Microbiol. Biotechnol. Lett. (2017), 45(2), 178–183
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1704.04002
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

RAW 264.7 세포에서 말오줌나무 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과

이진영[1], 유단희[1], 채정우[2]*
[1]호서대학교 화장품과학과
[2]경기도산림환경연구소

Received: April 28, 2017 / Revised: June 5, 2017 / Accepted: June 5, 2017

Inhibitory Effect of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) Extract on the mRNA and Protein Expression of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 Cells

Jin-Young Lee[1], Dan-Hee Yoo[1], and Jung-Woo Chae[2]*
[1]*Department of Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 31499, Republic of Korea*
[2]*Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Republic of Korea*

This study examined a new functional cosmetic material possessing application possibility of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) (SS) extract. For this, we analyzed the toxic effect of the SS extract on macrophages (RAW 264.7 cells) by performing MTT assay. Results of the MTT assay showed ≥100% cell viability after treatment with 500 μg/ml SS extract. To determine the anti-inflammatory activity of the SS extract, we examined its inhibitory effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production in RAW 264.7 cells by performing Griess assay. Result of the Griess assay showed that the SS extract inhibited LPS-induced NO production in a concentration-dependent manner. Next, we examined the effect of the SS extract on the production of proinflammatory factors inducible NOS (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. First, we determined the inhibitory effect of 50, 100, and 500 μg/ml SS extract on iNOS and COX-2 protein expression by performing western blot analysis, with β-actin as a positive control. Results of western blotting showed that treatment with 500 μg/ml SS extract decreased iNOS and COX-2 protein expression by 31.2% and 54.7%, respectively. Next, we determined the inhibitory effect of 50, 100, and 500 μg/ml SS extract on iNOS and COX-2 mRNA expression by performing reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR), with GAPDH as a positive control. Results of reverse transcription-PCR showed that treatment with 500 μg/ml SS extract decreased the mRNA expression of iNOS and COX-2 by 72.2% and 89%, respectively. These results suggest that the SS extract is a highly valuable natural compound because of its functional components and anti-inflammatory activity.

Keywords: ***Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)*, anti-inflammatory, iNOS, COX-2**

서 론

최근 생활환경 및 식생활의 변화로 인해 암, 당뇨병, 고혈압, 비만 및 혈관성 질환 등의 생활습관으로 생긴 질병이 증가하고 있는 추세이다. 이와 더불어 현대 사회의 급격한 산업화로 인해 환경오염, 스트레스 증가 등을 포함한 다양한 요인으로 인한 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속됨에 따라 아토피, 천식 등의 만성 염증 질환이 증가하고 있다[1, 2].

염증(inflammation)은 물리적인 상처나 미생물에 감염되었을 때 발생하는 정상적인 생체의 방어기전의 일종으로 염증작용을 통하여 발병요인을 중화시키거나 제거하고, 손상된 조직을 복구시켜 정상적인 구조와 기능을 할 수 있게 한다[3]. 염증반응은 체내에서 발생한 산화적 스트레스에 의해 촉진되며, 이러한 산화적 스트레스는 세포 사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 세포의 유전자 발현을 증가시켜 염

***Corresponding author**
Tel: +82-31-8008-6658, Fax : +82-31-374-2492
E-mail: forest1004@Korea.kr
© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

증반응을 개시하거나 약화시킨다. 염증반응의 대표적인 예로서 대식세포가 염증성 매개물질 중 하나인 lipopolysaccharide (LPS)를 toll like receptor 4 (TLR4)의 heterodimerization 형성으로 인식하여 대식세포 또는 단핵세포에서 세포 내 전사요소인 nuclear factor (NF-κB)의 활성화를 유도한다. 유도된 NF-κB가 핵으로 이동하여 염증성 cytokine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유전자 발현을 유도한다. 염증반응의 지표물질인 nitric oxide (NO)가 L-arginine으로부터 NO synthase (NOS)에 의해 합성되고, 유해한 자극 감염 및 외상 등에 의해 생긴 염증이 발현되면 세포막 인지질로부터 arachidonic acid (AA)가 유리되어 cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 prostaglandin (PG) 류의 다양한 염증반응의 매개체들을 생성한다[4–6]. NO는 NOS 중 iNOS에 의한 생성이 가장 많으며 염증상태에서 과도한 NO 생성은 염증반응을 촉진시키며 염증매개체의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다[7, 8]. 또한 AA로부터 생성된 PG들 중 PGE_2는 염증반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다[9].

