

## Verification of Anti-inflammatory Activities of the Ethanol Extracts of *Glechoma hederacea* var. *longituba* in RAW 264.7 Cells

Jin-Young Lee<sup>1</sup>, Dan-Hee Yoo<sup>1</sup>, Yong-Seong Jeong<sup>2</sup>, Sung-Hyun Joo<sup>2</sup> and Jung-Woo Chae<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

<sup>2</sup>Department of forestry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>3</sup>Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 447-290, Korea

Received November 24, 2017 / Revised January 18, 2018 / Accepted January 25, 2018

In this study, we investigated the potential of *Glechoma hederacea* var. *longituba* 70% ethanol extract as a natural functional material by examining the anti-inflammatory effect of it. Macrophages results in (Raw 264.7) induced by lipopolysaccharide (LPS). Confirming the viability of the macrophages *Glechoma hederacea* var. *longituba* 70% ethanol extract showed a 95.8% survival rate at 1,000 µg/ml concentration. Anti-inflammatory activity was examined the inhibitory tests on the production of LPS included nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells by Griess assay. The result showed that NO production deterrent effect of 37.4% at a concentration of 1,000 µg/ml. The deterrent effect of GG 70% ethanol extract on protein expression of inducible NOS (iNOS) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) was measured by Western blotting using the concentrations 50, 100 and 500 µg/ml, with β-actin used as the positive control. The inhibitory effect of iNOS and COX-2 mRNA expression was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using 50, 100 and 500 µg/ml concentration of GG 70% ethanol extract, with GAPDH used as the positive control. In experiments using Western blot and RT-PCR when compared with the control group vitamin C it was confirmed that the 70% ethanol extract from GG suppressed. When compiling the results of this study, we confirmed the possibility of GG 70% ethanol extract as an anti-inflammatory material.

**Key words** : Anti-inflammatory, COX-2, *Glechoma hederacea* var. *longituba*, iNOS, RAW264.7

### 서 론

아시아에서 생약재는 오랜 기간 동안 많은 질병 치료에 효과적으로 사용되어 왔으며, 생약재 내의 유효한 성분은 인체의 면역 시스템 중 보체계(complement system)의 활성화 등 질병에 대한 생체방어 시스템을 보강하는 등 인체의 생체 항상성(homeostasis)에 큰 영향을 미친다[13]. 면역이란 인체가 외부로부터 미생물의 침입 과정에서 스스로를 지키기 위한 일종의 보호기작으로 세포, 분자, 조직들이 감염원에 대하여 기관들을 보호하는 것이다. 선천 면역계에서 대식세포는 숙주의 방어기구의 일부로서 면역계에서 매우 중요한 역할을 수행하여 외부물질의 침입으로 대식세포가 활성화되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) 염증성 cytokine 생성의 향상 및 암세포, 각종 유해균의 성장을 억제할 수 있다[8, 21]. 그러나 지속적이며 과도한 만성 염증반응은 체내의 조직 손상

을 유발하며 이와 관련된 염증성 cytokine 또는 활성 산소종으로 인해서 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다[2]. 염증반응의 대표적 예로는, 대식세포에서 염증성 매개물질 중 하나인 lipopolysaccharide (LPS)를 toll like receptor 4 (TLR4)의 heterodimerization 형성으로 인식하고 세포내 전사인 nuclear factor-κB (NF-κB)의 활성화를 유도한다[15]. NF-κB가 핵으로 이동 시 염증성 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), cytokine의 유전자 발현을 유도하게 되며, nitric oxide synthase (NOS)에 의해서 염증반응 시 지표물질인 NO가 L-arginine으로부터 합성된다[19]. NO는 NOS 중 iNOS에 의한 생성이 절대적으로 많으며 과도한 NO 생성은 염증반응을 촉진하고 염증 매개체의 생합성을 촉진하며 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다[6, 14]. COX에 대한 연구는 1990년대 초반에 진행되었으며 COX-1, COX-2 두 가지로 나뉜다. COX-1은 대부분의 조직에서 발현되고, prostaglandin을 생산하여 신장의 혈액흐름 조절 또는 위장의 세포를 보호하는 등의 생리적 기능을 조절한다. COX-2의 경우 외부로부터 미생물에 의한 감염이나 손상 및 여러 요인의 스트레스에 반응하는 대식세포에서 발현된다[22]. 즉 iNOS와 COX-2의 발현 및 NO, PGE2는 면역세포의 대표적 염증인자이며, 다른 염증인자로는 pro-inflammatory cytokine인 tumor

