할을 한다. 내독소 자극은 대식세포와 반응하여 내독소를 제거하는데 기여하나 대식세포가 과도하게 자극되면 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (이하 TNF- $\alpha$ )와 같은 내독소의 매개체와 단백질분해효소 및 활성 산소종 생성을 통해 염증반응과 산화적 스트레스를 증가시키게 된다.

혈청의 지질수준이 동맥경화 유발을 설명하는 주요한 부분이지만 산화적 스트레스와 같은 다른 위험인자들, 내피세포의 활성화 및 plaque의 안정성 등이 현재 동맥경화 유발의 중요한 기여자로서 인정되고 있다(25). 동맥경화와 산화적 스트레스 및 염증과의 관련성은 죽상동맥경화의 진행과정에서 활성화된 대식세포는 여러 가지 cytokine과 활성 산소종을 생성하여 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-kappa B(이하 NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며 그 결과 inducible nitric oxide synthase와 cyclooxygenase-2를 발현시켜 염증을 일으키고 세포 부착 분자인 vascular cell adhesion molecule-1 및 intracellular adhesion molecule-1과 monocyte chemoattractant protein-1 등을 발현시켜 혈액 중의 monocyte 유입을 도와 동맥경화를 계속 진행시킨다(26,27). 그러므로 동맥경화는 산화적 스트레스에 의해 활성화된 대식세포가 중요한 역할을 담당하는 만성적 염증질환이라 할 수 있다(28). LPS에 의한 염증 매개체와 cytokines의 생성은 NF- $\kappa$ B와 같은 전사 인자의 활성화에 의한 유전자 발현에 의존하며(29,30), NF- $\kappa$ B는 세포의 산화환원전위 수준에서 변화하는 세포의 반응에서 초기 반응 유전자의 가능한 생리적 중요성과 기작을 연구하는 특별한 생화학적 지표이기도 하다.

따라서 본 연구에서는 내독소인 lipopolysaccharide(이하 LPS)로 산화적 스트레스를 유발시킨 BALB/c mice에 genistein을 투여하였을 때 TNF- $\alpha$ , TBARS, superoxide anion 농도와 GSH, 항산화효소계 활성화, 그리고 NF- $\kappa$ B trans-activation에 미치는 영향을 조사하여 genistein이 내독소에 의한 산화적 스트레스와 염증반응을 억제하는 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 관리 및 실험계획

암컷 BALB/c mice에 치명적인 내독소인 LPS를 주입한 후 복강 대식세포에 의해 내독소의 치명적인 효과에서 아주

중요한 역할을 하는 산화적 스트레스 매개물질인 superoxide anion과 TNF- $\alpha$ 의 생성이 유의적으로 증가하였다고 보고한 Victor와 De Lafuente(31) 및 Chae (32)의 연구에 기초하여 10주령의 BALB/c mice중 암컷 120수를 2주간의 적응기를 거쳐 평균체중 20 g인 실험동물을 완전입의배치로 plastic cage에서 사육하였다. 사육실의 온도는 20~25°C로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. LPS로 유도된 산화적 스트레스 및 대식세포의 기능 조절에 미치는 genistein의 영향을 확인하고자 LPS(*E. coli* 055:B5 LPS)를 mouse의 복강으로 투여하여 내독소 자극을 유발시켰다. 이때 투여한 LPS의 농도는 예비실험 및 Victor와 De Lafuente(31)의 연구를 통하여 mice의 체중 kg당 100 mg 농도로 결정하였다. 실험동물은 4군으로 분류하여 실험하였으며 정상대조군(PBS군)은 phosphate buffered saline solution(이하 PBS)를 복강 속으로 투여하여 30분경과 후 다시 PBS를 투여하였으며, genistein대조군은 genistein을 체중 kg당 200 mg으로 투여한 30분 후 PBS를 투여하였다. LPS군은 PBS를 투여한 30분 후 LPS를 체중 kg당 100 mg 농도로 투여하였고, genistein+LPS군은 체중 kg당 genistein 200 mg을 투여하고 30분경과 후 LPS를 체중 kg당 100 mg을 투여하였다. 이때 genistein과 LPS는 PBS(pH 7.4, Gibco)에 용해하여 사용하였으며 본 연구에 사용한 genistein과 LPS는 Sigma 제품이였다.

### 복강 대식세포의 분리

복강의 대식세포 생산을 위해 실험동물 희생 48시간 전에 4% thioglycollate를 복강에 주입하였으며, PBS와 LPS 주입 후 1시간, 4시간, 8시간 후에 실험동물의 복강으로부터 peritoneal suspension을 취하였다. 실험동물의 복부를 알코올로 소독한 후 복강 속으로 3 mL의 Hank's 용액(pH 7.4, Gibco)을 투여하고 주입된 용액의 90~95%를 회수한 후 비특이적인 esterase staining과 cytometric assay로 확인된 대식세포는 Hank's 용액으로 mL당  $5 \times 10^5$ 개로 조정하여 분석에 사용하였다.

### 혈액 및 간

PBS와 LPS 주입 후 1시간, 4시간, 8시간 후에 EDTA 처리가 된 미세관을 사용하여 실험동물의 안와정맥으로부터 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 분리된 혈장을 -70°C에서 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. PBS와 LPS 주입 후 1시간, 4시간, 8시간 후에 실험동물의 간을 관류시켜 적출하여 간에 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 차가운 생리식염수로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 -70°C에서 보관하며 항산화 효소계 및 NF- $\kappa$ B 활성화 분석에 사용하였다.

