

Immunomodulatory Effects of β -sitosterol and Daucosterol Isolated from *Dioscorea batatas* on LPS-stimulated RAW 264.7 and TK-1 Cells

Min-Kyung Park¹, Sehee Cho¹, Tae-Kyu Ahn¹, Do-Hyun Kim¹, So-Yeon Kim³, Jin-Wook Lee^{1,5}, Jee-In Kim^{2,4}, Eul-Won Seo¹, Kun-Ho Son³ and Jae-Hwan Lim^{1,2*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Institute of Vaccine Biotechnology, Andong National University, Andong 36729, Korea

³Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

⁴Department of Biochemistry and Cell Biology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁵Marine Industry Research Institute for East Sea Rim, Ulljin 36315, Korea

Received December 24, 2019 / Revised January 9, 2020 / Accepted February 20, 2020

Although many studies on immune modulatory materials have used RAW 264.7 cells, few have used T cell-derived TK-1 cell lines. Moreover, although some studies have investigated the efficacy of plant-derived β -sitosterol, few have examined the immunomodulatory activity of its analogue, daucosterol. In this study, β -sitosterol and daucosterol were isolated from *D. batatas* and identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy. To evaluate the immune-enhancing or inhibitory effects of the isolated phytosterols, the expression levels of the inflammatory response genes COX-2, TNF- α , IL-6, and iNOS were analyzed by RT-PCR. The relative expression levels of TNF- α and iNOS in RAW 264.7 cells were increased more than threefold with β -sitosterol treatment comparing to those of untreated control. In the case of TK-1 cells, the expression level of TNF- α was decreased and the expression level of iNOS was increased in a β -sitosterol concentration-dependent manner. The expression levels of COX-2, TNF- α , and IL-6 increased by approximately 0.7-1.2 times in RAW 264.7 cells treated with daucosterol compared to those of untreated control, but iNOS expression decreased by 0.8-0.18 times. In the case of daucosterol-treated TK-1 cells, the expression levels of TNF- α , IL-6, and iNOS were markedly reduced from those of TK-1 cells treated only with lipopolysaccharide. As a conclusion, β -sitosterol treatment increased TNF- α and iNOS expression levels in RAW 264.7 cells, thus exerting an immune-boosting effect. However, in TK-1 cells, iNOS expression increased while TNF- α expression decreased, indicating an immunosuppressive activity of β -sitosterol. Daucosterol appears to exert an immunosuppressive effect in both macrophages and T cell lines by inhibiting iNOS expression in RAW 264.7 cells and greatly inhibiting the expression of TNF- α , IL-6, and iNOS in TK-1 cells.

Key words : Beta-sitosterol, daucosterol, *Dioscorea batatas*, immune-related genes, TK-1

서론

염증반응은 체내에 바이러스나 물리, 화학적인 조직 손상에 대한 다양한 면역세포들의 상호작용으로 진행되는 복합적인 과정으로 매우 중요한 면역반응 중 하나이다[20, 24]. 위장 점막의 염증으로 인해 발생하는 위염은 장기적으로 방치할 시에 위궤양, 위암으로 진행될 수 있으며, 한국은 세계에서 위염 환자 비율이 가장 높은 국가이다[12]. 이러한 위염에는 위의 산도를 낮추기 위한 제산제나 위장관 운동 항진제 및 방어인

자 증강제가 처방되고 있다[12]. 가장 흔하게 처방되는 제산제의 경우, 최근 조성 성분 중에 발암물질이 검출된 바 있으며 장기간 복용 시에 다양한 부작용들이 발생하고, 약물복용의 중단 시에는 재발률이 약 50% 이상으로 알려져 있다[1].

이로 인해 천연 약용작물에서 항염증 소재를 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 그 중에서 산약(山藥)은 마(*Dioscorea batatas*) 또는 참마(*Dioscorea japonica*)의 뿌리줄기를 건조한 것으로 위염과 위궤양에 예방 및 치료효능이 있는 것으로 보고된 바 있다[9, 21, 22]. 산약의 지표 성분인 디오스게닌(diosgenin)은 대식세포주인 RAW 264.7 세포주에서 염증 유도시에 TNF- α 는 억제하지 못하나 활성산소(ROS)의 생성과 IL-1 (interleukin-1)의 발현을 억제함으로써 항염증 기능을 하는 것으로 보고되었다[10]. 또한 산약의 영여자에 함유된 페난트렌(phenanthrene) 성분은 항암과 심혈관 질환 예방 효능이 있어 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성이 보고된 바 있다[13, 26]. 최근 산약을 포함하여 대부분의 식물 추출물에서 발견되

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5797, Fax : +82-54-820-7729

E-mail : jhlim@anu.ac.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.