#### \*Corresponding author

Tel : +82-31-8008-6658, Fax : +82-31-374-2492

E-mail : forest1004@Korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) 등이 포함된다[3].

한국에 분포하는 긴병꽃풀(*Glechoma hederacea* var. *longituba*, GG)은 전남, 경남, 경기, 황해 이북에 나는 다년생 초본이다. 금전초(金錢草)는 앵초과의 과로황(過路黃; *Lysimachia christinae* Hance)의 전초로서 한의학에서는 청열해독(淸熱解毒), 통림(通淋), 소종(消腫) 등의 효능을 가지고 있어 간담질환과 비뇨기계의 결석을 치료하는데 쓰이며[20], 한국에서는 긴병꽃풀을 대용으로 사용하기도 한다[10]. 지금까지 긴병꽃풀에 대한 선행연구로는 Jo [7]의 긴병꽃풀의 화학조성 분석과 전자공여능 및 아질산염 제거활성에 대한 연구와 Kim [9]의 긴병꽃풀 정유의 제조활성 연구, Park [18]의 긴병꽃풀을 재배시 비료 처리에 따른 정유성분을 비교한 연구, Lee [12]의 긴병꽃풀 추출물이 Streptozotocin이 유발시킨 당뇨에 미치는 영향에 대한 연구가 있다. Lee [11]는 금전초 열수 추출물이 LPS와 rIFN- $\gamma$ 로 유도한 NO 생성을 농도의존적으로 억제시키며 IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 등 세포활성물질의 생성을 증가시킨다고 보고하였다.

지금까지 개발된 항염증제는 안전성 면에서 문제점이 있어서 사용 일부를 제한하고 있으므로 면역 작용을 천연물질로부터 보다 안전하게 증진하려는 연구에 대한 관심이 부각되고 있으며, 천연물질로 인해 유래된 면역 증강제는 면역 반응을 강화하거나 저하된 면역력을 회복시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다. 따라서 본 연구에서는 긴병꽃풀 추출물을 RAW264.7 세포에서 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도한 후, 긴병꽃풀 추출물의 항염증 효과를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시료 추출

실험에 사용된 긴병꽃풀의 줄기와 잎은 오산 일원에서 채취하여 열풍건조 후 분쇄하였다. 분쇄한 시료에 시료 중량의 10 배 양의 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 $^{\circ}$ C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 세포주

실험에 사용한 세포주인 RAW 264.7 cell은 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank)으로부터 구입하였으며, 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Thermo Scientific Hyclone

(USA) 및 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 시약 및 기기

세포 독성 측정에 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. 항염증 측정에 사용된 시약인 lipopolysaccharide (LPS), griess reagent 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot에  $\beta$ -actin, iNOS, COX-2의 primary antibody와 goat anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Cruz (CA, USA)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 이용한 Go Script<sup>TM</sup> Reverse Transcription System은 Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)에서 구입하여 사용하였다. Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microcentrifuge (gyrozen, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Vision Scientific, Korea), microplate reader (Tecan, Austria), PCR (ASTEC Co, Japan), Davinch-Chemi<sup>TM</sup> imager CAS-400SM system (Davinch-K Co, Korea), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Bio-Rad, USA), mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell (Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

### 실험 방법

#### 세포 배양

세포 배양은 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

#### MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[1]에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 2.5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.04 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.

