J Korean Soc Food Sci Nutr
44(12), 1763~1770(2015)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.12.1763

흰 민들레 뿌리의 항염증 및 산화 스트레스 개선 효과

조병제[1*] · 김미정[2*] · 송영옥[3]

[1]체담한방병원
[2]신라대학교 식품영양학과
[3]부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Effects of Root of *Taraxacum coreanum* Nakai on the Inhibition of Inflammation and Oxidative Stress Induced by Lipopolysaccharide in ICR Mice

Byung-Je Cho[1*], Mijeong Kim[2*], and Yeong Ok Song[3]

[1]Chedam Hospital of Korean Medicine
[2]Department of Food and Nutrition, Silla University
[3]Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University

ABSTRACT The effects of root of *Taraxacum coreanum* Nakai (TC), on the suppression of inflammation and oxidative stress induced by lipopolysaccharide (LPS) in ICR mice were studied. LPS (10 mg/kg body weight) was injected into ICR mice in between two consecutive oral administrations. Hot water extract of fresh TC (HWETC) was administered to mice immediately before and 24 h after LPS injection. The animal groups used in this study were as follows: NOR group (PBS injection, DW administration), CON group (LPS injection, DW administration), and TC group (LPS injection, 1.4 g/kg bw of HWETC administration). Mice in the CON group lost weight due to inflammation induced by LPS, while the body weight of the TC group mice increased significantly, indicating that inflammation was inhibited by HWETC administration. Compare with the CON group, plasma and hepatic triglyceride, reactive oxygen species, peroxynitrite, and hepatic thiobarbituric acid reactive substances concentrations of the TC group decreased significantly (P<0.05). The protein expression of a pro-inflammatory transcription factor, nuclear factor-κB (NF-κB) and its target enzyme, cyclooxygenase 2, increased in response to LPS injection, but was suppressed by HWETC administration (P<0.05). In conclusion, HWETC appears to ameliorate the oxidative stress and inflammatory responses induced by LPS via inhibition of NF-κB activation.

Key words: *Taraxacum coreanum* Nakai, lipopolysaccharide, oxidative stress, inflammation, triglyceride

서 론

민들레는 전 세계에 분포하는 다년생 초본이며, 흰 민들레는 우리나라에서만 자생하는 종자이다. 민들레는 한방에서 포공영(*Taraxacum coreanum* Nakai, 蒲公英, Pogongyeong)이라고 명명되며 뿌리, 잎, 꽃, 꽃줄기 등 모든 식물체에 약효가 있다고 알려져 있으나(1) 한방 약재로는 뿌리가 사용되고 있다. 민들레는 염증을 치료하는 약리 작용이 있어 임파선염, 급성 기관지염, 위염, 간염, 담낭염, 부인병에 처방하고 있으며(2), 서양에서는 해열, 발한, 해독제, 담즙분비 촉진제, 완화제, 항노이로제, 이뇨제 등의 치료 목적으로 사용하여 왔다(3). 민들레의 생리활성은 항산화(4), 항알레르기(5), 항균(6), 항암(7,8) 및 체내 지질대사 개선 효과(8) 등이 보고되고 있다. 이러한 생리활성은 민들레에 함유된 flavonoids, terpene 및 steroids 성분에 기인한 것으로 알려져 있으며 전초에서는 taraxasterol과 taraxacin(9), 꽃에서는 arnidiol, luteolin 및 flavoxanthine(10) 등이 그리고 잎에는 luteolin, violaxanthin 및 plastoquinone 등이 알려져 있다(5).

염증은 생체에 감염이나 물리적인 손상에 의한 부상이 발생하였을 때 일어나는 선천 면역 반응(11)으로 생존에 필요한 반응이지만 대식세포나 기타 면역 세포로부터 분비되는 cytokine이나 chemokine의 분비가 만성적으로 일어나거나 다량 분비되면 전문적인 염증 반응이 일어난다. Nuclear factor-κB(NF-κB)는 세포 증식을 조절하는 표적 유전자의 발현을 증가시키고 항균 물질의 방출 및 면역 반응을 촉진시키나(12), 지속적인 발현이나 발현 정도가 높아지면 inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclo-oxygenase (COX)-2, tumor necrosis factor(TNF)-α 그리고 inter-

Received 24 September 2015; Accepted 18 November 2015
Corresponding author: Yeong Ok Song, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 46241, Korea
E-mail: yosong@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2847
*These authors contributed equally to this work.

