

夜關門의 抗炎症效果

이호일^{1#}, 정지윤², 황보민¹, 구세광³, 김영우², 지선영^{1*}

1 : 대구시 수성구 신천동로 1, 대구한의대학교 한의과대학 외관과학교실,
2 : 경상북도 경산시 한의대로 1, 방제학교실, 3 : 해부학교실

Anti-inflammatory effects of *Lespedeza Cuneata* in vivo and in vitro

Hoil Lee^{1#}, Ji Yun Jung², Min Hwangbo¹, Sea Kwang Ku³, Young Woo Kim², Seon Young Jee^{1*}

1 : College of Oriental Medicine, Dept of ophthalmology, otolaryngology and dermatology,
2 : Dept of Herbal formula, 3 : Dept of Anatomy

ABSTRACT

Objectives : *Lespedeza Cuneata* has been used to treat leukorrhea, asthma, stomach pain, diarrhea, acute mastitis, in Korean traditional medicine. According to recent studies, *Lespedeza Cuneata* has antioxidation, hypoglycemia, cell protective, insulin secretion, whitening, corpora cavernosa smooth muscle relaxation and antimicrobial activities, but it has been rarely conducted to evaluate the immuno-biological activity. The present study was examined to evaluate the anti-inflammatory effects of the *Lespedeza Cuneata* MeOH extract (LCE) in vivo and in vitro.

Methods : In vitro, inflammatory mediators, such as cytokines, nitric oxide and prostaglandin E₂ were detected after the addition of LPS with or without LCE in Raw 264.7 macrophage cell line. In vivo, anti-edema effect of LCE was determined in the carrageenan-induced paw edema model in rats.

Results : In vitro assay, LCE decreased release of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) via suppression of iNOS and COX-2 expression, LCE inhibited the phosphorylation of I κ B indicating the suppression of NF- κ B pathway. In vivo assay, LCE significantly inhibited the formation of paw edema induced by carrageenan injection in rats. LCE effectively inhibited increases of hind paw skin thickness and inflammatory cell infiltrations.

Conclusion : These findings demonstrate that LCE has inhibitory effect on inflammatory mediators in LPS-activated Raw 264.7 cells and on paw edema in carrageenan-stimulated rats, showing the possibility of anti-inflammatory use of *Lespedeza Cuneata*.

Key words : *Lespedeza Cuneata*; anti-inflammation, NF- κ B, LPS, Carrageenan

서론

염증은 세균감염이나, 화학적 물질 등에 의한 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로 조직변질, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 병발하는 복잡한 병변으로 알려져 있으며 Alzheimers disease, asthma, psoriasis, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, atopic dermatitis, sarcoidosis 등

많은 질병의 원인으로 생각되고 있다¹⁻³⁾.

夜關門 (*Lespedeza Cuneata* G. Don)은 콩과 (Leguminosae) 싸리속에 속하는 여러해살이식물의 전초로서 우리나라, 일본, 중국, 대만, 인도 등지에 널리 분포하며, 비수리, 공갱이대, 截葉鐵掃帚, 野鷄草, 娟毛胡枝子, 老牛筋, 鐵掃帚, 薯草, 薯菘, 白馬鞭, 趙公鞭, 野辟汗草, 小葉胡枝子, 鐵線八草, 胡枝子, 山菜子 등의 이름으로 불리우며 性은 涼하고 味는 苦辛하다⁴⁻⁸⁾.

*교신저자 : 지선영, 대구시 수성구 신천동로 1, 대구한의대학교 한의과대학 외관과학교실
· Tel : 053-770-2101 · E-mail : jeesy@dhu.ac.kr
#제1저자 : 이호일, 대구시 수성구 신천동로 1, 대구한의대학교 한의과대학 외관과학교실
· Tel : 010-2593-2155 · E-mail : hoillee75@gmail.com
· 접수 : 2013년 4월 28일 · 수정 : 2013년 7월 25일 · 채택 : 2013년 7월 30일

夜關門은 補肝腎, 益肺陰, 散瘀消腫의 효능이 있어 遺精, 遺尿, 白濁, 白帶下, 喘息, 胃痛, 勞傷, 小兒疳積, 泄瀉, 打撲傷, 視力減退, 赤目, 急性乳腺炎 등의 치료에 활용된다^{4,9)}.

夜關門의 주요성분으로는 pinitol, tannin, β -sisterosterol, avicularin, juglanin, trifolin, quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등을 함유하고¹⁰⁻¹²⁾ 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 夜關門에 항산화효과¹³⁾, 혈당강하효과¹⁴⁾, 세포보호효과¹⁵⁾, 인슐린 분비 촉진효과¹⁶⁾, 음경해면체 평활근 이완효과¹⁷⁾, 항균효과⁹⁾ 등이 있음이 보고되었고, 특히 夜關門 메탄올 추출물은 항산화 및 미백효과^{18,19)}가 있다고 확인되었다. 임상 연구로서 夜關門은 慢性氣管支炎, 蛇咬傷, 急性胃炎, 痢疾의 제반증상을 소실시키거나, 현저히 감소시킴이 보고되어 있다⁹⁾.

그러나, 夜關門의 항염증효과와 그 기전에 관한 연구는 전무한 실정으로 저자는 夜關門 메탄올추출물 (*Lespedeza Cuneata* MeOH Extract; LCE)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서의 산화질소 (nitric oxide, NO) 생성, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 및 inhibitory kappa B alpha ($I\kappa B\alpha$), nuclear factor- κB (NF- κB), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, prostaglandin E_2 (PGE $_2$) 등의 염증 매개물질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 또한 carrageenan으로 유도한 급성염증 모델을 이용하여 夜關門의 항염증 효과를 살펴보고자 본 연구를 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

夜關門은 대원약업사 (대구)에서 구입하여, 잡질을 제거한 후 400 g을 취하여, 70% 메탄올 5 L에 넣고 3일간 추출한 후, 추출물을 거즈로 1차 여과하고 3000 × g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 0.2 μm filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 동결건조하여 30.4 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20°C에서 보관하였다. LCE의 수율은 7.6%였으며 in vitro 실험에서는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, in vivo 실험에서는 polyethylene glycol (PEG)에 녹여 사용하였다.