는 phytosterol의 한 종류인 β -sitosterol은 항암효능 및 전립선 비대증의 개선, 염증 억제 효능이 있는 것으로 보고된 바 있으나, 염증 억제 기작에 관한 연구 결과는 자세히 알려져 있지 않다[2, 23, 27, 32]. 또한 β -sitosterol의 유사체인 daucosterol의 경우, A549 폐암 세포주의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 효능이 보고되어 폐암 치료용 소재로 제안된 바 있으며, CD4 + T 세포에서 IFN γ (interferon γ)와 IL-2의 발현 증가가 보고되었으나 그 성분의 면역 활성 조절 기능에 관한 연구결과는 거의 없다[15, 25].

염증반응의 유도 과정에서, NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)는 iNOS (inducible nitric oxide synthase), IL-6 (interleukin 6), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), COX-2 (cyclooxygenase 2) 등과 같은 염증성 인자의 발현에 관여한다[3, 8, 29, 30]. TNF- α 는 염증 유도 cytokine의 하나로 주로 활성화된 대식세포, 보조 T 세포, 자연살해세포 등 거의 모든 세포에서 생성, 분비된다[31]. 반대로 TNF- α 는 IL-10의 발현 유도를 통해 CD4+ T 세포의 증식과 기능을 억제하는 것으로도 보고된 바 있다[28].

본 연구는 산약(*D. batatas*)에서 분리하여 동정한 phytosterol인 β -sitosterol과 daucosterol을 LPS로 처리한 마우스 대식 세포주인 RAW 264.7과 T-림프구 세포주인 TK-1에 각각 처리한 후, 염증 조절 관련 인자인 TNF- α , IL-6, COX-2 및 iNOS의 발현 유도 및 억제 조절 기능을 분석하여 천연 분리 소재인, 두 phytosterol 성분에 의한 염증 조절 기작의 기초 자료를 제공하고 염증조절 인자로서의 기능성 및 활용 가능성을 판단하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 분리 및 동정

건조된 산약(*D. batatas*)은 동우당제약에서 구입하여 10 kg을 분쇄기로 분쇄한 후 60°C에서 MeOH 20 l로 3회 환류냉각 추출하고, 그 추출액을 rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland)를 사용하여 감압농축하여 MeOH 추출물 840 g (yield: 8.4%)을 얻었다. MeOH 추출물 840 g을 증류수 15 l에 현탁시키고 동량의 Hexane을 첨가하여 상층부인 Hexane층과 수층을 분획하고 감압농축하여 Hexane 분획물 66.88 g (yield: 8.0%)을 얻었다. 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂ 15 l를 첨가한 후 분획과정을 통하여 CH₂Cl₂ 분획층과 수층으로 분리한 후, CH₂Cl₂ 분획물(0.79 g, yield: 0.09%)을 silica gel (Merck 7734) column에 로딩하고 hexane:EtOAc (10:0→3:7) 용매로 전개하여 분획 D1~D6을 얻었다. 계속해서 분획물 D6를 silica gel (Merck 7734) column에 로딩하고 Hexane:EtOAc (5:5→4:6) 용매로 전개하여 compound 3을 분리하였다(Fig. 1A). 또한 Hexane 분획물을 silica gel (Merck 7734) column에 로딩하고 Hexane:EtOAc (8:2)의 용매로 전개

하여 compound 10을 분리하였다(Fig. 1A). 이후 분획물에 포함된 compound들을 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 이용하여 분석한 결과, compound 3은 daucosterol (β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside), compound 10은 β -sitosterol로 확인되었으며 이를 다음 실험에 이용하였다. 동정된 compound 3, 10은 Hypersil Gold Column (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)을 사용하여 methanol:acetonitrile 용매조건(30:70 \rightarrow 0:100)에서 flow rate 1 ml/min으로 HPLC 분석을 수행한 후 Image J (NIH, USA) 프로그램을 이용하여 순도를 확인하였다.

