

## 구절초 꽃 추출물의 Nitric Oxide 생성과 Inducible Nitric Oxide Synthase 발현 억제 효과

한지영<sup>1</sup> · 김영화<sup>1</sup> · 성지혜<sup>1</sup> · 엄유리<sup>2</sup> · 이 이<sup>2</sup> · 이준수<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품공학과

<sup>2</sup>충북대학교 특용식물학과

### Suppressive Effects of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Flower Extracts on Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression

Jiyoung Han<sup>1</sup>, Younghwa Kim<sup>1</sup>, Jeehye Sung<sup>1</sup>, Yurry Um<sup>2</sup>, Yi Lee<sup>2</sup>, and Junsoo Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology, and

<sup>2</sup>Dept. of Industrial Plant Science & Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

#### Abstract

In this study, we investigated the effect of *C. zawadskii* extract on nitric oxide (NO) production, prostaglandin E2 (PGE2) production, protein and mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. *C. zawadskii* extract (5~50 µg/mL) significantly inhibited LPS-induced NO production in a concentration-dependent manner ranging from 23.3% to 100%. Consistent with the inhibitory effect on NO production, *C. zawadskii* extract inhibited the protein expression and mRNA expression of iNOS. Although flower extracts of *C. zawadskii* was not effective on the expression of PGE2 and COX-2, flower extracts of *C. zawadskii*, however, showed a strong anti-inflammatory activity through inhibition of NO production and iNOS expression. The present results suggest that *C. zawadskii* extract has an inhibitory effect on NO production, and thus can be used as an anti-inflammatory agent.

**Key words:** *Chrysanthemum zawadskii*, anti-inflammation, nitric oxide, inducible nitric oxide synthase

#### 서 론

염증은 외상이나 세균의 침입으로 인한 조직 상해나 파괴에 대한 생체 조직의 국소적 방어반응으로 통증, 발열, 홍반, 부종 및 기능 상실을 특징으로 한다(1-3). 세포 내에서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-citrulline과 함께 생성되는 nitric oxide(NO)는 신경계, 면역계, 심장혈관계에 있어서 중요한 전달 물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타내며 쇼크와 다른 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다(4,5). NOS는 세포의 종류에 따라 신경성 NOS(nNOS, NOS1), 유도성 NOS(iNOS, NOS2), 내피성 NOS(eNOS, NOS3)로 구분되며(6) 이중 유도성 iNOS는 세포내 칼슘 농도와 외부에서 주입된 calmodulin의 자극과는 무관하게 활성화된 세포에서만 활성을 보이며 다양한 세포에서 유도되어 병리생태학에서 중요한 역할을 한다(7,8). 또한 세포내 염증반응에서 세포분열이나 증식에 영향을 주는 prostaglandin(PG)은 2가지의 cyclooxygenase(COX) isoform에 의해 합성되며, COX

는 COX-1, COX-2의 isoform이 존재한다(9). COX-1은 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되어 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하는 반면 COX-2는 interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  및 lipopolysaccharide 등에 의하여 macrophage나 monocyte 등의 세포에서만 과발현된다(10). 이처럼 염증 반응에서는 iNOS에 의한 nitric oxide(NO)와 COX-2에 의한 prostaglandin E2(PGE2) 등과 같은 염증관련 인자들이 생성된다. 이러한 염증매개 물질의 형성은 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B를 활성화시키고 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 PG로 전환되어 NO를 생성한다고 알려져 있다(11).

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로, 전국 각처의 산지와 고원지에서 자생하며 세계적으로는 중국, 러시아, 몽골, 일본 등에서 자란다(12,13). 예로부터 구절초의 전초와 꽃이삭은 폐렴, 기관지염 등의 호흡기 질환성 염증, 방광질환, 부인병, 위장병 및 고혈압 등에 사용해 왔다(14-16). 따라서 본 연구에서는 구절초 꽃 추출물의 염증억제 효과를 알아

\*Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr  
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