복강 대식세포의 superoxide dismutase 활성과 superoxide anion 생성량

Superoxide dismutase(이하 SOD) 활성은 Marklund와

Marklund의 방법(33)에 의한 pyrogallol의 자동산화로 405 nm에서 10초 간격으로 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD 활성 1 unit은 pyrogallol의 산화를 50%까지 저해하는 효소의 양으로 나타내었다. Superoxide anion 생성량은 Kirk 등(34)의 방법을 수정하여 550 nm에서 1분 간격으로 10분간 흡광도 변화를 측정하였다.

#### 혈장 TNF- $\alpha$ 와 지질과산화물 농도

혈장의 TNF- $\alpha$  수준은 마우스용 TNF- $\alpha$  kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)를 사용하여 immunoassay법으로 분석하였다. 혈장과 간의 지질과산화물의 생성량은 thio-barbituric reactive substances(이하 TBARS) 농도로 측정하였다. 혈장의 TBARS 농도는 Buege와 Aust(35)에 의한 방법을 다소 수정하여 측정하였으며, 간의 TBARS 농도는 Fraga 등(36)의 방법으로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 사용하여 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde의 양으로 환산하였다.

#### 간의 항산화 효소계 활성 및 글루타치온 함량

간의 항산화 효소계 측정을 위한 시료조제의 모든 과정은 ice 상태에서 수행하였다. 먼저 간 조직의 20배에 해당하는 50 mM 인산완충액(pH 7.4)을 가해 간 조직을 균질화(speed 30, times 10-12)시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 다시 원심분리(10,000 rpm $\times$ 30 min)시킨 후 세포질 부분인 상등액은 catalase, glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성 측정에, 미토콘드리아 부분인 침전물은 Mn-SOD 활성 측정에 사용하였다.

글루타치온 함량은 Tietze(37)의 방법으로 측정하였으며 catalase 활성은 Aebi의 방법(38)으로, glutathione peroxidase와 glutathione reductase 활성은 Lawrence과 Burk의 방법(39)과 Inger와 Bengt의 방법(40)으로 각각 측정하였다. Mn-SOD 활성은 Marklund와 Marklund의 방법(33)으로 측정하였고 단백질 농도는 Bradford법(41)으로 측정하였다.

#### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

핵 단백질추출은 Dignam 등의 방법(42)을 다소 변형하여 추출하였다. 즉, -70°C에 보관된 조직을 일정량 취해 1 mL의 RNA lysis 완충액[0.6% NP40(Igepal), 0.15 M NaCl, 10 mM Tris(pH 7.9), 1 mM EDTA를 함유하는 완충액에 1:0.001의 비율로 protease inhibitor cocktail을 혼합]을 첨가하여 얼음 위에서 균질화시킨 후 얼음에서 10분간 방치하고 4°C에서 원심분리(1,250 g $\times$ 10분)한 후 상등액을 RNA lysis 완충액을 가하여 위의 과정을 2~3회 반복하여 상등액을 완전히 제거하였다. 여기에 50  $\mu$ L의 추출 완충액[10 mM HEPES (pH 7.9), 0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 25% glycerol을 혼합한 완충액에 1:0.03의 비율로 protease

inhibitor cocktail, 1:0.01의 비율로 50 mM dithiothreitol을 혼합]을 넣어 혼합하고 얼음에서 20분간 방치시킨 후 4°C에서 원심분리(1,250 g $\times$ 10 min)하여 상등액을 취하여 -70°C에서 보관하였다. 상등액의 일부를 이용하여 단백질 농도를 Bradford 법(41)으로 결정하였다.

EMSA를 위해 NF- $\kappa$ B-specific oligonucleotide는 T<sub>4</sub> polynucleotide kinase(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP로 end-labeled하고 microspin G-25 column(Amersham Inc., Piscataway, NJ, USA)으로 정제하였다. EMSA는 Promega에서 제공하는 manual에 따라 수행하였다. 핵단백질 5 mg, binding 완충액, <sup>32</sup>P-labeled NF- $\kappa$ B와 loading 완충액을 혼합하여 실온에서 30분간 방치하였다. DNA-단백질 복합체는 running 완충액으로 0.5X Tris-Borate EDTA 완충액을 사용하여 4% polyacrylamide gel을 이용한 전기영동을 실시하여 unbound DNA로부터 분리하였다. Gel은 -20°C에서 2시간 phospho screen(Perkin-Elmer Life Science, Wellesley, MA)에 노출시키고 band는 Phospho imager(Packard, USA)에 의해 정량하였다. Competitive assay는 HeLa를 이용하여 실시하였다.

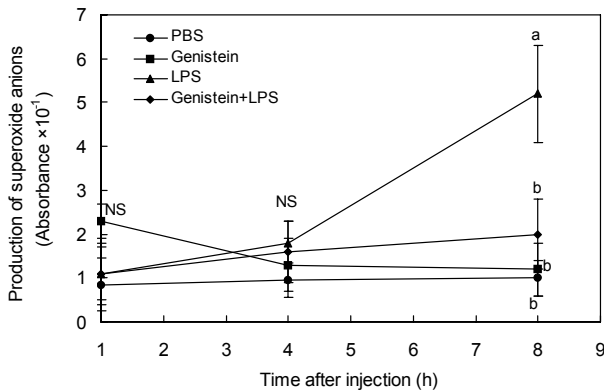
#### 통계처리

모든 실험결과는 SPSS/PC+ package(Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하여 분석하여 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며 일원배치분산으로 분석하였으며, Duncan 다중범위 분석법으로 p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검정하였다.

