

## 마디풀(*Polygonum aviculare* L.) 추출물의 대식구 면역증강 효과

전창배 · 김영훈 · Dulamjav Batsuren\* · Jigjidsuren Tunsag\* · 노주원\*\* · 판철호\*\* · 이재권#  
충북대학교 사범대학 생물교육과, \*몽골과학원 화학화공연구소, \*\*한국과학기술연구원 기능성천연물센터  
(Received September 7, 2013; Revised December 4, 2013; Accepted December 16, 2013)

### Immune-stimulating Effects of *Polygonum aviculare* L. Extract on Macrophages

Chang Bae Jeon, Young Hoon Kim, Dulamjav Batsuren\*, Jigjidsuren Tunsag\*,  
Chu Won Nho\*\*, Cheol-Ho Pan\*\* and Jae Kwon Lee#

Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*Institutes of Chemistry and Chemical Technology, MAS, 51 Ulaanbaatar, Mongolia

\*\*Functional Food Center, Korea Institute of Science and Technology, Gangneung 210-340, Korea

**Abstract** — In this study we demonstrated whether the extract of *Polygonum aviculare* L. (PAE) can be applied to the immune-stimulating responses in macrophages (Raw 264.7 cells). Cell viability was determined by WST-8 assay, and all four doses of PAE (5, 10, 20, and 40  $\mu\text{g/ml}$ ) had no significant cytotoxicity during the entire experimental period. PAE increased the production of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO), and mRNA expressions and protein levels of pro-inflammatory cytokines (tumor necrotic factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6) in the same cells. These immune-stimulating activities of PAE were found to be caused by the stimulation of NF $\kappa$ B signal and phosphorylation of MAP kinases (p38, ERK and JNK).

**Keywords** □ *Polygonum aviculare* L., macrophage, cytokine, inflammation

감염 및 질병의 발생은 면역 기능이 저하된 상태에서 주로 발생하기 때문에 신체 면역체계의 기능이 저하된 경우 천연물을 통해 이들 면역 반응을 증진시킬 수 있는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 최근 이러한 요구에 부응하여 천연물 중에 존재하는 성분들의 단순한 영양소 역할 외에 기능성 물질로서의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 천연 식물 자원을 대상으로 면역증강 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

마디풀은 마디풀과(*Polygonaceae*)에 속하는 한해살이풀로서 줄기는 둥근 기둥모양에 가지가 있으며 여름철 개화 전에 지상부를 채취하여 건조한 것을 약용으로 사용하며, 어린잎은 식용으로도 사용한다. 또한 마디풀의 전초를 건조하여 황달, 복통, 구충제, 혈뇨증, 설사, 이질, 류마티스, 고혈압 및 이뇨제로 이용하고 있다.<sup>2)</sup>

대식세포(Macrophage)는 내재면역뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 면역 반응 시에는 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )와 같은 사이토카인(cytokine)을 생산하여 감염 초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> 대식세포가 물질에 대응할 때 분비되는 산화질소(nitric oxide)는 면역증강 효과가 있는 것으로 보고되었다.<sup>5-7)</sup>

본 연구는 마디풀 추출물(PAE)의 면역증강 효과를 검증하기 위하여 마우스 대식구의 산화질소의 생성량, inducible nitric oxide(iNOS)의 발현 및 사이토카인 생성에 미치는 영향을 살펴 보았다. 뿐만 아니라 활성 기전을 연구하기 위하여 MAP kinases의 인산화 및 I $\kappa$ B의 활성을 확인하였다.

### 재료 및 실험방법

#### 마디풀 에탄올 추출물의 제조

마디풀을 수돗물로 2~3번 씻어내고 동결건조기를 사용하여 완전히 건조한 후 파쇄기로 미세하게 파쇄시켜 사용 시까지 냉

#### #Corresponding Author

Jae Kwon Lee

Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Tel.: 043-261-2734 Fax.: 043-260-3361

E-mail: chemokine@cbnu.ac.kr

동보관(-20°C)하였다. 건조물 800 g에 80% 에탄올 20 l를 가하여 상온에서 4일간 추출한 다음 추출물을 거르로 1차 여과하였다. 여과액을 3000 ×g에서 3분간 원심 분리한 다음, 상층액만을 취하여 0.2 µm filter로 여과하였다. 여과시킨 추출물은 감압건조기(evaporator)를 이용하여 농축하였다.

