

RAW264.7 Macrophage Cell에서 녹차씨껍질 에틸아세테이트 분획의 염증억제 효과 및 기전 연구

노경희¹ · 장지현¹ · 민관희¹ · 친조리그 라드나바자르¹ · 이미옥² · 송영선^{1*}

¹인제대학교 식품생명과학부, 기초과학연구소
²영산대학교 한국식품조리학과

Suppressive Effect of Green Tea Seed Coat Ethyl Acetate Fraction on Inflammation and Its Mechanism in RAW264.7 Macrophage Cell

Kyung-Hee Noh¹, Ji-Hyun Jang¹, Kwan-Hee Min¹, Radnaabazar Chinzorig¹,
Mi-Ock Lee², and Young-Sun Song^{1*}

¹School of Foods and Life Science, Institute of Basic Sciences, Inje University, Gyeongnam 621-749, Korea
²Dept. of Korean Food & Culinary Arts, Youngsan University, Busan 612-743, Korea

Abstract

Green tea seed coat (GTSC) was extracted with 100% ethanol for 4 hr and then fractionated with petroleum ether (PE), ethyl acetate (EtOAC) and butanol (BuOH). The EtOAC fraction showed the highest level in total phenol contents and the lowest level in nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell. Thus, this study was carried out to investigate the anti-inflammatory and its mechanisms of GTSC EtOAC fraction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell. GTSC EtOAC fraction contained EGC (1146.48±11.01 µg/g), tannic acid (966.99±32.24 µg/g), EC (70.88±4.39 µg/g), gallic acid (947.61±1.03 µg/g), caffeic acid (37.69±1.46 µg/g), ECG (35.46±3.19 µg/g), and EGCG (15.53±0.09 µg/g) when analyzed by HPLC. NO production was significantly ($p<0.05$) suppressed in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 80.11 µg/mL. Also prostaglandin E₂ level was also inhibited in a dose-dependent manner. Moreover, iNOS protein expression was suppressed in dose-dependent manner but COX-2 gene expression was not affected. Total antioxidant capacity and glutathione (GSH) levels were enhanced more than the LPS-control. Expressions of antioxidative enzymes including catalase, GSH-reductase and Mn-SOD were elevated compared to LPS-control. Nuclear p65 level was decreased in the GTSC EtOAC fraction in a dose-dependent manner. These results indicate that GTSC EtOAC fraction inhibit oxidative stress and inflammatory responses through elevated GSH levels, antioxidative enzymes expressions and suppression of iNOS expression via NF-κB down-regulation.

Key words: green tea seed coat, EtOAC fraction, anti-inflammation, anti-oxidative effect, protein expression

서 론

산화작용은 생체에서 끊임없이 일어나는데 호흡에 산소를 이용하는 생물체로서 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다(1). 생체에서 활성산소의 반응생성물이 증가됨으로써 동맥경화, 만성 염증성 질환, 암과 같은 성인병 및 노화가 일어나는 것으로 알려져 있다.

염증은 조직의 손상을 비롯한 외부로부터의 자극 등 다양한 감염원에 대한 체내 반응 중 하나로서 국소혈관과 다양한 면역세포가 유기적인 상호작용을 하게 된다(2,3). 이 과정에서 대식세포와 같은 염증세포들이 활성화되면서 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂(PGE₂), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β(IL-1β) 등 다량의 염증 매개 인자

를 분비하게 된다(4). 이러한 염증반응이 지속적으로 또는 과도하게 일어나면 여러 염증성 질환이나 다양한 질환의 원인이 된다(5). 대식세포에서 생성된 염증성 매개물들은 박테리아 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 면역 자극제 등에 노출될 경우 많은 염증 조직에서 발견되며, 그들의 mRNA 발현 또한 증가하게 된다. 이러한 염증성 매개물의 과잉 생산은 류마티스 관절염, 죽상동맥경화, 만성 간염 등 많은 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(6). Nuclear factor kappaB(NF-κB)는 cytokines, LPS와 산화적 스트레스 등을 포함한 여러 가지 외부 자극에 반응하여 활성화되어 핵으로 이동되고 면역과 염증반응을 포함한 여러 가지 target gene의 발현을 조절한다(7). 즉, NF-κB는 세포질 속에서 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 IκB와 함께

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

불활성형으로 존재하다가 활성 산소종, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 IκB kinase가 활성화되어 IκB가 분해되면 p50과 p65의 heterodimer 형태로 활성화되어 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 cytokine, iNOS, COX-2, adhesion molecule인 vascular cell adhesion molecule-1과 intercellular cell adhesion molecule-1의 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(8-10). 그러므로 NF-κB 활성화 억제를 통해 염증성 매개물을 감소시키면 다양한 염증 관련 질환을 예방할 수 있을 것이라 사료되고, 이러한 물질을 천연물에서 찾으려는 시도가 많아지고 있다. 최근 건강에 관한 많은 관심으로 녹차에 관한 연구는 많으나 녹차씨 껍질에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 녹차엽과 녹차씨에는 생리활성물질인 플라보노이드류, 사포닌, 비타민을 풍부하게 함유하고 있으며(11-14), 녹차씨껍질 또한 다양한 생리활성물질 함유에 따른 활성이 기대된다.

따라서 본 연구에서는 녹차씨껍질 분획 추출물의 항염증 활성을 비교하고 염증 저해능이 가장 강력한 분획 추출물을 선정하여 RAW264.7 macrophage cell에서 항염증 및 항산화효과의 기전을 생화학적, 분자적 수준에서 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

녹차씨껍질 분획 추출물 조제

본 연구에서 사용한 녹차씨껍질은 2009년 경남 화동소재 일송제다에서 구입하여 사용하였다. 녹차씨껍질(green tea seed coat, GTSC)은 녹차씨를 둘러싸고 있는 가장 바깥부분으로 깨끗하게 세척한 후 50±5°C에서 3일간 열풍 건조하여 40 mesh로 분쇄하였다. 녹차씨껍질 분말의 10배(w/v)의 95% 에탄올을 가해 80±5°C에서 4시간 동안 환류 추출하여 감압여과한 후 evaporator를 사용하여 건조시켜 에탄올(EtOH) 추출물을 조제하였다. 녹차씨껍질의 EtOH 추출물의 회수율은 3.64%이었다.

