

결명자로부터 분리된 Aurantio-obtusin의 항염증 활성

이기호^{1#} · 장지훈^{1#} · 우경완¹ · 노종현¹ · 정호경¹ · 조현우¹ · 용주현² · 안병관^{1*}
¹한약진흥재단 한약자원본부, ²해남자연농업영농조합법인

Anti-inflammatory Effects of Aurantio-obtusin isolated from *Cassia tora* L. in RAW264.7 Cells

Ki Ho Lee^{1#}, Ji Hun Jang^{1#}, Kyeong Wan Woo¹, Jong Hyun Nho¹, Ho Kyung Jung¹,
Hyun Woo Cho¹, Ju Hyun Yong², and Byeongkwan An^{1*}

¹Division of Traditional Korean Medicine Resource, National Development Institute of Korea Medicine,
288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Korea
²Heanam Natural Farming Association Corporation, Heanam 59021, Korea

Abstract – *Cassia tora* L. have been used as a folk medicine in Korea. This study investigated anti-inflammatory effect of aurantio-obtusin isolated from *C. tora*. We isolated aurantio-obtusin from 50% ethanol extracts of *C. tora* L. We investigated the anti-inflammatory effects of aurantio-obtusin on the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated inflammatory response in murine macrophage cell line (Raw 264.7). To investigate the cytotoxicity of aurantio-obtusin on RAW 264.7 cells, MTS assay was performed. RAW 264.7 cells were treated with aurantio-obtusin at different concentrations (12.5, 25, 50, 100 μ M) for 30 h. The result showed that aurantio-obtusin had no cytotoxic effect in a concentration range of 12.5 – 100 μ M. To determine the effect of aurantio-obtusin on LPS-induced NO production, the NO concentration measurement was performed. RAW 264.7 cells were treated with aurantio-obtusin at 12.5, 25, 50 and 100 μ M for 24 h, and the results showed that the NO production of aurantio-obtusin-treated cells compared to LPS alone treated group was significantly decreased in a dose-dependent manner. Pre-treatment of aurantio-obtusin inhibited LPS-induced NO production in a dose-dependent manner. To find out inhibitory mechanisms of aurantio-obtusin on inflammatory mediators, we examined the PGE₂ pathways. As a result, PGE₂ were decreased in a dose-dependent manner by aurantio-obtusin. The release of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 were also reduced. Moreover, aurantio-obtusin suppressed LPS-induced I κ B- α degradation. These results suggest that the down regulation of NO, PGE₂, IL-1 β and IL-6 expression by aurantio-obtusin are achieved by the downregulation of NF- κ B activity.

Keywords – *Cassia tora* L., Aurantio-obtusin, RAW 264.7, Anti-inflammatory effect.

염증(inflammation)이란 생체방어기작으로 물리적인 충격이나 화학물질, 세균 감염 등의 자극에 대항하는 것을 말한다. 이 과정에서 다양한 세포와 사이토카인들이 관여하게 되는데, 외부자극원으로 그람 음성균의 구성물질인 lipopolysaccharide(LPS), 내부자극원으로 arachidonic acid 대사체 등을 주요 매개로 하여 세포대세포 상호작용, 염증성 세포의 염증부위로의 이동 및 표적항원의 붕괴 등 여러 면역반응을 일으키게 된다.¹⁾

대식세포(macrophage)는 선천면역과 적응면역 등 다양한

면역반응에 관여하는 세포로 알려져 있다. 대식세포는 직접적으로 항원들을 제거해 면역반응에 관여 하는 M1과 항상성, 조직손상복구 대사작용 등에 관여해 광범위한 생리학적 역할을 하는 M2의 두 종류로 나뉜다. 항원에 의해 활성화된 대식세포는 일산화질소(NO)와 interferon gamma(IFN γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증매개성 사이토카인 분비를 촉진시켜 감염초기 생체방어에 중요한 역할을 한다.²⁾

결명자(決明子)는 콩과(Leguminosae) 식물인 결명자(*Cassia tora* L.), 결명(*C. obtusifolia* L.: 決明)의 종자를 말린 것으로 예로부터 차로 이용해 왔으며, 한방에서는 결명자가 청간명목(淸肝明目), 윤장통변(潤腸通便) 등 눈의 피

#These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): anben15@nikom.or.kr
(Tel): +82-61-860-2811

로와 간열을 내리고, 습관성 변비 등의 치료에 이용 되어 왔다.^{3,4)} 결명자를 이루는 주요 성분은 anthraquinones, anthroquinone glycoside, naphthalene 유도체, emondin과 포도당으로 변하는 배당체가 함유되어 있으며,^{3,4)} 장의 연동 촉진,⁵⁾ 간 보호, 면역 증강의 약리 효과가 보고되었다.⁶⁻⁸⁾