2. 시약

Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 026:B6)는 Difco (Detroit, MI, USA)에서, fetal bovine serum (FBS)과 antibiotics는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였으며, 항체는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA), Cayman (Ann Arbor, MI, USA), Zymed (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였고, BCL Western blotting detection reagents는 Amersham (Bucks, UK)에서 구입하였다. TNF- α , IL- 1β , IL-6,

COX-2의 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit는 Pierce endogen (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), 기염제인 carrageenan은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

Raw 264.7 세포(murine macrophage cell line)는 한국 세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 $\mu g/ml$ streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO $_2$ incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 생존환경에서 실험하였고, 20 계대를 넘지 않은 세포만 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 LCE를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 3, 10, 30, 100, 300 ($\mu g/ml$)의 농도로 LCE를 처리한 후에 37°C, 5% CO $_2$ 의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (0.1 mg/ml)를 50 μl 넣고 4시간 반응시킨 후 배지를 조심스럽게 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, Austria)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{viability (\% control)} = \frac{\text{absorbance of treated sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

5. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO $^{2-}$ 의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 간략하게 설명하면 세포배양 상등액 50 μl 와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H $_2$ O) 50 μl 를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO $^{2-}$ 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다.

6. Immunoblot analysis

Lysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml leupeptin)를 사용하여 단백질을 추출하고 정량분석을 하였다.

iNOS, COX-2, NF- κ B 등의 단백질 발현은 각 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 면역화학적 방법으로 분석하였으며, 2차 항체는 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit 을 사용하였다. 단백질의 발현은 ECL Western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였다.

7. Cytokine 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6 well plate에 Raw 264.7 세포를 5×10^5 cells/ml로 분주하고 LCE를 농도별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS를 처리하였다. LPS 처리 후 각 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 바로 측정하거나, 측정 전까지 -70°C 에서 보관하였다. TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 ELISA Kit를 사용하여 측정하였으며, 실험의 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

8. 실험동물 및 처치

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (130-160 g)를 10일 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23 $^\circ\text{C}$, 습도 60%, 12시간 명암주기를 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험은 기염제인 carrageenan (100 $\mu\text{l}/\text{rat}$)만을 피하주사한 군을 carrageenan군으로 하였으며, carrageenan과 dexamethasone (1 mg/kg, P.O.)을 투여한 dexamethasone군, carrageenan과 0.3 g/kg의 LCE를 투여한 0.3 g/kg LCE군, carrageenan과 1.0 g/kg의 LCE를 투여한 1.0 g/kg LCE군으로 나누었으며, 각 군당 n수는 5마리로 하였다. dexamethasone과 LCE는 4일 동안 매일 1회 투여하였으며, 마지막 약물투여 1시간 후 carrageenan을 100 $\mu\text{l}/\text{rat}$ 로 rat의 오른쪽 발바닥에 주입하였다.

9. 발 부종 (Paw edema)의 유도 및 측정

4일째 약물을 투여하고 1시간 후 carrageenan을 투여하여 발 부종을 유발시켰다. 발 부종의 측정은 carrageenan을 주입직전 (0시간)과 주입후 시간별로 (1, 2, 3, 4시간) 부종측정기 (Plethysmometer, LE 7500; LETICA Scientific Instruments, Spain)를 이용하여 측정하였다.

10. 조직처리 및 통계처리

발 부종에 미치는 LCE의 효과를 평가하기 위하여, carrageenan으로 염증이 유발된 흰 쥐의 오른쪽 하지 발목아래를 절단하고, 後肢의 발등 및 발바닥의 피부 실질조직을 분리하여, 10% 중성포르말린에 고정시킨 다음 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3-4 μm 의 longitudinal 절편을 제작하여 Hematoxylin-eosin 염색을 실시하고, 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다. Kim 등²⁰⁾의 방법을 변형시켜, 발등 및 발바닥 피부 (상피에서 진피)의 두께를 mm 단위로 40배 현미경 시야에서 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 측정하였으며, 각각 1 mm²의 발등 및

발바닥 피부에 침윤된 염증세포의 수를 자동영상분석장치를 이용하여, 200배 현미경 시야에서 측정하였다. 실험 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

결 과

1. 세포의 생존율에 미치는 영향

LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 전처치가 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO의 생성을 감소시킨 것이, LCE의 세포독성으로 인한 세포수의 감소에서 유래한 것인지, 아닌지를 확인하기 위하여, LCE 3, 10, 30, 100, 300 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 Raw 264.7 세포에 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

세포생존율측정 결과, 대조군은 $100.00 \pm 8.03\%$, LCE 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은, $99.88 \pm 9.26\%$, LCE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 $100.50 \pm 4.8\%$, LCE 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 $99.52 \pm 10.55\%$, LCE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 $93.01 \pm 8.93\%$ 로 유의한 세포독성을 나타내지 않았으며, LCE 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 $59.03 \pm 15.28\%$ 로 ($p < 0.01$) 유의한 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1).

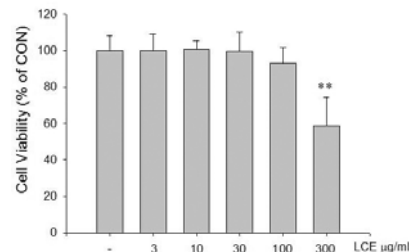


Fig. 1. Effects of LCE on the cell viability in LPS stimulated Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 3, 10, 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of LCE dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and the cells were further incubated for 24 h.

Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments.

*, significant as compared to control, ** $p < 0.01$.

2. LCE가 NO에 미치는 영향

세포수준에서 LCE의 NO 생성억제정도를 관찰하기 위하여 LCE를 3, 10, 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에 전처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. LPS만을 처리한 군에서는 대조군에 비교하여 $333.08 \pm 16.78\%$ 를 나타내어 유의하게 증가하였다. LPS에 의한 이러한 NO의 증가는 LCE 3, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 353.04 ± 44.84 , 358.66 ± 25.80 (%)로 NO의 증가를 억제하지 못하였지만, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 각각 307.80 ± 11.34 (LPS 단독의 92.41% 수준), 208.87 ± 7.77 (%) (LPS 단독의 62.71% 수준)로 NO의 함량을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 2). 그러므로, 본 연구에서는 NO의 생성을 유익하게 억제하고, 세포독성을 나타내지 않는 LCE의 농도로 30,

100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 선택하였다.