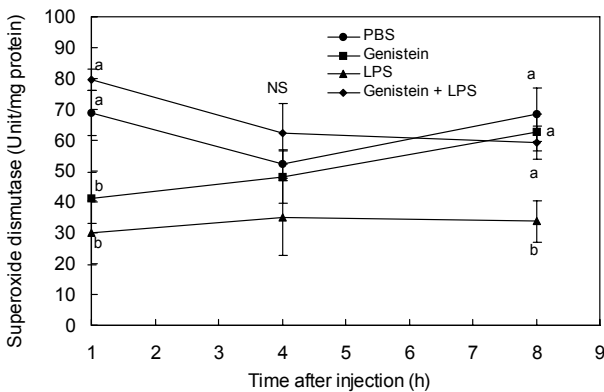
## 결과 및 고찰

#### 복강대식세포의 superoxide anion 생성량 및 SOD 활성

실험동물의 복강 대식세포에서 LPS 투여 후 8시간까지의 superoxide anion(이하 O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 생성량을 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. LPS를 투여하고 1시간과 4시간 후까지 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량은 실험군 간에 차이를 보이지 않았다. LPS 투여 8시간 경과 후 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량은 급격하게 증가하였다. LPS 투여 전 genistein을 투여한 genistein+LPS군은 LPS군에 비해 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량이 현저하게 감소하여 유의적인(p<0.05) 차이를 보였다. Genistein 대조군과 정상대조군은 8시간 후에도 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량이 전혀 변화하지 않았으며 genistein+LPS군 역시 이들 대조군과 비슷한 수준을 나타내었다. LPS를 투여한 후 시간에 따른 SOD 활성의 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. LPS 투여 1시간 경과 후 SOD 활성은 군 간에 유의적인 차이를 보였으며 genistein+LPS군이 LPS군에 비해 SOD 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. LPS 투여 4시간 경과 후에는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 8시간 후에는 LPS군을 제외한 모든 실험군에서 SOD 활성이 현저히 증가하였다(p<0.05). 그러나 LPS군은



**Fig. 1. Changes in superoxide anion generation of peritoneal macrophage from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means±SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.



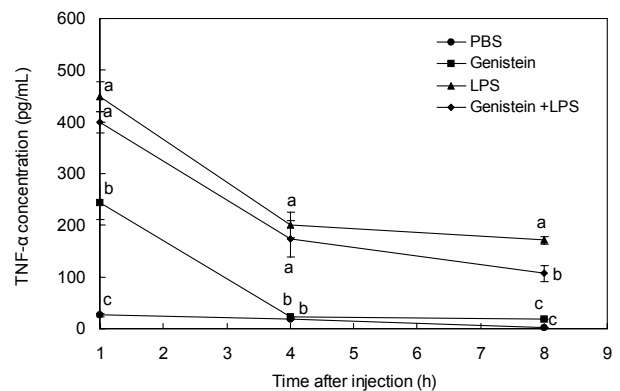
**Fig. 2. Changes in superoxide dismutase activity of peritoneal macrophage from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means±SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

8시간동안 SOD 활성에 차이를 보이지 않았다.  $O_2^-$  생성은 모든 호기적 세포에서 형성되며 산소 독성의 기작에 있어 주요한 인자로 암과 염증 등의 진행과정과 밀접한 관련이 있다(43). 산소를 이용하는 생물은 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 조직 내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 과산화수소를 생성하고 과산화수소는 catalase 등에 의해 물로 분해되어 생체를 방어하는 기능을 나타낸다

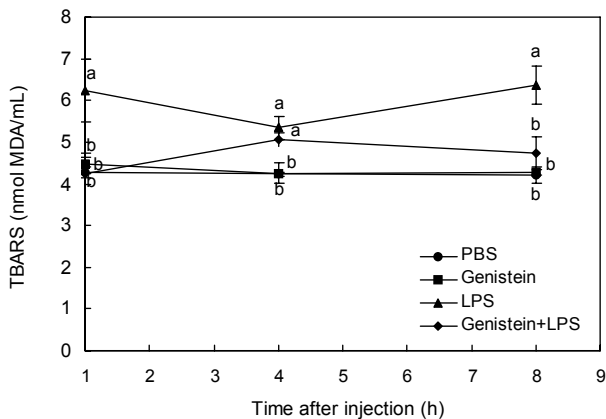
(44). 이 실험에서 LPS 투여는 대식세포에서  $O_2^-$ 의 생성을 촉진하는 것으로 나타났으며, LPS와 genistein을 같이 투여 하였을 때 SOD 활성이 증가하여  $O_2^-$ 의 생성이 저하하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어보아 genistein의 투여가 LPS를 처리하여 내독소에 의한 산화적 스트레스를 주었을 때 SOD 활성을 증가시켜  $O_2^-$ 생성을 감소시키는 것으로 사료되며 genistein은 내독소에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호 작용이 있는 것으로 보인다.