녹차씨껍질 분획추출물 조제는 EtOH 추출물 10 g을 증류수 500 mL을 가해 용해시킨 후 석유에테르(PE) 500 mL을 가하여 혼합한 후 PE분획인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다(PE분획). 남은 물층에 에틸아세테이트(EtOAC) 500 mL을 가하여 혼합한 후 EtOAC분획인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다(EtOAC분획). 남은 물층에 부탄올(BuOH) 500 mL을 가하여 혼합한 후 BuOH분획인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였으며(BuOH분획) 남은 물층은 H₂O 분획으로 사용하였다(Fig. 1). H₂O분획은 동결건조 하였으며 나머지 모든 분획 추출물은 evaporator를 사용하여 건조시켜 시료로 사용하였다. 각각의 회수율은 EtOH 추출물 10 g당 EtOAC분획 3.365 g>PE분획 2.499 g>BuOH분획 2.355 g>H₂O분획 0.668 g의 순으로 EtOAC 분획의 회수율이 가장

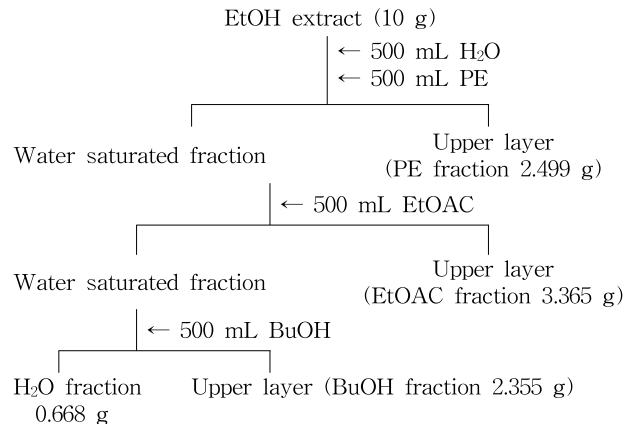


Fig. 1. Fractionation of green tea seed coat ethanol extracts. EtOH: ethanol, PE: petroleum ether, EtOAC: ethyl acetate, BuOH: butanol.

높은 수준이었다.

총 페놀함량

녹차씨껍질 추출물의 총 페놀함량은 Folin-Dennis법(15)으로 측정하였다. 즉, 각 추출물 200 μL에 50% Folin-Ciocalteu reagent 1 mL과 7.5% Na₂CO₃ 용액 800 μL을 가하고 암소에서 45분간 방치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 농도별로 조제하여 사용하였다.

HPLC에 의한 폴리페놀 분석

녹차씨껍질 EtOAC 분획의 epigallocatechingallate(EGCG), epigallo-catechin(EGC), epicatechingallate(ECG), epicatechin(EC), caffeic acid, gallic acid, tannic acid의 함량은 EtOAC에 녹여 syringe filter(0.45 μm, nylon membrane, Corning Inc., Acton, MA, USA)로 여과하여 이것을 HPLC용 시료로 사용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

세포 배양 및 시료처리

RAW264.7 macrophage cell은 ATCC(TIB-71, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS와 2 mM L-glutamine이 첨가된 DMEM에 배양하였다. 세포를 24-well plate(4×10⁵ cells/well)와 100 mm dish(5×10⁶ cells/dish)에 주입하여 24시간 동안 CO₂ incubator에서

Table 1. HPLC conditions for analysis of polyphenols contents in green tea seed coat ethyl acetate fraction

Items	Conditions
Instrument	HPLC (JASCO 1580)
Column	Shiseido capcell Pak C18 (5 μm, 4.6×2250 mm, Phenomenex)
Detector	UV 280/210 nm
Mobile phase	Solvent A : Solvent B (9:1→4:6)
Flow rate	0.5 mL/min
Sample injection	20 μL

Solvent A: 0.5% H₃PO₄, Solvent B: 50% CH₃CN in 0.5% H₃PO₄.

배양한 후, 농도별로 조제한 시료를 처리하여 2시간 배양한 후 산화적 손상을 유발하기 위해 LPS(1 µg/mL)를 첨가하고 20시간 배양하여 실험에 사용하였다. 이때 untreated군은 LPS를 처리하지 않은 negative control을, control군은 LPS를 처리한 positive control을 나타낸 것이다. 시료 처리 농도는 EtOH 추출물과 PE분획은 0~200 µg/mL, EtOAc분획은 0~125 µg/mL, BuOH와 H₂O분획은 각각 0~500 µg/mL이었다.

세포 생존율

세포 생존율은 MTT 방법(16)으로 분석하였다. 즉, 24 well의 배지를 제거하고, 1 mg/mL 농도가 되도록 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 첨가한 후, 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 살아 있는 세포에서 mitochondria dehydrogenases에 의해 MTT가 formazan dye 결정으로 전환되며 여기에 DMSO 150 µL를 첨가하여 세포에서 formazan dye를 용해시킨 후 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control에 대한 흡광도 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

항염증 효과

Nitric oxide 생성량: Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Green 등의 방법(17)으로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 즉, 100 µL의 배지 상등액에 50 µL의 1% sulphanimide(in 5% phosphoric acid)와 50 µL의 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride을 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 NaNO₂를 농도별로 조제하여 사용하였다.

PGE₂ 생성량: PGE₂ 생성 저해 효과는 PGE₂ assay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 ELISA 분석을 하였다.

항산화 효과

총항산화능: 총 항산화능은 Erel(18)의 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical cation decolorization assay로 분석하여 mM trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로 표시하였다.

글루타치온 함량: 항산화 영양소인 glutathione(GSH) 함량은 Tietze의 방법(19)을 다소 수정하여 측정하였다. 배지를 제거한 후 ice-cold PBS로 3회 세척한 다음 PBS 1 mL을 가하여 세포를 긁어 suspend한 후 eppendorf tube에 담아 cell count하여 일정량의 세포를 취해 ice bath내에서 sonicate(2×5 sec)를 사용하여 세포를 파쇄 하였다. 파쇄 후 원심분리(4500 rpm, 10 min)하여 상등액 400 µL에 100 µL 5% SSA와 섞어 4500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 GSH 함량을 분석하였다.

항산화 효소계와 염증 관련 단백질 발현

단백질 분리: 세포로부터 단백질을 분리하는 과정은

PROPREP™ protein extract solution(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea) 방법에 의해 수행하였다. 100 mm dish (5×10⁶ cells/dish)의 cell culture plate로부터 배양액을 제거하고 미리 준비해 둔 ice-cold PBS(pH 7.4)로 2번 세척한 후, 1 mL ice-cold PBS(pH 7.4)를 넣어 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 4°C에서 원심분리(12,000 rpm, 20 sec)하여 상층을 제거하고, cell lysis를 위해 400 µL PROPREP을 넣고 -20°C에서 10~20분간 incubation시킨 후 4°C에서 원심분리(12,000 rpm, 5 min)를 하여 세포 추출 상등액 즉, 총 단백질을 얻었다. 단백질을 정량 또는 분석을 위해 -20°C에 보관하였다.

Western blot analysis: 세포 추출 상등액을 Bradford법(20)으로 분석하여 단백질 정량 후 단백질 농도를 결정하였다. Protein sample 30 µg을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시한 후 polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에 90분간 blotting하고 5% nonfat dry milk에 넣고 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. 일차항체로 4°C에서 overnight hybridization한 후 비결합항체를 제거하고, 이차항체로 실온에서 1시간 동안 hybridization 하였다. 비결합항체를 제거한 후, western blotting chemiluminescence luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며 quantity one software(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. 본 실험에서 사용한 primary antibody(catalase antibody, GSH-red antibody, Mn-SOD antibody, Abcam)와 염증 관련 단백질 발현을 결정하기 위한 primary antibody(iNOS antibody, COX-2 antibody, actin antibody)는 Santacruz Biotechnology Inc. 제품을, 내부표준물질인 actin(43 kDa, sc-1616, 1:1,000)과 이차항체로 사용한 goat anti-mouse immunoglobulin G(1:2,000)은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 제품을 각각 사용하였다.