세포 배양

본 실험은 대식세포주 RAW 264.7과 T림프구 세포주인 TK-1을 사용하였다. RAW 264.7 세포주는 KCLB (Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하였으며, TK-1 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하여 사용하였다. RAW 264.7은 10% FBS (Gibco, USA)와 1% antibiotics-antimycotic (Gibco, USA)를 첨가한 DMEM (Welgene, Korea) 배지에서 배양하였으며 TK-1은 10% FBS (Gibco, USA)와 1% antibiotics-antimycotic (Gibco, USA)를 첨가한 RPMI 1640 (Welgene, Korea)에서 배양하였다. 배양 환경은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 계대 배양하였다. 위에서 분리, 동정한 β -sitosterol 및 daucosterol을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)를 용매로 하여 농도별로 희석한 후 본 실험에 사용하였다.

세포 생존율 분석

β -Sitosterol과 daucosterol을 세포주에 각각 처리한 후, 시간과 농도 차이에 따른 세포 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였다. 각 세포주를 96-well plate에 4.0×10^4 cell/well이 되도록 분주하여 배양한 후, β -sitosterol과 daucosterol의 농도가 10, 20, 50 μ M이 되도록 시료를 각각 처리하였다. 추가로 24시간 배양한 후에 MTT solution (5 mg/ml)을 각 well 당 10 μ l씩 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO (Sigma-Aldrich, USA) 100 μ l를 분주하고 15분간 교반한 뒤 microplate reader (Infinite[®] 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

염증반응 유도 후 두 분리성분(β -sitosterol, daucosterol)이 면역 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양된 각각의 세포주(1.0×10^5 cell/well)를 24시간 동안 배양한 후 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml)를 처리하고, 분리한 β -sitosterol과 daucosterol을 각각 10, 20, 50 μ M의 농도로 처리하고 12시간 동안 추가 배양하였다. TRIzol (Gibco, USA)을 이용하여 RNA를 추출하고 microplate reader (Infinite 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 사용하여 정량한 후