**혈장의 TNF- $\alpha$  수준**

실험동물의 혈장에서 TNF- $\alpha$ 의 농도를 측정된 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. LPS 투여 1시간 경과 후 TNF- $\alpha$  농도는 genistein+LPS를 투여한 군과 LPS를 투여한 군에서 다른 대조군에 비해 유의적으로 높은 수준이었으며 1시간 경과 후에 비해 4시간 후 두 군 모두에서 급격히 감소하는 경향을 보였다. LPS 투여 8시간 경과 후 TNF- $\alpha$  농도는 LPS군에 비해 genistein+LPS군에서 유의적으로 낮은 수준으로 나타났으나 genistein군과 PBS군에 비해서는 다소 높았다. 본 연구의 결과를 보면 LPS는 반응 초기 TNF- $\alpha$ 의 생성을 급격하게 증가시키는 것으로 보이며 genistein은 LPS의 이러한 작용을 효과적으로 억제하지 못하는 것으로 보인다. 그러나 시간이 경과함에 따라 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성은 급격하게 저하하였으며 8시간 후 genistein 투여는 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  생성은 LPS 투여한 지 8시간 후 급격하게 증가하는  $O_2^-$  생성반응보다 선행하는 반응으로 보인다. 그리고 LPS 투여 4시간 후 TNF- $\alpha$ 의 농도가 50% 이상 감소한 것은 TNF- $\alpha$ 의 반감기



**Fig. 3. Changes in TNF- $\alpha$  level of plasma from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means±SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

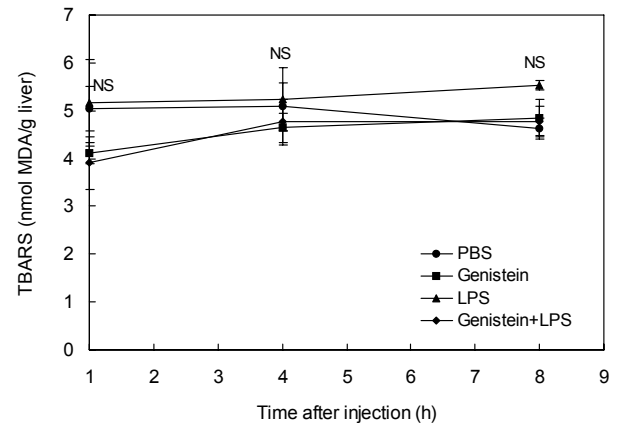


**Fig. 4. Changes in TBARS level of plasma from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means  $\pm$  SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

가 매우 짧기 때문으로도 풀이할 수 있겠다(45). 내독소 저항은 내독소의 치명적임을 야기하는 것으로 알려진 TNF- $\alpha$ 와 interleukin-1을 포함한 proinflammatory cytokines을 생산하여 대식세포의 capacity를 감소시키며(46) 내독소의 치명적임에 대하여 보호를 강화시킨다(47)고 하였으며 본 연구에서 genistein이 내독소의 저항능을 가지는 것으로 사료된다.

#### 혈장, 간에서의 지질과산화 및 GSH 수준

혈장에서의 지질과산화물 수준은 TBARS 농도로 확인하였으며 TBARS 농도는 LPS 투여 1시간 경과 후 급격하게 증가하였으며 genistein+LPS군은 LPS군보다 유의적으로 낮은 수준이었으며, 이것은 genistein 대조군과 PBS 대조군은 유사한 수준이었다(Fig. 4). LPS를 투여한지 4시간 후 genistein+LPS군에서도 TBARS가 다소 증가하는 경향을 보여 LPS군과 유사하였으나 8시간 경과 후 genistein+LPS군은 LPS군에 비해 현저하게 낮았으며 genistein군 및 PBS군과 유사한 수준을 보였다. 간에서의 지질과산화 정도는 LPS 투여 후 시간이 경과함에 따라 실험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 LPS군이 다른 실험군에 비해 다소 높은 경향을 나타내었다(Fig. 5). LPS 투여 후 혈장의 TBARS가 증가한 것은 LPS가 지질과산화를 촉진하는 것으로 설명할 수 있겠다. 그리고 genistein이 LPS에 의한 산화적 스트레스를 어떻게 조절할 수 있는가 하는 것은 아마도 genistein의 항산화제로서의 역할 혹은 항산화 효소계 활성을 유도하는 역할로 설명할 수 있을 것이다(17). 이미 여러 연구자들이 genistein 혹은 이소플라본의 free radical 생성 억제 및 *in vivo*에서의 항산화활성을 보고한 바 있으며(23),



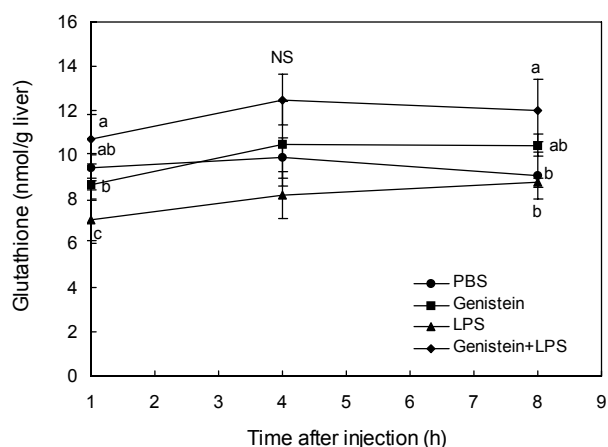
**Fig. 5. Changes in hepatic TBARS level from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means  $\pm$  SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

본 연구 결과도 genistein이 LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스 상황에서 이러한 역할을 수행한 때문으로 풀이된다.