### 실험 재료

Lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, U.S.A.)에서, WST-8은 Takara Bio Inc.(Takara Bio Inc, Japan)에서, IkB, p38, ERK, JNK, pERK, β-actin의 단클론 항체 그리고 이 항체들에 대한 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, U.S.A.)에서, p-p38, pJNK 단클론 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Cell Signaling, U.S.A.)에서 구입하였다. TNF-α, IL-1β, IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

### 세포 배양

쥐 대식구 세포주(mouse macrophage cell line)인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone Laboratories, Logan, UT, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories), 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

### 세포 독성 측정

96 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 Raw 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, PAE의 농도가 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml가 되도록 처리하였다. 이후 WST-8 시약을 각 well에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 1시간 배양하였다. 측정은 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 산화질소(nitric oxide) 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 다음 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 PAE의 농도가 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml가 되도록 처리하여 24시간 배양하였다. 배양상층액 중 산화질소의 농도는 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid+ 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O)을 이용하여 흡광도 550 nm에서 측정하였다.

### 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)

사이토카인을 측정하기 위하여 6 well plate에 세포(0.5×10<sup>6</sup>

cells/ml)를 분주하고 PAE의 농도가 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml가 되도록 처리하여 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 다음 배양 상층액을 수거하여 사이토카인을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70°C에서 보관하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit(Pierce endogen, Rockford, IL, U.S.A.)를 사용하여 측정 하였다.

### 웨스턴 블롯법(Western blot)

Raw 264.7 세포를 6 well plate(1.5×10<sup>6</sup> cells/ml)에 PAE 또는 LPS를 처리하여 일정 시간 배양 후 원심분리 방법으로 세포를 수거하였다. 회수한 세포를 Proprep(Intron, Seoul, Korea)으로 분쇄하여 세포 추출물을 준비한다. 준비된 시료는 bicinchoninic acid(BCA)법으로 총 단백질량을 구하였다. 정량된 단백질을 동일한 농도로 12% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) 막에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. β-actin, iNOS, p38, ERK, JNK, p-p38, pERK, pJNK 단백질의 발현은 각각의 단 클론 항체를 이용하여 확인하였다.

### 통계처리

실험 결과는 mean±SD로 나타냈으며, t-test의 통계처리 방법으로 통계적 유의성을 검정하였다.

## 실험 결과

### PAE의 RAW 264.7 세포에 대한 독성

Fig. 1에 나타난 것과 같이 실험군은 PAE를 5, 10, 20 그리고 40 µg/ml의 농도로 처리하고, 음성 대조군은 무처리군(control),

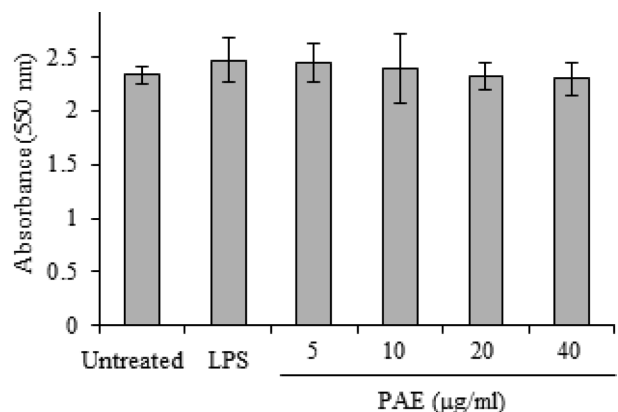
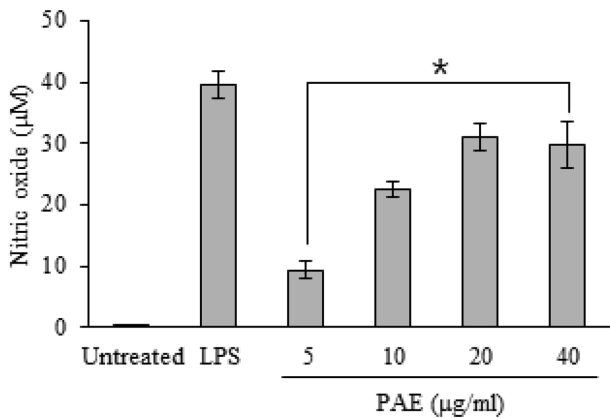


Fig. 1 – Cytotoxicity of PAE on Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with various concentrations (5, 10, 20 and 40 µg/ml) of PAE. After 24 hour cytotoxicity was determined by measuring the absorbance at 450 nm after WST-8 reagent addition. The values shown here are means±S.D. of three independent experiments.