보기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유도한 RAW 264.7 macrophage cell에서 염증 반응의 중요 매개인자인 NO와 prostaglandin E2(PGE2) 생성에 미치는 영향과 iNOS와 COX의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보고 또한 iNOS의 mRNA의 발현을 연구하여 항염증 효과를 탐색하고 작용기작을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용된 구절초는 2008년 충북지역 농가에서 구입하여 사용하였다. DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)는 Gibco-Life Technologies(Rockville, MD, USA), FBS(fetal bovine serum)는 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, 실험에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

### Methanol 추출물의 제조

구절초의 꽃을 일정량 분쇄기로 균질하게 마쇄한 뒤 질소 충전하여  $-74^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 마쇄된 시료 10 g에 80% methanol 200 mL을 가한 뒤 상온에서 24시간 동안 혼합하여 구절초로부터 유용성분을 추출하였다. 추출 후 고형분은 filter paper(TOYO, No. 2)를 이용하여 제거하였으며 분리된 상등액은 rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여  $40^{\circ}\text{C}$  이하에서 감압 농축하여 용매를 완전히 휘발시켰다. 수기의 무게 증가분을 이용하여 수율을 측정하고 추출물은 그 농도 100 mg/mL 되도록 DMSO(dimethylsulfoxide)에 재용해하였다. 제조된 추출물은 유용 성분의 손실을 방지하기 위하여 질소 충전 후  $-74^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며 실험에 사용된 추출물은 모두 0.2  $\mu\text{m}$  filter를 사용하여 멸균한 후 사용하였다.

### 세포 배양

실험에 사용된 세포주 RAW 264.7 mouse macrophage는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 mouse macrophage는 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin을 함유한 DMEM 배지에서  $2 \times 10^6$ 개의 세포를 직경 10 mm의 culture dish에 넣고 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 incubator에서  $37^{\circ}\text{C}$ 로 배양하였다.

### Nitric oxide 함량 측정

RAW 264.7 macrophage 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 6시간 후 구절초 꽃 추출물을 농도별(5, 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하고 30분 후 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 첨가하고 18시간 배양하여 NO를 측정하였다. 세포

배양액 100  $\mu\text{L}$ 와 Griess시약 100  $\mu\text{L}$  동량을 혼합하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 방치하여 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 산출하였다(17).

### 세포 독성 측정

구절초 꽃 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다(18). RAW 264.7 macrophage 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 6시간 후 구절초 꽃 추출물을 농도별(5, 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하고 30분 후 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 18시간 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 20  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하고 4시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$  incubator에서 반응시킨 후 MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 DMSO를 첨가하여 MTT를 환원하여 형성된 formazan을 녹여 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Prostaglandin E2 생성 저해 활성 측정

RAW 264.7 macrophage 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 6시간 후 실험에 사용된 구절초 꽃 추출물을 농도별(5, 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하고 30분 후 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 염증을 유도하고 18시간 배양하였다. 일정량의 상등액을 취해 PGE2 kit(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 PGE2를 측정하였다(19). Goat anti-mouse Ig가 부착되어있는 96 well plate에 PGE2 표준액과 구절초 추출물이 처리된 상등액을 가한 후 PGE2-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE2를 각각 50  $\mu\text{L}$ 씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE2 또는 PGE2-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 TMB (3,3',-5,5'-tetramethylbenzidine) 용액을 150  $\mu\text{L}$ 를 가하고 실온에서 30분 발색시킨 후 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  100  $\mu\text{L}$ 를 가하여 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blot

RAW 264.7 macrophage 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 6시간 후 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리하고 30분 후 LPS를 첨가하였다. iNOS와 COX-2의 발현을 위하여 18시간 동안 배양하였으며, 18시간 배양 후 PBS로 3회 세척한 후 세포를 얻어 원심분리하여 pellet에 lysis buffer를 가하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후, 12,000 rpm(14,240 g)으로 30분 동안 원심분리를 한 후 상등액을 모았다. 모은 상등액은 BCA protein assay kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 10  $\mu\text{g}$ 을 5배 희석한 sample buffer에 넣고  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 불활성화 시켜 10% SDS polyacrylamide

겔에 전기영동 하였다. 전기영동 된 SDS polyacrylamide 겔을 nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 5% non-fat dry milk에서 1시간 동안 blocking하였다. iNOS와 COX-2 항체는 1:1000의 비율로 상온에서 1시간 부착시켰으며 그 후 TBST buffer로 10분간 3번 washing하였다. 1:2000의 비율로 희석한 2차 항체로 1시간 상온에서 부착시킨 후 TBST buffer로 10분간 3번 washing하였고 ECL(Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)을 처리한 membrane을 암실에서 X-ray flim에 감광시켜 현상하였다(20).