간조직의 항산화효양소인 GSH 수준은 LPS 투여 1시간 후 genistein+LPS군이 LPS군에 비해 유의적으로 높은 수준을 보였으며 genistein만을 투여한 군보다도 높은 수준이었다(Fig. 6). LPS 투여 4시간 경과 후에는 각 군 간에 차이를 보이지 않았으나 8시간 경과 후 genistein+LPS군이 LPS군과 PBS군에 비해 유의적으로 높아 genistein의 투여가 LPS로 인한 산화적 스트레스에 대한 방어 작용으로 GSH의 수준을 증가시키는 것으로 보인다. 동물조직 중 비단백티올의 대부분을 차지하는 GSH는 유리기 제거제 역할과  $H_2O_2$ (이하 과산화수소) 및 과산화지질을 대사시키는 GSH-px의 기질로써 세포내 항산화제 중 중요한 역할을 담당한다(25). 따라서 genistein 투여에 의해 GSH 함량이 증가하는 것은 LPS 자극에 의해 genistein의 항산화 기능이 향상됨을 보여주는 것이며, LPS에 의한 산화적 스트레스를 저하하는 효과가 있는 것을 의미한다 하겠다.

#### 항산화 효소계 활성

실험동물의 간에서 측정된 항산화 효소계 활성은 Table 1에서 보는 바와 같다. Catalase 활성은 LPS군에서는 LPS를 투여한 후 시간이 경과할수록 감소하는 것으로 나타났으나 genistein+LPS군에서는 증가하는 경향을 나타내었다. Genistein군과 PBS군 역시 LPS군보다 높은 catalase 활성을 유지하였다. Mn-SOD 활성은 LPS 투여 후 시간이 경과함에 따라 genistein+LPS군과 LPS군 간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 genistein군이 가장 높은 활성을 보였다.



**Fig. 6. Changes in hepatic glutathione level from BALB/c mice injected with LPS and genistein.** Data represent the means  $\pm$  SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at  $p < 0.05$ . PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

GSH-px 활성은 LPS 투여 4시간 후 LPS군에서 현저하게 저하하였으며 genistein+LPS군은 LPS군에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. LPS 투여 8시간 후에도 genistein+LPS군의 높은 활성은 유지되었으며, 이 수준은 genistein군 및 PBS군과 유사한 수준이었다. GSH-red 활성은 LPS 투여 1시간 후 LPS군에서 가장 낮았으며 4시간 후 다소 회복하는 경향을 보여 PBS군과 유사한 효소 활성을 나타내었다. 그러나 genistein+LPS군의 활성은 LPS 투여 8시간 후 LPS군에

비해 현저하게 높은 GSH-red 수준을 나타내었다. Genistein만을 투여한 genistein군에서의 GSH-red는 PBS군에 비해 더 높은 활성을 보여 genistein의 투여가 GSH-red 활성을 증진시키는 것으로 보인다.

LPS가 항산화 효소계 활성화에 미치는 영향에 대해서는 연구자들 간에 다른 결과를 보고하고 있다. Ben-Shaul 등(48)은 흰쥐에 LPS를 주사하였을 때 SOD와 catalase 활성이 증가하였다고 보고하였으며 Iqbal 등(49)은 GSH-px 활성이 변화하지 않았다고 보고하고 있다. 그러나 Watson 등(50)은 LPS 주사 후 간에서의 SOD 활성 등은 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 LPS 투여에 의해 항산화 효소계 활성이 저하함을 확인하였으며 genistein을 투여하였을 때 항산화 효소계 활성이 유도됨을 확인하였다. Genistein을 복강 내로 투여한 genistein+LPS군의 catalase 활성 증가는 LPS의 내독소로 유도되는 산화로 생긴 과산화수소를 분해하기 위하여 활성이 증가(51)된 것으로 생각되며 따라서 genistein은 항산화 효소계의 활성화에 영향을 미쳐 간 조직에서의 활성 산소종에 의한 손상을 감소시키는데 기여를 하는 것으로 보인다. 산소를 이용하는 생물체는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 조직 내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 생성된 과산화수소를 제거하여 생체를 방어하는 기능을 나타낸다(44). 또한 대사과정 중 발생하는 활성 산소종의 유리기를 제거할 뿐 아니라 이들 활성 산소종에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 알려져 있다(52). 본 연구의 결과에서 보면 genistein의 투여는 Mn-SOD에는 영향을 크게 미치지 않는 것으로 보인다. GSH-px는 셀레늄 의존성 항산화효소로 지질과산화와 과산화수소의 무독화과정을 촉매하며 본 실험에서 genistein을 복강 내

**Table 1. Changes in hepatic antioxidant enzyme activity from BALB/c mice injected with LPS and genistein**

	Time after injection (h)	Group <sup>1)</sup>			
		PBS	Genistein	LPS	Genistein+LPS
Catalase (unit/mg protein)	1	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>2) b3)</sup>	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
	4	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
	8	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Mn-SOD <sup>4)</sup> (unit/mg protein)	1	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
	4	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	0.33 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
	8	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
GSH-px <sup>5)</sup> (unit/mg protein)	1	16.5 $\pm$ 2.01 <sup>NS</sup>	14.4 $\pm$ 1.0	10.9 $\pm$ 3.01	13.0 $\pm$ 3.62
	4	18.7 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 3.77 <sup>a</sup>	7.76 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	24.5 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>
	8	23.1 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	25.8 $\pm$ 5.44 <sup>a</sup>	12.0 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	25.0 $\pm$ 5.33 <sup>a</sup>
GSH-red <sup>6)</sup> (unit/mg protein)	1	3.01 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	1.99 $\pm$ 0.83 <sup>ab</sup>	0.85 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	3.49 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>
	4	3.44 $\pm$ 0.93 <sup>NS</sup>	2.42 $\pm$ 0.61	2.01 $\pm$ 0.84	3.56 $\pm$ 1.19
	8	2.67 $\pm$ 0.84 <sup>c</sup>	11.58 $\pm$ 2.81 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.95 <sup>c</sup>	6.93 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

<sup>2)</sup>Mean  $\pm$  SD of ten animals.