최근 연구에서는 결명자의 성분인 aurantio-obtusin이 전신 동맥을 안정화 시켜 고혈압 예방에 도움을 주고,⁹⁾ IgE 매개 비만세포 및 아나필락시스반응 등 알러지 작용 억제 효능이 보고 되었으나,¹⁰⁾ 항염증에 관한 연구는 미비하였다. 따라서 본 연구에서는 aurantio-obtusin을 이용해 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도시킨 염증반응을 관찰하여 결명자의 염증치료가능성을 보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 이용한 결명자는 2015년 6월에 전남 장흥에서 구입 해 목포대학교 한약자원학과 김희 교수 의 동정 후 실험에 이용하였고, 표본(표본번호: TKMII-9)은 한약진흥재단 한약재연구팀에서 보관하였다.

시약 및 기기 - 결명자의 추출 및 성분 분리에 사용된 methanol, *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol은 DAEJUNG(Korea)에서 구입하였다. 성분 확인을 위한 박층크로마토그래피(TLC, Thin layer chromatography)는 TLC plates(Silica gel 60 F254, Silica gel 60 RP-18 F254S)를 사용하였으며, 성분 분리를 위한 고정상은 silica gel(70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)과 ODS gel (50 μ m, 1.2 Kg YMC, Koyto, Japan)을 구입해 사용하였다. HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용해 성분 스크리닝을 진행하였으며, LC-IT-TOF MS(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 통해 성분의 추적 및 분리 성분의 구조 동정을 위한 분자량과 분자식 측정이 이루어졌다. LC와 LC-MS 분석에는 Water, Acetonitrile(Phillipsburg, NJ, USA), Formic acid (DAEJUNG, Korea)를 구입해 사용하였다. 분리한 성분은 Sigma aldrich Inc.(UK)의 DMSO-*d*₆를 사용해 용해시켰으며, Varian 600 spectrometer를 이용해 NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum을 측정하였다. Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), Penicillin-Streptomycin는 Gibco/BRL(Eggenstein-Leopoldshafen, Germany)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium(MTS), inner salt; phenazine ethosulfate(PES)가 포함된 The CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay와 Griess reagent system은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, PGE₂ ELISA kit은

Enzo Life Sciences Co.(Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였고, IL-1 β , IL-6의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit는 R&D systems(DuoSet ELISA Development Systems, MN, USA)에서 구입하였다. I κ B- α antibody, DAPI는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-rabbit FITC conjugate antibodies는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

지표물질 분리 - 결명자 5 kg을 50% ethanol로 80°C에서 3시간, 3회 반복 환류 냉각 추출 하였으며, 이를 50°C 이하의 중탕에서 감압농축해 358 g의 추출물을 얻었다. 추출물을 증류수에 현탁 시킨 후 ODS gel(50 μ m, 1.2 Kg YMC)을 이용한 Open column chromatography를 진행하였다. 고정상인 ODS gel을 Glass Column(16 cm \times 60 cm)에 충전하여 water와 acetonitrile을 이동상으로 전개하였으며, 19개의 소분획물을 얻었다(MJ90-1~19). 각각의 분획물은 LC IT-TOF MS(shimadzu, japan)를 이용해 스크리닝 하였으며, 분자량 측정을 통해 소분획물의 타겟성분을 추적하였다. 측정된 성분이 포함된 소분획물은 LC/MS 및 TLC를 이용해 분리 조건 설정 및 정제를 진행 하였다. 소분획물 16과 17을 Silica gel(70-230 mesh, Merck, Germany)을 이용한 순상 컬럼크로마토그래피를 *n*-Hexane: EtOAc=2:1 ~ 1:1의 비율로 실시하여 MJ90-1617-1(Aurantio-obtusin)을 분리하였다.

Aurantio-obtusin(MJ90-1617-1) - Yellow powder; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 13.25 (1H, s, 8-OH), 7.76 (1H, s, H-4), 7.16 (1H, s, H-5), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃), 3.80 (3H, s, 1-OCH₃), 2.28 (3H, s, 3-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 187.6 (C-9), 180.8 (C-10), 157.4 (C-8), 157.1 (C-6), 155.9 (C-2), 147.6 (C-1), 139.8 (C-7), 132.4 (C-3), 128.9 (C-11), 126.3 (C-4), 125.3 (C-14), 124.1 (C-13), 111.5 (C-12), 108.1 (C-5), 61.6 (7-OCH₃), 60.4 (1-OCH₃), 16.9 (3-CH₃); LC ESI-IT-TOF MS: *m/z* 331.0716[M+H]⁺.