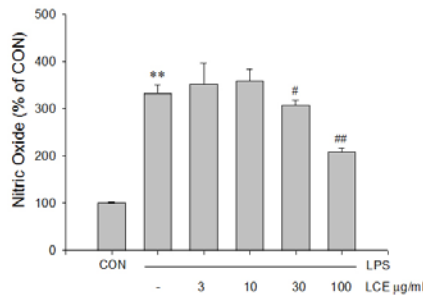


Fig. 2. Effects of Lespedeza Cuneata MeOH Extract (LCE) on the production of NO by LPS. Raw 264.7 cells were treated with 3, 10, 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of LCE dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of nitrite and nitrate in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments. *, significant as compared to control. ** $p < 0.01$. #, significant as compared to LPS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

3. LCE가 iNOS 발현에 미치는 영향

LCE의 NO생성 억제에 관련된되는 iNOS의 발현을 평가하기 위하여 Western blot analysis를 이용하여 약물처리 후의 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처리시에는 iNOS 단백질의 발현이 대조군에 비교하여 증가하였으나, LPS에 LCE를 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 LPS처리군에 비교하여 감소하였으며, 이는 LPS에서의 iNOS발현량과 비교하였을 때 LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 각각 81%, 61% 수준이었다 (Fig. 3).

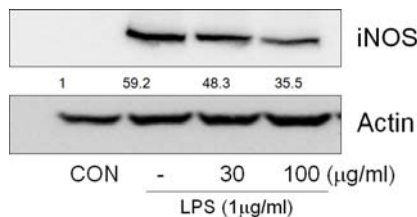


Fig. 3. Effect of LCE on the induction of iNOS by LPS. The levels of iNOS and actin protein were monitored 18h after treatment of cells with LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with or without LCE 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of iNOS protein were determined by immunoblot analysis using iNOS specific antibodies. The values in the westernblot indicate densitometric scanning results. The actin was used as a loading control.

4. LCE가 COX-2 발현에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 활성화되는 COX-2는 arachidonic acid를 변환시켜 PGE₂를 생성하며, 이는 염증 반응 또는 발암과정에서 중요한 역할을 한다.

본 연구에서 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 경우에는 COX-2 단백질의 발현이 증가하였으며, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 LPS처리군에 비교하여 감소하였다. LPS처리군의 COX-2

발현량과 비교하였을 때 LCE 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 각각 86%, 64% 수준이었다 (Fig. 4).

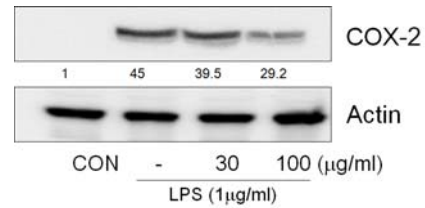


Fig. 4. Effect of LCE on the induction of COX-2 by LPS. The levels of COX-2 and actin protein were monitored 12h after treatment of cells with LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with or without LCE 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pretreatment (i.e. 1h before LPS). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of COX-2 protein were determined by immunoblot analysis using COX-2 specific antibodies. The values in the westernblot indicate densitometric scanning results. The actin was used as a loading control.

5. LCE가 PGE₂에 미치는 영향

Fig. 4에서 LCE가 COX-2의 발현을 감소시키기에 따라, PGE₂의 함량을 평가하였다. LPS처리군에서 PGE₂는 2962.388 \pm 220.83 pg/ml로 대조군의 960.59 \pm 36.61 pg/ml에 비교하여 PGE₂ 생성을 유의하게 (3.83배) 증가시켰으며, LCE 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 각각 2116.65 \pm 240.50, 1392.12 \pm 217.36 pg/ml로 LPS로 유도된 PGE₂를 유의하게 농도의존적으로 감소시켰으며, 이는 LPS에서의 PGE₂량과 비교하였을 때 LCE 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 각각 71.45%, 47.00% 수준이었다. (Fig. 5). 이러한 결과는 LPS와 LCE를 동시에 처리하였을 때 COX-2의 생성이 억제된 결과와 일치한다.

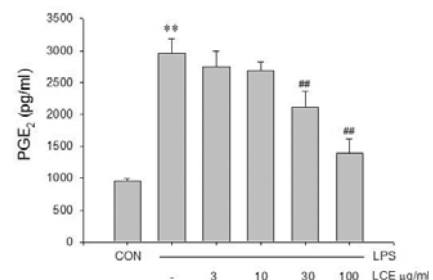


Fig. 5. Effects of LCE on the production of PGE₂ by LPS. Raw 264.7 cells were treated with 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LCE dissolved in media for 1 h prior to the addition of LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the cells were further incubated for 24 h. The concentrations of PGE₂ in culture medium were monitored as described in the materials and methods section. Data represent the mean \pm SD with eight separate experiments. *, significant as compared to control. ** $p < 0.01$. #, significant as compared to LPS alone, ## $p < 0.01$.

6. LCE가 NF- κ B(p65)발현에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에서의 LPS자극은 toll-like receptor를 통하여 NF- κ B와 NF- κ B 억제 단백질 (I- κ B protein)의 복합체중 억제단백질을 인산화시키고, NF- κ B를 핵으로 전위하도록 하여 iNOS, COX-2 등의 전사를 유도하게 된다.

본 연구에서는 세포질에서의 p-I κ B α , 핵분획에서의

NF-κB 단백질 발현을 평가하였다. 세포질에서 p-IκBα는 LPS처치에 의하여 대조군 대비 3.09배 증가하였으나, LCE 30, 100 (μg/ml)는 각각 2.78배, 2.25배로서, LPS 처치군에 비교하여 감소되었다 (Fig. 6A). 핵분획에서의 NF-κB는 LPS 처치에 의해 대조군 대비 3.17배 증가하였으나, LCE 30, 100 (μg/ml)의 전처치에 의하여 NF-κB량은 1.04배, 0.66배로서 LPS 처치군에 비교하여 감소되었다 (Fig. 6B). 이러한 결과는 LCE가 IκBα의 인산화를 억제하고, NF-κB의 핵전위를 억제하여 염증매개물질을 억제함을 나타낸다.

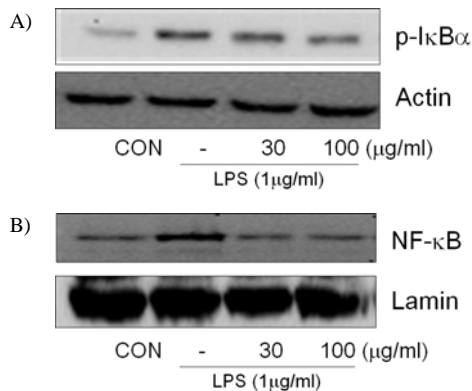


Fig. 6. Effect of LCE on the induction of p-IκBα and NF-κB (p65) by LPS. The levels of p-IκBα, NF-κB (p65) and actin protein were monitored after treatment of cells with LPS 1 μg/ml with or without LCE 30, 100 μg/ml pretreatment. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. Expressions of p-IκBα and NF-κB (p65) protein were determined by immunoblot analysis using p-IκBα and NF-κB (p65) specific antibodies. The actin was used as a loading control.