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

**NO 생성 억제 활성 측정**

RAW 264.7 cell로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법 [5]에 따라 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였다. 6 well plate에 Raw 264.7 cell을 1×10<sup>5</sup> cells/ml 로 분주하였다. 37℃, CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 이후 1X PBS로 2번 세척한다. LPS 10 ug/ml을 normal 실험군을 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<sup>6</sup> cells/well로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 LPS를 1 ug/ml 농도로 2시간 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24~48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. Complete mini 1 tab을 가한 100 ul로 radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 용해하여 4℃, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit로 정량하였으며 20 ul의 단백질을 10% acrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기 (BIORAD)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 1시간 배양시켰다. iNOS, COX-2, β-actin의 1차 항체를 희석하여 4℃에서 over night한 다음, 다시 10분간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. iNOS와 COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit IgG-HRP, β-actin의 2차 항체는 anti-mouse IgG-HRP를 사용하고 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 image quant LAS 4,000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

**Total RNA 분리 및 cDNA 합성**

세포를 100 mm culture dish에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후 LPS를 1 ug/ml 농도로 2시간 동안 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 ul를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 4℃, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 ul가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocabonate (DEPC) water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 4℃, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC-treated water를 50 ul씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 용액 5 ul와 멸균수 195 ul를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 ug/ml) 1 ul, 추출한 RNA (2 ug)와 nuclease free water로 10 ul를 맞추고 75℃에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

**Reverse transcription-PCR**

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. PCR tube에 5X green Go taq flexi buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix (10mM), 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**

**대식세포(RAW 264.7)의 생존율 측정**

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

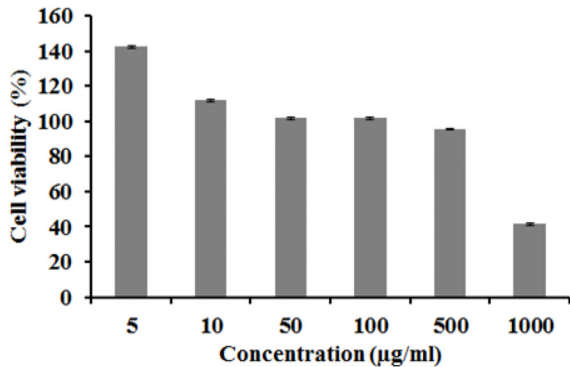


Fig. 1. Cell viability of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethanol extract on macrophage cells. Effect of GG extract on cell viability in RAW 264.7 cell. Effect of GG on the growth ( $1 \times 10^5$  cells/well) of RAW 264.7 cells. Cytotoxicity was measured by MTT assay of GG ethanol extract. DMSO treated RAW 264.7 cell after 24 hr at the indicated concentrations.

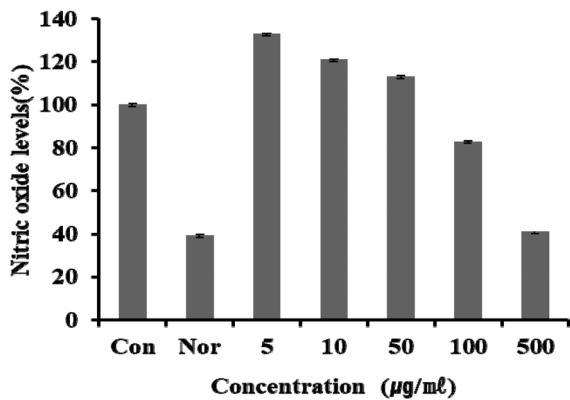


Fig. 2. Effect of *Glechoma hederacea* var. *longituba* extract on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. Effect of GG extract on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. Effect of 70% ethanol extracts of GG on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were treated with GG 70% ethanol extract and LPS (1 µg/ml) for 24 hr. NO production was determined in culture supernatant by Griess reagent.

MTT assay란 노란색을 띠는 수용성 물질 MTT를 이용하여 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원시키는 효소능력에 의하여 formazan 생성량을 측정하는 검사법이다[17].