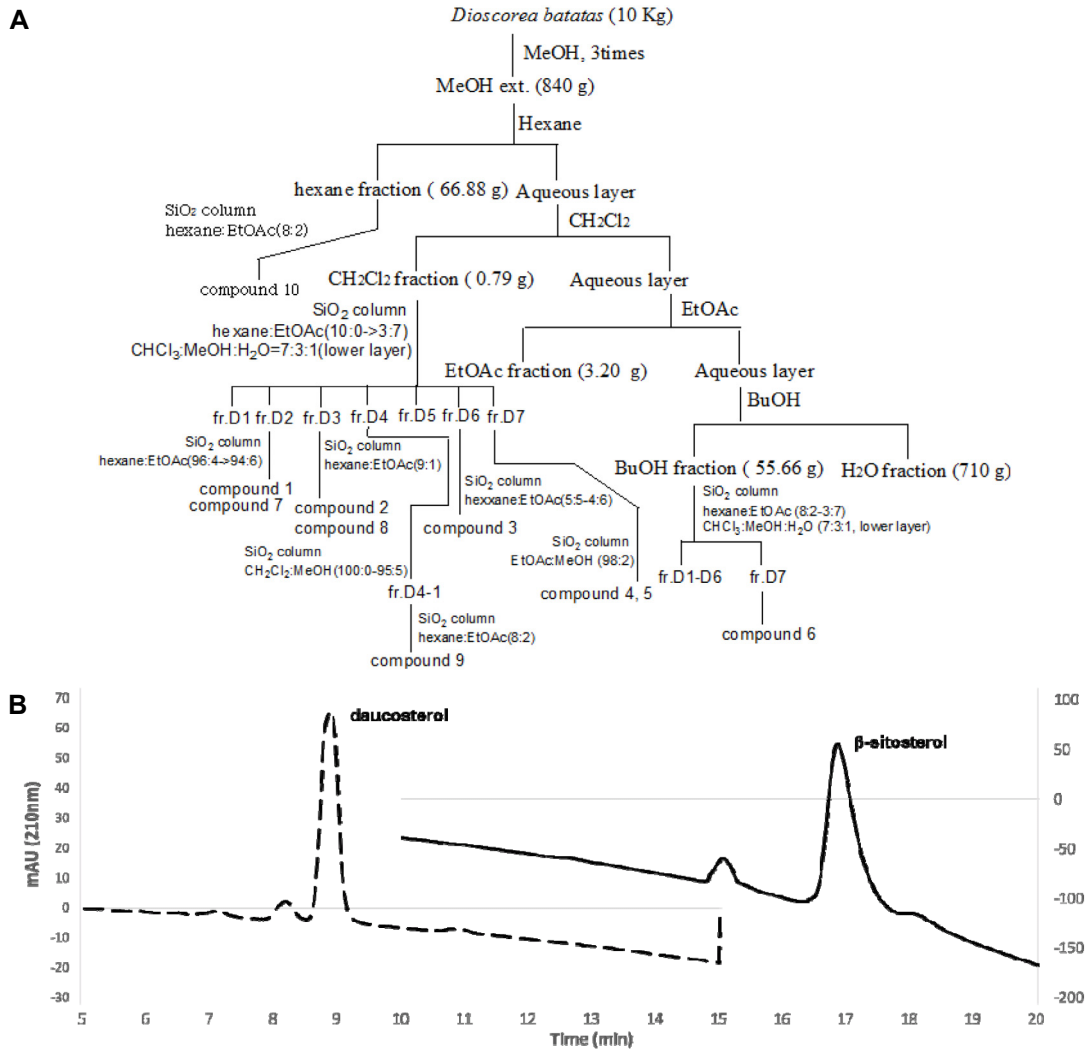


Fig. 1. Isolation and determination of extracted compounds from *D. batatas*. (A) Schematic drawing for extraction and isolation of compounds 1-10 from *D. batatas*. Subsequently, compound 3 was determined to daucosterol and compound 10 was determined to β -sitosterol. (B) HPLC chromatogram for determining identities of isolated β -sitosterol and daucosterol. HPLC was performed with a C18 reverse phase column (Hypersil Gold Column, 5 μ m 250 \times 4.6 mm) and the linear gradient solvent system from 30:70 to 0:100 of methanol:acetonitrile. Right axis, solid line: β -sitosterol, left axis, dotted line: daucosterol.

iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR 진행을 위한 oligo primer 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 면역 관련 유전자에 해당하는 모든 primer는 NCBI Primer BLAST 프로그램으로 디자인한 뒤, 바이오닉스 (Seoul, Korea)에 합성을 의뢰하였다. PCR 반응은 Ex-Taq (Takara, Japan)을 이용하였으며, 각 PCR product는 전기영동 후 Quantity One (Bio-Rad, USA) 프로그램을 이용하여 mGAPDH 유전자의 발현양과 비교한 유전자의 발현 정도를 각각 정량 분석하였다.

통계처리

본 실험에서 측정된 분석값은 평균 \pm 표준편차(S.D)로 표기하였다. 처리 간의 차이 유무를 확인하기 위한 통계학적 분석은 SPSS version 12.0 (Chicago, USA) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA (analysis of variance) 분석을 하였고, Duncan's test로 $p < 0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

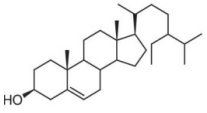
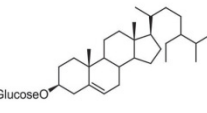
시료 분리 및 동정

산약추출물로부터 분리한 화합물은 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 이용한 성분 분석 결과 β -sitosterol과 daucosterol로 확인되

Table 1. Primer sequences of selected genes related inflammation used in RT-PCR

Gene	Oligonucleotide sequence (5' - 3')		Product size (bp)
TNF- α	F : CTCCCTCCAGAAAAGACACCA	R : TTGCTACGACGTGGGCTAC	312
COX-2	F : CAACACCTGAGCGGTTACCA	R : CTGCTCTGGTCAATGGAGGC	320
IL-6	F : GAGTTGTGCAATGGCAATTCTG	R : GGAAATTGGGGTAGGAAGGACT	309
iNOS	F : ACAGGGAGTTGAAGACTGAGAC	R : GCACAAGGGGTTTCTTCACG	309
mGAPDH	F : GGAGAGTGTTCCTCGTCCC	R : TCCACGACATACTCAGCACC	313

Table 2. ¹H- and ¹³C-NMR spectral data for β -sitosterol and daucosterol extracted from *D. batatas*