<sup>3)</sup>Value in a row with the same letters are not significantly different at  $p < 0.05$ . NS: Not significant.

<sup>4)</sup>Superoxide dismutase. <sup>5)</sup>Glutathione-peroxidase. <sup>6)</sup>Glutathione-reductase.

로 투여하였을 때 GSH-px의 활성이 증가된 것은 LPS의 내독소에 의해 생성된 산소유리기를 제거하려는 genistein의 항산화작용으로 GSH 함량의 증가와 관련이 있는 것으로 사료된다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 genistein의 투여는 간의 항산화 효소계에 영향을 미침으로써 LPS와 같은 내독소로 인해 야기된 산화적 스트레스를 개선시킬 수 있는 좋은 기능성 소재로 사료된다.

간조직의 NF-κB transactivation

실험동물의 간에서 NF-κB의 transactivation 정도는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. LPS 투여 1시간과 4시간 경과 후에 LPS군의 NF-κB 활성은 PBS군에 비해 높은 수준을 보였으며 genistein+LPS군 역시 LPS군과 비슷한 수준을 유지하였다. LPS 투여 8시간 경과 후 LPS군의 NF-κB 활성은 현저하게 상승하였으나 genistein+LPS군은 4시간 후의 결과와 차이를 보이지 않았다. Genistein군과 PBS군은 8시간 동안 NF-κB 활성에 변화를 보이지 않았다. 즉 LPS의 투여는 NF-κB의 transactivation을 자극하며 genistein의 투여는 LPS에 의한 NF-κB transactivation을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. NF-κB는 cytokines과 radiation 및 산화적 스트레스를 포함한 다양한 자극에 의해 활성화된다. 활성화 산소종은 NF-κB의 복합체로부터 IκB의 분해와 분리로 인해 NF-κB가 활성화되며(53,54), N-acetyl-N-cystein, pyr-

rolidithiocarbamate, α-tocopherol과 같은 항산화제는 NF-κB 활성을 감소시키거나 완전히 저해한다(55). NF-κB는 또한 세포의 산화환원전위 수준에서 변화하는 세포의 초기 반응 유전자의 가능한 생리적 중요성과 기작을 연구하는 특별한 인자로 최근의 연구에서 NF-κB는 세포의 산화환원전위에 의해 조절되며, 따라서 chemo-prevention 연구에 사용되는 항산화 식이보충 효과 연구에 이상적인 생화학적 지표로 대두 이소플라본과 같은 항산화의 phytochemacals는 세포의 산화환원전위를 변형시키는 주요한 인자이므로 NF-κB 활성을 변형시킬 것으로 기대한다(45). NF-κB는 cytokine 반응, 염증, 세포성장조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자로 최근 연구들은 inducible NF-κB가 죽상동맥경화 발병에 관여함을 강하게 제기하고 있다(56). Davis 등(46)은 genistein이 prostate cancer cell에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 TNF-α에 의해 유도된 NF-κB 활성을 저해한다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 이상의 결과를 요약해보면 LPS의 투여는 혈장과 간의 산화적 스트레스와 염증반응을 촉진하는 것으로 나타났으며 LPS 투여 전 공급한 genistein은 LPS로 유도된 산화적 스트레스와 염증반응을 항산화효소계 활성 증가와 NF-κB transactivation 억제, TNF-α 생성저하 등의 기작으로 세포내의 과산화수준을 수준을 낮추고 GSH를 증가시켜 산화적 스트레스를 억제하는 것으로