lukin(IL)-1β, IL-6 그리고 IL-8과 같은 염증 매개물의 발현을 촉진한다. iNOS와 COX-2에 의해 생성된 nitric oxide(NO)와 prostaglandin(PG)E_2는 강력한 염증 발현 물질이다(13). NF-κB가 주도하는 신호 대사는 간, 지방조직 그리고 중추신경계의 염증 매개성 대사질환 발현에 중요한 역할을 한다(14). 염증이 증가하면 면역계 세포들이 유리기를 지니고 있는 reactive oxygen species(ROS) 및 reactive nitrogen species(RNS)의 분비를 촉진하여 체내 산화 스트레스를 증가시킨다. 산화 스트레스는 생체 손상 및 다양한 질환 발생의 원인으로 잘 알려져 있다(15). Lipopolysaccharide(LPS)는 그램 음성 세균의 세포막 구성 성분으로, 진핵생물에서 자연 면역반응을 촉진하는 강력한 염증 유발 물질이다(16). LPS는 친수성 saccharide와 지용성인 lipid A로 구성되어 있으며(17) lipid A 부분(16)이 세포막의 LPS binding protein 및 CD 14와 결합하여 inner membrane으로 이동하고 이후 세포내막에 존재하는 LPS receptor complex와 결합한다. 이러한 결합은 세포내막에 존재하는 신호 전달 물질인 Toll-like receptor(TLR)4를 포함한 다양한 TLRs 및 CDs와 결합하여 NF-κB를 포함한 다양한 경로를 활성화시켜 몸 전체에 염증 신호를 전달한다(18). LPS는 체재 염증 반응뿐 아니라 활성산소종의 생성도 증가시켜 산화 스트레스를 유발한다고 알려져 있다(19). 민들레의 항염증 효과 및 산화 스트레스 개선 효과는 LPS로 유발된 대식세포를 이용한 세포실험에서 보고되어 왔다(20).

본 연구에서는 한방에서 약재로 사용하고 있는 민들레 뿌리의 항염증 및 산화 스트레스 개선 효과를 *in vivo*에서 알아보기 위하여 LPS를 처리한 동물에서 한국에 자생하는 토종 민들레인 흰 민들레 뿌리 열수 추출물의 염증 억제 효과 및 활성산소 생성 억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

동물사육

6주령의 ICR 마우스(male)는 두열바이오텍(Seoul, Korea)에서 구입하여 1주일 동안 사육실 환경에 적응시킨 다음 실험군당 10마리씩, 평균 체중이 동일하도록 3군으로 나누었다. 동물은 케이지당 1마리씩 넣어 사육하였으며 식이(2018S Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad, Madison, WI, USA)와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물사육실의 온도는 22±1°C, 습도는 55±5%로 유지하였으며, 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 동물 실험의 전 과정은 부산대학교 동물실험윤리위원회(Pusan National University-Institutional Animal Care and Use Committee, PNU-IACUC)의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호 PNU-2014-0613).

시료 제조

흰 민들레인 *Taraxacum coreanum* Nakai를 수확 직후 전초를 하얀민들레농원(Chungju, Korea)에서 구입하여 뿌리만 실험에 사용하였다. 학계 보고에 의하면 한국에 자생하는 토종 흰 민들레는 한 종만 존재한다고 한다(21). 본 연구에서는 흰 민들레 구입 시 '농산물 및 품종 증명서'를 통해 토종 민들레임을 확인하였다. 뿌리 중량 대비 10배(w/v)의 증류수를 첨가한 후 추출기(KMC-130sh, speed level; max, temp. level; 7, Vision Scientific Co., Ltd., Daegu, Korea)에서 2시간 동안 추출하였다. 추출액은 여과지(No. 2 filter paper, Whatman, Springfield Mill, UK)를 사용하여 불순물을 제거한 후 진공원심농축기(rotavator R-200, BÜCHI, Flawil, Switzerland)로 농축하고, 동결건조(SFDSM 06, Samwon, Busan, Korea) 하였다.

LPS 주사, 시료 투여 및 해부

전신에 염증반응을 일으키기 위하여 동물 체중 kg당 10 mg의 LPS를 1회 복강으로 주사하였다(22). 동물에 LPS를 처리한 직후 동결 건조한 흰 민들레 뿌리 열수 추출물을 해당 농도로 조제하여 1차 경구 투여하고 24시간 경과 후에 2차 경구 투여하였다. 본 실험의 동물군은 3군으로 정상군은 LPS와 동일양의 생리식염수를 복강주사하고 증류수를 경구 투여한 군(normal control group; NOR), LPS 대조군은 LPS 주사 후 증류수를 경구 투여한 군(LPS control group; CON) 그리고 실험군은 LPS 주사와 흰 민들레 뿌리 열수 추출물 1.4 g/kg bw를 섭취시킨 군이다(*Taraxacum coreanum* Nakai intake group; TC). 동물에 투여한 흰 민들레 뿌리 열수 추출물 농도는 본초학에 의거하여 산출하였다(23). 즉 성인 하루 흰 민들레 뿌리 복용 양은 12~20 g으로 이를 체중 70 kg을 기준으로 산출한 후 인간과 마우스의 대사속도 차이를 고려하여 보상계수 12를 곱하여 마우스 투여 양을 산출하였다. 이에 본 연구에서 얻어진 흰 민들레 뿌리의 열수 추출물의 수율(41.8%)을 고려하여 마우스 체중 kg당 투여 양을 산출하였을 때 0.86~1.43 g이었다. 본 계산에 근거하여 시료 투여량을 1.4 g으로 설정하였다. 2차 시료 투여 후 12시간 동안 절식시키고, zolazepam, tiletamine 혼합물(zoletil 50, 30 mg/kg bw, Virbac Laboratories, Carros, France)과 xylazine(10 mg/kg, Bayer Korea, Seoul, Korea) 혼합액을 복강 주사하여 마취하였다. 하대정맥에서 채혈한 혈액은 heparin tube에 채취하여 혈액의 응고를 방지하였으며, 2,012.4×*g*, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 혈장을 얻었다. 채혈 후 차갑게 냉각시킨 phosphate buffered saline으로 관류하여 간에 남은 혈액을 제거한 다음 장기를 적출하여 여러 차례 씻은 후 여과지로 수분을 완전히 제거한 다음 무게를 측정하였다. 모든 시료는 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