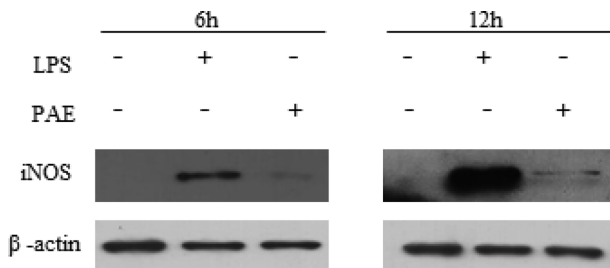
양성 대조군은 LPS(1 µg/ml)만 처리하여 24시간 배양 후 WST-8을 이용하여 세포에 대한 독성을 비교하였다. 실험결과 40 µg/ml 농도까지의 다양한 PAE의 실험농도에서 Raw 264.7 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다.

**PAE의 산화질소 생성에 미치는 영향**

Raw 264.7 세포에서 PAE에 의한 산화질소 생성 정도를 관찰하기 위하여 PAE를 Fig. 1에서와 동일한 조건으로 처리 한 후 얻어지는 세포 배양 상층 액에서 산화질소 생성을 측정하였다. 무처리군에서는 산화질소가 생성되지 않았지만, LPS 처리한 양성 대조군에서 40 µM 정도의 산화질소가 생성 되었다. PAE를 처리한 실험 군에서는 비록 LPS 처리군 보다는 낮지만 PAE 농도 증가에 의존적으로 유의한 산화질소 생성 증가를 나타내었다.



**Fig. 2** – Effects of PAE on the nitric oxide production of the Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with various concentrations (5, 10, 20 and 40 µg/ml) of PAE. After 24 hour the culture supernatant were subjected the nitric oxide assay. The values shown here are means±S.D. of three independent experiments. \*p<0.01 as compared to the untreated cells.



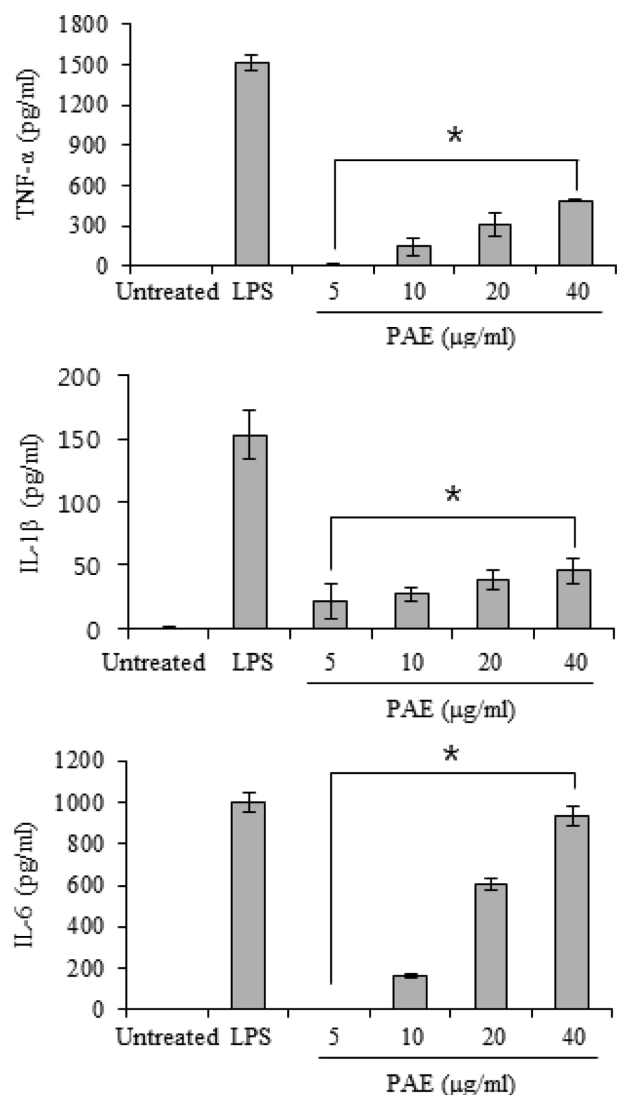
**Fig. 3** – Effects of PAE on the iNOS production of the Raw 264.7 cells. The cells were treated with LPS (1 µg/ml) or PAE (40 µg/ml) for 6 hour or 12 hour. Total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared and the resolved proteins by western blot were analyzed by anti-iNOS antibody. Anti-β-actin antibody was used as a control. Western blot analysis was performed in triplicate and all of them showed similar results.