세포주 및 세포배양 - 본 실험에서 사용한 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Virginia, USA)에서 분양받았다. Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin 첨가하여 CO₂배양기(MCO-17A1, Sanyo, Osaka, Japan)에서 온도 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다.

세포 독성 평가(MTS 분석) - Aurantio-obtusin의 세포 독성이 있는지 확인하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 12 well plate에 1 \times 10⁵ cells/ml로 분주하여 24시간 배양하였고 FBS가 들어있지 않은 DMEM 조건에서 시료를 12.5~100 μ M 처리하였다. 그 후 30시간 배양 후 MTS 용해액이 전체배양액의 1/10되게 첨가하였다. 37°C에서 4시간 배양한

후 ELISA 흡광도측정기(Infinite 200 pro, TECAN, Grödig, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric Oxide(NO) 농도 측정 - Aurantio-obtusin의 NO 생성 억제를 측정하기 위해 시료를 12.5~100 μ M 농도로 전처리하고, 2시간 후에 시료자체의 NO생성에 영향이 있는지도 확인하기 위해 LPS를 처리(500 ng/ml) 혹은 무처리한 다음 RAW 264.7 cell를 24시간 배양하였다. 그 후에 세포배양액 100 μ l, griess 시약(A+B) 100 μ l를 혼합하였다. 10분 동안 반응 시킨 후 ELISA 흡광도측정기(Infinite 200 pro, TECAN, Grödig, Austria)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Prostaglandin E2(PGE₂) 분석 - LPS 자극에 의하여 RAW 264.7 cell로부터 생성되는 prostaglandin E2(PGE₂)양이 aurantio-obtusin에 의해 얼마나 감소하는가를 측정하기 위해 Nitric oxide(NO) 측정방법과 동일한 조건에서 배양된 세포 배양액을 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 분석하였다. 세포 배양액 내 존재하는 PGE₂의 농도(pg/ml)는 표준용액의 농도를 기준으로 환산하였다. 구체적인 실험방법은 kit에 있는 프로토콜대로 수행하였다.

Cytokines(IL-1 β , IL-6) 측정 - Aurantio-obtusin의 염증성

사이토카인 생성억제 효과를 측정하기 위해서 RAW 264.7 cell을 6 cm 배양 용기에 5×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 배양하여 세포를 안정화 시킨 뒤에 시료를 12.5~100 μ M 전처리 한 뒤 2시간 후에 LPS를 500 ng/ml이 되도록 처리하였다. 24시간 배양한 후 상등액을 취하였다. 구체적인 실험방법은 kit에 있는 프로토콜대로 수행하였다.

면역형광염색(Immunofluorescence) 분석 - Aurantio-obtusin이 염증 세포신호전달과 관련된 I κ B- α 의 degradation 정도를 확인하기 위하여 immunofluorescence 실험방법을 이용하여 I κ B- α 와 핵을 염색하여 확인하였다. Cover slip에 세포를 분주하여 24시간 배양 후에 샘플을 2시간 처리 한 후 LPS를 500 ng/ml 처리하고 30분이 지난 후 그룹 별로 PBS로 세척을 3회하고, 3.7% formaldehyde로 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 다시 PBS로 세척을 3회하고, 형광물질이 들어갈 수 있도록 0.5% triton X-100을 15분간 처리한 후, 3% BSA로 실온에서 1시간 동안 blocking을 하였다. 1% BSA에 든 anti-I κ B- α (1:100) 처리하고 4°C에서 밤새 반응하였다. 그런 후에 2차 anti-rabbit FITC conjugated(1:200)와 DAPI를 처리하고 실온에서 4시간 반응하였다. 마지막으로 PBS로 3회 세척 후 cover slip을 fluorescence solution