서양에서 딱총나무속 식물은 관목이면서 꽃이 많이 피고 열매가 아름다워 조경수로 개발되어 인기가 높으며 꽃과 열매는 다양한 용도로 활용되고 있다. 국내에서 자생하는 인동과 딱총나무속에 속하는 식물로는 말오줌나무(*Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai))가 있으며 울릉도에서만 자라는 특산식물이다. 낙엽관목이며 화서가 크고 열매가 작은 것이 특징이며, 말오줌나무의 어린잎을 나물로 먹거나 열매를 술로 담가 먹는 등으로 이용되고 있다[10–12]. 하지만 말오줌나무의 약용 효과에 대해서는 연구가 미비한 실정이다. 따라서 말오줌나무의 염증효과를 검증하고 염증관련 제품으로서 이용가능성을 확인하기 위하여 본 실험에서는 LPS로 처리한 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 말오줌나무 추출물의 항염증 효능을 연구하였다.

재료 및 방법

시료준비

실험에 사용된 말오줌나무 잎과 줄기는 울릉도에서 채취하였으며, 채취한 시료는 분쇄한 시료에 시료 중량의 10배양의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결건조하여 −20℃에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 세포주는 대식세포인 RAW 264.7은 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank)에서 구매하였으며, 세포 독성 측정에 사용된 haemacytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구매하여 사용하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Bioshop (Canada)에서 구매하였다. 항염증 측정에 사용된 시약인 lipopolysaccaride (LPS), griess regent 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 또한 단백질 발현 측정에 사용된 1차 항체인 iNOS, COX-2와 2차 항체인 anti-rabbit IgG-HRP는 Santa Cruz (USA)에서 구입하여 사용하였고, mRNA 발현 측정 실험에 사용된 cDNA polymerase kit, GoScript™ Reverse Transcription kits는 Promega (USA)에서 구매하였다. 실험에 사용된 기기는 ELISA reader (Tecan, Austria), PCR (C-100, Bio-Rad, USA), image quant LAS 4,000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden), CO_2 incubator (Vision scientific, Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Swltzerland), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), autoclave (JS Research Inc., Korea), Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea) 등을 사용하였다.

세포 배양

세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbeco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[13]에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포생존율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[14]에 따라 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2의 형태로 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 cell을 1×10^5 cell/well로 분주하였다. 37℃ CO_2 incubator에서 24시간 배양한 이후 1× PBS로 2번 세척한다. Lipopolysaccharide (LPS) 10 μg/ml을 normal을 제외하고 처리한 후 2시간 이후 농도 별로 조제한 시료용액을 처리하여 24시간 배양한 후 상등액을 얻은 후, 동량의 griess 시약을 첨가하여 96 well plate에서 10분 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO 억제능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

iNOS, COX-2의 활성을 확인하기 위하여 cell line RAW 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거하여 LPS를 1 μg/ml 농도로 2시간 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24–48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab을 가한 100 μl로 용해해서 4℃에서 16,110 ×*g*에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μl의 단백질을 10% SDS-PAGE사에서 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기(BIORAD)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. iNOS, COX-2, β-actin의 1차 항체를 희석하여 4℃에서 overnight한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. iNOS와 COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit, β-actin의 2차 항체는 anti-mouse를 사용하고 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후 LPS를 1 μg/ml 농도로 2시간 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 μl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 16,110 ×*g*에서 20분간 원심분리하여 상층액을 isopropanol 500 μl가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 16,110 ×*g*에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 16,110 ×*g*에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water를 50 μl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μl와 멸균수 195 μl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μg/ml) 1 μl, 추출한 RNA (2 μg)와 nuclease free water로 10 μl를 맞추고 75℃에서 5분간 반응시킨 후 5× reaction buffer, $MgCl_2$, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR.

Gene	Primer	Sequence (5′ → 3′)
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
COX-2	Sense	GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT
	Anti-sense	ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA
iNOS	Sense	AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT
	Anti-sense	GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC

Reverse transcription-polymerase chain reaction

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5× green GoTaq flexi buffer, $MgCl_2$, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. GAPDH, iNOS는 96℃에서 2분, 96℃에서 10초, 64℃에서 30초, 72℃에서 1분, 72℃에서 10분(40 cycles), COX-2는 96℃에서 2분, 94℃에서 10초, 51℃에서 30초, 72℃에서 1분, 72℃에서 10분(40 cycles)을 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 40분간 전기영동한 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

결과 및 고찰

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율을 확인하기 위하여 진행한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 담황색의