7. LCE가 cytokine에 미치는 영향

염증매개 인자 중 IL-1β는 내피세포를 활성화하여 염증 반응을 매개하고, 발열을 유도하는 cytokine으로서, T 세포의 활성화, B 세포의 성숙과도 관련되어 있다²¹⁾. 본 연구에서는 LPS의 자극에 의하여 IL-1β의 분비가 320.67 ± 34.80%로 대조군과 비교하여 3.21배 유의하게 증가하였다. LCE 3, 10, 30 (μg/ml)은 각각 320.74 ± 29.77%, 315.64 ± 33.92%, 293.71 ± 23.65%로서 유의하게 억제하지 못하였으나, LCE 100 μg/ml의 농도에서는 232.11 ± 28.56%로 유의하게 감소시켰다. 이는 LPS 단독처치의 72.84% 수준이었다 (Fig. 7A).

IL-6는 plasma로의 분화 및 증식을 촉진하고, 항체의 분비를 활성화하는 cytokine이며²²⁾, IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다²³⁾. 본 연구에서 LPS는 IL-6의 생성을 11383.73 ± 791.99%로 대조군에 비교하여 113.84배 유의하게 증가시켰다. LCE 3, 10 (μg/ml)은 10620.00 ± 653.03%, 10720.53 ± 821.63%로서 유의하게 억제하지 못하였으나, LCE 30, 100 (μg/ml)의 농도에서는 9920.53 ± 603.23%, 3795.73 ± 167.42%로 유의하게 감소시켰다. 이는 LPS 단독처치의 87.15%, 33.34% 수준이었다 (Fig. 7B).

TNF-α는 내피세포, 호중성백혈구를 활성화하고, 발열을

유도하는 cytokine으로²⁴⁾, 본 연구에서 LPS는 TNF-α의 분비를 LPS, 13816.13 ± 1497.72%로 대조군에 비교하여 138.16배 유의하게 증가시켰다. 그러나, LCE는 시험의 전농도에서 유의한 결과를 유도하지 못하였다 (Fig. 7C).

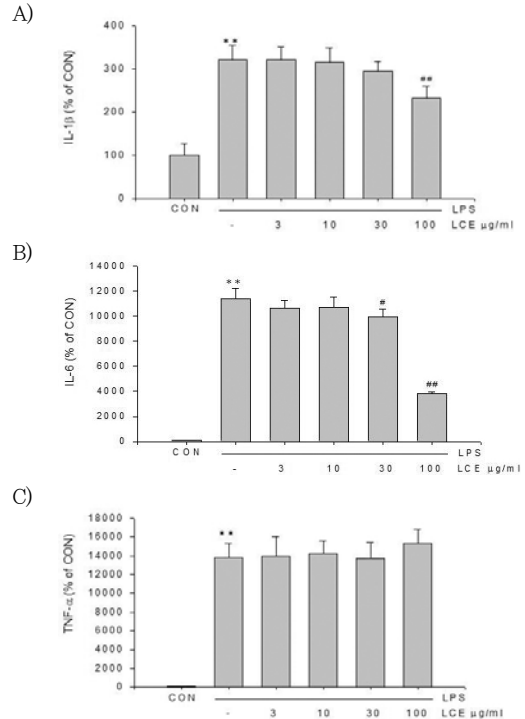


Figure 7. Inhibitory effects of LCE on cytokines production by LPS. Production of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) were measured using the medium of Raw 264.7 cells cultured with LPS 1 μg/ml in the presence or absence of LCE. Raw 264.7 cells were treated with 3, 10, 30, 100 μg/ml LCE for the 1 h, and continuously incubated with LPS. Data represents the mean ± SD from three separate experiments *, significant as compared with vehicle-treated control, **p<0.01, #, significant as compared with LPS alone, #p<0.05, ##p<0.01.

8. LCE가 carrageenan으로 유도된 흰쥐의 발 부종에 미치는 영향

LCE가 *in vitro*에서 염증매개물질을 억제함을 확인하고, LCE가 *in vivo*에서도 유의한 염증억제 작용이 있는지를 평가하기 위하여, carrageenan 유도 흰쥐의 발 부종 모델에서 염증억제효능을 평가하였다. 발 부종을 측정된 결과, carrageenan을 주입한 군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 1.57 ± 0.08, 1.93 ± 0.09, 2.29 ± 0.18, 2.37 ± 0.15, 2.31 ± 0.13 (cm³)를 나타내어, 유의한 발 부종이 유발되었으며, 1, 2, 3, 4시간은 0시간에 비교하여 각각 1.23, 1.46, 1.51, 1.47배 발 부종이 증가하였다. 그러나, 발 부종 유도 후 dexamethasone을 처치한 군에서는 0, 1, 2, 3, 4 시간에 각각 1.59 ± 0.05, 1.67 ± 0.10, 1.67 ± 0.99, 1.62 ± 0.06, 1.57 ± 0.09 (cm³)를 나타내어 carrageenan만을 주입한 군에 비교하여 1, 2, 3, 4시간에 유의한 발 부종의 억제를 나타내었으며, carrageenan에 비교하여 1, 2, 3, 4시간에 각각 1.01, 0.87, 0.73, 0.68, 0.68배 수준으로 감소하였다.

LCE 0.3 g/kg 투여군에서는 1, 2, 3, 4시간에 1.96 ± 0.10, 2.00 ± 0.11, 1.95 ± 0.17, 1.84 ± 0.17 (cm³)로서 carrageenan에 비교하여 각각 1.02, 0.87, 0.82, 0.79% 수준이었으며, 특히 3, 4시간에 유의한 족부종의 억제를 나타내었다. LCE 1.0 g/kg 투여군에서는 1, 2, 3, 4시간에 1.97 ± 0.08, 1.96 ± 0.10, 1.90 ± 0.11, 1.72 ± 0.11 (cm³)로서 carrageenan에 비교하여 각각 1.02, 0.85, 0.80, 0.74 (%) 수준이었으며, 특히 3, 4시간에 유의한 발 부종의 억제를 나타내었다 (Fig. 8).

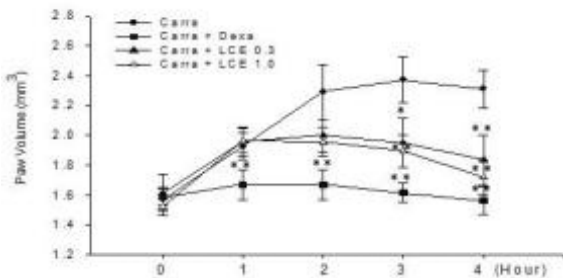


Fig. 8. Inhibition of carrageenan(Carra)-induced paw edema by LCE. LCE (0.3, 1.0 g/kg/day) was administered to rats for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting a 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The swelling of the paw was measured 1~4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (Dexa, 1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean±SD of 5 animals. *, significant as compared with carrageenan alone, ** p<0.01.

