

RAW264.7 대식세포에서 Heme Oxygenase-1 발현을 통한 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 잎 추출물의 항염증효과

정혜림 · 성미선 · 김영화 · 함현미 · 최용민 · 이준수[†]

충북대학교 식품공학과

Anti-Inflammatory Activity of *Salvia plebeia* R. Br. Leaf through Heme Oxygenase-1 Induction in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages

Hyerim Jeong, Misun Sung, Yunghwa Kim, Hyeonmi Ham, Youngmin Choi, and Junsoo Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract

Salvia plebeia R. Br. (Labiatae), distributed in many countries such as Korea, China, India, Iran, and Australia, is used as a folk remedy for a variety of inflammatory diseases including hepatitis, cough, diarrhea, gonorrhea, menorrhagia, tumors, and hemorrhoids. This study focused on determining the involvement of anti-inflammatory heme oxygenase-1 (HO-1) in the inhibitory activity of an extract of *Salvia plebeia* R. Br. leaves (SPL) on nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. SPL extract at the highest concentration (500 µg/mL) significantly inhibited NO production by approximately 85% and suppressed iNOS protein expression by approximately 90% compared to LPS-stimulated cells. The SPL extract induced the expression of HO-1 in a dose-dependent manner, and blocking HO-1 activity abolished the inhibitory effects of the SPL extract on NO production. These results suggest that an SPL extract has potent anti-inflammatory activity through HO-1 induction in RAW264.7 macrophages.

Key words: *Salvia plebeia*, anti-inflammation, nitric oxide, heme oxygenase-1

서 론

염증은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어반응의 하나로써 손상된 조직을 재생하려는 기작이다. 그러나 지속적인 염증반응은 만성염증질환 및 종양 등의 유발 원인이 되기도 한다(1). 대식세포는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직세포로 염증반응이 일어나면 nitric oxide(NO), prostaglandin (PGE₂), tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin(IL)-1, IL-6 등 염증매개체들을 방출한다(2). 염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase(NOS)에 의해 합성된다. NO 형성은 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있다. 그러나 과도한 NO의 형성은 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자변이, 폐혈성 쇼크 및 신경손상 등을 일으킨다(3). Prostaglandins(PGs)는 염증뿐 아니라 세포분열이나 증식을 조절함으로써 각종 인체 질병과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되고 있다(4). PGs 중 PGE₂는 염증과정에 중요한 역할을 하며 종양의 세포사멸을 억제하고 angiogenesis를 촉진하는 등 종양생성에도 깊이 관여하고 있다(5). Cyclooxygenase(COX)는 arach-

idonic acid를 PG로 전환시키는 효소로서 특히 COX-2는 growth factor, mitogens, cytokines 등과 같은 요인에 의해 발현이 증가되어 다량의 PG를 생성함으로써 염증관련 질병을 유발한다(6).

Heme oxygenase(HO)는 heme을 biliverdin, carbon monoxide(CO)와 iron으로 전환시키는 중요한 효소이다(7). 이렇게 생긴 biliverdin은 biliverdin 환원효소에 의해 bilirubin이 된다. 이중 HO-1은 스트레스나 허혈, 염증 상황에서 유도되어지는 단백질로서 지질의 과산화, 단백질산화, RNA/DNA 손상 등에 대한 방어 작용을 한다(8). HO-1이 매개하는 세포보호 작용은 산화적인 스트레스에 민감한 조직에 결정적인 역할을 한다(9). HO-1의 산물인 bilirubin은 부종형성, 백혈구의 흡착과 이동을 억제하고 pro-inflammatory cytokines의 생성을 감소시키는 것으로 보고되고 있다(10). CO와 biliverdin은 COX의 활성 및 발현과 NO의 생성을 통제할 수 있으며 따라서 염증반응을 예방한다고 알려져 있다(11).