**PAE의 iNOS 발현에 미치는 영향**

PAE가 Raw 264.7 세포에서 산화질소 생성을 증가시킴을 확인하고 산화질소의 생성을 촉진하는 효소인 iNOS 생성을 웨스턴 블릿으로 확인하였다. 40 µg/ml의 PAE를 세포에 처리한 다음 6 시간과 12시간 후에 iNOS 발현을 웨스턴 블릿으로 확인하였다. Fig. 3의 결과와 같이 iNOS의 발현은 LPS와 비교하여 약한 증가를 보였지만 무처리 대조군과 비교하여 유의한 증가를 나타내었다.

**PAE의 사이토카인의 발현에 미치는 영향**

PAE에 의한 대식세포의 또 다른 면역 증강 효과를 확인하기



**Fig. 4** – Effects of PAE on TNF-α, IL-1β, and IL-6 production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 5~40 µg/ml of samples or LPS (1 µg/ml) for 24 h. The culture supernatant, which was subject to enzyme immunoassay of cytokines, was harvested. The values shown are means±S.D. for three independent experiments. \*p<0.01 as compared to the untreated cells.

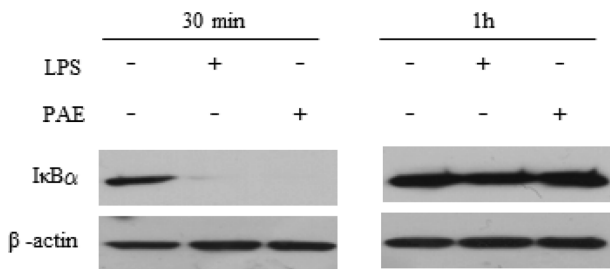
위하여 활성이 증가된 대식세포로부터 분비되는 면역 활성 사이토카인, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 분비량을 효소면역분비법으로 분석하였다. 사이토카인의 양을 측정하기 위하여 세포에 PAE를 농도별로 처리 한 후 24시간 후 배양 상층액에서 사이토카인의 양을 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 무처리 대조군은 세 종류의 사이토카인이 분비 되지 않은 반면, LPS의 처리에 의해 사이토카인의 생성은 급격히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 생성은 PAE의 처리에 의해 최고 농도에서 다소 증가되었다. 반면 IL-6의 경우에는 최고 농도인 40  $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 LPS와 유사한 효과를 나타내었다.

**PAE의 I $\kappa$ B 발현에 미치는 영향**

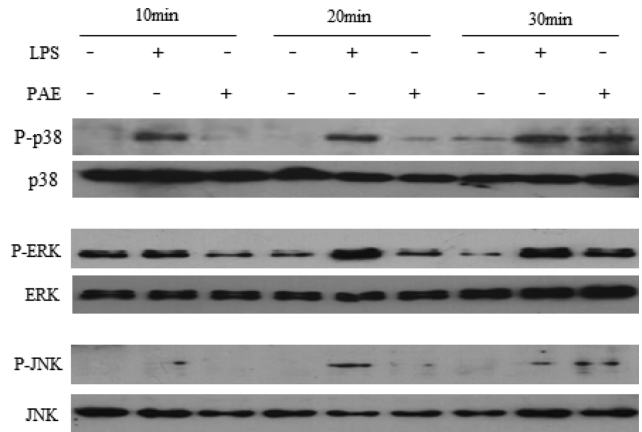
NF $\kappa$ B는 면역 반응에 중요한 세포신호전달 단백질로서 활성이 증가되기 위해서는 먼저 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 분해되어야 한다. 그러므로 PAE의 면역증강활성에 대한 기전연구로서 NF $\kappa$ B의 활성을 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 양으로 확인하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 의 존재량을 확인하기 위해서 PAE를 40  $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 농도로 처리한 다음, 30분, 1시간 후에 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현량을 웨스턴 블릿으로 확인한 결과, PAE 처리 후 30분에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 LPS 처리군 수준으로 사라지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). PAE에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 양이 줄어드는 것은 NF $\kappa$ B의 억제체가 줄어드는 것이므로 NF $\kappa$ B의 신호가 강해짐을 의미하는 것이다.