MTT assay를 이용하여 세포 독성을 측정한 결과 Fig. 1와 같이 긴병꽃풀 추출물을 RAW 264.7에 처리하였을 때 농도가 500 µg/ml 구간에서 생존율은 95.8%로 측정됨에 따라 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았기 때문에 RAW 264.7 세포에 독성이 매우 낮다는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 세포 독성이 영향을 미치지 않는 구간인 50, 100, 500 µg/ml을 설정하여 관련 실험을 진행하였다.

**NO 저해활성 측정 결과**

본 연구에서는 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 긴병꽃풀 추출물의 효과를 알아보았다. 그 결과 Fig. 2와 같이 LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현량을 보였으며, 긴병꽃풀 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히 500 µg/ml의 농도에서 41.2%의 저해율을 나타낸 것을 확인하였으며, 대식 세포주에서의 LPS로 염증을 과발현 시켰으며, 이를 우수한 결과로 염증을 억제시킴으로써 긴병꽃풀 에탄올 추출물이 염증억제에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

**iNOS, COX-2의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제효과 확인**

포유동물에서의 NOS는 Type I, II, III이 3가지로 화학적 성상에 따라 동종 효소로 나뉜다. Type I인 neuronal NOS, 세포내에 항상 존재하고 있는 type II인 endothelial NOS, type III인 iNOS는 일부 세포에서 cytokine, LPS 및 박테리아 독소와 같은 자극들에 의해서만 발현된다[16, 23]. Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변화시키기 위한 촉진 효소로써, 대부분 조직에서 위장관 보호 및 신장 기능 조절과 같은 신체 항상성 유지에 관여하는 COX-1, 면역반응 시 세포분열인자나 cytokine에 의해 염증의 부위에서 세포 내 발현이 증가하는 COX-2로 나뉜다[4].

따라서 긴병꽃풀 추출물이 iNOS, COX-2인자의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 western blot을 이용하여 실험하였다. 단백질 발현량을 비교하기 위하여 house-keeping gene인 β-actine을 positive control로 사용하였고, 대조 구로서는 vitamin C를 사용하였다. Fig. 3에 나타난 결과와 같이 긴병꽃풀 추출물을 처리한 세포군에서 긴병꽃풀 추출물의 최고 농도인 500 µg/ml에서 iNOS와 COX-2는 각각 92.73%, 26.90%의 발현 정도를 보였고 농도가 증가함에 따라 iNOS와 COX-2의 대조군인 vitamin C와 비교했을 때 iNOS의 단백질 발현과 유의한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었으며, COX-2는 대조군보다 우수함을 나타내었다.

긴병꽃풀 추출물이 iNOS와 COX-2 인자의 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 긴병꽃풀 추출물을 농도별로 50, 100, 500 µg/ml 처리하여 RT-PCR을 진행하여 mRNA 발현을 확인하였다. 이 때, mRNA 발현량을 비교하기 위하여 housekeeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였으며, 대조군으로써 vitamin C를 사용하였다. Fig. 4에 나타난 결과와 같이 긴병꽃풀 추출물을 처리한 세포군에서 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현량이 감소하여 500 µg/ml 농도에서 각각 82.08%, 84.61%의 발현 억제를 보여주었고 대조군인 vitamin C와 비교해 보았을 때 긴병꽃풀 추출물과 대조군의 mRNA 발현이 iNOS의 발현은 유의함을 나타내었고, COX-2는 발현이 우수함을 확인할 수 있었다.