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 또는 이년생 직립초목으로 우리나라 전 지역에서 자생한다. 설건초, 과동청 혹은 뱀배추란 이명을 가지

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

고 있으며 예로부터 기침, 천식, 간염, 설사, 염증 등에 효과가 있다고 알려져 있다(12). 주요 성분으로 flavonoid, polyphenol, saponin, 강심배당체, 불포화 스테롤 등이 보고되어 있다(13). 현재 배암차즈기 추출물이 항산화, 항균, 항알레르기 효과와 대식세포에 LPS 자극처리 시에 NO 형성을 억제함에 따라 항염증 효과가 있다고 보고된 바 있다(12). 그러나 HO-1에 의한 항염증 효과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 배암차즈기 잎의 항염증 효과를 알아보기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)로 염증을 유도한 RAW264.7 대식세포에서 염증 반응의 주요한 매개인 NO와 PGE2 생성에 미치는 영향과 iNOS와 COX의 단백질 발현에 영향을 알아보고 배암차즈기 추출물이 HO-1 발현에 미치는 영향을 연구하여 항염증 효과를 탐색하고 작용기작을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 배암차즈기는 2011년 전라도 지역 농가에서 구입하여 사용하였다. DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)와 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. Zinc protoporphyrin IX(ZnPP)는 Frontier scientific Inc.(Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 사용된 추출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

배암차즈기 추출물의 제조

배암차즈기 잎을 자연건조 한 뒤 10 g을 100°C 물에 넣고 12시간 추출하였다. 추출 후 고형분은 filter paper(Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 분리하였다. 추출액은 동결건조한 뒤 질소층진 하여 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 수기의 무게 증가분을 이용하여 수율을 측정하고 추출물의 농도를 50 mg/mL가 되도록 dimethylsulfoxide(DMSO)에 재 용해하였다. 실험에 사용된 추출물은 모두 0.2 µm filter를 사용하여 멸균한 후 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 세포주 RAW264.7 대식세포는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW264.7 대식세포는 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 50 µg/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지에서 2×10⁶개의 세포를 직경 10 mm의 culture dish에 넣고 5% CO₂가 공급되는 incubator에서 37°C로 배양하였다.

Nitric oxide 함량 측정

RAW264.7 대식세포를 1.5×10⁵ cells/well의 농도로 96

well plate에 분주하고, 6시간 후 배암차즈기 잎 추출물을 농도별(50, 100, 250, 500 µg/mL)로 처리한 뒤 LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 18시간 배양하였다. 세포배양액 150 µL와 Griess 시약 20 µL를 혼합하여 37°C에서 10분 동안 incubator에서 반응시킨 후 ELISA reader(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO의 함량을 산출하였다(14).

세포 독성 측정

배암차즈기 잎의 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다(15). RAW264.7 대식세포를 1.5×10⁵ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 6시간 후 배암차즈기 잎 추출물을 농도별(50, 100, 250, 500 µg/mL)로 처리하고 LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 18시간 배양하였다. 배양 후 MTT(5 mg/mL) 시약을 각 well에 20 µL씩 첨가하고 4시간 동안 37°C incubator에서 반응시킨 후 MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 각 well에 150 µL의 DMSO를 첨가하여 MTT를 환원하여 형성된 fomazan을 녹여 ELISA reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Prostaglandin E2 생성 저해 활성 측정

RAW264.7 대식세포를 1.5×10⁵ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 6시간 후 실험에 사용된 배암차즈기 잎 추출물을 농도별(50, 100, 250, 500 µg/mL)로 처리하고 LPS(1 µg/mL)로 염증을 유도하여 18시간 배양하였다. 일정량의 상등액을 취해 PGE2 kit(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 PGE2를 측정하였다(16).

Western blot

RAW264.7 대식세포를 1×10⁶ cells/well의 농도로 6 well plate에 분주하여 6시간 후 배암차즈기 추출물을 농도별(50, 100, 250, 500 µg/mL)로 처리한 뒤 LPS(1 µg/mL)를 첨가하여 18시간 동안 배양하였다. 18시간 배양 후 PBS로 3회 세척한 후 세포를 얻어 원심분리 하여 pellet에 lysis buffer를 가하여 -20°C에서 overnight 한 후, 12,000 rpm으로 30분 동안 원심분리를 하여 상등액을 모았다. 모은 상등액은 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 20 µg을 5×sample buffer에 넣고 100°C에서 10분간 불활성화 시켜 10% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동 된 SDS polyacrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 5% non-fat dry milk에서 1시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2와 HO-1의 항체는 1:1,000의 비율로 상온에서 2시간 부착시켰으며 그 후 tris buffered saline Tween-20(TBST) buffer로 10분간 3번 washing 하였다. 2차 항체는 1:2000의 비율로 희석하여 2시

간 상온에서 부착시킨 후 TBST buffer로 10분간 3번 washing 하였고 ECL(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway Township, NJ, USA)을 처리한 membrane을 암실에서 X-ray flim에 감광시켜 현상하였다(17).