Identified compounds	Basic properties	Measured spectra	
		H-NMR (400MHz, pyridine- <i>d</i> ₅)	C-NMR (100MHz, pyridine- <i>d</i> ₅)
 β -sitosterol	<ul style="list-style-type: none"> mp : 137-140°C white amorphous powder IR Vmax cm⁻¹ 3410 (OH), 1464 (C=C) FAB-MS m/z 415 [M+H]⁺ 	δ 0.69 (3H, s, CH-18), 0.82 (3H, d, J=6.6 Hz, CH-29), 0.84 (3H, d, J=6.6 Hz, CH-26), 0.86 (3H, d, J=7.7 Hz, CH-21), 0.90 (3H, d, CH-19), 1.07 (3H, s, CH-19), 5.43 (1H, d, J=5.2 Hz, H-6)	δ 37.5 (C-1), 32.2 (C-2), 71.3 (C-3), 42.8 (C-4), 142.0 (C-5), 121.2 (C-6), 32.5 (C-7), 29.5 (C-8), 50.5 (C-9), 36.9 (C-10), 21.3 (C-11), 40.8 (C-12), 42.4 (C-13), 57.1 (C-14), 24.5 (C-15), 28.6 (C-16), 56.3 (C-17), 12.5 (C-18), 19.2 (C-19), 36.4 (C-20), 19.0 (C-21), 34.3 (C-22), 26.5 (C-23), 46.1 (C-24), 29.4 (C-25), 19.6 (C-26), 20.0 (C-27), 23.4 (C-28), 12.6 (C-29)
			δ 37.0 (C-1), 30.3 (C-2), 78.1 (C-3), 40.0 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 32.2 (C-7), 32.1 (C-8), 51.4 (C-9), 37.5 (C-10), 21.5 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 25.7 (C-15), 29.5 (C-16), 56.9 (C-17), 12.2 (C-18), 20.0 (C-19), 36.4 (C-20), 19.4 (C-21), 34.2 (C-22), 26.4 (C-23), 46.1 (C-24), 30.0 (C-25), 21.3 (C-26), 19.2 (C-27), 23.4 (C-28), 12.0 (C-29), 102.6 (C-1'), 75.4 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.9 (C-6')
 daucosterol	<ul style="list-style-type: none"> mp : 280-282°C white amorphous powder IR Vmax cm⁻¹ 3371 (OH), 1050 (glycosidic C-O) FAB-MS m/z 577 [M+H]⁺ 	δ 0.66 (3H, s, CH-18), 0.86 (3H, d, J=6.6 Hz, CH-28), 0.89 (3H, d, J=6.6 Hz, CH-29), 0.92 (3H, d, J=6.6 Hz, CH-26), 0.94 (3H, d, J=7.7 Hz, CH-21), 1.07 (3H, s, CH-19), 5.06 (1H, d, J=7.7 Hz, anomeric H), 5.35 (1H, d, J=H, H-6)	δ 37.0 (C-1), 30.3 (C-2), 78.1 (C-3), 40.0 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 32.2 (C-7), 32.1 (C-8), 51.4 (C-9), 37.5 (C-10), 21.5 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 25.7 (C-15), 29.5 (C-16), 56.9 (C-17), 12.2 (C-18), 20.0 (C-19), 36.4 (C-20), 19.4 (C-21), 34.2 (C-22), 26.4 (C-23), 46.1 (C-24), 30.0 (C-25), 21.3 (C-26), 19.2 (C-27), 23.4 (C-28), 12.0 (C-29), 102.6 (C-1'), 75.4 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.9 (C-6')
			δ 37.0 (C-1), 30.3 (C-2), 78.1 (C-3), 40.0 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 32.2 (C-7), 32.1 (C-8), 51.4 (C-9), 37.5 (C-10), 21.5 (C-11), 39.9 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 25.7 (C-15), 29.5 (C-16), 56.9 (C-17), 12.2 (C-18), 20.0 (C-19), 36.4 (C-20), 19.4 (C-21), 34.2 (C-22), 26.4 (C-23), 46.1 (C-24), 30.0 (C-25), 21.3 (C-26), 19.2 (C-27), 23.4 (C-28), 12.0 (C-29), 102.6 (C-1'), 75.4 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.9 (C-6')

F; forward primer, R; reverse primer

었으며, 각 분석 결과는 Table 2에 제시하였다. 각 성분을 이후 실험의 시료로 사용하기 위하여, 동정된 시료의 성분 및 순도를 RP-HPLC를 이용하여 재확인하였다(Fig. 1B). β -Sitosterol과 daucosterol은 95% 이상의 순도로 분리되었음을 확인하였다.