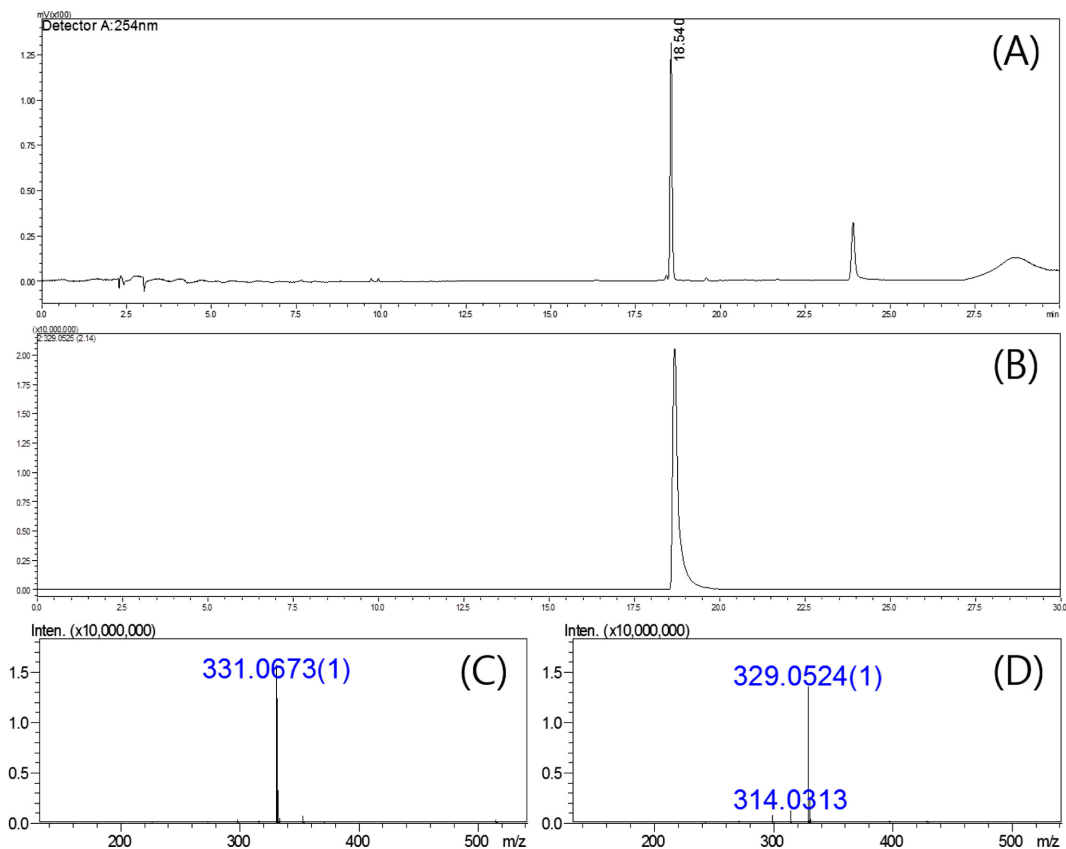


Fig. 1. LC-MS chromatogram (A and B) and mass spectrum (C and D) of aurantio-obtusin from *C. tora* L. (A: LC chromatogram by UV at 286 nm, B: Total ion chromatogram by TOF-MS, C: Positive mode, D: Negative mode).

(DAKO cytation, Carpinteria, CA)으로 고정 시킨 후 fluorescence microscope(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 관찰하였다.

통계처리 - 본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 SPSS Statistics 25 Standard for Public Service 프로그램으로 통계 분석을 하였으며, 평균치 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었다. 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 일원 분류 분산분석(one way analysis of variance)을 통하여 검증하였고, 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

지표성분 구조 분석 - MJ90-1617-1의 LC/MS 분석 결과 m/z 331.0743 $[M+H]^+$, 329.0673 $[M-H]^-$ 의 분자량 및 $C_{17}H_{14}O_7$ 의 분자식을 확인하였다(Fig. 1). 1H -NMR spectrum를 통해 δ 7.76(1H, s, H-4)과 7.16(1H, s, H-5)에서 aromatic proton peak를 확인하였으며, δ 3.83(3H, s, 7-OCH₃)과 3.80(3H, s, 1-OCH₃)에서 두 분자의 methoxy proton을, δ 2.28(3H, s, 3-CH₃)에서 한 분자의 methyl proton을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum를 통해 δ 187.6(C-9), 180.8(C-10)에서 두 분자의 ketone peak를 확인하였으며, anthraquinone 계열의 화합물임을 예측하였고, 12개의 benzenring carbon을 추가로 확인하였다. 또한 δ 61.6(C-7), 60.4(C-1)에서 두 분자의 methoxy carbon과 δ 16.9(C-3)에서 한 분자의 methyl carbon을 확인하였다. 이를 기존 문헌과 비교해 aurantio-obtusin으로 동정하였다(Fig. 2).^{11,12)}

RAW 264.7 세포주에서 Aurantio-obtusin의 세포 독성 확인 - 항염증효과를 알아보기 전에 aurantio-obtusin이 RAW 264.7 세포에서 MTS assay를 통해 독성이 없는 농도를 확인하였다. 앞의 실험방법대로 수행한 결과 모든 농도에서 세포독성이 없는 것을 확인하였고, 이 후 항염증 실험에서 12.5~100 μ M 농도로 실험을 수행하였다(Fig. 3).