Real-Time PCR

RAW264.7 대식세포 세포를 1×10^6 cells/well의 농도로 6 well plate에 분주 6시간 후 배암차즈기 추출물을 농도별로 처리한 뒤 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 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, CA, USA)로 정량하였다. RNA(1 μg)을 SuperScript III(Invitrogen)로 cDNA를 합성하여 iQ5 Real-Time PCR(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용해 iNOS의 발현량을 측정하였으며(18), control로는 GAPDH를 사용하였다. 사용된 iNOS의 primer는 sense 5'-acc atg gag cat ccc aag ta-3', anti-sense 5'-cca tgt acc aac cat tga agg-3'이었으며 56°C에서 annealing하였고 GAPDH의 primer는 sense 5'-aat gt atc cgt tgt gga tct ga-3', antisense 5'-gct tca cca cct tct tga tgt-3'이었으며 56°C에서 annealing하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다. 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 t-test와 분산분석(one-way ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

세포 독성과 NO 생성 저해 효과

NO는 cytokine의 자극 또는 미생물 침입으로 인해 세포가 활성화되는 것으로서 NO 합성 효소에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체이다. RAW264.7 대식세포에 LPS 자극에 의해 많은 양의 NO를 형성하며 이에 의한 세포 독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다(19). 본 실험에서는 RAW 264.7 대식세포에서 배암차즈기 잎 추출물의 NO 생성 저해 효과를 알아보기 위하여 LPS 자극을 준 세포에 배암차즈기 잎 추출물을 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 전 처리하여 18시간 후의 NO 함량을 측정하였다(Fig. 1). 배암차즈기 잎 추출물의 경우 농도별로 22.8, 17.8, 10.2, 4.6 μM 로 저해 효과를 나타내었고 유의적인 차이를 보였다. 실험에 사용된 배암차즈기의 추출물의 농도별 세포독성 여부를 MTT assay를 통하여 알아보았으며 사용된 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 보여 배암차즈기 추출물은 RAW264.7 세포에서 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 따라서 배암차즈기 잎 추출물의 처리

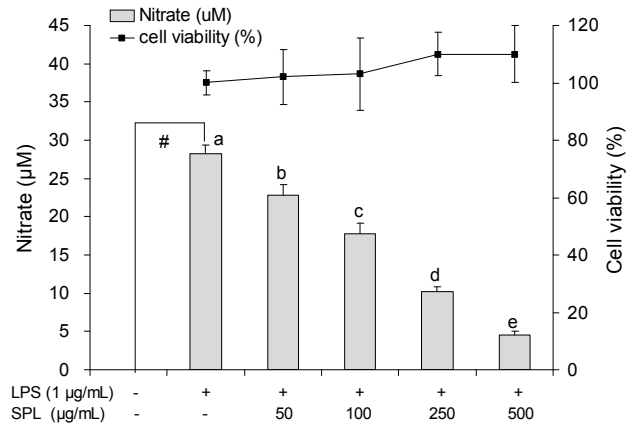


Fig. 1. Effects of the SPL hot water extract on cell viability and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean \pm SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves. # $p < 0.05$ compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

농도를 RAW264.7 대식세포에서 독성을 보이지 않은 0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여 다음 실험을 진행하였다. Kamatou 등(20)은 *Salvia* species인 *Salvia runcinata*, *Salvia stenophylla*, *Salvia repens*의 항산화, 항염, 항균 활성을 보고하고 있으며 Qu 등(21)은 *Salvia plebeia*의 성분인 homoplantagin이 간보호 효과를 나타내며 이는 LPS 처리를 한 간세포에 생성되어지는 TNF- α , IL-1, IL-6 및 proinflammatory cytokine의 생성을 억제하는 효과를 나타낸다고 보고하였다.