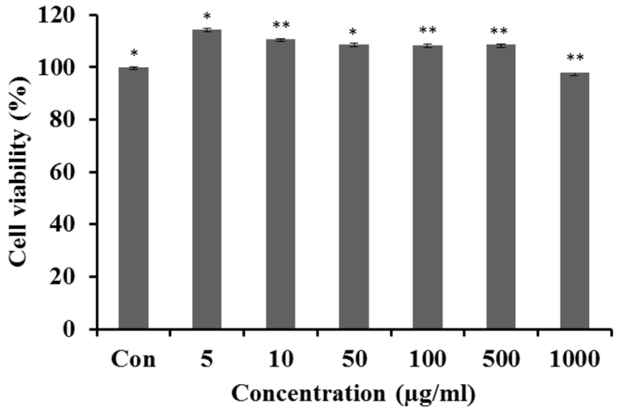

Fig. 1. Cell viability of extract from *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (5×10^4 cells) were started in medium for 24 h the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 μg/ml of extracted *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* for 24 h. Result are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$).

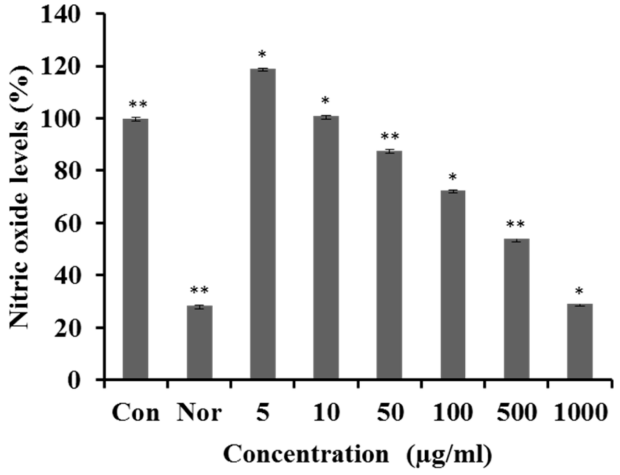

Fig. 2. Effect of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) on production of nitric oxide in RAW 264.7 cell. Effect of 70% ethanol extracts of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells) were treated with *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* 70% ethanol extract and LPS (1 μg/ml) for 24 h. Result are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$).

기질로 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 효소에 의해 환원되어 암적색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않고 생 세포에서 생성된 formazan의 생성량을 측정하는 시험법이다[15].

말오줌나무 추출물의 세포생존율을 대식세포인 RAW 264.7에서 MTT assay로 확인한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 말오줌나무 추출물은 500 μg/ml의 농도에서 108%의 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었으며, 따라서 이하의 western blot과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)의 실험은 높은 생존율을 보인 500 μg/ml의 농도 이하에서 실험을 진행하였다.

Nitric oxide (NO) 저해활성 측정

활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 말오줌나무 추출물의 효과를 알아보았다. 그 결과 Fig. 2와 같이 LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현량을 나타내었으며 말오줌나무 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 1,000 μg/ml의 농도에서 29.0%의 저해율을 나타낸 것을 확인하였으며, RAW 264.7 세포에서 염증발현을 억제시키는 것에 말오줌나무 추출물이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

iNOS 및 COX-2 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과 측정

염증반응이 일어나면 염증매개물질인 nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2), 염증성 cytokine 등이 분비된다. 그 중 염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase (NOS)에 의해 합성되며, NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS (iNOS)의 세가지 형태가 존재한다. 이들 중 iNOS에 의한 NO형성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다[16].

다른 염증인자 중 하나인 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2가 존재하며, 이는 다양한 세포에서 다른 경향을 나타낸다. COX-1은 정상적인 세포에서 정상적인 생체기능을 하지만 COX-2는 염증반응 부위에서 발현이 된다. COX-2에 의해 생성되는 PGE_2는 통증, 발열 등에 관여하는 염증 매개체로서 염증반응, 면역반응에 관여하고 혈관신생을 촉진시키는 것에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[17].

본 연구에서는 염증발현 인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 western blot을 통해 실험하였다. 대식세포인 RAW 264.7에 말오줌나무 추출물을 50, 100, 500 μg/ml 농도별로 처리하여 24시간 뒤에 단백질 발현 억제 효과를 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 때, 세포의 종류나 환경에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 말오줌나무 추출물을 50, 100, 500 μg/ml의 농도로 처리한 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2 단백질 발현양이 농도가 높아짐에 따라 억제됨을 확인하였으며, 500 μg/ml에서 각각 31%, 54%의 효과를 나타내었다. 또한 대조군인 비타민 C와 비교