Real-Time PCR

RAW 264.7 macrophage 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96 well plate에 분주 6시간 후 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리하고 30분 후 LPS를 첨가하여 염증을 유도하였다. 18시간 배양 후 세포를 PBS로 cell을 washing한 후 pellet을 얻어 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 얻어진 RNA를 total RNA kit(Invitrogen, Carlsbad, USA)로 정량하였다. RNA(1 µg)을 SuperScript III(Invitrogen)로 cDNA를 합성하여 iQ5 Real-Time PCR(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용해 iNOS의 발현량을 측정하였으며(21), control로는 GAPDH를 사용하였다. 사용된 iNOS의 primer는 sense 5'-accatggagcatccaagta-3', antisense 5'-ccatgtaccaaccattgaagg-3'이었으며 56°C에서 annealing하였고 GAPDH의 primer는 sense 5'-aatgtatccgtgtg-gatctga-3', antisense 5'-gcttcaccaccttctgatgt-3'이었으며 56°C에서 annealing하였다.

통계분석

대조군과 각 치료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 p<0.01 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균±표준편차로 표시하였다.

결과 및 고찰

세포독성과 NO 생성 저해 효과

LPS 처리에 의해 활성화되고 신경소교세포에서 생성되어 배양액 중으로 유리된 NO의 농도를 NO<sup>2-</sup>의 형태로 Griess 시약을 사용하여 정량하였다. NO<sup>2-</sup>의 형태로 NO를 측정하는 이유는 NO는 매우 불안정하여 NO<sup>2-</sup>의 형태로 바로 전환되기 때문이다(22). LPS로 활성화된 NO는 21.9 µM 수준으로 증가하였으며 실험에 사용된 구절초 꽃 추출물을 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도에서 농도 의존적인 감소경향을 나타냈으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 구절초 꽃 추출물의 경우 농도별로 16.8, 10.5, 1.3, 0.0 µM로 저해 효과를 나타내었고 유의한 차이를 보였다.

실험에 사용된 구절초 꽃 추출물의 농도별 세포 독성 여부를 MTT assay를 통하여 알아보았으며 구절초 꽃은 사용된

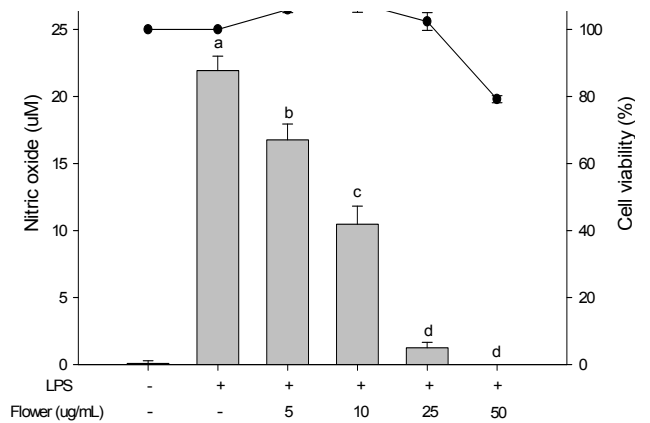


Fig. 1. Effects of flower extracts from *C. zawadskii* on cell viability and NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage. Each value is expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the same letter are not significantly different (p<0.001).