PGE2 저해 활성

Prostaglandin은 국소적으로 활성화되는 물질로서 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(COX)의 작용에 의해 합성되어진다. PGE2는 염증반응을 유도하는 중요한 인자로 염증반응에 동반되어지는 홍반, 부종 및 통증을 유발한다(22). 따라서 본 연구에서 배암차즈기 잎 추출물의 PGE2 억제 활성을 측정하였다. 배암차즈기 잎 추출물을 LPS와 함께 RAW264.7 대식세포에 처리 후, 배지 중의 PGE2의 농도를 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. LPS로 활성화된 PGE2는 20 ng/mL 수준으로 증가하였으며 실험에 사용된 배암차즈기 잎 추출물 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 16.3, 15.0, 6.5, 1.2 ng/mL로 감소하는 경향을 나타내었다. Hinz 등(23), Pang과 Hoult(24)는 sialic acid와 aspirin이 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)로서 LPS 자극을 준 대식세포의 PGE2 분비를 줄이고 이는 COX-2 효소의 발현 억제를 통한 것이라고 보고하였으며, 이는 또한 NO에 의해 조절되어진다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 배암차즈기 잎 추출물에 의한 효과가 NO가 감소되어짐에 따라 PGE2의 저해 효과에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.

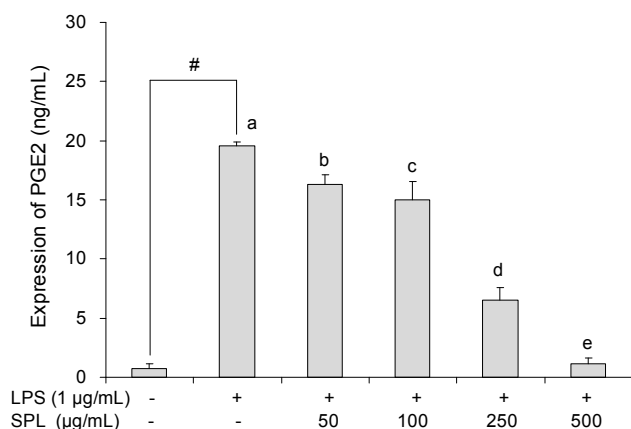


Fig. 2. Effects of SPL hot water extract on prostaglandin E2 production in LPS-induced RAW264.7 macrophage. Each value is expressed as a mean±SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves; PGE2, prostaglandin E2. #p<0.05 compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

iNOS 생성 억제 효과

NO를 형성하는 NO synthase(NOS)는 3가지 이성질체로 존재한다. Endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS)는 상피세포와 신경에 존재하여 정상적 생리기능을 조절하기 위해 지속적으로 NO를 소량 생성하지만, 대식세포나 혈관세포의 inducible NOS(iNOS)는 NO를 과량 생성하여 면역질환 및 패혈증을 초래한다(25). 배암차즈기 잎 추출물이 NO의 분비를 감소시켰으므로 이러한 배암차즈기 잎의 효과가 iNOS의 발현억제에 기인한 것인지 알아보기 위하여 western blot을 실행하였다. iNOS 단백질은 자극을 하지 않은 상태의 RAW264.7 대식세포에서는 거의 발현되지 않았지만 LPS 자극에 의하여 현저하게 증가하였다. LPS에 의해 증가한 iNOS 단백질의 발현은 배암차즈기 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하였으며, iNOS 단백질의 발현은 50, 100, 250, 500 µg/mL에서 14.8, 44.1, 71.7 및 87.3%의 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). Lee 등(26)과 Lee 등(27)에 연구결과에 의하면 NO 저해 활성이 높은 *Eupatorium japonicum* ethanol 추출물과 *Rhus verniciflua* stroke의 성분인 sulfuretin이 iNOS 단백질 발현도 효과적으로 억제한다고 보고하였다. 본 연구의 배암차즈기 잎 추출물의 NO 생성 억제활성과 iNOS 발현 억제활성은 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 배암차즈기 잎 추출물에 의한 iNOS 단백질 발현억제는 NO의 생성억제에 영향을 미친다고 판단된다.