혈중 아미노기 전이효소 활성 측정

혈중 AST 및 ALT 활성은 분석용 kit(AM101-K, Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였다.

혈장 및 간의 지질 함량 측정

혈중 중성지방질 농도(AM157S-K, Asan Pharmaceutical Co.) 및 총 콜레스테롤 농도(AM202-K, Asan Pharmaceutical Co.)는 분석용 kit을 이용하여 측정하였다. 간의 중성지방질 및 총 콜레스테롤 농도를 측정하기 위하여 간 조직 균질액을 제조한 후 추출 용매(chloroform : methanol, 2:1, v/v)로 지방을 추출한 다음 실험용 시료로 사용하였다. 간의 중성지방질 및 총 콜레스테롤 농도는 혈장의 중성지방질 및 총 콜레스테롤 농도 측정에 사용한 kit으로 측정하였다.

혈장 및 간의 활성산소종 및 peroxynitrite 함량 측정

혈액의 ROS 농도는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(D6886, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 발색 시약을 사용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광강도를 측정한 후 분당 fluorescence 강도로 계산하였다(24). Peroxynitrite($ONOO^-$) 농도는 rhodamine buffer[5 mM DHR123, 90 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate(pH 7.4), 5 mM KCl, 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid]로 발색시킨 후 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광강도를 측정하여 분당 fluorescence 강도로 계산하였다(25).

간의 ROS 및 peroxynitrite 함량 측정은 간 조직의 post-mitochondria fraction을 사용하였다. 간 조직 균질액을 4°C에서 2,012.4×*g*로 15분간 원심분리 하여 상층액을 얻은 후, 이를 4°C에서 18,626.8×*g*로 15분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 post-mitochondria fraction으로 사용하였다. 간의 ROS 및 peroxynitrite 농도 측정은 혈장과 동일한 방법으로 실시하였다.

간의 지질과산화물 함량 측정

지질 과산화물의 농도는 TBARS 방법(26)으로 측정하였다. 간 조직 균질액에 1% phosphoric acid와 0.67% TBA 용액을 첨가하여 vortex에서 잘 혼합한 뒤 95°C의 water bath에서 45분간 반응시켰다. n-Butanol로 반응을 종결시키고, 2,012.4×*g*에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻어 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물 농도는 malonaldehyde(MDA) 표준곡선을 이용하여 계산하고 nmol MDA로 내었다.

Western blot 분석

시료 제조: 간 조직에 nonidet(NP)-40 buffer[1 M Tris (pH 8.0), 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]와 protease inhibitor cocktail(P8340, Sigma-Aldrich Co.) 혼합액(100:1, v/v)을 첨가하여 균질화하였다. 균질액을 1시간 동안 얼음에 보관한 후 4°C에서 18,626.8×*g*로 5분간 원심분리 하여 상층액을 취한 다음 단백질 추출액으로 사용하였다. 단백질 농도를 측정한 후(Bradford assay kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 시료의 단백질 농도가 일정하게 한 뒤 Laemmli sample buffer(#161-0737, Bio-Rad)와 β-mercaptoethanol을 첨가하여 western blot 분석용 시료로 제조하였다.