핵의 NF-κB 수준 평가

PBS로 세포를 수집하여 원심분리(500×g, 5 min) 후, 하층에 Nodiet P-40 lysis buffer(pH 8.0) 300 µL첨가하고 4°C에서 10분간 반응시켜 500×g에서 5분간 원심분리한 후 남아있는 하층에 high salt buffer(20 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) 30 µL를 첨가하여 잘 혼합한 후 원심분리(15,000×g, 30 min)한 후 상등액을 취해 핵 추출물로 사용하였다. 핵단백질의 발현은 p65 rabbit mAb(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 사용하여 위의 방법과 동일한 방법으로 확인하였다.

통계처리

통계분석은 SPSS software(Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였으며 모든 결과는 mean±SE로 표시하였고 각 군 간의 유의성은 one-way

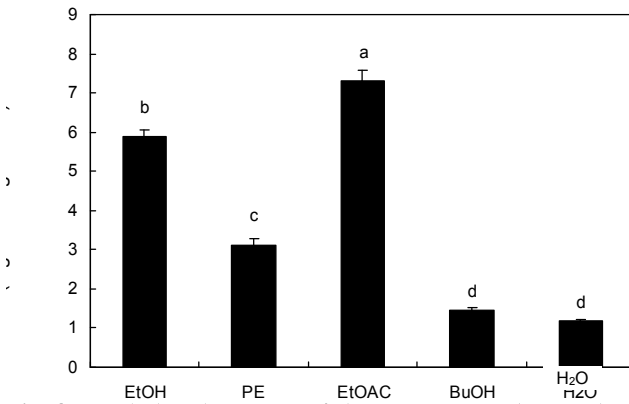


Fig. 2. Total phenol contents of the green tea seed coat ethanol extract and its fractions. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. Refer to Fig. 1.

ANOVA와 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

총 페놀함량

Fig. 2에서 보듯이 녹차씨껍질 추출물 100 mg당 총 페놀함량은 EtOAC분획(7.31 \pm 0.28 mg)에서 가장 높은 수준이었으며 EtOH추출물(5.89 \pm 0.16 mg) > PE분획(3.12 \pm 0.17 mg) > BuOH분획(1.44 \pm 0.08 mg)과 H₂O분획(1.19 \pm 0.03 mg)의 순으로 나타나 EtOAC분획에서 현저하게 높은 수준으로 나타났다.

인삼을 50% 에탄올로 추출한 후 헥산, 에테르, 에틸아세테이트, 부탄올 등으로 분획 추출한 인삼 분획 추출물에서 총 페놀함량이 EtOAC층에서 가장 높았다는 보고(21)가 있다. Oh 등(22)은 천궁을 지상부와 근경으로 나누어 용매별 추출을 실시한 결과 지상부와 근경 모두 에틸아세테이트 층에서 총 페놀함량이 가장 높았으며 플라보노이드 함량 역시 근경의 에틸아세테이트 층에서 가장 높았다고 하였다. 이러한 보고들은 본 연구의 결과와 비교 시 유사한 것으로 나타났다.

NO 생성능

LPS로 인한 스트레스에서 증가하는 NO 생성능에 미치는 영향으로 녹차씨껍질 추출물의 염증 억제능을 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 각 추출물을 100 μ g 농도로 처리 시 LPS 대조군에 비해 EtOH 추출물, PE분획 및 EtOAC분획에서 현저하게 낮은 수준이었으나 BuOH 분획과 H₂O분획은 LPS 대조군과 유사한 수준이었다.

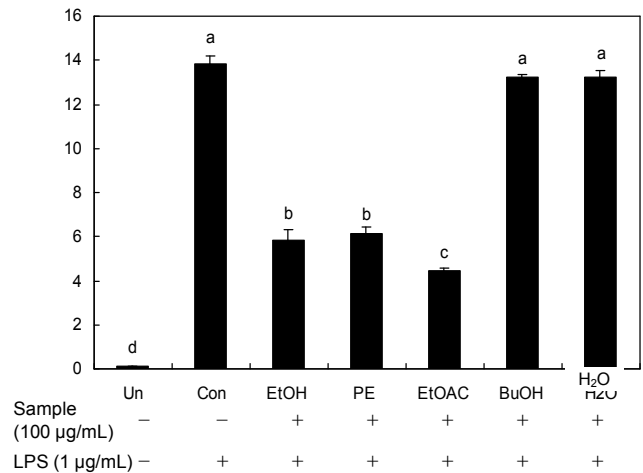


Fig. 3. Effects of the green tea seed coat ethanol extract and its fractions on NO production in RAW264.7 macrophage cell. Cells (4×10^5 /well) were preincubated with and without indicated concentrations of GTSC EtOH extract and its fractions (100 μ g/mL) for 2 hr, and then incubated with LPS (1 μ g/mL) for 20 hr. Untreated (Un) is negative control without LPS treatment, while control (Con) is positive control treated with LPS. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

EtOAC분획에서의 NO 생성능은 EtOH 추출물과 PE분획에 비해 현저하게 낮은 수준으로 EtOAC분획이 NO 억제능이 가장 강한 것으로 나타났다. Kim과 Park(23)은 북강활의 에틸아세테이트분획은 LPS로 자극한 RAW264.7 macrophage cell에서 다른 분획물에 비해 가장 강력하게 NO 생성을 억제하였다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 총 페놀함량과 NO 억제능이 가장 강한 EtOAC분획을 선정하여 항염증 효과의 기전과 생리활성물질 농도를 조사하였다.

녹차씨껍질 EtOAC분획의 폴리페놀 함량

HPLC를 사용하여 분석한 녹차씨껍질 추출물의 폴리페놀 함량은 Table 2에서 보는 바와 같이 EGC(1146.5 \pm 11.01 μ g/g) > tannic acid(967.0 \pm 32.24 μ g/g) > EC(70.9 \pm 4.39 μ g/g) > gallic acid(47.6 \pm 1.03 μ g/g) > caffeic acid(37.7 \pm 1.46 μ g/g) > ECG(35.5 \pm 3.19 μ g/g) > EGCG(15.5 \pm 0.09 μ g/g)의 순으로 검출되었다.

녹차의 주요한 polyphenols는 flavan-3-ols와 flavonols로 녹차의 polyphenolic compounds의 약 77%가 flavan-3-ols이며 구조적으로 flavonols보다 덜 안정하다. 녹차의 주요한 flavonol은 quercetin과 kaempferol의 glycosides이다

Table 2. Contents of catechins, caffeic acid, tannic acid, and gallic acid of green tea seed coat EtOAC fraction by HPLC analysis (μ g/g extracts)

EGCG	EGC	ECG	EC	Caffeic acid	Tannic acid	Gallic acid
15.53 \pm 0.09 ¹⁾	1146.5 \pm 11.01	35.5 \pm 3.19	70.9 \pm 4.39	37.7 \pm 1.46	967.0 \pm 32.24	47.6 \pm 1.03

¹⁾Mean \pm SE.