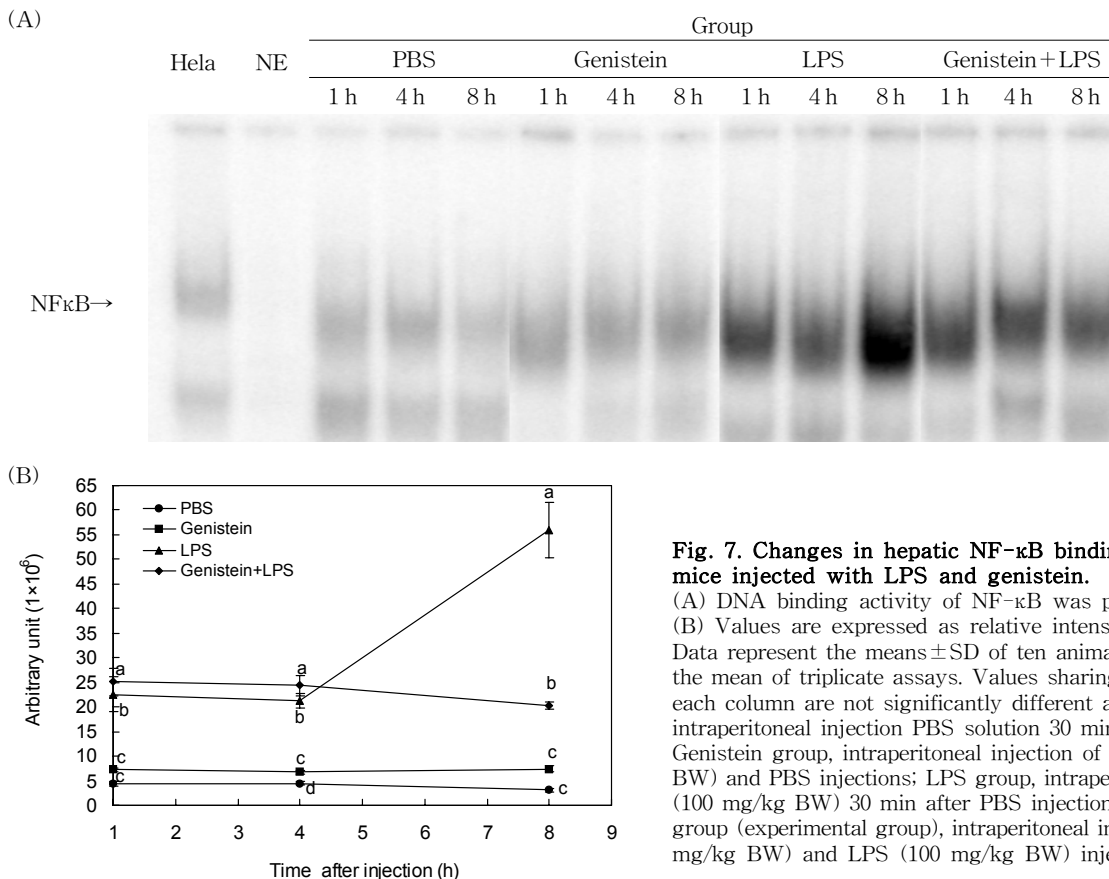


Fig. 7. Changes in hepatic NF-κB binding activity BALB/c mice injected with LPS and genistein.

(A) DNA binding activity of NF-κB was performed by EMSA. (B) Values are expressed as relative intensity of radioactivity. Data represent the means ±SD of ten animals, each value being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript in each column are not significantly different at p<0.05. PBS group, intraperitoneal injection PBS solution 30 min after PBS injection; Genistein group, intraperitoneal injection of genistein (200 mg/kg BW) and PBS injections; LPS group, intraperitoneal injection LPS (100 mg/kg BW) 30 min after PBS injection; and genistein+LPS group (experimental group), intraperitoneal injection genistein (200 mg/kg BW) and LPS (100 mg/kg BW) injections.

사료된다.

## 문 헌

### 요 약

본 연구에서는 내독소인 LPS로 산화적 스트레스를 유발 시킨 BALB/c mice에 genistein을 투여하였을 때 TNF- $\alpha$ , TBARS, superoxide anion 농도와 GSH, 항산화 효소계 활성, 그리고 NF- $\kappa$ B transactivation에 미치는 영향을 조사하여 genistein이 내독소에 의한 산화적 스트레스와 염증반응을 억제하는 효과가 있는지 알아보려고 하였다. 평균체중 20 g인 BALB/c mice 암컷 120수를 30수씩 완전임의배치로 4군으로 분류하여 PBS군(대조군)은 PBS를 복강 속으로 투여 후 30분경과 후에 다시 PBS를 투여하였으며, genistein군은 genistein을 체중 kg당 200 mg으로 투여한 30분 후 PBS를 투여하였다. LPS군은 LPS를 처리한 군으로 PBS 투여 30분 후 LPS를 체중 kg당 100 mg 농도로 복강 투여하였고, genistein+LPS군은 체중 kg당 genistein 200 mg을 투여 30분 후 LPS를 체중 kg당 100 mg을 투여하였다. 마지막 투여 1시간, 4시간, 8시간 경과 후 mouse의 안와정맥으로부터 혈액을, 복강으로부터 복강대식세포와 간을 취하였다. LPS 투여 8시간 경과 후 LPS군의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성량은 현저하게 증가하였으며 genistein+LPS군은 genistein 대조군, PBS군과 비슷한 수준을 유지하였다. 반면 SOD 활성은 genistein+LPS군이 LPS군에 비해 유의적으로 높은 수준이었다. 혈장에서의 TNF- $\alpha$  수준은 LPS 투여 8시간 후 genistein+LPS군이 LPS군보다 유의적으로 낮은 수준을 보였다. LPS 투여는 항산화 효소계 활성과 GSH의 수준을 감소하였으나, genistein을 투여한 genistein+LPS군은 LPS군에 비해 GSH 농도와 catalase, GSH-px, GSH-reductase 활성이 모두 유의적으로 증가하는 결과를 보였다. 간에서의 NF- $\kappa$ B transactivation 정도는 LPS 투여 후 1시간, 4시간 경과 후에 PBS군에 비해 LPS군과 genistein+LPS군에서 유의적으로 높은 수준이었으나 8시간 경과 후 LPS군은 증가하는 반면 genistein+LPS군은 변화하지 않았다. 이상의 결과를 요약해보면 LPS의 투여는 혈장과 간의 산화적 스트레스와 염증반응을 촉진하는 것으로 나타났으며 LPS 투여 전 공급한 genistein은 LPS로 유도된 산화적 스트레스와 염증반응을 항산화 효소계 활성 증가와 NF- $\kappa$ B transactivation 억제, TNF- $\alpha$  생성 저하 등의 기작으로 세포내의 과산화수준을 수준을 낮추고 GSH를 증가시켜 산화적 스트레스를 억제하는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 우수여성과학자도약연구사업비(R04-2003-000-10035-0) 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