COX-2 생성 억제 효과

COX는 thromboxane, prostacyclin, PG를 포함하는 prostanoid라고 불리는 중요한 biological mediator의 형성을 위한 효소로서 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽 보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다. 반면 COX-2는 염증과 같은 병적인 환경에서 대식세포 등 면역관련 세포의 활성을 유도하여 염

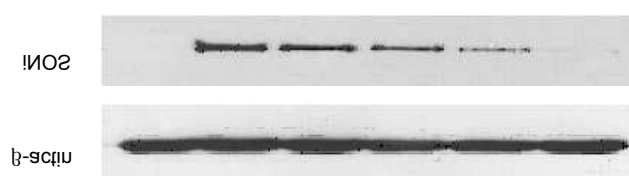
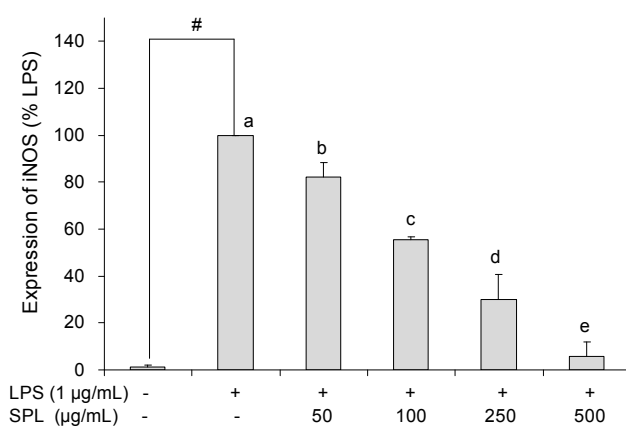


Fig. 3. Effects of the SPL hot water extract on LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase protein expression in RAW264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean ±SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves; iNOS, inducible nitric oxide synthase. #p<0.05 compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

증반응을 일으키는 원인 물질이다(6). 따라서 과량의 PGE2를 생성하는 효소인 COX-2의 생성에 대한 배암차즈기의 추출물의 영향을 확인하기 위하여 western blot을 실행하였다. COX-2 단백질은 자극하지 않은 RAW264.7 대식세포에서는 거의 생합성 되지 않았지만 LPS 자극에 의하여 유의적으로 발현이 증가하였다. 증가한 COX-2는 배암차즈기 추출물을 50, 100, 250, 500 µg/mL 농도로 처리함에 따라 9.2, 22.8, 24.3, 47.2%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4). Jung 등(28)은 NO와 PGE2 억제활성에 효과가 있는 *Dioscorea bulbifera*의 methanol 추출물의 COX-2 활성을 본 결과 LPS를 처리한 대식세포의 COX-2 단백질 발현이 증가되었으며, 증가한 COX-2의 발현이 추출물에 의해 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 이 결과는 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 보였으며 이는 배암차즈기 추출물이 COX-2를 억제함으로써 염증 유발 물질인 PGE2의 활성 역시 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다.

iNOS의 mRNA 발현량 억제 효과

배암차즈기 잎 추출물이 iNOS 단백질의 생합성을 억제하였으므로 전사단계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR을 실행하였다. LPS를 자극하지 않은 RAW264.7 대식세포에서 iNOS mRNA 발현은 거의 나타나지 않았지만 LPS 자극에 의하여 발현이 증가되었다. 증가한 iNOS mRNA는 LPS로 자극을 주어 발현량을 증가시킨 군과 비교하여 LPS만 처리한 그룹에 대한 비율로 나타냈으며 배암차즈기