(24). 녹차의 flavone-3-ol을 기본으로 하는 catechins로는 (+)-catechin, (-)-EGCG, (-)-EGC, (-)-ECG, (-)-EC가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(14). Yoon 등(14)은 녹차의 주요 항암성분은 폴리페놀 화합물의 일종인 EGCG로 알려져 있으며 한잔의 녹차에는 150~200 mg의 EGCG가 포함되어 있다고 하였다. Lim 등(25)은 녹차씨의 catechin류 함량을 HPLC로 분석한 결과 녹차씨 메탄올 추출물에서 ECG 821±95 µg/g, gallate 112±72 µg/g, caffeine 155±42 µg/g, EGC 116±72 µg/g, EGCG가 108±32 µg/g, EC 37±40 µg/g 순으로 함유되어 있다고 하였다.

본 연구에서는 녹차씨껍질 EtOAC분획에는 모든 종류의 catechin들이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 녹차 잎에 비해 catechin류의 함량이 낮은 수준이나 녹차 잎에 비해 많은 양을 얻을 수 있는 점을 고려할 때 경제성이 있는 자원이라 할 수 있다.

NO 저해능

Fig. 4에서 보는 바와 같이 녹차씨껍질 EtOAC분획은 RAW264.7 macrophage cell에서 0~125 µg/mL로 처리 시 농도 의존적으로 NO 생성을 현저하게 저해하는 것으로 나타났으며 IC₅₀값은 80.11 µg/mL이었다. 여러 연구자들에 의하면 세포에 LPS 처리는 LPS를 처리하지 않은 untreated군에 비해 NO의 산화적 생성물인 nitrite의 생성을 유의적으로 증가시킨다고 하였다(26-28). NO는 생리학적 수준에서 phagocytosis를 포함하나, NO가 과량 생산 시 염증과 조직 손상을 야기할 수 있다. NO는 빠르게 superoxide와 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite를 형성하여 염증 자극제로서

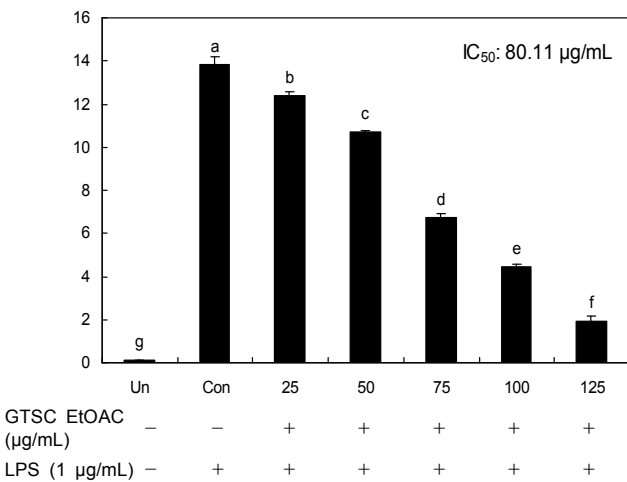


Fig. 4. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on NO production in RAW264.7 macrophage cell. Cells (4×10^5 /well) were preincubated with and without indicated concentrations of GTSC EtOAC fraction for 2 hr, and then incubated with LPS (1 µg/mL) for 20 hr. Untreated (Un) is negative control without LPS treatment, while control (Con) is positive control treated with LPS. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean ± SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

활성화된 대식세포에서 NF-κB의 DNA-binding 활성을 up-regulated하여(26,28) DNA를 포함한 많은 단백질을 손상시킨다(29). LPS 처리한 RAW264.7 macrophage cell에서 다른 식물들의 IC₅₀값은 클로렐라 dechloromethane 추출물이 30.5 µg/mL(30), 민들레 메탄올 추출물과 열수 추출물은 각각 79.9 µg/mL과 157.5 µg/mL(31)로 보고하였다. 본 연구의 결과와 비교 시 녹차씨껍질 EtOAC분획의 IC₅₀값은 클로렐라보다는 높은 수준이었으나 염증억제에 효과가 있는 것으로 알려진 민들레 메탄올 추출물과는 유사한 수준이었고 유사하였고 민들레 열수 추출물보다는 낮은 수준으로 나타났다.

녹차씨껍질 추출물의 경우 EtOAC분획이 RAW264.7 macrophage cell에서 LPS로 인한 산화적 스트레스 유발 시 NO 생성을 억제하여 항염증 효과를 가지는 것으로 보인다.

세포 생존율

녹차씨껍질 EtOAC분획의 세포독성을 세포 생존율로 확인한 결과 Fig. 5와 같이 본 연구에서 처리한 농도 수준 0~125 µg/mL에서는 세포 생존율이 영향을 미치지 않아 녹차씨껍질 EtOAC분획은 세포 독성을 가지지 않는 것으로 나타났다.

PGE₂ 생성량

RAW264.7 macrophage cell에서 LPS로 유발된 산화적 스트레스에 의한 염증생성물질인 PGE₂ 수준은 녹차씨껍질 EtOAC층을 50 µg/mL 이상의 농도에서 LPS 대조군에 비해 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 IC₅₀값은 268.55 µg/mL이었다(Fig. 6). 여러 다양한 조직에서 물질대사를 조절하는 prostaglandin(PG)은 평활근의 수축과 이완, 혈관의 수축과 확장, 혈압조절, 발열유발, 염증유발 등과 같은 다양한 신체기능에 관여하는 물질 중 하나로 arachidonic acid로부터 합성되며 cyclooxygenase(COX)라는 효소가 관여한다(32,33). PG는 모두 8종으로 알려져 있으며, PGE₂는

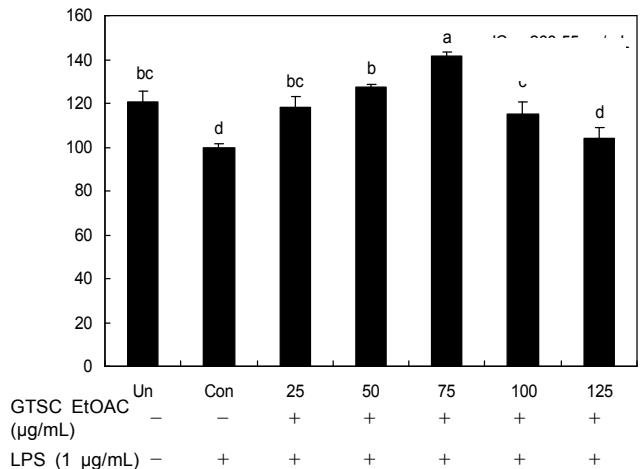


Fig. 5. Effects of green tea coat EtOAC fraction on cell viability in RAW264.7 macrophage cell. Refer to Fig. 4.