RAW 264.7 세포주에서 Aurantio-obtusin의 NO 생성 억제 효과 - RAW 264.7 세포주에서 aurantio-obtusin이 NO

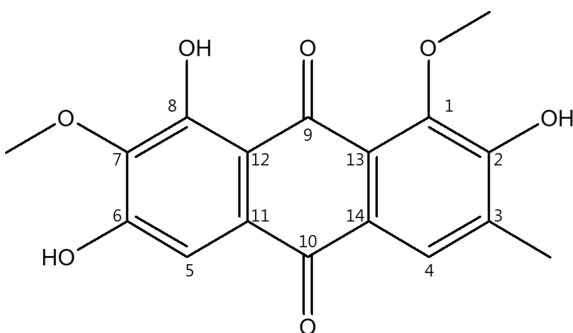


Fig. 2. The chemical structure of aurantio-obtusin

생성을 저해하는지 확인하기 위해 aurantio-obtusin을 12.5~100 μ M 농도로 전처리하고 2시간 후에 LPS(500 ng/ml)를 처리 혹은 무처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 상층액을 취하여 griess 시약을 이용해 NO 생성량을 확인하였다. 그 결과 LPS를 처리하지 않고 aurantio-obtusin을 12.5~100 μ M 처리한 군에서는 유의적인 차이가 없었다. 하지만 LPS를 처

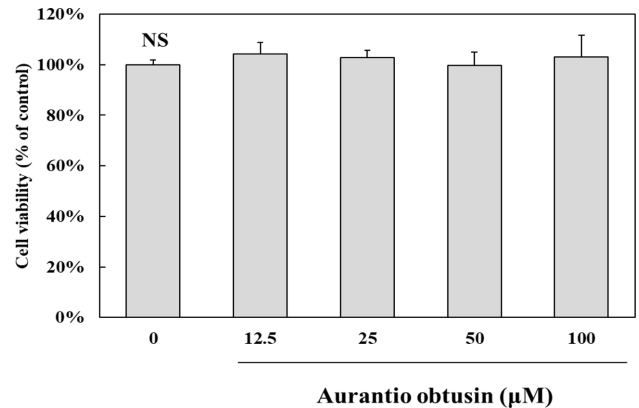


Fig. 3. Effect of aurantio-obtusin on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 30 hours in the presence or absence of aurantio-obtusin at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple range test. NS: not significant.

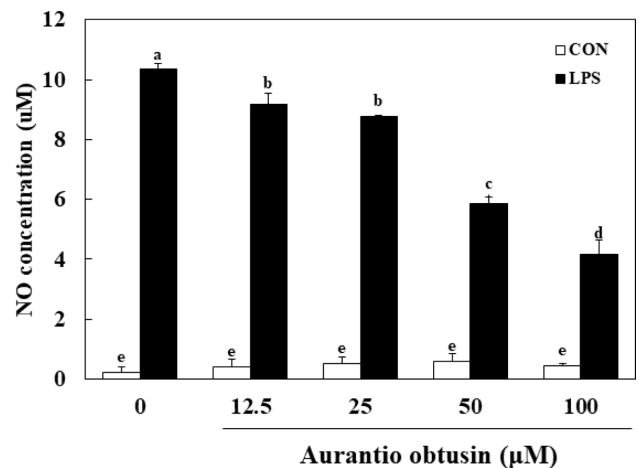


Fig. 4. Effect of aurantio-obtusin on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of aurantio-obtusin for 2 hours before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple range test. CON: control, LPS: LPS treated.

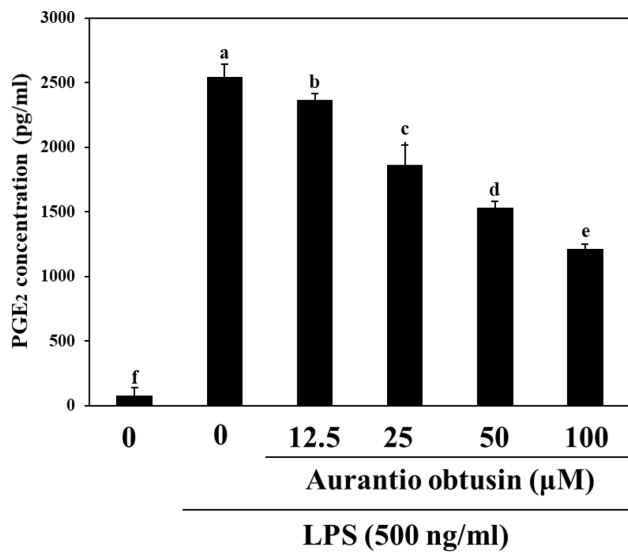


Fig. 5. Effect of aurantio-obtusin on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of aurantio-obtusin for 2 hours before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple range test. CON: control, LPS: LPS treated.