β -Sitosterol과 daucosterol을 처리한 면역세포 생존률의 비교

산약에서 분리 동정한 β -sitosterol과 daucosterol의 처리에 따른 세포의 성장 및 생존에 미치는 영향을 분석하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. β -Sitosterol을 10, 20, 50 μ M 농도로 처리한 RAW 264.7 세포는 90.4%, 93.6%, 87.82%의 세포 생존율을, TK-1 세포는 87.1%, 83.6%, 79.3%의 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 2A). Daucosterol을 10, 20, 50 μ M을 24시간 처리 시에 RAW 264.7은 98.0%, 91.3%, 84.8%의 세포 생존율을, TK-1의 경우 99.5%, 100.3%, 98.6%의 세포 생존율을 나타냈다. 종합하면 50 μ M의 β -sitosterol 처리 시에는 모든 세포에서 80% 이상의 생존율을 보였다. Daucosterol을 50 μ M로 처리한 RAW 264.7 세포에서 85% 이상의 세포 생존율을 보였으며, TK-1 세포에서는 98.6% 이상의 생존율을 확인할 수 있었다. 결과적

으로 β -sitosterol과 daucosterol의 각각 처리시에 50 μ M 농도 까지 80% 이상의 생존률을 나타내는 것을 확인하였다.

LPS 처리시간에 따른 염증 관련 cytokine의 발현량 변화

일반적으로 면역 연구에 많이 사용되고 있는 RAW 264.7 세포와 비교하여, TK-1 세포를 대상으로 LPS 처리에 의한 염증 관련 유전자의 발현 정도를 분석한 연구보고는 거의 없다. 따라서 β -sitosterol과 daucosterol의 염증 반응에 미치는 영향을 분석하기 전에, LPS 처리가 TK-1 세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. LPS를 처리하지 않은 RAW 264.7에서 각 유전자 발현량을 0으로, LPS 처리 12시간 후의 발현량을 1로 환산하고, 24시간 처리 한 후의 발현량을 상대적으로 비교하였다. LPS 처리 후 24시간 배양 시에 COX-2는 2.63 fold, TNF- α 는 3.74 fold, IL-6는 1.02 fold, iNOS는 14.95 fold 로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

앞서 언급한대로, 일반적으로 TK-1 세포의 경우는 LPS 처리에 의한 면역관련 유전자의 발현 증가는 예상하기 어려우며 그에 대한 연구 결과도 거의 밝혀져 있지 않다. 하지만, 같은 방법으로 염증 관련 유전자의 유도발현량을 비교하였을 때,