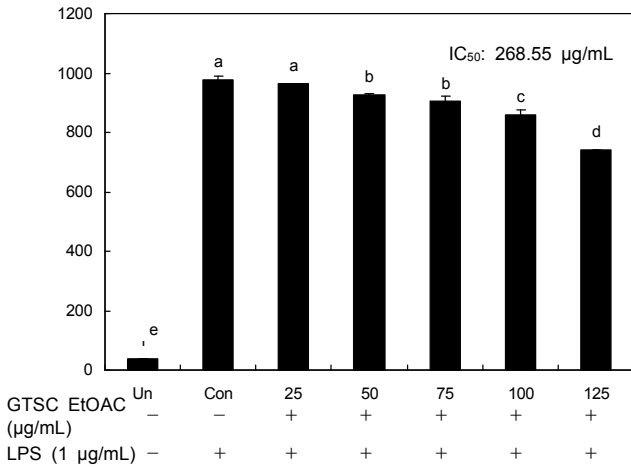


Fig. 6. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on PGE₂ production in RAW264.7 macrophage cell. Refer to Fig. 4.

PG 합성효소에 의해 PGH₂가 합성될 때 형성되며(34) 염증성 질환을 포함한 다양한 생체반응에 있어서도 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병의 유발과 진행에 관여한다(35). 따라서 본 연구에서 녹차씨껍질 EtOAC층은 NO 생성 억제뿐만 아니라 PGE₂의 수준을 저해시켜 염증생성을 조절하는 것으로 보인다.

iNOS와 COX-2 단백질 발현

녹차씨껍질의 EtOAC분획이 NO와 PGE₂ 생성 효소인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 western

blot으로 확인하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 NO 생성과 관계있는 iNOS의 단백질 발현은 LPS 대조군에 비해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였으며 처리농도 100 µg/mL 이상 처리 시에는 untreated군과 유사한 수준을 보였다. 그러나 녹차씨껍질 EtOAC층은 COX-2 발현에는 영향을 미치지 않았다. iNOS는 NO의 생성을 촉진하며 생산된 NO는 superoxide와 반응한다. 여러 연구자들은 식물 추출물이 직접적인 free radical 소거능, iNOS 단백질과 mRNA 발현 억제를 통해 NO 생성을 억제한다고 보고하였다(30,36-38). COX는 thromboxane, prostacyclin, PG을 포함하는 prostanoid라고 불리는 중요한 biological mediator의 형성을 위한 효소로 PG합성에는 일반적으로 2가지 isoform인 COX-1 및 COX-2가 관여하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 대부분 조직에서 housekeeper enzyme으로 일정한 수준으로 발현되어 혈소판 활성화, 위장보호 등과 같은 인체의 항상성 유지기능에 관여하나, COX-2는 cytokine, 자외선, 세균성 내독소 및 TNF 등과 같은 여러 종류의 pro-inflammatory agent에 의하여 과발현되어 염증뿐만 아니라 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다(39,40)

본 연구에서는 녹차씨껍질 EtOAC분획이 iNOS의 유전자 발현을 억제하여 NO 생성을 저해하나 COX-2의 단백질 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

총 항산화능 및 항산화영양소 수준

산화적 스트레스에 대한 녹차씨껍질 EtOAC분획의 방어

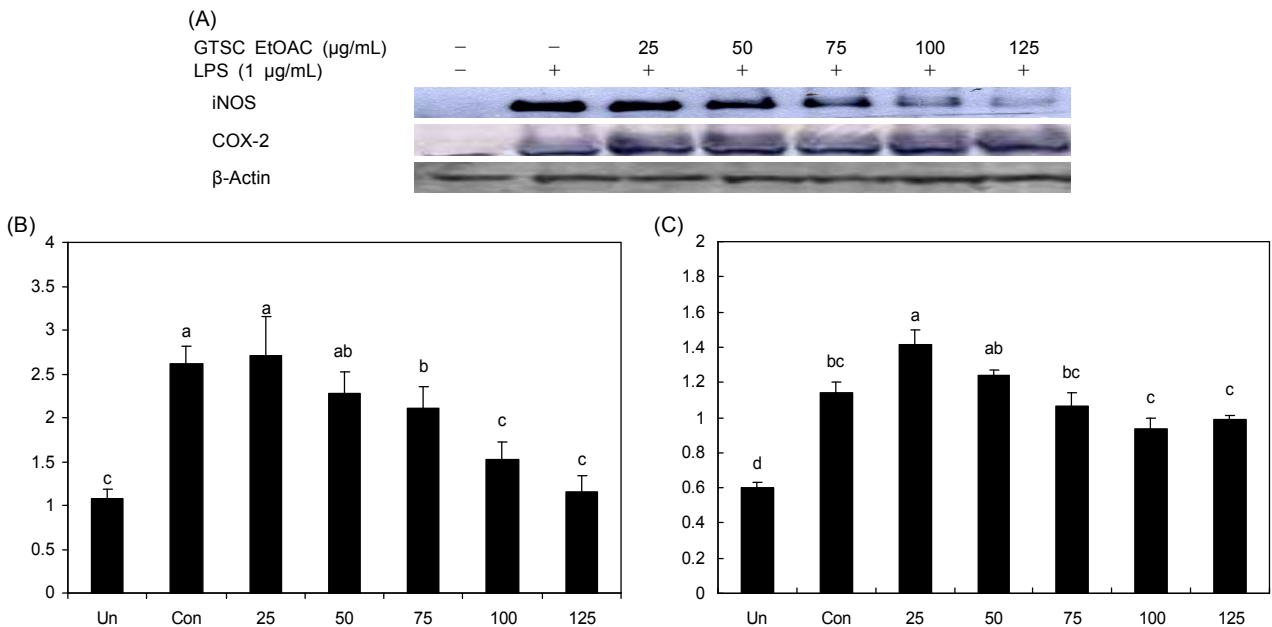


Fig. 7. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on iNOS and COX-2 protein expressions in RAW264.7 macrophage cell. Cells (5×10⁶/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of GTSC EtOAC fraction for 2 hr, and then incubated with LPS (1 µg/mL) for 20 hr. Untreated (Un) is negative control without LPS treatment, while control (Con) is positive control treated with LPS. A: Levels of iNOS and COX-2 proteins were measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. B and C: All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

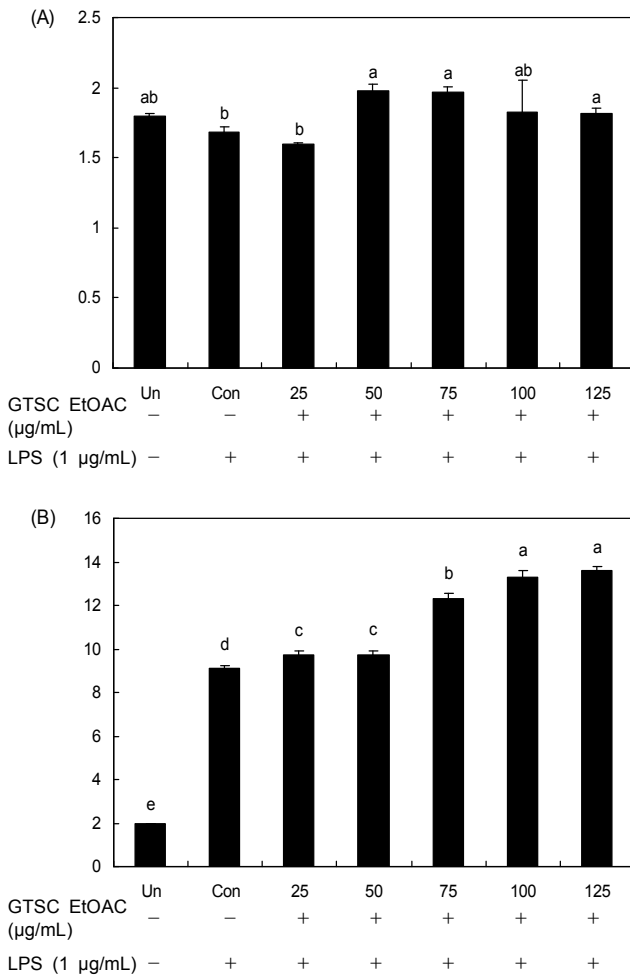


Fig. 8. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on antioxidative activities in RAW264.7 macrophage cell. A: total antioxidant capacity, B: GSH levels. Refer to Fig. 4.