농도 중에서 가장 높은 50 µg/mL의 농도에 약 20%의 세포 독성을 나타내었다. Ukiya 등(23)은 *Chrysanthemum morifolium*의 triterpene diol 및 triol의 성분들이 항염증 효과를 갖는다고 보고하고 있으며 Cheon 등(24)은 *Chrysanthemum indicum* 추출물(CIE)의 항염증 기작을 보고하고 있다. CIE는 NO, PGE2 및 proinflammatory cytokine의 생성을 억제하였으며 이는 NF-κB와 MAPKs의 억제를 통해 이루어짐을 보고하였다. 또한 Hseu 등(19)의 연구에 의하면 *Antrodia camphorata*는 100 µg/mL의 농도에서 20% 이상의 세포독성을 나타내었으나 모든 실험에 100 µg/mL의 농도를 사용하였으며, Bae 등(17)의 연구결과 brazilin은 약 15%의 세포 독성을 보였으며 세포독성이 없다고 판단하였다. 따라서 본 실험에서 구절초 꽃 추출물의 세포 실험에서 약 20%의 세포독성은 유효하다고 생각되어 다음 실험을 진행하였다.

PGE2 저해 활성

Prostaglandin은 면역을 조절하는 물질로 알려져 있으며 특히 PGE2는 염증반응을 유도하는 중요한 인자이다. 따라서 본 연구에서는 PGE2의 억제 활성을 측정하였다. 배양액 중에 유리된 PGE2를 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며 LPS로 활성화된 수준과 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리한 군은 가장 높은 농도인 50 µg/mL를 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 결과로 구절초 꽃 추출물은 PGE2 생성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. Pacheco-Sanchez 등(25)의 연구결과에 의하면 *Collybia dryophila* polysaccharide(CDP)는 NO의 생성을 효과적으로 감소시켰으나 PGE2의 경우 오히려 증가시키는 경향을 보이거나 효과를 나타내지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 NO 함량은 감소되었으나 PGE2 저해 효과에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

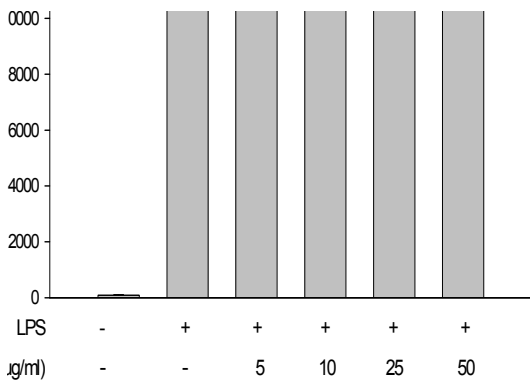


Fig. 2. Effects of flower extracts from *C. zawadskii* on PGE2 production in LPS-induced RAW 264.7 macrophage. Each value is expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the same letter are not significantly different (p<0.001).

iNOS 생성 억제 효과

상피세포와 신경에 존재하는 eNOS와 nNOS에 의하여 소량 생성되는 NO는 혈관확장과 신경전달 등 정상적인 생리 기능을 조절하지만 대식세포에서 유도되는 iNOS에 의하여 과량 생성되는 NO는 자가 면역 질환, 염증성 질환 및 패혈증을 초래한다(26). 따라서 과량의 NO를 생성하는 효소인 iNOS의 생성에 대한 구절초 꽃 추출물의 영향을 확인하기 위하여 western blot을 실행하였다(Fig. 3).

iNOS 단백질은 자극을 하지 않은 안정 상태의 RAW 264.7 세포에서는 거의 생합성이 되지 않았지만 LPS 자극에

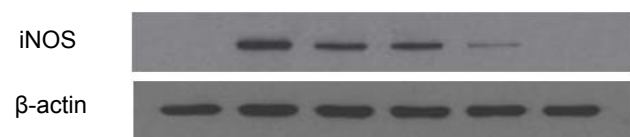
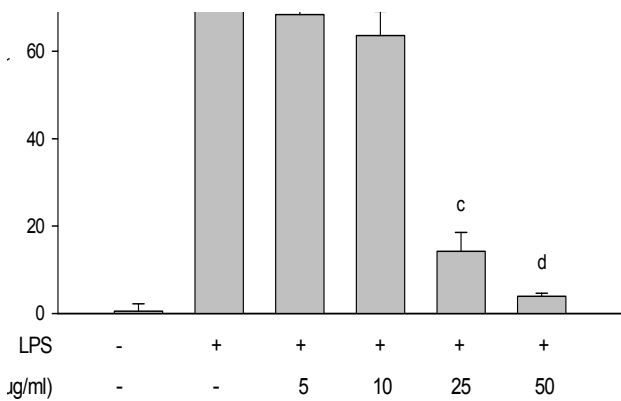


Fig. 3. Effects of flower extracts from *C. zawadskii* on LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophage. Each value is expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the same letter are not significantly different (p<0.001).