Western blot analysis: 염증관련 전사인자인 NF-κB와 이로부터 발현된 iNOS 및 COX-2의 발현 정도를 측정하기 위해 일정 농도의 단백질을 함유한 시료를 8% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel에 올린 후 90 V로 2시간 동안 전기영동(Power Pac 300, Bio-Rad)하였다. 전기영동 종료 후 동일 전압에서 40분 동안 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane(0.45 μm pore size, Whatman)으로 이동시켰다. 이를 5% skim milk(NB0669, Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada)를 함유한 tris-buffered saline(TBS)-T(0.5% Tween 20 in TBS)에서 1시간 침지하여 blocking 한 후 TBS-T로 10분 간격으로 3회 그리고 5분 간격으로 3회 세척하였다. 세척된 membrane에 1차 antibody로 하룻밤 동안 4°C에서 반응시켰다. NF-κB 분석용 1차 antibody는 NF-κB p65(L8F6) Mouse mAb(#6956, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)를, iNOS 분석에는 NOS2 antibody(sc-7271, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 그리고 COX-2 분석에는 Cox-2 antibody(sc-1747, Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. TBS-T로 10분간 3회 및 5분간 3회 연속적으로 세척하여 부착되지 않은 1차 antibody를 씻어낸 후 NF-κB 및 iNOS 측정에는 2차 antibody인 Rabbit Anti-Mouse IgG H&L(HRP)(ab6728, Abcam Inc., Cambridge, UK)을 그리고 COX-2 측정에는 Rabbit Anti-Goat IgG H&L(HRP)(ab6741, Abcam Inc.)을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 부착되지 않은 2차 antibody는 TBS-T로 10분간 3회, 5분간 3회 세척하여 제거하고 enhanced chemiluminescence 용액(HyGLO, Denbille Scientific, Metuchen, NJ, USA)으로 단백질을 발광시켜 CAS-400 SM(Davinch-K, Seoul, Korea)으로 촬영하였다. 발현된 단백질 양은 ImageJ software(http://rsbweb.nih.gov/ij/)로 측정하고, 단백질의 발현 정도는 β-actin에 대한 비율로 표시하였다. β-Actin은 1차 antibody인 Anti-beta Actin antibody(ab8226, Abcam Inc.)와 2차 antibody인 Rabbit Anti-Mouse IgG H&L(HRP)(ab6728, Abcam Inc.)로 측정하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 실험 결과의 군 간 평균 차이에 대한 유의성 검정을 위해서 SPSS version 20(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다. CON군과 TC군 사이의 차이를 확인하기 위하여 Student's t-test도 실시하였다. 모든 통계처

Table 1. Body weight changes of ICR mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) followed by oral administration of hot water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai (g)

Group[1)]	Body weight		
	Initial	Final	Changes
NOR	28.20±0.64[NS2)3)]	28.97±0.47[a4)]	0.77±0.63[a]
CON	28.60±1.02	26.26±1.53[b]	-2.34±2.02[b]
TC	27.58±0.65	26.91±0.99[b]	-0.66±1.08[a]

[1)]NOR: mice had intraperitoneal injection of phosphate buffered saline as a vehicle followed by oral administration of distilled water (DW), CON: mice had intraperitoneal injection of LPS followed by oral administration of DW, TC: mice had intraperitoneal injection of LPS and followed by oral administration of 1.4 g/kg body weight of water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai.
[2)]All data are mean±SD (n=10 each group).
[3)]NS: data in the column are not significantly different.
[4)]Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

리의 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

체중 변화

정상대조군(NOR)의 체중은 약간 증가하였으나, LPS를 처리한 LPS 대조군(CON)의 체중은 NOR군에 비해 유의적으로 감소하였고 민들레 뿌리 열수 추출물 투여군인 TC군은 CON군에 비해 체중 감소 정도가 낮았으며, CON군과 TC군의 체중 변화 역시 유의적인 차이를 보였다(Table 1, $P<0.05$).

혈중 AST 및 ALT 활성

간 손상 지표 중 하나인 혈중 aspartate aminotransferase(AST) 활성은 LPS 처리에 의해 유의적으로 상승하였다(Table 2). CON군의 AST 활성은 NOR군에 비해 141% 높았으며($P<0.05$), TC군은 CON군에 비해 19.05% 감소하였다($P<0.05$). 혈중 alanine aminotransferase(ALT) 농도는 NOR군이 가장 높았고, CON군, TC군 순서로 나타났다. CON군의 AST 활성은 NOR군에 비해 CON군은 9.98% 그리고 TC군은 20.87% 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

Table 2. Plasma aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) concentrations of ICR mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide followed by oral administration of water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai

Group[1)]	AST	ALT
NOR	54.79±3.30[c2)3)]	24.25±0.97[a]
CON	132.13±5.91[a]	21.83±1.68[ab]
TC	106.96±18.24[b]	19.19±2.54[b]

[1)]See the legend of Table 1.
[2)]All data are mean±SD (n=10 each group).
[3)]Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

혈중 및 간 지방질 농도

LPS 처리에 의해 혈중 중성지방질 농도는 유의적으로 상승하였다. CON군의 혈중 중성지방질 농도는 NOR군에 비해 76.08% 유의적으로 증가하였으며(Table 3, $P<0.05$), TC군의 혈중 중성지방질 농도는 CON군에 비해 20.35% 감소하였다($P<0.05$). 그러나 혈중 콜레스테롤 농도는 세 군간 유의적인 차이가 없었다. 간의 중성지방질의 농도는 LPS 처리군에서 유의적으로 감소하여 NOR군이 가장 높고, CON군 그리고 TC군 순서였다(Table 3). NOR군의 간 중성지방질 농도는 CON군 및 TC군에 비해 각각 213.66% 및 379.85% 높았다. TC군은 CON군에 비해 34.64% 감소하였다($P<0.05$). 간의 콜레스테롤의 농도 역시 혈장과 마찬가지로 세 군 모두 유의적인 차이가 없었다.