리한 군에서는 aurantio-obtusin 처리 농도가 증가함에 따라 NO 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

염증 유도된 RAW 264.7 세포주에서 aurantio-obtusin의 Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성 억제 효과 - RAW 264.7 세포주에서 aurantio-obtusin이 PGE₂ 생성을 저해하는지 확인하기 위해 aurantio-obtusin을 12.5~100 μM 농도로 처리하고 2시간후에 LPS(500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 세포 상등액만 취하여 PGE₂ 생성이 aurantio-obtusin의해 저해되는지 ELISA kit를 이용하여 분석하였다. LPS에 의해 Raw 264.7 세포에서 PGE₂ 생성이 약 33배 이상 증가되는 것을 확인하였고, aurantio-obtusin을 처리하였을 때 농도별로 유의성 있게 PGE₂ 생성이 감소되었고, 이는 aurantio-obtusin이 PGE₂ 생성 활성을 낮춤으로써 항염증 효과가 있음을 시사한다(Fig. 5).

Aurantio-obtusin의 염증관련 Cytokines의 생성 억제 효과 - Aurantio-obtusin이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도되는 각종 전염증성 및 염증성 cytokine들의 생성에 대한 영향을 조사하기 위하여 IL-6와 IL-1β의 생성을 조사하였다. 세포 상등액을 ELISA 방법으로 측정된 결과 aurantio-obtusin 12.5~100 μM 농도에서 IL-6, IL-1β를 농도 의존적으로 억제하는 걸 확인하였고, 25 μM 농도이상에서는 유의적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

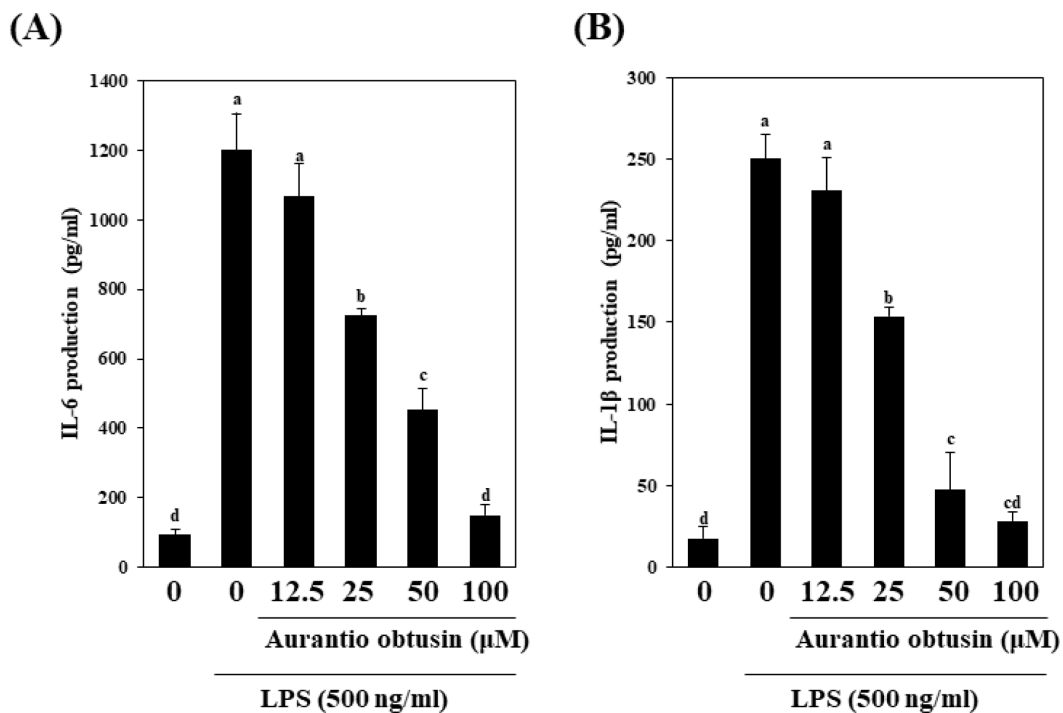


Fig. 6. Effect of aurantio-obtusin on LPS-induced IL-6 (A), IL-1β (B) production in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of aurantio-obtusin for 2 hours before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 24 hours. Production of IL-6 and IL-1β were measured by ELISA. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple range test.