의하여 현저하게 증가하였다. 증가한 iNOS 단백질의 생합성은 구절초 꽃 추출물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 꽃 추출물 50 μg/mL에서의 iNOS의 발현은 LPS를 처리하지 않은 그룹과 비슷한 수준으로 회복되었다. 구절초 꽃 추출물에 의한 iNOS 단백질의 생합성은 5 μg/mL에서 31.6%, 10 μg/mL에서 36.4%, 25 μg/mL에서 85.8% 그리고 50 μg/mL에서는 96.0%의 억제 효과를 나타내었다. Lee 등(27)과 Kang 등(28)의 연구결과에 의하면 NO 저해 활성을 높게 나타낸 2'-hydrozycinnamaldehyde와 *Angelica dahuricae* radix 추출물은 iNOS 단백질 발현 억제도 효과적으로 저해한다는 것을 나타내었다. 본 연구 결과 iNOS 단백질 저해효과와 NO 생성 억제는 유사한 경향을 나타내었다. 이는 구절초 꽃 추출물에 의한 NO의 생성 억제는 iNOS 단백질 발현의 억제에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

COX-2 생성 억제 효과

PGE2는 염증 반응을 유도하는 중요 인자로 COX-2의 발현에 의해 생성되는 것으로 알려져 있으며 COX-2에 의해 생성된 PGE2는 수지상세포, 자연살해세포 및 대식세포 등 면역관련 세포의 활성을 유도하여 염증반응을 일으키는 원인 물질이다(29). 따라서 과량의 PGE2를 생성하는 효소인 COX-2의 생성에 대한 구절초 추출물의 영향을 확인하기 위하여 western blot을 실행하였다(Fig. 4).

COX-2 단백질은 자극을 하지 않은 안정 상태의 RAW 264.7 세포에서는 iNOS와 같은 결과로 거의 생합성이 되지

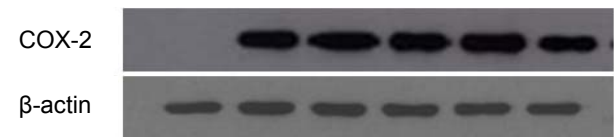
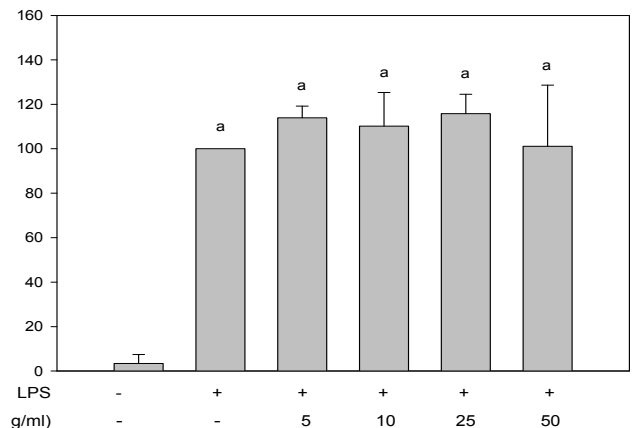
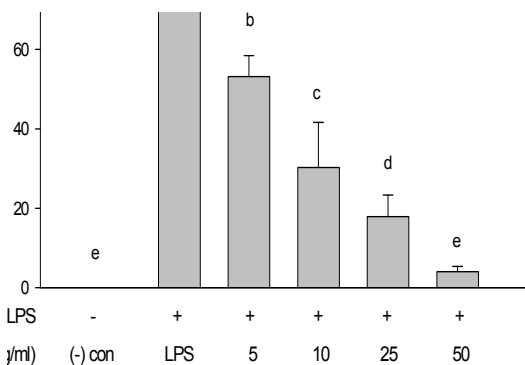


Fig. 4. Effects of flower extracts from *C. zawadskii* on LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage. Each value is expressed as mean±standard deviation (n=3). Means with the same letter are not significantly different (p<0.001).