**PAE의 MAP kinases 발현 효과**

MAP kinases는 일반적으로 세포의 증식, 분화 그리고 세포의 생존 및 사멸에 관여하며, 더불어 NF $\kappa$ B와 함께 면역반응을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그래서 PAE의 처리에 의해 Raw 264.7 세포에서 MAP kinases의 신호가 변화되는지를 웨스턴 블릿으로 확인하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 에서와 동일한 조건으로 세포에 PAE를 처리한 후 10, 20, 30분 후에 세포를 회



**Fig. 5** – Effects of PAE on I $\kappa$ B degradation. Raw 264.7 cells were treated with 40  $\mu\text{g}/\text{m}$  of PAE or LPS (1  $\mu\text{g}/\text{m}$ ). The total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared after 30 minute and 1 hour, and cell signaling proteins were detected by Western blot analysis. The expression levels of I $\kappa$ B was compared with  $\beta$ -actin as a control. Western blot analysis using a specific antibody was performed in triplicate and all of them showed similar results.



**Fig. 6** – Effects of PAE on phosphorylation of MAP kinases. Raw 264.7 cells were treated with 40  $\mu\text{g}/\text{m}$  PAE or LPS (1  $\mu\text{g}/\text{m}$ ). The total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared after 10 minutes, 20 minutes and 30 minutes and cell signaling proteins were detected by Western blot analysis. The expression levels of p38 MAPK, ERK1/2 and JNK were compared with phosphorylated proteins. Western blot analysis using a specific antibody was performed in triplicate and all of them showed similar results.

수하여 MAP kinases에 속해있는 단백질인 p38, ERK, JNK의 인산화 정도를 측정한 결과, PAE를 전 처리한 경우 LPS를 처리한 것과 동일하게 p38, ERK, JNK 모두 30분에서 인산화가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 특히 p38과 ERK는 JNK와 비교하여 강하게 인산화 되었다.

**고 찰**

마디풀은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 한해살이풀로서 줄기는 둥근 기둥모양에 가지가 있으며 여름철 개화 전에 지상부를 채취하여 건조한 것을 약용으로 사용하며, 어린잎은 식용으로도 사용한다. 또한 마디풀의 전초를 건조하여 황달, 복통, 구충제, 혈뇨증, 설사, 이질, 류마티스, 고혈압 및 이뇨제로 이용하고 있다.<sup>2)</sup> 그러나 마디풀의 면역학적 효과에 관한 연구는 매우 미흡한 실정므로, 본 연구에서는 마디풀의 추출물인 PAE가 대식세포의 면역 활성에 미치는 영향을 평가 하였다.

산화질소는 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase를 경유하여 생성되며 라디칼 물질로서 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다.<sup>8)</sup> iNOS는 산화질소의 생성을 유도하는 대표적인 효소로서 염증 반응 시 다량 생성 된다.<sup>9)</sup> iNOS는 LPS, interferon- $\gamma$ , IL-1 및 TNF- $\alpha$  등의 자극에 의해 생성이 증가되며, 대식세포, 내피세포, 심근세포에 작용하여 다량의 산화질소 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 생체 내에서 고농도의 산화질소 생성은 혈관확장과 더불어 생체 면역 반응을 촉진하게 된다.<sup>10-14)</sup>

이와 같은 이유로 산화질소는 면역 반응의 증가를 의미하는 물질이다. 본 연구에서는 PAE가 대식구로부터 산화질소의 생성을 증가시키는 물질임을 밝혔다. 본 연구결과에 의하면 PAE는 기존에 강력한 면역증강물질로 알려져 있는 LPS 보다는 효과가 다소 부족하였다. 그러나 LPS는 면역증강효과가 너무 강하여 제어할 수 없으므로 실제 면역증강제로 사용이 불가능하다. 반면 PAE의 경우 농도의존적인 활성을 보였으므로 활성의 제어가 용의할 것으로 사료되었다.