9. LCE가 carageenan으로 유도된 흰쥐의 발 조직에 미치는 영향

Carrageenan으로 유도된 발 부종의 피부두께 및 침윤 염증세포의 수를 평가를 위하여 4 시간째의 발 부종의 정도를 측정하고 실험동물을 희생하여 부종 발을 절단하였다. 실험 결과, 발등피부의 두께는 carrageenan군이 2.85 ± 0.24 mm였으며, 이러한 피부의 두께는 dexamethasone을 처치한 군에서 1.04 ± 0.16 mm로 carrageenan군에 비해 36.34%수준으로 유의하게 감소하였다. 또한 LCE를 0.3, 1.0 (g/kg)를 처치한 실험군에서는 각각 2.41 ± 0.13, 2.15 ± 0.16 (mm)로 유의하게 감소하였다. 이는 carrageenan군에 비해 84.53% 및 75.31% 수준이었다 (Fig. 9, 11A).

발바닥 부위의 피부두께에 있어서도, carrageenan군은 1.21 ± 0.07 mm였으며, 이러한 피부의 두께는 dexamethasone을 처치한 군에서, 0.83 ± 0.07 mm로, carrageenan군에 비해 68.66%수준으로 유의하게 감소하였다. 또한 LCE를 0.3, 1.0 (g/kg)를 처치한 실험군에서는 각각 1.09 ± 0.04, 1.04 ± 0.08 (mm)로 유의하게 감소하였다. 이는 carrageenan군에 비해 90.13 및 86.07% 수준이었다 (Fig. 10, 11B).

부종 발의 발등에서 침윤 염증세포의 수는 carrageenan군에서는 119.20 ± 8.53였으며, 이러한 염증세포의 증가는 dexamethasone을 처치한 군에서, 27.80 ± 3.56로 carrageenan

군에 비해 23.32% 수준으로 유의하게 감소하였다. 또한 LCE를 0.3, 1.0 (g/kg)를 처치한 실험군에서는 각각 74.40 ± 16.13, 57.80 ± 8.93로 유의하게 감소하였다. 이는 carrageenan군에 비해 62.42% 및 48.48% 수준이었다 (Fig. 9, 12A).

부종 발의 발바닥에서의 침윤 염증세포의 수는 carrageenan군에서는 920.80 ± 69.14였으며, 이러한 염증세포의 증가는 dexamethasone을 처치한 군에서, 85.20 ± 14.04로, carrageenan군에 비해 9.25% 수준으로 유의하게 감소하였다. 또한 LCE를 0.3, 1.0 (g/kg)를 처치한 실험군에서는 각각 755.40 ± 96.11, 511.80 ± 72.09로 유의하게 감소하였다. 이는 carrageenan군에 비해 82.04% 및 55.58% 수준이었다 (Fig. 10, 12B).

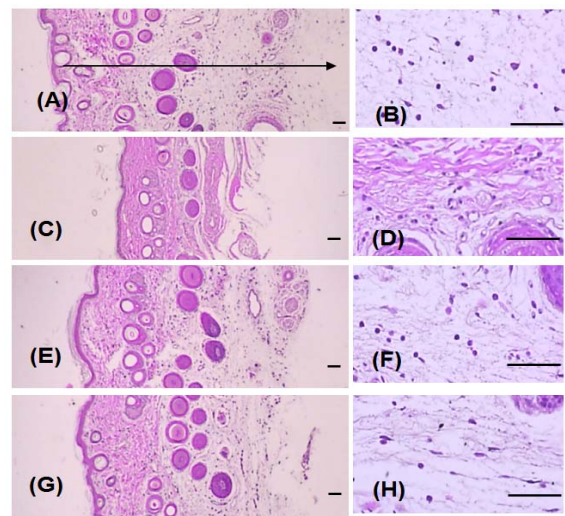


Fig. 9. Changes on histological profiles of the dorsum pedis skins. The hind paw skins were separated and stained with Hematoxylin and eosin. Arrow indicated total thicknesses measured. Carrageenan control (A, B), dexamethasone (C, D), LCE 0.3 g/kg (E, F), LCE 1.0 g/kg (G, H) treated groups. Scale bars = 160 μm.

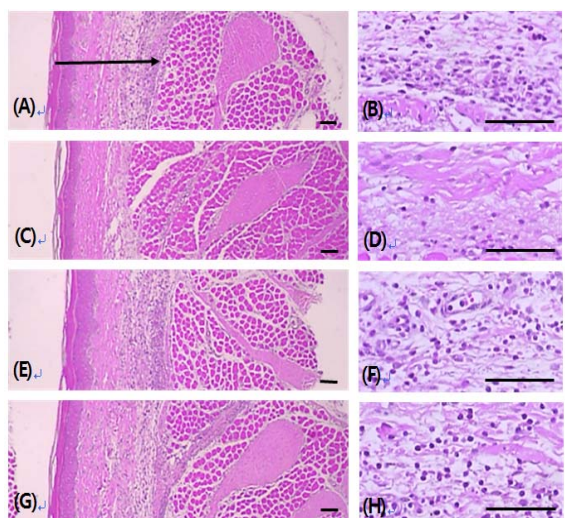


Fig. 10. Changes on histological profiles of the ventrum pedis skins. The hind paw skins were separated and stained with Hematoxylin and eosin. Arrow indicated total thicknesses measured. Carrageenan control (A, B), dexamethasone (C, D), LCE 0.3 g/kg (E, F), LCE 1.0 g/kg (G, H) treated groups. Scale bars = 160 μm.

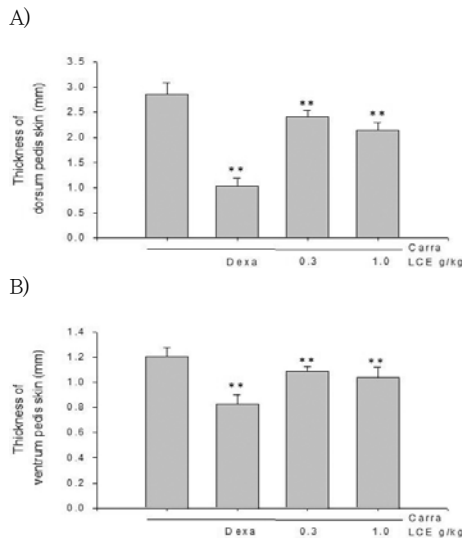


Fig. 11. Inhibitory effect of LCE on Carrageenan-induced paw thickness. LCE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 (g/kg/day) for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The Paw thickness of dorsum (A) and ventrum (B) was measured 4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of 5 animals. *, significant as compared with Carrageenan alone, ** $p < 0.01$.