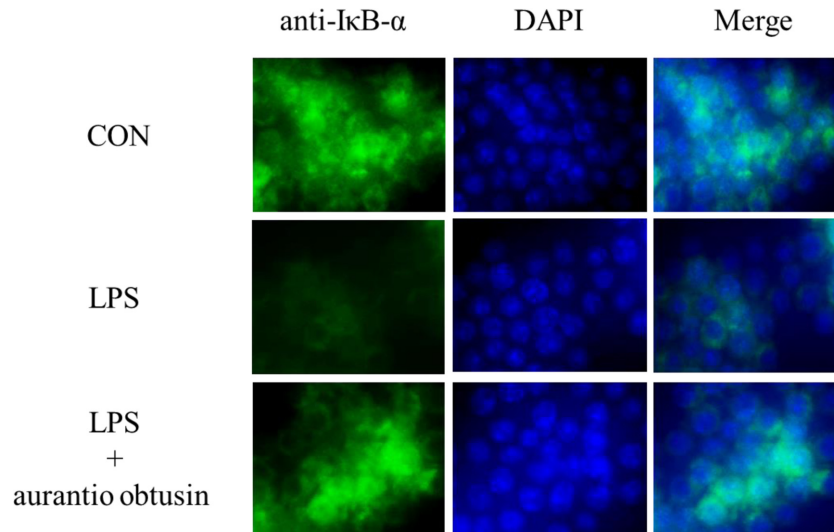


Fig. 7. Effect of aurantio-obtusin on IκB-α degradation in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with 100 μM of aurantio-obtusin for 2 hours before being incubated with LPS (500 ng/ml) for 30 min. IκB-α was visualized with immunofluorescence staining with anti-IκB-α antibody. Green: IκB-α Blue: DAPI (nuclei).

Aurantio-obtusin의 염증관련 Cytokines의 생성 억제 효과 - 본 실험에서는 IκB-α을 염색하여 염증반응에 의한 IκB-α degradation을 확인하여 NF-κB 핵내 유입을 간접적으로 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 LPS 처리시 IκB-α 발현이 감소되었고, 100 μM aurantio-obtusin을 전처리 했을 때 LPS에 의해 감소된 IκB-α 발현량을 증가시켰다. 이는 aurantio-obtusin이 IκB-α의 phosphorylation에 의한 degradation을 감소시키고 NF-κB의 Nuclear translocation을 차단하며, 이에 따라 염증반응을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 7).

결론

이 연구는 결명자로부터 분리한 anthraquinone계열 화합물인 aurantio-obtusin을 colum chromatography법을 이용해 분리하였고, ¹H, ¹³C NMR과 TOF-ESI MS를 이용해 구조 동정하였으며, 분리한 성분의 항염증 효과의 가능성을 서술한 것이다. 염증반응은 유해한 자극원인 감염, 손상된 세포 등으로 일어나는 초기 생체반응 중 하나로 감염되거나 손상된 세포를 제거함과 동시에 원인이 되는 항원을 제거하는 후천적인 면역반응을 촉발시키는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 하지만 정상세포 등을 인식하지 못하게 되거나, 일부 적은 자극에도 큰 반응성을 나타내는 등 비정상적인 염증 반응에 의해 지속적인 통증을 겪게 된다.¹⁴⁾ 최근에는 여러 항염증 치료제들의 외부 미생물에 의한 감염 노출 위험성, 위장관의 소화장애, 과민반응 등 부작용이 보고되었으며, 이를 극복할 수 있는 항염증 활성성분을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{15,16)} NO, PGE₂, cytokine, chemokine 등 다양한

염증 관련 물질을 분비하는 것으로 알려진 대식세포와,^{17,18)} 이를 자극하는 항원으로 잘 알려진 LPS는 그람 음성균의 외막에서 관찰되며, 대식세포의 표면에 있는 수용체인 TLR4와 결합을 통해 평소에는 세포질에 IκB에 의해 억제되어 있던 NF-κB가 염증반응이 촉진되게 되면 IκB가 붕괴(degradation)되고 NF-κB가 핵 안으로 전이(translocation)되어 전사인자로서 각종 염증 관련 매개 물질의 분비를 촉진시키게 된다.¹⁹⁾ 이러한 사실에 기초하여 결명자에서 추출 분리한 aurantio-obtusin의 항염증 연구를 한 결과 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO, PGE₂, 염증성 cytokine인 IL-6와 IL-1β를 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였지만, 추가 기전 연구에 대해서는 많은 연구들이 필요할 것으로 사료된다. 추가적인 결명자 함유 단일 성분의 분리 및 항염증 관련 효능을 규명함으로써 향후 기능성 소재로의 이용 가능성을 제시한다.