않았지만 LPS 자극에 의하여 현저하게 생합성이 증가하였다. 증가한 COX-2는 구절초 꽃 추출물을 처리하여도 감소 효과가 나타나지 않았으며, Lee 등(30)의 연구결과에 의하면 참깨과의 리그난 화합물은 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으나 COX-2의 발현에 대해서는 감소 경향을 나타내지 않았다고 하였다. 본 결과 Lee 등(30)과 유사하게 구절초 꽃 추출물에 의한 COX-2 단백질의 발현 억제는 유의성이 없는 것으로 확인되었다.

**iNOS의 mRNA 발현량**

구절초 꽃 추출물이 iNOS 단백질의 생합성을 억제하였으므로 전사단계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR를 실행하였다(Fig. 5). LPS를 자극하지 않은 안정한 상태에서의 RAW 264.7 세포에서 iNOS mRNA 발현은 거의 확인되지 않았지만 LPS의 자극에 의하여 발현이 현저하게 증가하였다. 증가한 iNOS mRNA는 LPS로 자극을 주어 발현량을 증가시킨 군과 비교하여 LPS만 처리한 그룹에 대한 비율로 나타냈으며 구절초 꽃 추출물은 농도 의존적으로 iNOS mRNA의 발현량의 감소 경향을 보였다. 구절초 꽃 추출물은 5, 10, 25, 50 µg/mL에서 53.1, 30.3, 19.9, 4.0%의 iNOS의 발현을 나타냈다. Jung 등(21)은 *Citrus reticulata* 추출물을 real-time PCR을 실시하여 iNOS의 mRNA 양을 측정하였으며, LPS 자극으로 발현량이 증가하였고 추출물이 농도 의존적으로 mRNA 발현량을 감소시키는 경향을 나타내어 본 연구와 비슷한 결과를 나타내었다. Real-time PCR의 실험 결과는 NO 생성 억제와 iNOS 단백질의 발현 저해 효과와 마찬가지로 유사한 경향을 나타냈으며, 이 결과로 구절초 꽃 추출물이 iNOS의 전사단계에서 저해 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 5. Effects of flower extracts from *C. zawadskii* on LPS-induced expression of iNOS mRNA.** Relative iNOS expression (2<sup>-ΔCt</sup>) was performed by Real-time PCR. Means with the same letter are not significantly different (p<0.001). ΔCt=CtiNOS-CtGAPDH.

**요 약**

본 연구에서는 구절초의 항염증 효과를 탐색하기 위해 NO의 함량과 iNOS의 발현 및 PGE2와 COX-2의 발현을 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 macrophage cell을 이용하여 실험하였다. 연구 결과 구절초 꽃 추출물은 NO 함량 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 나타냈으며 유의한 차이를 보였다. 또한 세포독성은 꽃 추출물(5~50 µg/mL)은 최고 농도인 50 µg/mL에서 약 20%의 독성을 나타냈으며 그 이하의 농도에서는 독성을 나타내지 않았다. NO 생성의 억제는 iNOS의 단백질과 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 저해하였으며 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이 결과로 구절초 꽃 추출물이 전사단계에서 저해 활성을 나타낸다는 것을 보여주었다. 그러나 PGE2와 COX-2의 발현 억제는 나타나지 않았으며, 이 결과 구절초 꽃 추출물에 의한 COX-2 단백질의 발현 억제와 PGE2 생성 억제는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 본 연구 결과, 구절초 추출물은 염증을 일으키는 중요 인자인 NO를 저해하였고, iNOS의 발현, iNOS의 mRNA 발현 등 항염증에 우수한 효과를 보였으며, 항염증 연구의 기초 자료로 활용될 것으로 예상된다. 또한 추후 산업적 응용도 가능하므로 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

**감사의 글**

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

**문 헌**

- Sarkar D, Fisher PB. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 236: 13-23.
- Fierro IM, Serhan CN. 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 34: 555-566.
- Park JS, Lee EJ, Lee JC, Kim WK, Kim HS. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 7: 70-77.
- Bredt DS, Snyder SH. 1994. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13: 301-313.
- Jaffrey SR, Snyder SH. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 417-440.
- Tsao LT, Lee CY, Huang LJ, Kuo SC, Wang JP. 2002. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by a synthetic carbazole, LCY-2-CHO. *Biochem Pharmacol* 63: 1961-1968.
- Vodovotz Y, Russell D, Xie QW, Bogdan C, Nathan C. 1995. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophage. *J Immunol* 154: 2914-2925.

8. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Synder SH, Russell SW, Murphy WJ. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734.
9. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. 2000. Cyclooxygenase: structures, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-182.
10. Chun KS, Surh YJ. 2004. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 15: 1089-1100.
11. Cheon YP, Mohammad LM, Park CH, Hong JH, Lee GD, Song JC, Kim KS. 2009. *Bulnesia sarmienti* aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Life Sci* 19: 479-485.
12. 이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사, 서울. p 754.
13. 육창수. 1997. 생약도감. 도서출판 경원, 서울. p 528.
14. 임록재. 1998. 조선약용식물지. 농업출판사, 서울. p 186.
15. 원도희, 하광원. 1997. 약용식물도감. 식품의약품안전본부. p 72.
16. Kim YY, Lee SY, Yim DS. 2001. Biological activities of linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Hoeji* 45: 604-610.
17. Bae IK, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 513: 237-242.
18. Kim JH, Kim DH, Beak SH, Lee HJ, Kim MR, Kwon HJ, Lee CH. 2006. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 71: 1198-1205.
19. Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. 2005. Anti-inflammatory potential of *Antrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway. *Int Immunopharmacol* 5: 1914-1925.
20. Hirafuji M, Tsunoda M, Machida T, Hamaue N, Endo T, Miyamoto A, Minami M. 2002. Reduced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in smooth muscle cells of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 70: 917-926.
21. Jung KH, Ha E, Kim MJ, Won HJ, Zheng LT, Kim HK, Hong SJ, Chung JH, Yim SV. 2007. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by *Citrus reticulata* extract in RAW 264.6 macrophage cells. *Food Chem Toxicol* 45: 1545-1550.
22. Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, Choi DK, Choi WS. 2007. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *J Ethnopharmacol* 112: 49-54.
23. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Kasahara Y, Kimura Y, Koike K, Nikaido Y, Takido M. 2001. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene dio, triol, and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem* 49: 3187-3197.
24. Cheon MS, Yoon T, Lee DY, Choi G, Moon BC, Lee AY, Choo BK, Kim HK. 2009. *Chrysanthemum indicum* Linne extract inhibits the inflammatory response by suppressing NK- $\kappa$ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 112: 473-477.
25. Pacheco-Sanchez M, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ. 2007. Inhibitory effects of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophage. *Eur J Pharmacol* 555: 61-66.
26. Garcia X, Stein F. 2006. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 17: 55-57.
27. Lee SH, Lee SY, Son DJ, Lee H, Yoo HS, Song S, Oh KW, Han DC, Kwon BM, Hong JT. 2005. Inhibitory effect of 2'-hydrozycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 69: 791-799.
28. Kang OH, Lee GH, Choi HJ, Park PS, Chae HS, Jeong SI, Kim YC, Sohn DH, Park H, Lee JH, Kwon DY. 2007. Ethyl acetate extract from *Angelica Dahuricae Radix* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B in macrophages. *Pharmacol Res* 55: 263-270.
29. Jang SI, Jun CS, Kwak KC, Bea MS, Lee JH, Kim KY, Yun YG, Chai GY. 2006. Evaluation of Korea phytomedicinal plant on inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS stimulated U937 cells. *Korean J Ori Physio Path* 20: 455-459.
30. Lee HJ, Son DJ, Kang MH, Lee BC, Hong JT. 2006. Effects of lignan compound of sesame on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Soc Cosmet Sci Korea* 32: 173-180.

(2009년 9월 3일 접수; 2009년 10월 8일 채택)