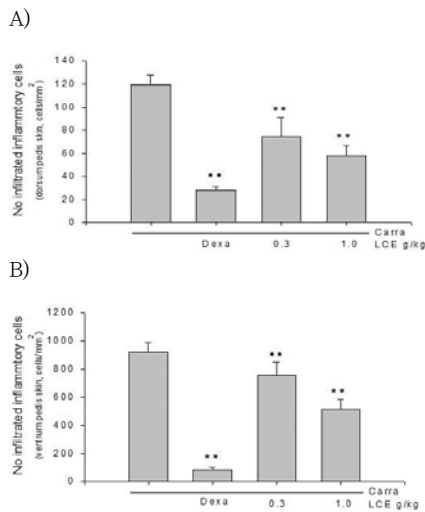


Fig. 12. Inhibitory effect of LCE on Carrageenan(Carra)-induced Paw inflammatory cells. LCE was administered to rats at an oral dose of 0.3, 1.0 (g/kg/day) for 4 days before the induction of paw edema. Paw edema was induced by subcutaneously injecting 1% solution of carrageenan dissolved in saline (0.1 ml per animal) into the right hind paw. The infiltrated inflammatory cells of of dorsum (A) and ventrum (B) was measured 4 h after carrageenan injection. Dexamethasone (1 mg/kg p.o.) was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of 5 animals. *, significant as compared with Carrageenan alone, ** $p < 0.01$.

고찰

비수리, 공갱이대 등으로 불리는 夜關門 (*Lespedeza Cuneata*

G. Don)은 苦辛凉하며, 補肝腎, 益肺陰, 散瘀消腫의 효능이 있어 遺精, 遺尿, 白濁, 白帶下, 喘息, 胃痛, 勞傷, 小兒疳積, 泄瀉, 打撲傷, 視力減退, 赤目, 急性乳腺炎 등의 치료에 활용된다⁴⁻⁹⁾.

주요성분으로는 pinitol, tannin, β -sistosterol, avicularin, juglanin, trifolin, quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등을 함유하고¹⁰⁻¹²⁾ 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 夜關門 종자의 열수추출물과 에탄올추출물의 항산화효과¹³⁾와 동물실험을 통한 혈당강하효과¹⁴⁾가 보고되었고, 夜關門 메탄올추출물이 RIN-m5F세포에서 과산화수소를 이용한 산화적 스트레스에 대하여 세포보호효과¹⁵⁾, 열수추출물이 RIN-m5F세포에서 5mM의 포도당 자극에 대한 세포보호효과 및 인슐린 분비 촉진효과¹⁶⁾가 높은 것으로 보고되었다. 또한 夜關門 추출물은 tyrosinase monophenolase를 36.3%, DOPA 자가산화율 16.3% 억제하여 미백효과를 가지며¹⁸⁾, 夜關門 페놀추출물과 클로로포름 분획이 tyrosine을 효과적으로 억제함¹⁹⁾이 보고되었으며, 夜關門은 음경해면체의 평활근을 이완시키며¹⁷⁾, 황색포도상구균, 폐렴쌍구균, 연쇄상구균에 대한 항균효과가 있음⁹⁾이 보고되었다. 임상적 보고로서 夜關門은 慢性氣管支炎, 蛇咬傷, 急性胃炎, 痢疾의 제반증상을 소실시키거나, 현저히 감소시키미 보고되어 있다⁹⁾.

그러나, 夜關門의 항염증효과와 그 기전에 관한 연구는 전무한 실정으로 저자는 메탄올로 추출된 夜關門 (LCE)이 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 염증매개물질 발현에 미치는 영향 및 carrageenan으로 유도한 급성염증 모델에서 이의 항염증 효과를 살펴보았다.

염증반응은 인체의 항상성을 유지시키는 면에서 불가결한 반응이지만, 불충분한 염증반응은 면역 결핍상태로 감염 및 암 등으로 발전될 수 있으며, 과도한 반응은 류마티스관절염, 크론병, 동맥경화, 당뇨병, 알츠하이머 질환, 다발성경화 및 심근경색과 같은 질병을 발생시키고 질병의 이환율 및 사망률을 증가시킨다. 만약 패혈증, 뇌수막염 등과 같이 염증이 혈류 속으로 확산되면 염증반응은 원래 발생한 자극보다 더 위험할 수도 있다. 그러므로 개체의 건강유지 및 항상성은 염증이 항염증반응에 의해 제한될 때 극복 및 유지할 수 있다^{1,2)}.

NO는 nitric oxide synthases (NOS)로부터 생성되는데, NOS는 칼슘 의존적이며 지속적으로 발현되는 constitutive NO synthases (cNOS)와 칼슘 비의존적이며 자극시 유도되는 inducible NO synthases (iNOS)로 분류된다. 대식세포는 LPS나 사이토카인에 의해 자극을 받으면 iNOS를 통해 L-arginine으로부터 다량의 NO를 생성한다²⁵⁾.

NO는 세포내에서 혈관조절, 숙주면역, 방어, 신호전달 등에서 중요한 역할을 하지만, 과량의 NO는 septic shock, 뇌경색, 당뇨, 퇴행성신경질환 등을 유발하기도 한다²⁶⁻³²⁾. 이런 까닭에 NO 생성 억제제는 염증반응의 조절제로서의 가능성 때문에 NO억제에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

일반적으로 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응에는 pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, PGE₂, iNOS, COX-2 등 다량의 염증매개물질이 매개된다³³⁾. 포유류에서 NO는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) 그리고 iNOS 세가지 형태의 NOS가 있으며, nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하지만, iNOS는 염증유발 자극에 의해 발현된다. 이들 3가지 NOS중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대

적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다²⁵⁾.

LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 LCE의 NO 생성억제를 평가하기 위하여 LCE를 3, 10, 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 전처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. NO는 반감기가 짧아 측정하기 어려우므로, 최종대사산물인 질산염을 측정하였다. LPS의 자극에 의하여 NO는 대조군에 비교하여 3.33배의 증가를 보였으나, LCE 30과 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 각각 3.07배, 2.08배로 NO의 함량을 유의하게 감소시켰다. NO를 유의하게 억제하는 LCE의 농도 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 유의한 세포독성을 나타내지 않았다.