혈액 및 간의 ROS, peroxynitrite 및 간의 지질과산화물 가 농도

혈중 ROS 농도는 CON군이 NOR군에 비해 626.32% 증가하였고 흰 민들레 뿌리를 투여한 TC군은 CON군에 비해 73.72% 유의적으로 감소하였다(Table 4, $P<0.05$). Peroxynitrite 농도는 CON군에서 NOR군에 비해 42.12% 상승하였고, TC군은 CON군에 비해 22.34% 유의적으로 낮아졌다(Table 4, $P<0.05$). 간의 ROS 농도는 LPS 처리한 CON군이 NOR군에 비해 443.33% 증가하였고, TC군은 CON군에

Table 3. Plasma and hepatic triglyceride (TG) and total cholesterol concentrations (TC) of ICR mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide followed by oral administration of water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai

Group[1)]	Plasma (mg/dL)		Liver (mg/g tissue)	
	TG	TC	TG	TC
NOR	66.94±14.04[c2)3)]	79.85±16.30[NS4)]	6.43±0.67[a]	1.53±0.30[NS]
CON	117.87±14.04[a]	77.22±13.18	2.05±0.62[b]	1.50±0.25
TC	93.88±6.61[b]	80.56±15.60	1.34±0.41[c]	1.64±0.22

[1)]See the legend of Table 1.
[2)]All data are mean±SD (n=10 each group).
[3)]Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.
[4)]NS: data in the column are not significantly different.

Table 4. Inhibitory effects of hot water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai on the level of plasma and hepatic reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite ($ONOO^-$) in lipopolysaccharide treated ICR mice

Group[1)]	Plasma (Flu/min/μL)		Liver (Flu/min/mg protein)	
	ROS	$ONOO^-$	ROS	$ONOO^-$
NOR	402.3±204.7[b2)3)]	744.0±80.3[b]	834.2±134.3[b]	79.0±6.4[b]
CON	2,922.0±588.5[a]	1,057.4±233.2[a]	4,532.5±1,234.2[a]	312.8±87.7[a]
TC	767.9±185.5[b]	821.2±27.3[b]	1,496.6±700.2[b]	116.3±32.7[b]

[1)]See the legend of Table 1.
[2)]All data are mean±SD (n=10 each group).
[3)]Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.
[4)]NS: data in the column are not significantly different.

비해 66.98% 유의적으로 감소하였다(Table 4, $P<0.05$). 간의 $ONOO^-$ 농도 역시 CON군이 NOR군에 비해 295.95% 증가하였고, TC군은 CON군에 비해 62.82% 감소하여 유의적인 감소를 보였다(Table 4, $P<0.05$). 간의 TBARS 농도는 TC군에서 유의적으로 감소하였다(Table 5, $P<0.05$). TC군의 간 TBARS 농도는 CON군에 비해 40.47% 감소하였다($P<0.05$).

Table 5. Hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration of ICR mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide followed by oral administration of water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai (nmol MDA/mg protein)

Group[1)]	TBARS
NOR	4.49±1.00[a2)3)]
CON	5.14±1.89[a]
TC	3.06±0.57[b]

[1)]See the legend of Table 1.
[2)]All data are mean±SD (n=10 each group).
[3)]Data with different letters in the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

NF-κB, iNOS 및 COX-2 단백질 발현

Fig. 1에 나타난 바와 같이 CON군의 NF-κB 단백질 발현은 NOR군에 비해 38.08% 유의적으로 증가하였고($P<0.05$), TC군의 NF-κB 단백질 발현은 CON군에 비해 21.16% 감소하였다($P<0.05$). NF-κB 전사인자에 의해 발현이 조절되는 효소 중 NO 생성 효소인 iNOS 단백질 발현은 CON군에서 NOR군에 비해 20.42% 유의적으로 증가하였고($P<0.05$), TC군은 CON군에 비해 10.13% 단백질 발현이 억제되었으나 유의적이지 않았다. 염증 반응에 관여하는 다른 효소인 COX-2 단백질 발현을 살펴보았을 때 NF-κB 단백질 발현과 유사한 경향을 나타내었다. COX-2 단백질 발현은 CON군에서 NOR군에 비해 30.23% 증가하였고($P<0.05$) TC군은 CON군에 비해 17.92% 감소하였으며, 이러한 변화는 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$).