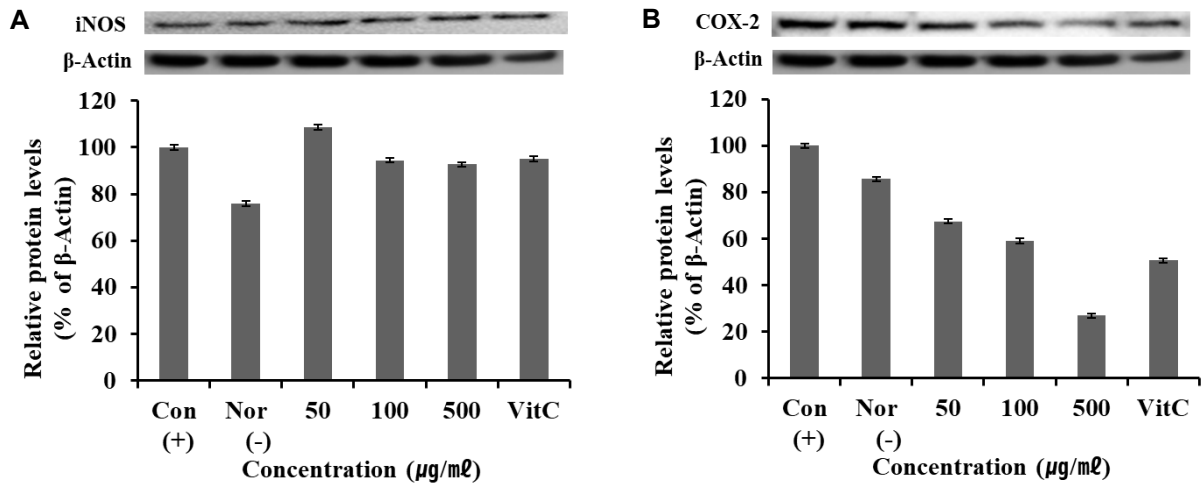


Fig. 3. iNOS and COX-2 protein expression rate of *Glechoma hederacea var. longituba* extracts on RAW 264.7 cells. A: iNOS protein expression rate of GG extract. B: COX-2 protein expression rate of GG extract. After RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/ml of extract of GG for 24 hr. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments.

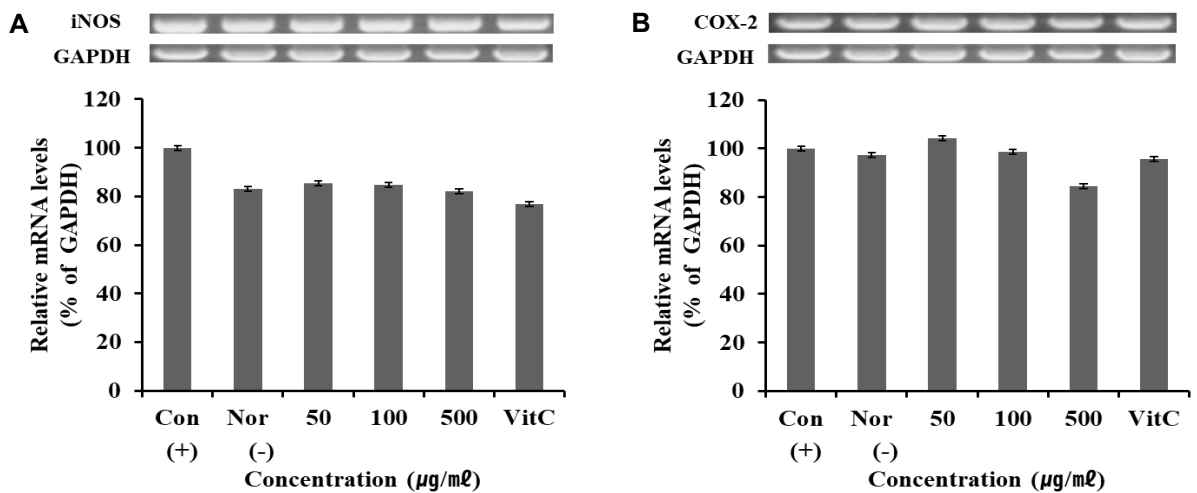


Fig. 4. iNOS and COX-2 mRNA expression rate of *Glechoma hederacea var. longituba* extracts on RAW 264.7 cells. A: iNOS mRNA expression rate of GG extract. B: COX-2 mRNA expression rate of GG extract. After RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/ml of extract of GG for 24 hr. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments.