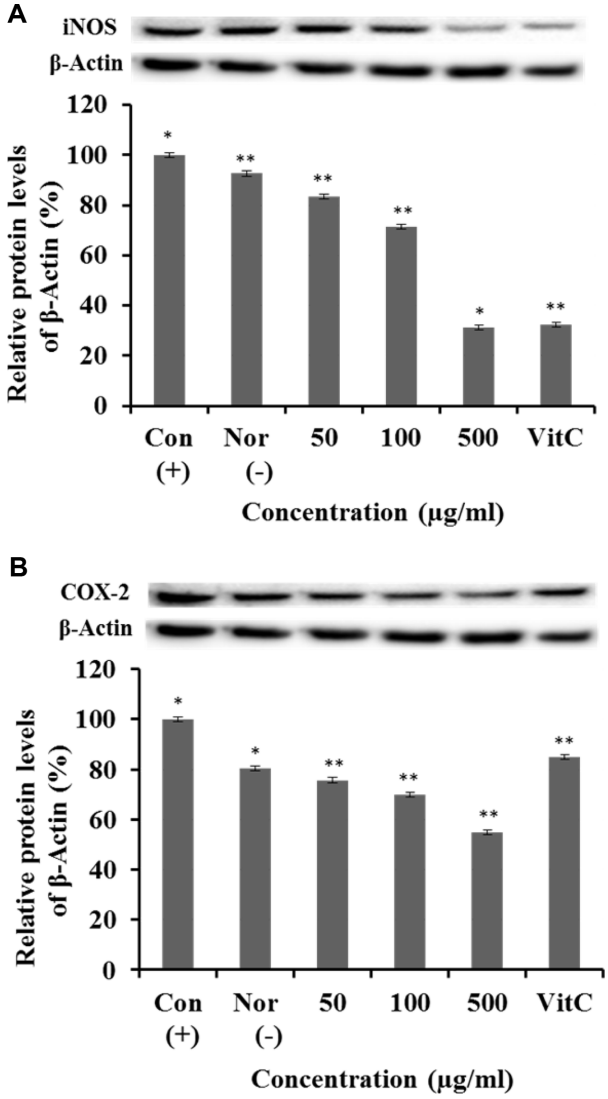

Fig. 3. iNOS, COX-2 protein expression rate of extract from *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* on macrophage cell (RAW 264.7). (A) iNOS protein expression rate of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* extract. (B) COX-2 protein expression rate of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 150 and 500 μg/ml of extract of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* for 24 h. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments (Significant as compared to control. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

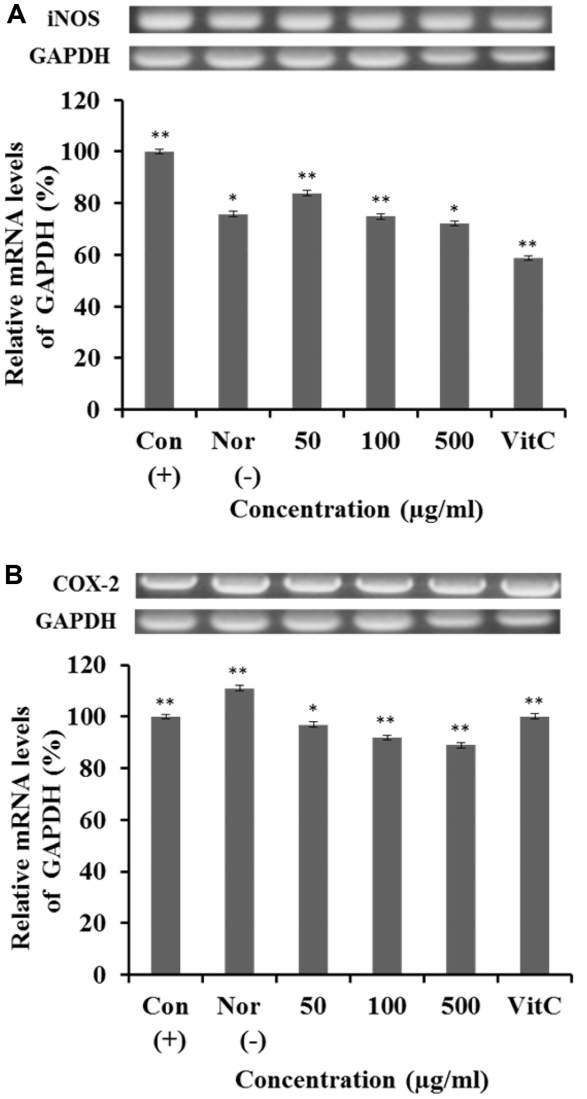

Fig. 4. iNOS, COX-2 mRNA expression rate of extract from *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* on macrophage cell (RAW 264.7). (A) iNOS mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* extract. (B) COX-2 mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* extract. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 150 and 500 μg/ml of extract of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula (Nakai)* for 24 h. Each values represents mean ± S.D. of three individual experiments (Significant as compared to control. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