대식세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 대표적인 전염증성 사이토카인으로서 단핵세포와 대식세포에서 생성 되어 그 밖의 면역인자들의 생성을 촉진 한다.<sup>15)</sup> 내재면역반응에서는 TNF- $\alpha$ 의 역할을 빼고는 이야기 할 수 없을 정도로 면역반응에 중요한 역할하고 있다.<sup>16)</sup> 본 연구에서 PAE는 전 농도에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시켰다. IL-1 $\beta$ 는 단핵구, 대식세포, B 세포, 수지상세포, 간세포 등에서 분비되는 IL-1 $\beta$ 는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6와 함께 전염증성 사이토카인으로서 여러 면역 반응들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 $\beta$ 은 단핵구와 대식세포로부터 분비되어 T 세포와 B 세포를 활성화시키고 다양한 림포카인(lymphokine)을 분비시키며 세포증식과 세포외기질 축적을 자극 한다.<sup>17)</sup> 뿐만 아니라 IL-1 $\beta$ 는 자연살해세포의 활성을 증가 시킨다.<sup>18)</sup> 본 연구에서 PAE는 실험에 사용된 전 농도에서 농도 의존적으로 유의하게 IL-1 $\beta$ 의 생성량을 증가시켰다. IL-6는 단핵구나 대식세포에서 분비되며 면역 반응, 신경세포의 기능, 조혈작용(hematopoiesis) 등에서 중요한 기능을 하는 물질이다.<sup>19-21)</sup> 뿐만 아니라 B 세포가 형질세포로 분화되는 마지막 단계를 활성화 시키고, 항체의 분비를 촉진 한다.<sup>21)</sup> 본 연구에서 PAE는 실험에 사용된 전 농도에서 농도 의존적으로 대식세포로부터 IL-6의 생성을 증가시켰다. 이상의 연구 결과로부터 PAE는 면역증강 사이토카인들의 생성을 농도에 따라 점차적으로 증가시킴 생체 면역 기능을 전반적으로 증가시킴을 확인할 수 있었다.

NFB는 세포 주기(cell cycle)의 조절, oncogenesis 등과도 관련이 있으며,<sup>22)</sup> 염증 반응에 의해 활성화되어 iNOS나 TNF- $\alpha$  등의 유전자발현에 관련 한다.<sup>16)</sup> 일반적인 상태에서 NF $\kappa$ B는 세포질에서 억제단백질인 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100 등과 결합하여 비활성형으로 존재하지만, LPS의 자극에 의해 활성화 되어 NF $\kappa$ B 신호전달계가 작동되면 I $\kappa$ B의 인산화가 진행되면서 NF $\kappa$ B가 핵으로 전위하여 COX-2, iNOS 등의 유전자 전사를 유도한다. I $\kappa$ B는 NF $\kappa$ B에 부착하여 NF $\kappa$ B의 신호전달을 억제하는 단백질이다.<sup>22)</sup> 그러므로 본 연구에서는 NF $\kappa$ B의 신호 활성을 간접적으로 알아보기 위하여 세포질의 I $\kappa$ B $\alpha$  농도를 측정하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 PAE의 처리 30분 후에 세포질의 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 급격하게 감소하였다. 이 결과로 미루어 볼 때 PAE의 면역증강 활성은 NF $\kappa$ B 신호와 관련됨을 간접적으로 확인할 수 있었다.

또 다른 면역 활성 신호전달 분자로는 serine/threonine kinase

로써 세포 밖 신호를 핵 내로 전달하게 하는 MAP kinases가 있다. MAP kinases에 속하는 신호분자로는 p38, ERK, JNK가 있으며, 이 세 분자 모두 면역활성의 변화에 큰 영향을 주고 있음이 밝혀진 바 있다.<sup>16,23,24)</sup> 본 연구의 결과에서 확인할 수 있듯이 PAE는 비록 시간대는 다르지만 p38, ERK, JNK의 인산화를 각각 증가시킴을 알 수 있었으며, 이 활성이 30분 이상 지속됨을 확인하였다. 이 결과로 부터 마디풀의 대식세포 면역력 증가 활성은 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 촉진함으로써 NF $\kappa$ B의 신호 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 MAP kinases인 p38, ERK, JNK의 신호를 보다 강하게 함으로써 나타남을 알 수 있었다.