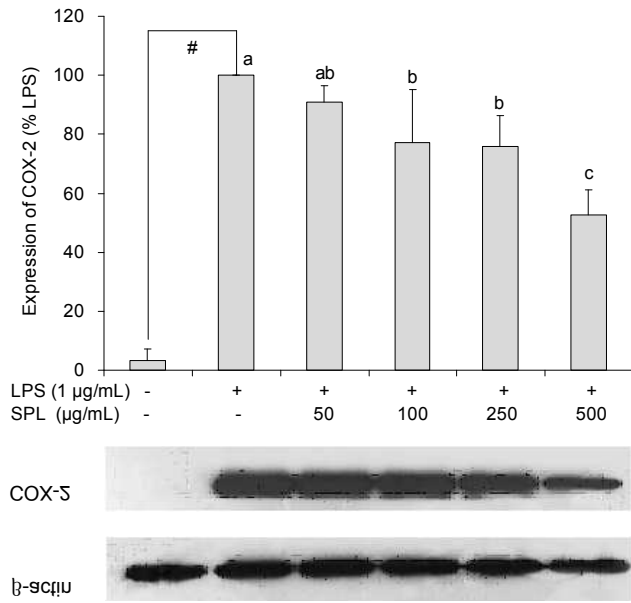


Fig. 4. Effects of the SPL hot water extract on LPS-stimulated inducible cyclooxygenase-2 protein expression in RAW 264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean±SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves; COX-2, cyclooxygenase-2. #p<0.05 compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

있 추출물을 50, 100, 250, 500 µg/mL 농도로 처리함에 따라 89.5, 73.2, 36.0, 26.6%로 iNOS mRNA의 감소 경향을 보였다(Fig. 5). Kim 등(29)의 연구에 의하면 NO 생성 억제 활성화 과 iNOS 단백질 발현 억제 효과가 있는 capsaicin을 real-time PCR을 실시하여 iNOS의 mRNA 양을 측정된 결과 NO와 iNOS 억제 효과와 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 결

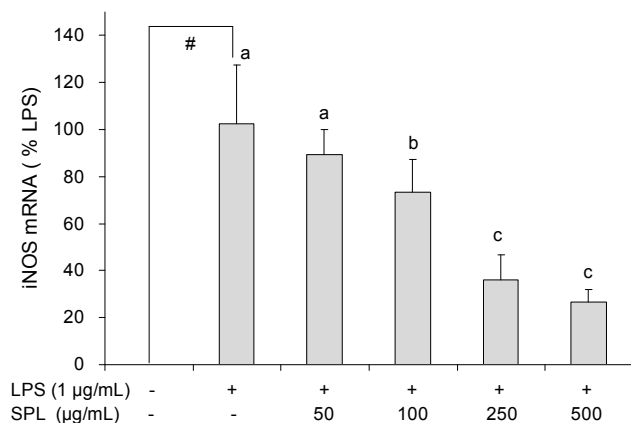


Fig. 5. Effects of flower extracts from SPL hot water extract on LPS-induced expression of iNOS mRNA. Relative iNOS expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was performed by Real-time PCR. Each value is expressed as a mean±SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves; iNOS, inducible nitric oxide synthase. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{iNOS} - \Delta Ct_{GAPDH}$. #p<0.05 compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

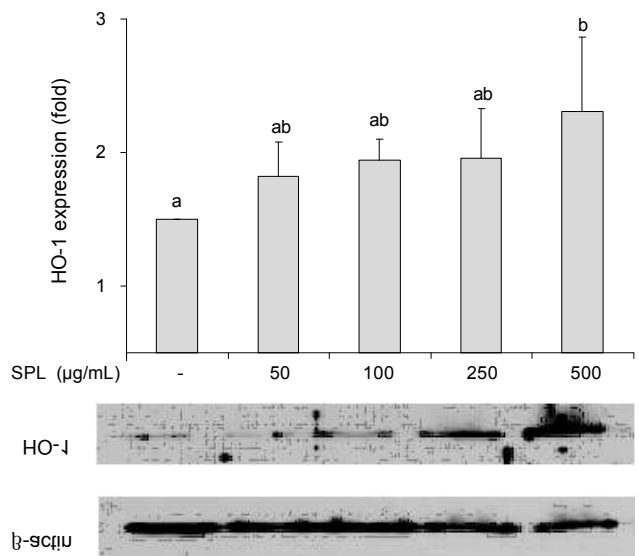


Fig. 6. Effects of SPL hot water extract on the production of heme oxygenase-1. Each value is expressed as a mean±SD (n=3). SPL, *Salvia plebeia* R. Br. leaves; HO-1, heme oxygenase-1. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

과는 본 연구와 비슷한 결과를 보였으며 따라서 배암차즈기 잎 추출물이 iNOS의 전사단계에서 저해 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