### References

- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radio-sensitivity. *Cancer Res.* **47**, 943- 949.
- Chung, E. K., Seo, E. H., Park, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H. and Lee, B. R. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Kor. J. Organic Agric.* **19**, 245-253.
- Dendorfer, U. 1996. Molecular biology of cytokines. *Artif. Org.* **20**, 437-444.
- Golden, B. D. and Abramson, S. B. 1999. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **25**, 359-378.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}N$ ] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Hippeli, S. and Elstner, E. F. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic. Res.* **31**, 81-87.
- Jo, D. J., Lee, J. E., Noh, J. E., Kim, O. K. and Kwon, J. H. 2001. Chemical composition and electron donating and nitrite scavenging activities of *Glechoma hederacea var. longituba* Nakai. *J. Food Sci. Nutr.* **6**, 142-146.

8. Kim, H. S. and Kang, J. S. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 109-116.
9. Kim, S. M., Kim, H. Y., Hwang, K. H. and Chun, I. K. 2008. Herbicidal activity of essential oil from *Glechoma hederacea*. *Kor. J. Weed Sci.* **28**, 152-160.
10. Lee, H. G., Byun, J. S., Buyn, S. H. and Kim, S. C. 2002. The effects of *Glechoma longituba* on rats fed high diet. *Kor. J. Orien. Medi. Pres.* **10**, 61-72.
11. Lee, H. J. 2004. Inhibitory effect of nitric oxide production of *Lysimachiae christinae*. Master's Thesis Dissertation, Wonkwang Univ., Jeonrabukdo, Korea.
12. Lee, K. J., Ham, I. H., Bu, Y. M., Kim, H. C. and Choi, H. Y. 2008. Antidiabetic effect of *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr in diabetic rats induced by Streptozotocin. *Kor. J. Herbology* **23**, 175-180.
13. Lee, S. Y. 2000. Use and perspective views of oriental herbs in food industry. *Food Ind. Nutr.* **5**, 21-26.
14. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749-803.
15. Miyake, K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Micro.* **12**, 186-192.
16. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3115.
17. Park, J. G., Karmer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875-5884.
18. Park, Y. H., Lim, S. H., Kim, H. Y., Kim, G. H. and Kim, S. M. 2009. Comparison of compounds on the essential oil in *G. hederacea* var. *longituba* Nakai by fertilizer treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **27**, 171.
19. Shon, D. H., Choi, D. W. and Kim, M. H. 2012. Improvement of anti-inflammation activity of *Gardeniae fructus* extract by the treatment of  $\beta$ -Glucosidase. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 331-336.
20. The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. 2004. The herbalmedicine. Pp. 451, Youn-glimsa, Seoul.
21. Yoon, T. J. 2008. Effect of water extracts from root of *Taraxacum officinale* on innate and adaptive immune responses in mice. *Kor. J. Food Nutr.* **21**, 275-282.
22. Yun, H. J., Heo, S. K., Yi, H. S., Kim, C. H., Kim, B. W. and Park, S. D. 2008. Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 169-178.
23. Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291-316.

**초록 : RAW 264.7 세포에서 긴병꽃풀 에탄올 추출물의 항염증 활성 검증**

이진영<sup>1</sup> · 유단희<sup>1</sup> · 정용성<sup>2</sup> · 주성현<sup>2</sup> · 채정우<sup>3\*</sup>  
 (<sup>1</sup>호서대학교 화장품과학과, <sup>2</sup>경북대학교 임학과, <sup>3</sup>(재)경기도산림환경연구소)

본 연구에서는 긴병꽃풀에 대한 항염증 효과를 검증함으로써 천연 기능성 소재로서의 사용 가능성을 검토하고자 하였다. 대식세포(Raw264.7)에서 긴병꽃풀 70% 에탄올 추출물의 세포 생존율을 확인한 결과 1,000 µg/ml 농도에서 95.8%의 생존율을 보였고, 특히 1,000 µg/ml 의 농도에서 37.4%의 Nitric oxide (NO) 발현을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다. Western blot과 RT-PCR을 이용한 실험에서는 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 긴병꽃풀 추출물에서 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구결과를 종합하였을 때 긴병꽃풀 추출물의 항염증 소재로서의 가능성을 확인하였다.