LCE의 NO생성 억제에 관련되는 iNOS의 발현 역시 LPS 처리시에는 대조군에 비교하여 3.67배 증가하였으나, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현량이 CON에 비교하여, 2.86, 2.02배로 감소하였다.

COX-1과 2는 arachidonic acid를 PGG₂로, PGG₂는 다시 COX에 의해 PGH₂가 되고, 최종적으로 PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2 α} , TXA₂가 되며, 이들은 염증반응에 중추적 역할을 하며, 암발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응에서 PGE₂는 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다^{34,35)}. COX-2 또한 염증반응 과정에 발현되는 유도성 효소로서, COX는 arachidonic acid를 변환시키는 데에 핵심적 역할을 하며, 이들은 염증반응과 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 PGE₂는 혈관을 확장시키고 혈관투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학주성을 증가시킨다³⁴⁾.

COX의 종류 중, COX-1은 위점막보호, 혈소판응집작용 등으로 인체항상성의 유지에 관여하는 것으로, NSAIDs 사용시 COX-1을 억제하여 부작용을 유발하는 주된 원인으로 알려져 있다. COX-2는 유도형으로서 염증반응, 성장촉진인자, cytokine 등에 의해 유도되어, 염증성질환, 자가면역질환 등에서 중요한 역할을 한다³⁶⁾.

본 연구에서 COX-2는 LPS 처리시에는 대조군에 비교하여 3.09배 증가하였으며, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 2.78, 2.25배로 감소시켰다. LCE가 COX-2의 발현을 억제함에 따라 LCE가 PGE₂에 미치는 영향을 평가하였다. LPS는 대조군에 비교하여 PGE₂를 3.83배 증가시켰으며, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 PGE₂를 유의하게 농도의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 LCE가 LPS에 의한 COX-2의 발현 및 활성을 억제함으로써 인하여 PGE₂의 생성을 유의하게 감소시킴을 나타낸다.

염증 관련된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현에 관여하는 전사인자로는 NF- κ B가 대표적인 전사조절인자로 알려져 있다^{37,38)}. 대식세포는 염증유발 자극에 의해 NF- κ B pathway가 활성화되어 iNOS나 TNF- α 등의 유전자 발현에 관련한다³⁷⁾. NF- κ B 억제단백질에는 I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ 등이 있지만, 가장 풍부한 것은 I κ B α 로 알려져 있다³⁹⁾. 일반적으로 NF- κ B는 저해 단백질인 I- κ B α 와 복합체의 형태로 존재되며 불활성화되어 세포질에 존재한다. 염증신호를 포함한 외부자극은 I- κ B kinase를 활성화시키고 이에 의해 I- κ B α 의 N-terminal로부터 serine이 인산화를 시작으로 lysine에 multi-ubiquitination되면서 proteasome에서 분해된다. NF- κ B/I- κ B α 복합체에서 I- κ B α 의 분해는 세포질의 NF- κ B를 유리하고, 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동하여,

표적유전자 프로모터에 결합하여 다양한 유전자의 발현을 증가시킨다^{23,40)}.

본 연구에서는 세포질에서의 p-I κ B α , 핵분획에서의 NF- κ B 단백질 발현을 평가하였으며, 세포질에서 p-I κ B α 는 LPS처치에 의하여 대조군보다 3.09배 증가하였으나, LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의해 감소되었으며 (Fig. 6), 핵분획에서의 NF- κ B는 LPS 처치에 의해 대조군보다 3.17배 증가하였으나, 역시 LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의하여 NF- κ B가 감소하였다. 이러한 결과는 LCE가 I κ B α 의 인산화를 억제하고, NF- κ B의 핵전위를 억제하여 염증매개물질을 억제함을 나타낸다.

Cytokine은 대식세포와 단핵구를 포함하는 다양한 세포에서 생성되며, 감염에 대한 반응으로 합성되어 방출된다. 전염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등은 급성기 반응에서 중요한 역할을 하며, 다량생산될 경우 염증반응에 관련된 제반 증상을 발현시킨다. 이 중 IL-1 β 는 내피세포를 활성화하여 염증반응을 매개하고, 발열을 유도하는 cytokine으로서, T 세포의 활성화, B 세포의 성숙과도 관련되어 있으며²¹⁾, IL-6는 plasma로의 분화 및 증식을 촉진하고, 항체의 분비를 활성화하는 cytokine이며²²⁾, IL-6는 염증 부위에서 항상 높은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있다²³⁾. TNF- α 의 국소적인 증가는 열, 부종, 통증, 발적 등의 염증의 기본적인 임상 징후를 일으키지만, 전신적인 증가는 미세혈관의 혈전, 전신적으로 모세혈관의 누출을 유발시켜 심장 박출량을 억제하여 조직의 손상을 가져 온다²⁵⁾. 또한 다른 염증 세포를 활성화시켜 IL-1, HMGB1 (high mobility group B1) 등과 같은 사이토카인, 그리고 염증과 조직손상을 촉진시키는 eicosanoid, 산화질소, 활성산소 등과 같은 매개물질을 분비하게 하여 염증반응을 확장 및 지속시킨다²⁵⁾.

본 연구에서는 LPS의 자극에 의하여 IL-1 β 의 분비가 대조군에 비교하여 3.21배 유의하게 증가하였으며, LCE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의하게 감소시켰으며, IL-6 역시 LPS는 대조군에 비교하여 113.84배 유의하게 증가하였으며, LCE 30과 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)은 유의하게 감소시켰다. 그러나, LCE는 LPS에 의해 증가된 TNF- α 를 억제하지 못하였다.

LCE가 *in vitro*에서 염증매개물질을 억제함에 따라, LCE가 *in vivo*에서도 염증억제 작용이 있는지를 평가하기 위하여, carrageenan유도 흰쥐의 발 부종 모델에서 염증억제효능을 평가하였다. Carrageenan유도 흰쥐의 발 부종 모델은 잘 알려진 급성 염증 동물 모델이다. 발 부종을 측정할 결과, carrageenan을 주입한 군에서는 1~4 시간에 유의한 발 부종이 유발되었으며, LCE 0.3 및 1.0 (g/kg) 투여군에서는 3, 4시간에, 유의한 발 부종의 억제를 나타내었다.

이상의 연구결과는 夜關門 메탄올추출물 (LCE)이 *in vitro*, *in vivo*에서 모두 유의한 항염증작용을 나타냄을 의미한다.