## 결론

본 연구에서는 마디풀(*Polygonum aviculare* L.) 추출물(PAE)의 면역 증강 효과를 평가하기 위하여, 쥐 대식구 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 산화질소와 전염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)의 생성에 미치는 영향 및 활성기전을 연구하였다. Raw 264.7 세포에 PAE를 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 결과 산화질소의 생성이 유의성 있게 증가되었다. iNOS 단백질의 발현은 비록 LPS 세포 보다는 약하지만 PAE의 처리에 의해 발현이 증가되었다. 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6는 PAE의 처리에 의해 유의성 있게 증가시켰다. 이상의 PAE 활성에 대한 기전을 연구한 결과, PAE에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 촉진되어 NF $\kappa$ B 신호가 강해 졌으며, MAP kinases인 p38, ERK, JNK의 인산화를 증가시켰다. 이상의 결과로부터 PAE는 대식구의 면역 활성을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 말씀

"이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음". 본 연구에 사용한 마디풀 시료는 미래창조과학부의 한-몽골 과학기술협력센터사업의 지원으로 준비되었음.

## 참고문헌

- 1) Wanger, H. : Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure & Appl. Chem.* **66**, 1271 (1990).
- 2) Lee, C. G., Kim, N. J., Hong, N. D. and Kwon, C. H. : Anti-lipid peroxidation and liver protective effects of *Polygonum aviculare* L. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 59 (1994).
- 3) Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. : Inhibition of nitric

- oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation in cultured murine macrophage. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 617 (2004).
- 4) Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. : Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425 (1990).
  - 5) McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. : Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 24 (1996).
  - 6) Corbett, J. A. and Mac Daniel, M. L. : Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* **181**, 559 (1995).
  - 7) Cetkovic-Cvrije, M. and Eizirik, D. L. : TNF and IFN $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* **6**, 399 (1994).
  - 8) Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S. : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (1988).
  - 9) Kubes, P. : Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut* **7**, 6 (2000).
  - 10) Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N. and Terasawa, K. : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* **28**, 217 (2000).
  - 11) Lee, B. G., Kim, S. H., Zee, O. P., Lee, K. R., Lee, H. Y., Han, J. W. and Lee, H. W. : Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur. J. Pharmacol.* **406**, 301 (2000).
  - 12) Seo, W. G., Pae, H. O., Oh, G. S., Chai, K. Y., Yun, Y. G., Kwon, T. O. and Chung, H. T. : Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Gen. Pharmacol.* **35**, 21 (2000).
  - 13) Chiou, W. F., Chou, C. J. and Chen, C. F. : Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* **69**, 625 (2001).
  - 14) Seo, W. G., Pae, H. O., Oh, G. S., Kim, N. Y., Kwon, T. O., Shin, M. K., Chai, K. Y. and Chung, H. T. : The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 119 (2001).
  - 15) Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y., Lee, J. H. and Kim, Y. H. : Effects of Chitosan oligosaccharide on the C. albicans-induced inflammatory effect in mice and RAW 264.7 macrophage cells. *J. Chitin Chitosan.* **12**, 15 (2007)
  - 16) Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. and Kim, S. G. : Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- $\alpha$  and COX-2 expression by saquinone effects on I-Ba phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British J. Pharmacol.* **139**, 11 (2003).
  - 17) Papayianni, A. : Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren. Fail.* **18**, 725 (1996).
  - 18) Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. : Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**, 355 (2003).
  - 19) Hibi, M., Nakajima, K. and Hirano, T. : IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* **74**, 1 (1996).
  - 20) Hirano, T., Matsuda, T. and Nakajima, K. : Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* **12**, 262 (1994).
  - 21) Van Snick, J. : Interleukin-6 an overview. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 253 (1990).
  - 22) Chen, F., Castranova, V. and Shi, X. : New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* **159**, 387 (2001).
  - 23) Garrington, T. P. and Johnson, G. L. : Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Cell. Biol.* **11**, 211 (1999).
  - 24) Seo, J. H., Lim, J. W., Kim, H. and Kim, K. H. : Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1 and NF- $\kappa$ B and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab. Invest.* **84**, 49 (2004).