사사

이 연구는 2017년도 한약진흥재단에서 수행한 결명자발효분말의 배변활동원활 기능성원료 인정 및 건강기능식품 개발 사업[817034-3]의 위탁을 받아 수행한 결과의 일부이며 농림축산식품부의 지원에 감사드립니다.

인용문헌

1. Medzhitov, R. and Janeway Jr., C. A. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin.*

- Immunol.* **9**: 4-9.
2. Tao, J. Y., Zheng, G. H., Zhao, L., Wu, J. G., Zhang, X. Y., Zhang, S. L., Huang, Z. J., Xiong, F. L. and Li, C. M. (2009) Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Melilotus suaveolens* Ledeb on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **123**: 97-105.
 3. 생약학교재편찬위원회 (2012) 생약학, 304-306. 동명사, 서울.
 4. 한방약리학교재편찬위원회 (2010) 한방약리학, 419-422. 신일북스, 서울.
 5. Nho, J. H., Jung, H. K., Lee, M. J., Jang, J. H., Sim, M. O., Jung, J. K., Lee, K. H., An, B. K., Cho, J. H., Jang, M. C., Yong, J. H. and Cho, H. W. (2016) Effect of roasted water extract of fermented *Cassia tora* L. by *Lactobacillus casei* on the loperamide-induced constipation model in rats. *Korean J. Med. Crop Sci.* **24**: 471-478.
 6. Ahn, J. Y., Um, M. Y., Hong, K. H. and Ha, T. Y. (2012) Effect of *Cassia tora* extracts on D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Korean J. Food. Nutr.* **25**: 546-553.
 7. Bin-Hafeez, B., Ahmad, I., Haque, R. and Raisuddin, S. (2001) Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on chlophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *J. Ethnopharmacol.* **75**: 13-18.
 8. Ha, T. Y., Cho, I. J. and Lee, H. Y. (2001) Effect of *Cassia tora* ethanol extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **33**: 789-794.
 9. Li, L., Li, Q., Lv, X., Liao, L., Yang, W., Li, S., Lu, P. and Zhu, D. (2015) Aurantio-obtusin relaxes systemic arteries through endothelial PI3K/AKT/eNOS-dependent signaling pathway in rats. *J. Pharmacol. Sci.* **128**: 108-115.
 10. Kim, M., Lim, S. J., Lee, H. J. and Nho, C. W. (2015) *Cassia tora* seed extract and its active compound aurantio-obtusin inhibit allergic responses in IgE-mediated mast cells and anaphylactic models. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 9037-9046.
 11. Choi, J. S., Jung, J. H., Lee, H. J. and Kang, S. S. (1996) The NMR assignments of anthraquinones from *Cassia tora*. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 302-306.
 12. Zhu, L., Yu, S., Zeng, X., Fu, X. and Zhao, M. (2008) Preparative separation and purification of five anthraquinones from *Cassia tora* L. by high-speed counter-current chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **63**: 665-669.
 13. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. and Girardin, S. E. (2007) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin. Exp. Immunol.* **147**: 227-235.
 14. Lechner, M., Lirk, P. and Rieder, J. (2005) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol.* **15**: 277-289.
 15. Jung, H. K., Kang, B. M., Jang, J. H., Ahn, B. K., Yeo, J. H., Jung, W. S., Cho, J. H., Kuk Y. I., Hyun, K. H. and Cho, H. W. (2014) Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* Sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **22**: 98-104.
 16. Lee, K. S., Kim, G. H., Seong, B. J., Kim, S. I., Han, S. H., Lee, S. S., Yang, H. and Yoo, Y. C. (2014) Anti-inflammatory activity of solvent fractions from ginseng berry extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **22**: 449-456.
 17. Sarkar, D., Saha, P., Gamre, S., Bhattacharjee, S., Hariharan, C., Ganguly, S., Sen, R., Mandal, G., Chattopadhyay, S., Majumdar, S. and Chatterjee, M. (2008) Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF-kappaB pathway. *Int. immunopharmacol.* **8**: 1264-1271.
 18. Southan, G. J. and Szabó, C. (1996) Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 383-394.
 19. Tsai, W. H., Huang, D. Y., Yu, Y. H., Chen, C. Y. and Lin, W. W. (2011) Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol.* **13**: 717-730.

(2018. 10. 2 접수; 2019. 1. 24 심사; 2019. 3. 4 게재확정)