하였을 때 대조군보다 감소하는 것으로 보아 단백질 발현 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

또한 iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 reverse transcription-PCR을 이용하여 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 말오줌나무 추출물을 50, 100, 500 μg/ml 농도별로 처리한 후 LPS에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현양의 감소를 측정하여 Fig. 4과 같이 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 mRNA 발현이 농도가 높아짐에 따라 억제되는 것을 확인하였고, 대조군인 비타민 C와 비교하였을 때 iNOS는 대조군에 비해서는 감소하지 않았지

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1704.04002

만 유사한 결과를 나타냈고 COX-2는 대조군에 비해 현저히 감소한 결과를 나타내어 iNOS와 COX-2에서 유의한 억제 효과를 확인하였다.

Kim 등[18]의 말오줌나무 추출물의 항염증 활성에 대한 과거 연구에서 50 μg/ml 농도에서 말오줌나무 추출물은 NO 생성을 46.75% 억제시켰다. 본 연구결과에서 말오줌나무 추출물을 저농도로 처리하였을 때 iNOS 단백질의 발현이 소폭 억제된 것과 유사하다고 판단되며, 말오줌나무의 항염증 활성에 대하여 더 많은 연구가 진행된다면 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높아질 것이라고 판단된다.

요 약

본 연구는 새로운 기능성 화장품 소재를 개발하기 위해 천연물 재료인 말오줌나무 추출물 활용 가능성 연구하였다. 이 목적을 이루기 위하여, 말오줌나무의 세포독성효과를 MTT assay를 통해 확인한 결과, 500 μg/ml 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 항염증 활성을 효과적으로 확인하기 위하여, LPS로 유도된 대식세포 내 NO 생산을 억제하는 효과를 griess의 방법으로 조사하였다. 그 결과 NO의 생성이 말오줌나무 추출물의 농도 의존적으로 저해되었음을 확인하였다. 말오줌나무 추출물을 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 전염증성 인자(iNOS, COX-2)들을 생성하여 측정하였다. 그 후, iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 50, 100, 500 μg/ml 농도에서 western blot을 수행하였고, β-actin를 양성대조군으로 사용하였다. iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위해 50, 100, 500 μg/ml 농도에서 RT-PCR을 수행하였고, 양성대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 결과적으로, western blot으로 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정한 결과 500 μg/ml 농도에서 각각 31.2%, 54.7%의 감소 효과를 보였으며, iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제 효과를 RT-PCR로 측정한 결과 500 μg/ml 농도에서 각각 72.2%, 89% 정도로 감소하였다. 이러한 결과들을 통해 말오줌나무 추출물은 항염증 효과를 가진 천연물 소재로 활용 가능할 것으로 생각된다.

References

1. Heinzemann A, Daser A. 2002. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **127**: 170-180.
2. Sung YY, Kim DS, Yang WK, Nho KJ, Seo HS, Kim YS, *at al.* 2012 Inhibitory effects of *Drynaria fortunei* extracts on house dust mite antigen-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J. Ethnopharmacol.* **144**: 94-100.
3. Shin JS, Park YM, Choi JH, Park HJ, Shin MC, Lee YS, *at al.* 2010. Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF-κB in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Int. Immunopharmacol.* **10**: 943-950.
4. Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes; Advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875.
5. Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* **12**: 186-192.
6. Shon DH, Choi DW, Kim MH. 2012. Improvement of anti-inflammation activity of *Gardeniae fructus* extract by the tratment of β-Glucisudase. *Korean J. Food Sci. Echnol.* **44**: 331-336.
7. Hippeli S, Elstner EF. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic. Res.* **31**: 81-87.
8. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, *at al.* 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med*. **178**: 749-754.
9. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89**: 271-277.
10. KNA (Korea National Arboretum). 2010. Folk plants in Korean peninsula VI, p. 275. Gyeongnam & Gyeongbuk province, Korean.
11. KNA (Korea National Arboretum). 2011. Folk plants in Korean peninsula VII, p. 321. Gyeonggi province, Korean.
12. Lee CB. 2006. Korea illustrated plant book II, pp. 227-228. Hyangmoonsa, Seoul, Korea.
13. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell HB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
14. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
15. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**: 206-209.
16. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
17. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, *at al.* 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* **91**: 3228-3232.
18. Kim HJ, Lee DJ, Ku JJ, Choi K, Park KW, Kang SH, *at al.* 2013. Anti-inflammatory effect of extracts from folk plants in Ulleung island. *Korean J. Plant Res.* **26**: 169-177.