1. Lee YS, Jang SY, Kim KO. 2005. Effect of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet. *Korean J Nutr* 38: 89-95.
2. Bibgham SA, Atkinson C, Liggins J. 1998. Phytoestrogen: where are we now? *Br J Nutr* 79: 393-406.
3. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res* 26: 63-70.
4. Wei HC, Wei LH, Frenkel K. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20: 1-12.
5. Sekizaki H, Yokosawa R, Chinen C. 1993. Synthesis isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biol Pharm Bull* 16: 698-701.
6. Kapiotis S, Hermann M, Held I. 1997. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-2874.
7. Lee YS, Xiaowei C, Anderson J. 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutr Res* 21: 1287-1298.
8. Rodrdanz E, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. 2002. The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J Nutr* 132: 370-375.
9. Jang HR. 2002. The effects of soy isoflavone on the factors relating to vascular disease in ovariectomized and hyperlipidemic rats. *MS Thesis*. Seoul National University, Seoul.
10. Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland JR, Sanders T. 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F<sub>2</sub>-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 72: 395-400.
11. Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA, Josse RG. 2002. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocystein, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* 76: 365-372.
12. Zhan S, Ho SC. 2005. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr* 81: 397-408.
13. Yeung J, Yu TF. 2003. Effects of isoflavone (soy phyto-estrogen) on serum lipid: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J* 2: 15-22.
14. Weggemans RM, Trautwein EA. 2003. Relation between soy-associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 57: 940-946.
15. Zhuo XG, Melby MK, Watanabe S. 2004. Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of 8 randomized controlled trials in humans *J Nutr* 134: 2395-2400.
16. Belleville J. 2002. Hypocholesterolemic effect of soy protein. *Nutrition* 18: 684-686.
17. Choi JM, Ryu HJ, Chung JH, Park JC, Hwang JK, Shin DB, Lee SK, Ryang R. 2005. Antioxidant property of genistein: inhibitory effect on HOCl induced protein degradation, DNA cleavage, and cell death. *Food Sci Biotechnol* 14: 399-404.
18. Lai HH, Yen GC. 2002. Inhibitory effect of isoflavones on



- peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 22-28.
19. Sarkar FH, Li Y. 2003. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 21: 744-757.
  20. Xu J, Loo G. 2001. Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines. *J Cell Biochem* 82: 78-88.
  21. Pesce N, Eyster KM, Williams JL, Wixon R, Wang C, Martin DS. 2000. Effect of genistein on cardiovascular responses to angiotensin II in conscious unrestrained rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 806-809.
  22. Migliaccio S, Anderson JJ. 2003. Isoflavones and skeletal health: are these molecules ready for clinical application? *Osteoporos Int* 14: 361-368.
  23. Zielonka J, Gbicki J, Gryniewicz G. 2003. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radic Biol Med* 35: 958-965.
  24. Qiong G, Gerald R, Hadi M, Stafan W, Lester P. 2002. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 179: 171-180.
  25. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
  26. Ito T, Ikeda U. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 257-265.
  27. Bratus VV, Talaieva TV, Radalovska NV. 1999. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins and the development of hypercholesterolemia. *Fiziol Zh* 45: 40-49.
  28. Kanters E, Pasparakis M, Gijbels M. 2003. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation in macrophages increase atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 112: 1176-1185.
  29. Yamamoto Y, Gaynor RB. 2004. I $\kappa$ B kinase: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Biochem Sci* 29: 72-79.
  30. Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, Media FS, Zarzuelo A. 2006. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 72: 1010-1021.
  31. Victor VM, De Lafuente M. 2003. Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Physiol Res* 52: 101-110.
  32. Chae BS. 2002. Comparative study of the endotoxemia and endotoxin tolerance on the production of Th cytokines and macrophage interleukin-6: differential regulation of indomethacin. *Arch Pharm Res* 25: 910-916.
  33. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
  34. Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC. 2000. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 20: 1529-1535.
  35. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 52, p 302-306.
  36. Fraga CG, Leibovita RM, Roeder RG. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 4: 155-161.
  37. Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue. *Anal Biochem* 27: 502-522.
  38. Aebi H. 1984. *Catalase in vitro in method of enzymology*. Academic press, Orlando, Florida, USA. Vol 150, p 121.
  39. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 71: 952-958.
  40. Inger C, Bengt M. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 113, p 484-490.
  41. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248-254.
  42. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475-1498.
  43. Sun T, Xie W, Xu P. 2004. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* 58: 379-382.
  44. Frintche K, Johnston PV. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr* 118: 425-426.
  45. Davis JN, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar FH. 2001. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  in blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 30: 1293-1302.
  46. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. 1991. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-1754.
  47. Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. 2001. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica serovar* Typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 69: 463-471.
  48. Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. 2001. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett* 123: 1-10.
  49. Iqbal M, Cohen RI, Marzouk K, Liu SF. 2002. Time course of nitric oxide, peroxynitrite, and antioxidants in the endotoxemic heart. *Crit Care Med* 30: 1291-1296.
  50. Watson AM, Warren G, Howard G, Shedlofsky SI, Blouin RA. 1999. Activities of conjugating and antioxidant enzymes following endotoxin exposure. *J Biochem Mol Toxicol* 13: 63-69.
  51. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver and liver morphology in rats fed high diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 374-378.
  52. Geeta S, Ravindra N, Kiran DG. 1991. Effect of ethanol on Cd-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem Pharmacol* 42: S9-S16.
  53. Allen R, Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.
  54. Gius D, Botero A, Shah, Curry HA. 1999. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *Toxicol Lett* 106: 93-106.
  55. Li N, Karin M. 1999. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13: 1137-1143.

56. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M. 1997. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95: 1532-1541.

(2008년 5월 28일 접수; 2008년 9월 1일 채택)