Heme oxygenase-1(HO-1)의 발현 효과

HO-1은 heme을 분해하여 biliverdin, free iron, CO 등을 생성하는데 관여하는 속도 조절 효소로서 산화적 스트레스에 대한 보호 작용을 하여 염증 반응을 약화시킨다(30). HO-1에 의해 생성되는 CO는 혈관을 확장시켜 장기 손상을 억제하며 항염증 및 항세포자멸사의 기능이 있으며, bilirubin은 출혈 쇼크 시 정맥 내 백혈구 이동을 억제시켜 염증을 감소시키는 것으로 보고되었다(31). 배암차즈기 잎 추출물은 500 µg/mL 농도에서 HO-1의 발현량을 1.8배 유의적으로 증가 시킬을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 배암차즈기 잎 추출물에 의한 HO-1 발현이 NO 생성에 미치는 영향에 대해 확인하기 위하여 HO-1 inhibitor인 ZnPP를 사용하였다. 실험결과 ZnPP를 처리하여 HO-1 발현을 억제하였을 때 추출물에 의해 감소되었던 NO의 함량이 다시 증가되었다(Fig. 7). 본 실험 결과는 HO-1이 NO의 생성을 억제할 수 있으며 따라서 염증을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있으며 실험에서 이용되었던 배암차즈기 잎 추출물이 HO-1의 유도를 통하여 염증 반응에 효과가 있음을 알 수 있었다. Park 등(32)의 연구에서 HO-1의 항염증 효과를 알아보기 위해 ZnPP를 처리한 결과 surfactin에 의해 감소되었던 pro-inflammatory cytokine이 다시 증가되어지는 것을 확인하였으며 이러한 결과는 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구 결과 배암차즈기 잎 추출물의 항염증 효과는 HO-1의 이러한 기작을 통하여 작용되었을 것이라고 예측할 수 있으며

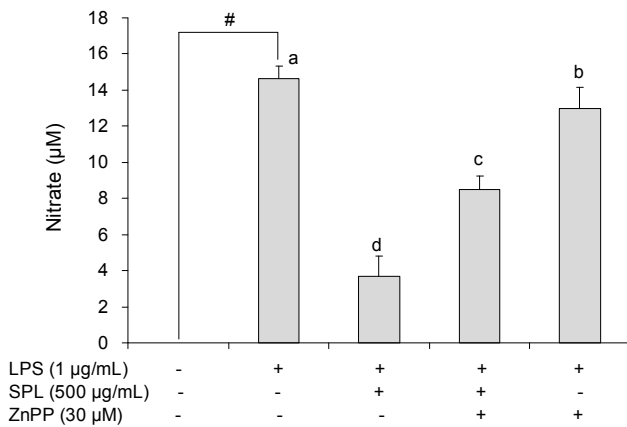


Fig. 7. Involvement of heme oxygenase-1 in the inhibitory effects of SPL hot water extract on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Each value is expressed as a mean±SD (n=3). LPS, lipopolysaccharides; SPL, *Salvia plebeia* R. Br leaves; ZnPP, zinc protoporphyrin IX. #p<0.05 compared to control by t-test. Values with different letters above bar graphs are significantly different at the 5% level by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

HO-1 발현을 통하여 염증뿐만 아니라 다양한 질병의 치료에도 활용될 것으로 예상된다.