고 찰

본 연구에서는 한방에서 주로 사용하는 우리나라 토종 흰

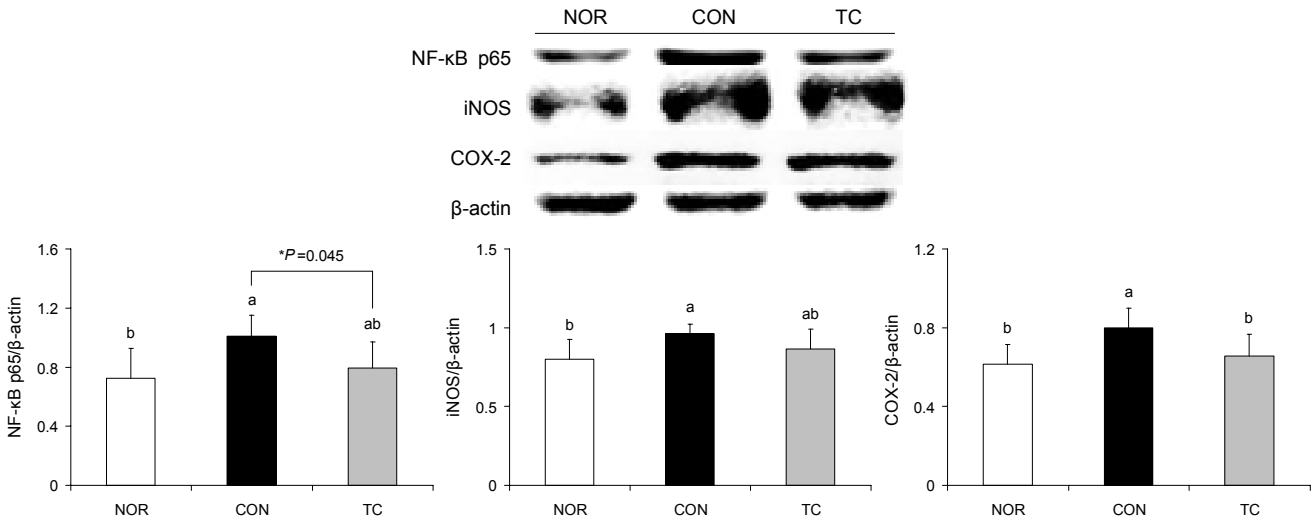

Fig. 1. Protein expression of nuclear factor-κB (NF-κB), nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) of ICR mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide followed by oral administration of water extract of *Taraxacum coreanum* Nakai. See the legend of Table 1 for experimental groups. Data with different letters (a,b) are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$. *Significantly different between CON and TC group by Student's t-test.

민들레 뿌리의 염증 억제 및 산화 스트레스 개선 효과를 LPS로 처리한 동물에서 확인하였을 때 유리기 생성, 지질과산화, 염증을 유발하는 효소 및 이의 전사인자의 발현이 억제되었고 염증 억제에 의해 혈중 중성지방질의 농도가 낮아짐을 확인하였다. 민들레는 전 세계에 분포하는 초본으로 동양과 서양에서 민간 약제로 널리 사용되어 왔다. 민들레의 생리활성으로는 항산화(4), 항균(6), 항알레르기(4) 등이 알려져 있으며, 항암(7,8), 지질대사 개선 효과(8) 등이 보고되어 있다. 최근 민들레의 항염증 효과에 대한 연구가 세포실험을 통해 활발히 진행되었는데 한방에서는 흰 민들레를 포공영이라고 명명하고, 흰 민들레 뿌리를 임파선염, 급성 기관지염, 위염, 간염, 담낭염, 부인병 등의 염증관련 질환에 널리 사용하여 왔기 때문이다. 그러나 민들레는 뿌리뿐 아니라 전초에 약효가 있다고 보고되면서(9) 민간에서 나물 등으로 조리하여 섭취하고 있다.

세포막에 존재하는 내독소인 LPS는 단기간에 염증을 유발시킬 수 있는 물질로 기능성 물질의 항염증 효과 및 산화 스트레스 개선 효과를 확인하는 동물 실험에 많이 사용되고 있다. LPS 구성 성분인 lipid A는 세포막에서 LPS binding protein 및 CD14와 결합하여 세포내막으로 이동한 후 LPS receptor와 복합체를 구성하여 TLR4를 포함한 다양한 TLRs, CD11 또는 CD18과 결합함으로써 NF-κB, extracellular signal-regulated kinase 1/2 그리고 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase 경로를 활성화시켜 몸 전체에 염증관련 신호를 전달하는 강력한 물질이다(18). 마우스 체중 kg당 10 mg의 LPS를 한 번만 투여하여도 전신에 염증 반응이 일어나며(21) 염증으로 인해 체중이 급격하게 감소한다고 알려져 있다(27). 본 연구에서 LPS로 염증을 유발한 마우스의 체중은 민들레 뿌리 열수 추출물을 투여하였을 때 증가하였고, 이는 흰 민들레 뿌리 열수 추출물의 항염증 효과가 LPS로 유도되는 전신 염증반응을 억제하였기 때문으로 생각된다. 혈액의 AST 활성은 LPS 대조군에 비해 흰 민들레 뿌리 열수 추출물군에서 유의적으로 감소하여 LPS로 인한 간의 손상을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. NF-κB는 염증반응을 개시하는 전사인자로 iNOS나 COX-2 등의 발현을 촉진시켜 NO와 PGs 같은 염증 매개 물질의 합성을 촉진시킴으로써 염증을 유발한다(13). 이에 NF-κB의 발현을 억제하여 퇴행성 질환을 예방하고자 하는 연구가 진행되어 왔으며, 민들레 추출물은 LPS를 처리한 대식세포에서 NF-κB의 활성 억제 및 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하였다(20). 본 동물실험에서도 민들레 뿌리 열수 추출물이 LPS 처리에 의해 증가된 NF-κB 및 COX-2 단백질 발현을 억제함을 확인하여 한방에서 사용하는 흰 민들레 뿌리는 *in vivo*에서도 NF-κB 발현 억제를 통한 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 염증 반응이 증가하면 대식세포 및 호중구와 같은 면역 세포들에서 면역 반응이 활성화되면서 ROS 및 RNS 생성(28)이 증가하여 산화 스트레스를 유발하고 간의 지질과산화를 촉진한다. 산화 스트레스 및 지질과산화는 생체 내 유효한 단백질을 공격함으로써 다양한 질환을 일으키는 원인으로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 마우스에 민들레 뿌리 열수 추출물을 섭취시켰을 때 ROS 및 peroxynitrite의 농도가 유의적으로 감소하였으며 간에서 지질과산화도 억제되었다. 이러한 유리기 생성이 억제된 것은 민들레 뿌리 추출물에 함유된 항산화 물질 때문으로 생각된다(29). 민들레의 항산화 물질로는 caffeoylquinic acid와 chicoric acid 같은 페놀 물질이 보고되었다(30). 민들레 추출물은 고지방식이를 급여한 흰쥐에서 항산화계 효소인 glutathione peroxidase와 catalase 효소의 활성을 높여 혈장 및 간 내 지질과산화물의 농도를 낮추었다고 하였다(31). LPS를 처리한 대식세포에서 기능성 물질들이 염증반응을 억제하는 기전 중 하나로 물질의 항산화성이 보고되고 있다(32).