능을 평가하기 위해 총 항산화능과 항산화 영양소인 GSH 수준을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 녹차씨껍질 EtOAC분획의 총 항산화능(Fig. 8A)은 control군에 비해 유의적으로 높은 수준으로 나타났으나 농도의존적인 효과는 보이지 않았다. 항산화 영양소인 GSH 수준은 LPS로 산화적 스트레스를 유발한 대조군에서 산화적 스트레스를 유발하지 않은 untreated군에 비해 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 녹차씨껍질 EtOAC분획을 처리 시 control군에 비해 모든 군에서 현저하게 증가되었으며 EtOAC층의 처리 농도가 높을수록 GSH 수준도 증가하였다(Fig. 8B). 녹차에는 폴리페놀성 화합물인 카테킨을 비롯한 다수의 성분이 함유되어 있어 여러 가지 약리작용이 뛰어나며(41), 항산화효과가 뛰어나 생체 내·외의 stress에 의해 발생하는 유리기를 제거하는 기능이 있다고 알려져 있다(42). 동물조직 중 비단백 티올의 대부분을 차지하는 GSH는 유리기 제거제 역할과 과산화수소(H_2O_2) 및 과산화지질을 대사시키는 GSH-px의 기질로서 세포내 항산화제 중 중요한 역할을 담당한다(43). 녹차의 항산화 작용에 대한 연구로는 Nakayama 등(44)의

연구에서 카테킨의 폴리페놀 구조들이 hydrogen peroxide (H_2O_2)에 의한 cytotoxicity를 억제하는 효과가 있으며 지질 과산화 초기단계에서 singlet oxygen과 유리기 제거 역할로 플라보노이드가 효과적이라고 하였다. 본 연구에서도 녹차씨껍질 EtOAC층에 상당한 양의 카테킨과 phenol이 함유되어 있음을 확인하였으며, 이것이 LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage cell에서 항산화능을 높이는 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 녹차씨껍질 EtOAC 추출물에 의해 GSH 함량이 증가하는 것은 LPS 자극에 의해 항산화 기능이 향상됨을 보여주는 것이며, LPS에 의한 산화적 스트레스를 저하하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

항산화효소계의 단백질 발현

RAW264.7 macrophage cell에서 녹차씨껍질 EtOAC분획의 처리가 항산화효소계 단백질 발현에 미치는 영향은 Fig. 9에서 보는 바와 같다. Catalase 발현은 대조군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC분획 75 µg/mL 이상 처리 시 유의적으로($p < 0.05$) 단백질 발현을 상승시키는 것으로 나타났다. Glutathione-reductase(GSH-red) 발현은 녹차씨껍질 EtOAC분획을 75 µg/mL 농도로 처리하였을 때 현저하게 증가하여 가장 높은 수준을 보였으나 125 µg/mL 이상의 농도에서는 농도의존적인 효과를 보이지 않았다. Mn-SOD 발현 정도는 대조군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC층을 처리한 모든 군에서 현저하게 증가하였으며, 농도의존성을 나타내었다. 유리산소는 SOD에 의해 H_2O_2 와 O_2^- 로, H_2O_2 는 다시 glutathione-peroxidase(GSH-px)와 catalase의 작용에 의해 H_2O 로 배설됨으로써 SOD, catalase 및 GSH-px는 유리산소의 독으로부터 생체를 보호하는 매우 중요한 효소로 알려져 있다(45). 산소를 이용하는 생물체는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 조직 내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 생성된 과산화수소를 제거하여 생체를 방어하는 기능을 나타낸다(46). 또한 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐 아니라 이들 활성산소종에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 알려져 있다(47). LPS는 nitric oxide(NO)를 생산하는 내독소로 LPS 투여로 유발된 산화적 스트레스에서 생성된 자유 라디칼인 NO는 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 형성하고 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히는 것으로 알려져 있다. 따라서 녹차씨껍질 EtOAC층은 항산화 효소계 활성화와 GSH 수준을 증가시켜 NO와 같은 자유라디칼을 소거하여 LPS에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 것으로 사료된다. 체내에서 GSH는 GSH-red에 의해 GSH의 산화된 형태인 GSSG로부터 재생산되어질 수 있으며(48), GSH의 증가는 GSH-px 활성 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 결과에서 녹차씨껍질 EtOAC분획이 LPS로 인한 산화적 스트레스에 대한 방어 작용으로 항산화 효소계 활성화와 GSH-red 단백질 발현을 증가시켜 GSH의 수준을 증가시키고 따