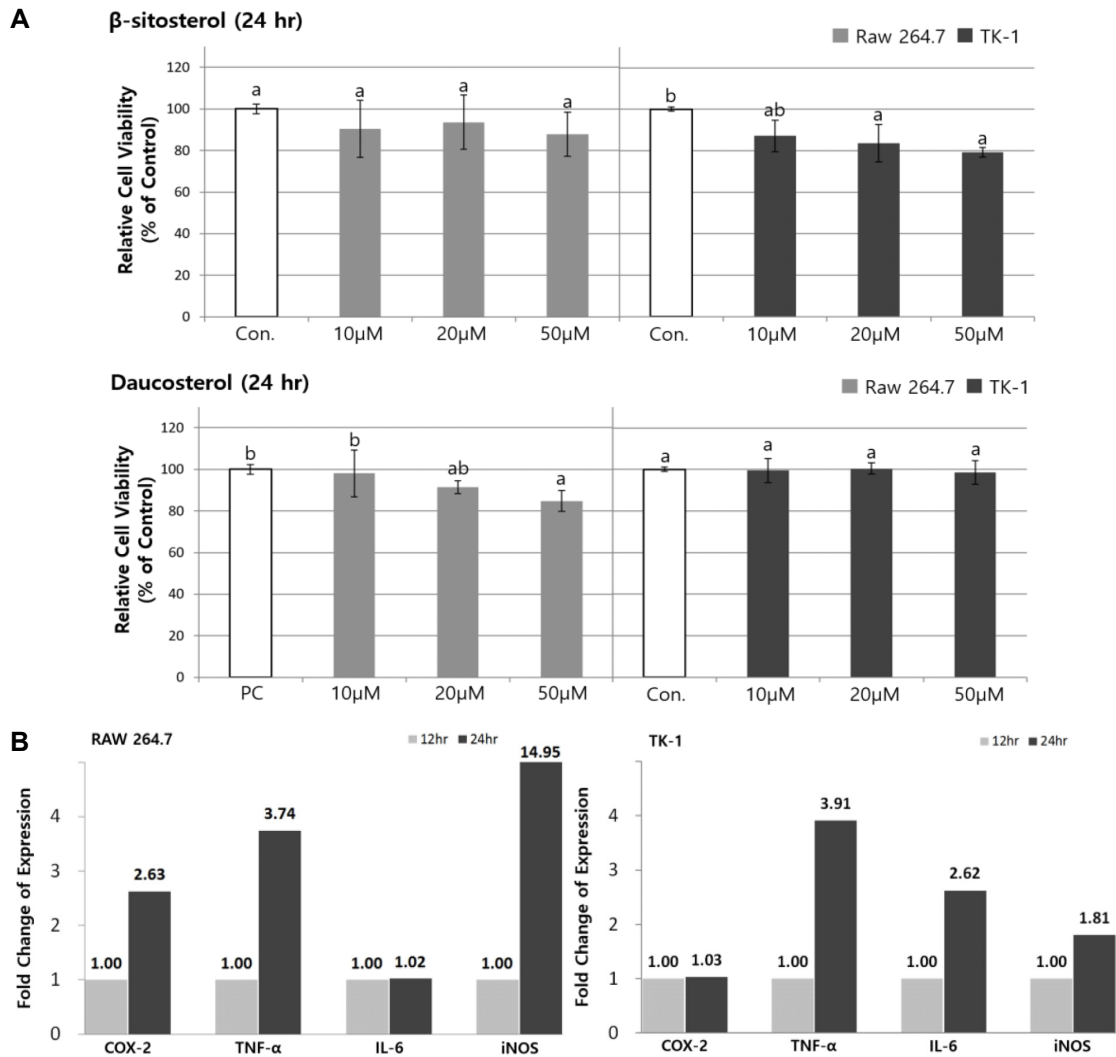


Fig. 2. (A) Cell viabilities of RAW 264.7 cells and TK-1 cells. Both cells were treated with lipopolysaccharide for 24 hr, respectively. Then, cell viability was measured by MTT assay. (B) Immune-related gene expressions in LPS-stimulated RAW 264.7 and TK-1 cell lines. COX-2, TNF-α, IL-6 and iNOS mRNA expression in LPS-stimulated both cell lines treated with LPS (1 μg/ml) for 12 or 24 hr were measured. All levels of relative gene expression for 24 hr were compared with those expression levels for 12 hr designed to 1. Data represent the means ± S.D of triplicated experiments. Sharing the same alphabet indicates no significant difference between the two groups ($p < 0.05$).

TK-1에 LPS를 24시간 동안 처리 후 COX-2는 1.03 fold, TNF-α는 3.91 fold, IL-6는 2.62 fold, iNOS는 1.81 fold 수준으로 유전자 발현양이 증가하였다. 결과적으로, TK-1에서도 LPS 처리에 의해 cytokine IL-6를 포함하여 염증 관련 인자인 TNF-α, iNOS의 발현이 크게 유도되고 있음을 확인하였다.

β-Sitosterol 및 daucosterol 처리가 RAW 264.7 내 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향

β-Sitosterol의 처리를 통하여 LPS에 의한 염증 반응의 강화 및 억제 효능을 확인하기 위하여 LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 β-sitosterol을 10, 20, 50 μM의 농도로 각각 처리한 후 12시간, 24시간 뒤 COX-2, TNF-α, IL-6, iNOS 발현

양의 변화를 각 유전자 특이적 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 LPS만 처리한 양성대조군과 비교하여 상대적으로 분석하였다. β-Sitosterol을 12시간 동안 처리하였을 때 COX-2의 경우 1.0~1.35 fold의 발현양을 나타내었으며, IL-6의 경우 0.9에서 0.98 fold의 발현양을 나타냈다. TNF-α의 경우 10, 20 μM 처리시에는 6.2 fold, 50 μM 처리시에는 7.8 fold로 발현양이 증가하였다. 또한, iNOS의 경우는 10, 20, 50 μM β-sitosterol의 처리 농도에 따라 각각 2.8, 4.8, 8.5 fold로 그 발현양이 각각 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 결과적으로, β-sitosterol 처리시에 RAW 264.7 세포에서의 염증반응은 염증 유도 인자의 발현 증가를 통하여 더욱 크게 유도되는 것으로 여겨진다.