요 약

본 연구에서는 배암차즈기의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 NO, PGE2 활성, iNOS, COX-2와 HO-1의 발현의 변화를 측정하였다. 연구결과 RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 증가되었던 NO의 함량이 배암차즈기 잎 추출물을 처리한 결과 농도 의존적으로 감소되었음을 확인할 수 있었으며, 또한 배암차즈기 잎 추출물은 NO의 생성에 관여하는 iNOS 단백질 발현과 전사단계의 iNOS의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것을 알 수 있었다. 이 결과로 배암차즈기 잎 추출물이 전사단계에서 저해 활성을 나타낸다는 것을 보여주었다. NO 이외의 pro-inflammatory cytokine인 PGE2 또한 배암차즈기 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며 PGE2 생성에 관여하는 효소인 COX-2의 발현 또한 저해하는 활성을 나타내었다. 또한, 배암차즈기 잎 추출물은 HO-1 단백질 발현을 농도 의존적으로 유도하였다. 본 연구 결과 배암차즈기 추출물은 염증을 일으키는 주요인자인 NO, PGE2를 저해하였고, iNOS, COX-2의 발현, iNOS의 mRNA 발현을 억제하여 항염증 효과에 우수한 효과를 나타내었다. 이는 산화적 손상으로부터 세포 보호 방어기작에 관여하는 HO-1의 발현을 증가시킴에 따라 항염증에 우수한 효과를 보였으며 항염증 연구의 기초 자료로 활용될 것으로 예상된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ismäki P, Punnonen J. 1997. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med* 29: 449-507.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 2907-2916.
- Kim JY, Jung KS, Jeong HG. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321-326.
- Botting RM. 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 5: S113-124.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12013-12017.
- Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
- Otterbein LE, Choi AM. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1029-1037.
- Schipper HM. 2000. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp Gerontol* 35: 821-830.
- Nakao A, Otterbein LE, Ovehaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimizuka K, Nalesnik MA, Kaizu T, Uchiyama T, Liu F, Murase N, Bauer AJ, Bach FH. 2004. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 127: 595-606.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-63.
- Lim JA, Yun BW, Baek SH. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korea J Medical Crop Sci* 15: 183-188.
- Shin MK, Kim SK, Lee SK, Yang EY, Lee HO, Baek SH. 2001. Cytotoxicity and antimicrobial effect of the extract of *Salvia plebeia*. *Kor J Pharmacogn* 32: 55-60.
- Bae IK, Min HY, Han AR, Seo EK, Lee SK. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazillin in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 513: 237-242.
- 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-κB and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 71: 1198-1205.
- Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL. 2005. Anti-inflammatory potential of *Androea camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol* 5: 1914-1925.
- 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 vascular smooth muscle cells of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 70: 917-926.
18. Jung KH, Ha E, Kin 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.
 19. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide, and N^G-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215.
 20. Kamatou GPP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Lourens ACU, Baser KHC, Demirci B, Lindsey KL, Van Staden J, Steenkamp P. 2005. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J Ethnopharmacol* 102: 382-390.
 21. Qu XJ, Xia X, Wang YS, Song MJ, Liu LL, Xie YY, Cheng YN, Liu XJ, Qiu LL, Xiang L, Gao JJ, Zhang XF, Cui SX. 2009. Protective effects of *Salvia plebeia* compound homoplantagin on hepatocyte injury. *Food Chem Toxicol* 47: 1710-1715.
 22. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-150.
 23. Hinz B, Kraus V, Pahl A, Brune K. 2000. Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2 dependent prostaglandin E2 synthesis in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 197-202.
 24. Pang L, Hoult JRS. 1997. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. *Biochem Pharmacol* 53: 493-500.
 25. Garcia X, Stein F. 2006. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 17: 55-57.
 26. Lee HN, Lim DY, Lim SS, Kim JD, Yoon Park JH. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 65-71.
 27. Lee DS, Jeong GS, Li B, Park H, Kim YC. 2010. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 10: 850-858.
 28. Jung JY, Lee JR, Byun SH, Jung JW, Kim YH, Kim SC. 2010. Inhibition effect of *Dioscorea bulbifera* methanol extract on pro-inflammatory mediator in vitro and in vivo. *Korea J Oriental Physiol Pathol* 24: 310-318.
 29. Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R. 2003. Capsaicin exhibition anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 15: 299-306.
 30. Li L, Grenard P, Nhieu JT, Julien B, Mallat A, Habib A, Lotersztajn S. 2003. Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 125: 460-468.
 31. Tamion F, Richard V, Bonmarchand G, Leroy J, Lebreton JP, Thuillez C. 2001. Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1933-1938.
 32. Park SY, Kim YH, Kim EY, Ryu EY, Lee SJ. 2010. Heme oxygenase-1 signals are involved in preferential inhibition of pro-inflammatory cytokine release by surfactin in cell activated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Chem Biol Interact* 188: 437-445.

(2012년 3월 26일 접수; 2012년 4월 12일 채택)