결론

夜關門 메탄올추출물 (LCE)의 염증억제효능을 평가하기 위하여, *in vitro*로서 LPS로 활성화된 설치류 대식세포주인 Raw 264.7 세포에서 NO, iNOS, COX-2, NF- κ B의 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ 등에 미치는 영향을 평

가하였으며, *in vivo*에서 carageenan으로 유도된 흰쥐의 발 부종에 미치는 영향을 평가한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS는 NO의 생성량을 유의하게 증가시켰으며, 이러한 증가는 LCE 30, 100 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 전처치에 의하여 유의하게 억제되었다.
2. LCE는 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에서 분비되는 IL-1 β , IL-6를 유의하게 억제하였으며, LPS에 의해 발현이 증가된 COX-2, PGE₂ 역시 LCE에 의하여 감소하였다.
3. LCE는 LPS로 증가된 세포질에서의 p-I κ B α 의 발현을 억제하였으며, 핵분획에서의 NF- κ B의 발현을 유의하게 억제하였다.
4. Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 발 부종에 대하여 LCE는 피부두께 및 침윤 염증세포의 수 등 carrageenan으로 유발된 급성 부종성 염증 소견을 유의하게 억제하였다.

이러한 결과로 보아, 夜關門은 NF- κ B와 관련된 과도한 산화질소 및 염증성사이토카인에 의한 염증성 질환의 치료에 적극 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2012-0009400)

Reference

1. Park CY, Ryu HJ. Inflammation and Obesity. *J Korean Soc Endocrinol*. 2004 ; 19(2) : 97-108.
2. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 ; 420(6917) : 846-52.
3. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002 ; 420(6917) : 853-9.
4. Kim CM, Shin MG, Ahn DG, Lee GS, Kang BS, Kang SS. *The Chinese Herbal Dictionary*. Seoul : Jeongdam, 1997 : 2770-3.
5. Kim TH, Ryu SN. Antioxidant activity of methanol extract from aerial parts in *Lespedeza cuneata* G. Don. *Korean J Crop Sci*. 2008 ; 53 : 121-23.
6. Kwon DJ, Kim JK, Ham YH, Bae YS. Flavone glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* G. Don. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2007 ; 50 : 344-7.
7. Kim TJ. *Wild Flowers and Resources Plants in Korea (2)*. Seoul : SNU Press. 2008 : 457.
8. Chang JK. *Wild Plants for Health*. Seoul : Nexus books. 1996 : 72.
9. Ahn DG. *Color Pictures of Korean Medicinal Herbs*. Seoul : Gyohaksa. 1998 : 111.
10. Matsuura S, Iinuma M, Ito E, Takami H, Kagei K. Studies on the constituents of the useful plants. VIII. The Constituents of *Lespedeza cuneata* G. Don. *Yakugaku Zasshi*. 1978 ; 98 : 1542-4.
11. Atsushi N, Kazuko H. C-Glycoylflavones in *Lespedeza cuneata*. *Chem Pharm Bull*. 1980 ; 28 : 964-5.
12. Deng F, Chang J, Zhang JS. New flavonoids and other constituents from *Lespedeza cuneata*. *J Asian Nat Prod Res*. 2007 ; 9(6-8) : 655-8.
13. Kim SJ, Kim DW. Antioxidative Activity of Hot Water and Ethanol Extracts of *Lespedeza cuneata*. *Korean J Food Preserv*. 2007 ; 14(3) : 332-5.
14. Kim MS, Min OJ, Rhyu DY. Effect of *Lespedeza cuneata* Extracts on diabetes and diabetic nephropathy. *Korean J plant Res*. 2008 ; 4 : 83.
15. Lee DS, Jeong GS, An RB, Bin Li, Erisa Byun, Kim YC. Search for plant extracts with protective effects of pancreatic beta cell against oxidative stress. *Kor J Pharmacogn*. 2008 ; 39(4) : 335-40.
16. Choi JS, Cho CS, Kim CJ. Cytoprotective Effect of *Lespedeza Cuneata* Extract on Glucose Toxicity. *J Korean Oriental Med*. 2010 ; 31(4) : 70-100.
17. Jung YH, Lim CH. Bioactivity of an Extract of *Lespedeza Cuneata* G. Don to Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle Tone. *Jour Agri Sci*. 2005 ; 32(1) : 63-70.
18. Cho EJ, Lee SG, Kim DO. The effect of *Lespedeza Cuneata* extract for antioxidative and whitening effect. *J Life Resources & Science Res*. 2009 ; 28 : 34-8.
19. Cho EJ, Chu HM, Jung CH, Eom SH, Hur HJ, Kim DR. Effect of Phenolic Extract of Dry Leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on Antioxidant Capacity and Tyrosinase Inhibition. *Kor J Hort Sci Technol*. 2011 ; 29(4) : 358-65.
20. Kim HD, Cho HR, Moon SB, Shin HD, Yang KJ, Park BR, Jang HJ, Lim LS, Lee HS, Ku SK. Effect of exopolymers from *Aureobasidium pullulans* on formalin-induced chronic paw inflammation in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2006 ; 16 : 1954-60.
21. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003 ; 37(6) : 355-61.
22. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989 ;

- 142(1) : 144–7.
23. Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol.* 2001 ; 159(2) : 387–97.
24. Charles AJ, Paul T, Mark W, Mark S. *Immunobiology* (5ed). New York : Garland, 2001 : 80.
25. Yun HY, Dawson VL and Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol.* 1996 ; 10 : 291–316.
26. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr.* 2007 ; 137 : 1616S–20S.
27. Weisz A, Cicatiello I and Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.* 1996 ; 316 : 209–15.
28. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1993 ; 178 : 749–754.
29. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. 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- γ and lipopolysaccharide. *Gen Pharmacol.* 2000 ; 35 : 21–8.
30. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2001 ; 69 : 625–35.
31. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000 ; 406 : 301–9.
32. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med.* 2000 ; 28 : 217–26.
33. Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 ; 361 : 98–106.
34. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992 ; 6 : 3051–64.
35. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* 2006 ; 98(11) : 736–47.
36. Yang CH. Gastrointestinal disorders associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Dongguk Med.* 2003 ; 10(2) : 190–9.
37. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J pharmacol.* 2003 ; 139 : 11–20.
38. Patk HJ, Yoon SW, Yoon JW, Yoon HJ, Ko WS. Inhibitory Effect of Omisodok-eum on Secretion of NO in LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2002 ; 16(2) : 921–7.
39. Shon GH, Kim SH. Antitumor Activity of Bupleuri Radix and Artemisiae capillaris Herba and Synergistic Effect with Anticancer Drugs. *KOMS.* 1995 ; 16(2) : 414–32.
40. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 1996 ; 78(5) : 773–85.