체내 염증이 발생하면 혈중 중성지방질 농도가 상승하게 되는데 이는 간에서 중성지방질을 함유한 초저밀도지방질 단백질(very low density lipoprotein, VLDL)의 방출이 증가하기 때문이거나(33), 염증에 의해 lipoprotein lipase의 활성이 억제되어 피하지방세포로 중성지방질의 이동이 제한되거나(34), 염증 유발 매개체인 TNF-α IL-1, IL-2, IFN-α 그리고 IL-6 등의 cytokine에 의해 간에서 VLDL의 방출을 자극되기 때문이라고 설명되고 있다(35). 본 연구에서도 LPS 처리에 의해 혈장 중성지방질이 유의적으로 상승하여 기존의 보고와 일치하였으며 흰 민들레 뿌리 열수 추출물 섭취에 의해 혈장 중성지방질 농도가 낮아졌는데 이는 흰 민들레 뿌리의 항염증 효과 때문으로 생각된다. 이에 반해 간의 중성지방질 농도는 정상대조군에서 가장 높았고 LPS 처리에 의해 유의적으로 낮아졌는데 이는 LPS에 의해 간 조직이 손상되어 정상적인 중성지방질 합성이 이루어지지 못했기 때문으로 생각된다. 본 연구에서 민들레 뿌리 열수 추출물을 투여한 동물의 간의 중성지방질 농도는 예상과는 달리 LPS만 처리한 대조군에 비해 낮았는데 이와 관련된 기전에 대한 앞으로의 연구가 필요하다. 염증 유발에 따른 중성지방질 농도 변화에 비해 혈장 및 간의 콜레스테롤 농도는 모든 실험군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았는데, 이는 간에서 지방산 합성 효소의 발현이 염증 반응에 더욱 민감하게 영향을 받는 것이 아닌가 생각되며 염증과 지방합성 전사인자 발현과의 관계에 대한 연구가 요구된다.

요 약

한방에서 염증 치료 목적으로 사용하는 흰 민들레 뿌리의 열수 추출물을 제조하여 항염증 효과 및 산화 스트레스 개선 효과를 확인하고자 하였다. ICR mice에 lipopolysaccharide (LPS)를 1회 복강 투여하여(10 mg/kg bw) 염증 및 산화 스트레스를 유발하고, 한국에만 자생하는 흰 민들레 뿌리 열수 추출물을 1.4 g/kg bw 농도로 2회 경구 투여하였다. LPS에 의한 염증 유발은 체중 감소 현상으로 확인하였고,

민들레 뿌리 열수 추출물 투여군은 유의적으로 체중이 증가하여 염증 억제 효과가 관찰되었다. LPS 처리는 혈액의 중성지방질, 혈액 및 간의 reactive oxygen species(ROS), peroxynitrite 농도 그리고 간의 지질과산화 수준을 증가시켰다($P<0.05$). LPS를 처리한 대조군에 비해 흰 민들레 뿌리 열수 추출물 투여군은 혈중 및 간의 중성지방질, ROS, peroxynitrite 농도 그리고 간의 지질과산화물 수준이 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 이는 흰 민들레 뿌리 열수 추출물이 간의 NF-κB 전사인자 및 이의 조절을 받는 COX-2의 단백질 발현을 억제함으로써 염증 관련 매개체 및 유리기 생성을 유의적으로 억제하였기 때문으로 생각된다. LPS 처리군에서 간의 중성지방질 농도가 감소한 것은 염증에 의해 간 조직이 손상되어 중성지방질의 합성이 억제되었기 때문으로 생각된다. 본 연구는 한방에서 사용하여 온 한국 토종 흰 민들레 뿌리가 NF-κB 전사인자의 발현을 억제함으로써 염증 및 산화 스트레스를 개선하는 효과가 있음을 확인하였다.