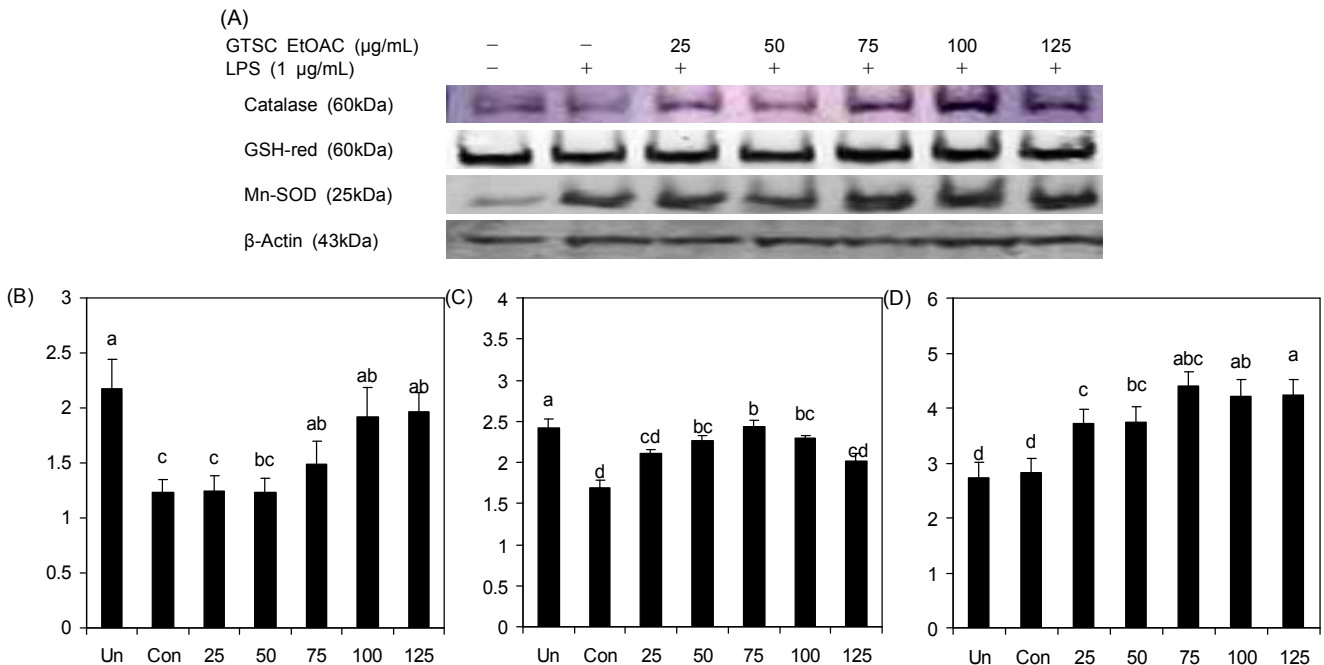


Fig. 9. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on catalase, GSH-red, and Mn-SOD protein expressions in RAW264.7 macrophage cell. Cells (5×10^6 /dish) were preincubated with and without indicated concentrations of GTSC EtOAC fraction for 2 hr, and then incubated with LPS (1 µg/mL) for 20 hr. Untreated (Un) is negative control without LPS treatment, while control (Con) is positive control treated with LPS. A: Levels of catalase, GSH-red and Mn-SOD proteins were measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. B, C and D: All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

라서 내독소인 LPS에 의한 산화적 스트레스를 저하시켜 세포를 보호하는 효과를 가지는 것으로 사료된다.

NF-κB의 transactivation

녹차씨껍질 EtOAC분획이 RAW264.7 macrophage cell에서 LPS로 유도된 산화적 스트레스에 대한 p65 농도를 핵에서 확인한 결과는 Fig. 10에서 보는 바와 같다. 핵에서의 p65 농도는 LPS 대조군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC분획을 처리한 군에서 농도 의존적으로 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 많은 세포에서 NF-κB는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor로(49) 세포질 속에서 p50, p65, IκB subunit의 trimer로 발견되고, 산화적 스트레스에 의해 IκB가 분해되면 p50/p65 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA 결합을 초래하는 것으로 알려져 있다(50). 그러므로 NF-κB 활성화 억제를 통해 염증성 매개물을 감소시키면 다양한 염증 질환을 예방할 수 있을 것이라 사료된다. NF-κB는 또한 세포의 산화환원전위 수준에서 변화하는 세포의 초기 반응 유전자의 가능한 생리적 중요성과 기작을 연구하는 특별한 인자로 NF-κB는 세포의 산화환원전위에 의해 조절된다(51). 또한 NF-κB는 cytokine 반응, 염증, 세포성장조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자이다. Park 등(30)은 클로렐라 dichloromethane이 RAW264.7 macrophage cell에서 LPS에 의해 유도된 NF-κB 활성을 저해한다고 보고하였다.

Jang 등(52)은 tanshinone IIA가 RAW264.7 macrophage cell에서 LPS로 유도된 NF-κB 활성 억제 연구에서 세포질과 핵에서의 p65의 발현이 억제되었다고 보고하였으며 이러한 결과는 본 연구의 결과와 유사하였다.

따라서 녹차씨껍질 EtOAC분획의 NF-κB 억제 작용은 염증성 매개물인 NO, PEG₂의 생성을 감소시키고 GSH 수준을 증가시키며, 항산화 효소계를 활성화시켜 세포내 산화적 스트레스 및 염증반응을 약화시키는 것으로 설명할 수 있다.

요 약

본 연구는 녹차씨껍질 분획 추출물 중 염증 저해능이 강력한 EtOAC분획을 선정하여 대식세포주인 RAW264.7 macrophage cell에서 항염증효과의 기전을 생화학적, 분자학적 수준에서 분석하고자 하였다. 녹차씨껍질 추출물 100 mg당 총 페놀함량은 EtOAC분획에서 가장 높은 수준이었으며 EtOH추출물 > PE분획 > BuOH분획과 H₂O분획의 순으로 나타났다. 또한 EtOAC분획의 NO 억제능이 가장 강한 것으로 나타나, EtOAC분획의 polyphenol을 분석한 결과 EGC (1146.5 ± 11.01 µg/g) > tannic acid(967.0 ± 32.24 µg/g) > EC (70.9 ± 4.39 µg/g) > gallic acid(947.6 ± 1.03 µg/g) > caffeic acid(37.7 ± 1.46 µg/g) > ECG(35.5 ± 3.19 µg/g) > EGCG(15.5 ± 0.09 µg/g)의 순으로 나타났다. 녹차씨껍질 EtOAC분획이 RAW264.7 macrophage cell에서 LPS 처리에 의한 산화적

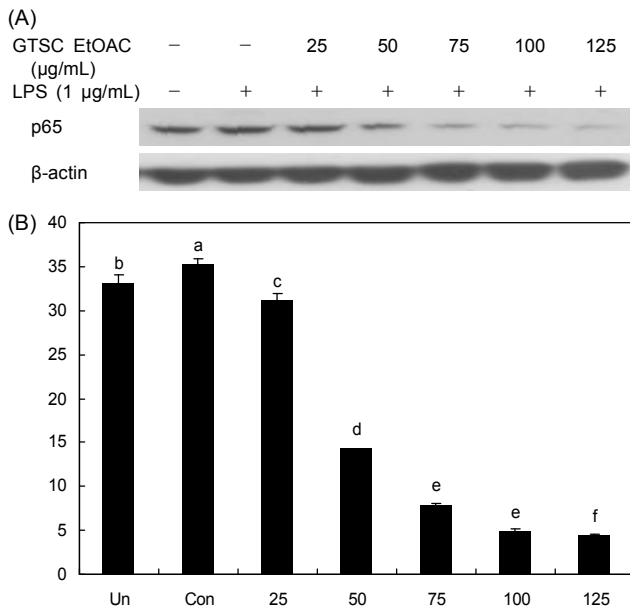


Fig. 10. Effects of the green tea seed coat EtOAC fraction on nuclear extract NF- κ B transactivation RAW264.7 macrophage cell. Cells (5×10^6 /dish) were preincubated with and without indicated concentrations of GTSC EtOAC fraction for 2 hr, and then incubated with LPS (1 μ g/mL) for 20 hr. Untreated (Un) is negative control without LPS treatment, while control (Con) is positive control treated with LPS. A: Levels of target protein were measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. The levels of NF- κ B localization in cells was determined with anti-p65 antibody. B: All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean \pm SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

스트레스로 발생하는 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시키며(IC_{50} : 80.11 μ g/mL) PGE₂의 생성을 억제하였다. 염증생성 전사인자인 iNOS의 유전자 발현은 농도 의존적으로 억제시켰으나 COX-2의 단백질 발현에는 영향을 미치지 않았다. 녹차씨껍질 EtOAC분획은 총 항산화능과 GSH 수준을 증가시켜 산화적 스트레스를 경감시키는 역할을 하며 항산화효소계인 catalase, GSH-red 및 Mn-SOD 활성의 단백질 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 핵에서의 p65 농도는 대조군에 비해 녹차씨껍질 EtOAC분획을 처리한 군에서 현저하게 낮은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서, 녹차씨껍질 EtOAC분획은 NF- κ B 활성을 억제함으로써 iNOS 단백질 발현을 억제하여 NO의 생성을 감소시키고 총 항산화능과 GSH 수준을 증가시키며, 항산화 효소계를 활성화시켜 세포 내 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 LPS 자극에 의한 염증반응을 지연하거나 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2009-0067086) 결과이다.

므로 이에 감사드립니다.

문헌

- Seo HS, Chung BH, Cho YG. 2008. Antioxidant and anti-cancer effects of Agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese lizardtail (*Saururus chinensis* Baill). *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 139-143.
- Mariathasan S, Monack DM. 2007. Inflammasome adaptors and sensors; intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40.
- Zedler S, Faist E. 2006. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 12: 595-601.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94.
- Cheon MS, Yoon T, Choi G, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK, Kim HK. 2009. Comparative study of extracts from rhubarb on inflammatory activity in RAW 264.7 cells. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 109-114.
- Coker RK, Laurent GJ. 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J* 11: 1218-1221.
- Choi C, Cho H, Park J, Cho C, Song Y. 2003. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1916-1922.
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR. 2001. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291-1297.
- Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. 1999. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an anti-rheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 442: 89-94.
- Allen R, Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.
- Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. 2006. Enzyme preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54: 2951-2956.
- Rah HH, Baik SO, Han SB, Bock JY. 1992. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinensis* L.). *J Korean Agric Chem Soc* 35: 272-275.
- Yosioka I, Nishimura T, Matsuda A, Kitagawa I. 1970. Saponin and sapogenol. II. Seeds sapogenols of *Thea sinensis* L. theasapogenol A. *Chem Pharm Bull* 18: 1621-1632.
- Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
- Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 191-202.
- Bernas T, Dobrucki J. 2002. Mitochondrial and non-mitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47: 236-242.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Erel O. 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reaction. *Clin Biochem* 37: 112-119.
- 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.
20. 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.
 21. Lee SE, Seong NS, Bang JK, Kang SW, Lee SW, Chung TY. 2003. Inhibitory effect against angiotensin converting enzyme and antioxidant activity of *Panax ginseng* C.A. meyer extract. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 236-245.
 22. Oh YJ, Seo HR, Choi YM, Jung DS. 2010. Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 373-378.
 23. Kim CM, Park YK. 2009. The effects of different extracts of *Ostericum koreanum* on the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology* 24: 169-178.
 24. Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG, Chung DW. 2010. Isolation and characterization of nicotiflorin obtained by enzymatic hydrolysis of two precursors in tea seed extract. *J Agric Food Chem* 5: 4808-4813.
 25. Lim HA, Jang CH, Kim JH, Kim JR, Ha YR, Song YS, Kim YK, Kim JS. 2006. Antiproliferative and anticarcinogenic enzyme-inducing activities of green tea seed extract in hepatoma cells. *Food Sci Biotechnol* 15: 914-919.
 26. Ippouchi K, Itou H, Azuma K, Higashio H. 2002. Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in liposaccharide-activated macrophages. *Life Sci* 71: 411-419.
 27. Wang J, Mazza G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanines and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50: 850-857.
 28. Kang JL, Lee K, Castronova V. 2000. Nitric oxide up-regulates DNA-bind activity of nuclear factor-kappa B in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants. *Mol Cell Biochem* 215: 1-9.
 29. Yen GC, Lai HH. 2002. Inhibitory effects of isoflavones on nitric oxide- or peroxynitrite-mediated DNA damage in RAW 264.7 cells and ϕ X174DNA. *Food Chem Toxicol* 40: 1433-1440.
 30. Park JY, Cho HY, Kim JK, Noh KH, Yang JR, Ahn JM, Lee MO, Song YS. 2005. Chlorella dichloromethane extract ameliorates NO production and iNOS expression through the down-regulation of NF κ B activity mediated by suppressed oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. *Clinica Chimica Acta* 351: 185-196.
 31. Park CM, Park JY, Noh KH, Shin JH, Song YS. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF κ B modulation in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 133: 834-842.
 32. Kim TH, Ko SS, Park C, Park SE, Hong SH, Kim BW, Choi YH. 2010. Anti-inflammatory effects of *Nerium indicum* ethanol extracts through suppression of NF-kappa B activation. *J Life Sci* 20: 1221-1229.
 33. Lee HH, Park C, Kim MJ, Seo MJ, Choi SH, Jeong YK, Choi YH. 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E₂ production through down-regulation of NF-kB activity by the extracts of fermented beans. *J Life Sci* 20: 388-395.
 34. Balzary RW, Cocks TM. 2006. Lipopolysaccharide induces epithelium- and prostaglandin E₂-dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 806-812.
 35. Lee EM, Choi YJ, Lee J, Ku L, Kim KH, Choi JS, Lim SJ. 2006. α -Tocopheryl succinate, in contrast to α -tocopherol and α -tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E₂ production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis* 27: 2308-2315.
 36. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. 2002. Camosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23: 983-991.
 37. Alvarez E, Leiro J, Orallo F. 2002. Effect of (-)epigallocatechin-3-gallate on respiratory burst of rat macrophages. *Int Immunopharmacol* 2: 849-855.
 38. Kim AJ, Yuh CS, Lee PJ, Choi MK, Kim SY. 2003. Mineral contents and anti-inflammatory effect of ostrich extract combined with Korean herb medicine. *Food Sci Biotechnol* 12: 617-620.
 39. Botting RM. 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 5: S113-124.
 40. Wu DD, Mennerich K, Amdt K, Sugiyama N, Ozaki K, Schwarz J, Wei H, Wu NH, Bishopric HD. 2009. Comparison of microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion and COX-2 inhibition in acute cardiac ischemia in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 90: 21-25.
 41. Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe H. 1990. Pharmacological action of tea extracts on the central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40: 351-356.
 42. Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Kim JK, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutr Res* 22: 733-744.
 43. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion leaf extracts (*Taraxacum officinale*) on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
 44. Nakayama T, Yoshizaki A, Izumida S, Suehiro T, Miura S, Uemura T, Yakata Y, Shichijo K, Yamashita S, Sekin I. 2007. Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor alpha in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 30: 825-833.
 45. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
 46. Park KY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS. 1995. Superoxide dismutase gene expression induced by lipopolysaccharide in alveolar macrophage of rat. *Tuberc Respir Dis* 42: 522-534.
 47. 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.
 48. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata de V, Casini FA. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66: 1499-1503.
 49. Grimm S, Baeuerle PA. 1993. The inducible transcription factor NF κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290: 297-308.
 50. 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.
 51. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I. 1993. Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF κ B. *Nature* 365: 182-185.
 52. Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Jeong SI, You YO. 2006. Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF-kB activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *Eur J Pharmacol* 542: 1-7.

(2011년 2월 22일 접수; 2011년 3월 4일 채택)