REFERENCES

1. Lee HH, Kim YS, Park HY. 2007. Plant regeneration *via* organogenesis from leaf explant culture of *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 62-66.
2. Lee EB, Kim JK, Kim OK. 1993. The antigastritic effect of Taraxaci Herba. *Kor J Pharmacogn* 24: 313-318.
3. González-Castejón M, Visioli F, Rodriguez-Casado A. 2012. Diverse biological activities of dandelion. *Nutr Rev* 70: 534-547.
4. Hu C, Kitts DD. 2003. Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent-fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts *in vitro*. *J Agric Food Chem* 51: 301-310.
5. Cheong H, Choi EJ, Yoo GS, Kim KM, Ryu SY. 1998. Desacetylmatricarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Med* 64: 577-578.
6. Kim KH, Chun HJ, Han YS. 1998. Screening of antimicrobial activity of the dandelion (*Taraxacum officinale*) extract. *Korean J Soc Food Sci* 14: 114-118.
7. Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H. 1999. Anti carcinogenic activity of *Taraxacum* plant Ⅰ. *Biol Pharm Bull* 22: 602-605.
8. Cho SY, Park YJ, Oh YJ, Jang JY, Park EM, Kim MJ, Kim KS. 2000. Effect of dandelion leaf extracts on lipids metabolism in rats high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 676-682.
9. Ahmad VU, Yasmeen S, Ali Z, Khan MA, Choudhary MI, Akhtar F, Miana GA, Zahid M. 2000. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii*. *J Nat Prod* 63: 1010-1011.
10. Kim TJ. 1996. *Korean resources plants*. Seoul National University Pub. Co., Seoul, Korea. p 307-311.
11. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6: 347-373.
12. Hayden MS, Ghosh S. 2008. Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* 132: 344-362.
13. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2046-2050.
14. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF-κB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13: 11-22.
15. Houde V, Grenier D, Chandad F. 2006. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *J Periodontol* 77: 1371-1379.
16. Alexander C, Rietschel ET. 2001. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7: 167-202.
17. Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET. 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16: 83-104.
18. Triantafilou M, Triantafilou K. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 23: 301-304.
19. Luster MI. 1998. Inflammation, tumor necrosis factor, and toxicology. *Environ Health Perspect* 106: A418-A419.
20. Kim HC, Park SJ, Park CW, Kim YR, Kim JH, Choi ES, Cho HJ, Cho YU, Ha YL. 2001. Overcome effect of catabolic response in mouse by the egg yolks from laying hens intubated astaxanthin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1278-1282.
21. Sohn MK, Shin YW. 2012. A comparative study of memory improving effects of Taraxaci Herba on scopolamine-induced amnesia in mouse. *Kor J Herbology* 27: 27-35.
22. Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, Chen YC. 2002. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol* 446: 187-194.
23. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine School. 2005. *Herbology (Boncho-hak)*. Younglimsa, Seoul, Korea. p 245-247.
24. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. 1991. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13: 637-648.
25. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 16: 149-156.
26. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
27. Park JY. 2005. Suppressive effect of *Taraxacum officinale* extracts on NO production and iNOS expression through the down-regulation of NF-κB activity. *MS Thesis*. University of Inje, Gimhea, Korea. p 38.
28. Xue T, Roy R. 2003. Studying traditional Chinese medicine. *Science* 300: 740-741.
29. Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* 39: 255-259.
30. Nugroho A, Kim MH, Lee JH, Kim JD, Lee KR, Choi JS, Yoo YM, Park HJ. 2011. Polyphenol analysis and peroxynitrite scavenging effect of the extracts from eight Korean mountainous vegetable. *Kor J Pharmacogn* 42: 38-45.
31. Yang HY, Lee SG. 2011. Effects of dandelion (*Teraxacum platycarpum*) with various extracting method on antioxidative capacity, lipid metabolism in diet-induced obese rats. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 48-54.
32. Kim YH, Lee MJ, Lee HS, Kim JG, Park WH. 2011. Suppressive effect of *Euryale ferox* salisbury extracts on inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

through the antioxidative mechanism. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 202-211.
33. Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. 2005. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr* 24: 16-31.
34. Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Cryer A, Ramji DP. 1996. Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines. *Cytokine* 8: 525-533.
35. Kim JJ, Park CM, Kim MJ, Cho CW, Song YS. 2014. Hypolipidemic effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts *via* fecal lipid excretion in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Food Sci Biotechnol* 23: 841-847.