Daucosterol을 농도별로 12시간 동안 처리한 실험군에서

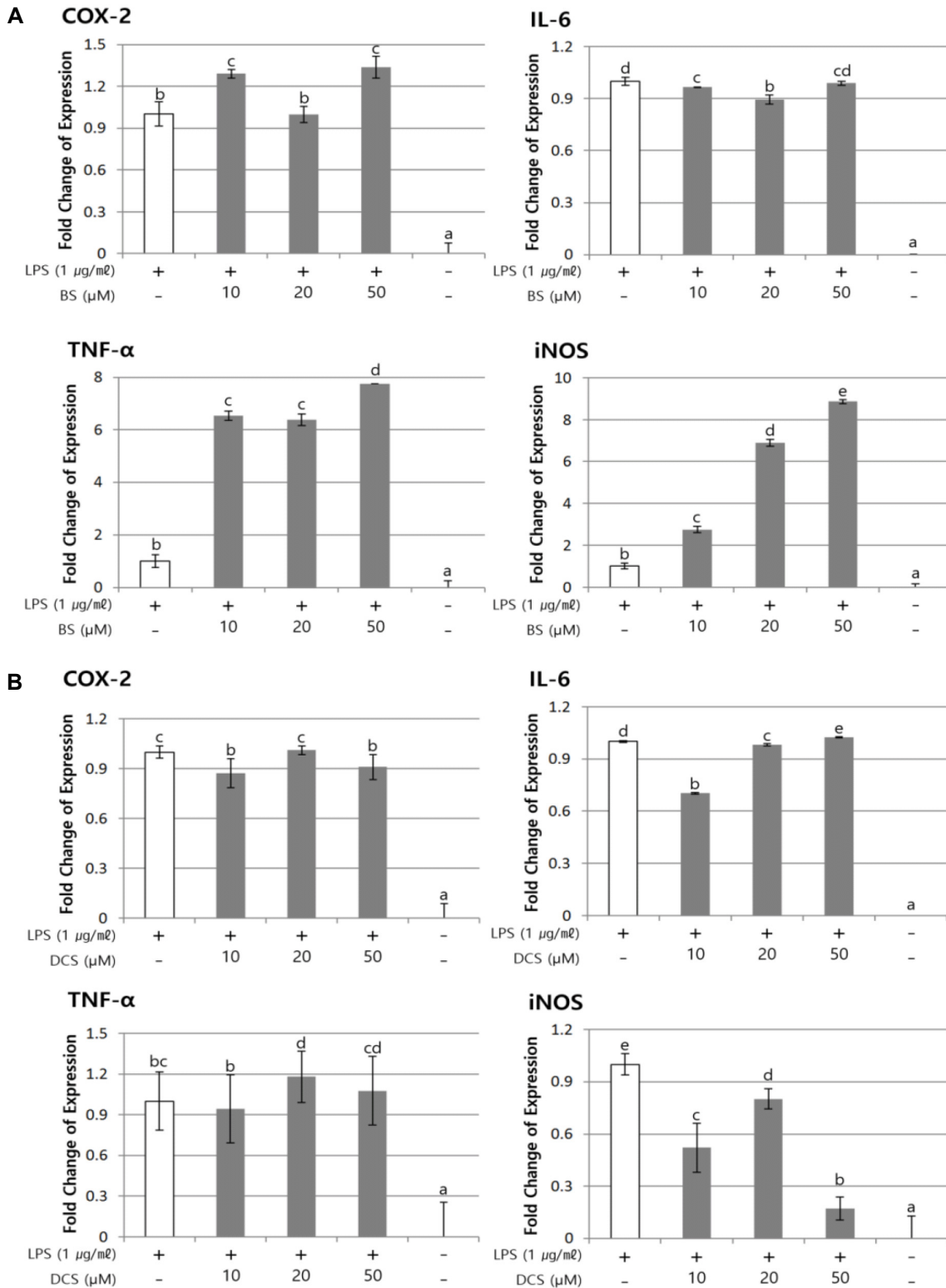


Fig. 3. (A) Effect of β -sitosterol on COX-2, TNF- α , IL-6 and iNOS mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with β -sitosterol (10, 20, 50 μ M) and LPS (1 μ g/ml) for 12 hr. (B) Effect of daucosterol on COX-2, TNF- α , IL-6 and iNOS mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with daucosterol (10, 20, 50 μ M) and LPS (1 μ g/ml) for 12 hr. And the levels of each gene expression showed relatively after comparing to the level of only LPS-treated cell designed to 1. Data represent the means \pm S.D. of triplicated experiments. Sharing the same alphabet indicates no significant difference between the two groups ($p < 0.05$). BS; β -sitosterol, DCS; Daucosterol.

COX-2의 경우 10, 50 μM 의 처리 시에 각각 0.88 fold, 0.92 fold로 나타났다. TNF- α 의 경우는 20, 50 μM 처리 시에 각각 1.18 fold, 1.08 fold로 상대적으로 약하게 증가한 발현양을 나타냈다. IL-6의 경우는 10 μM 처리 시에 발현양이 0.7 fold로 감소하였으나 20, 50 μM 처리 시에는 발현양의 변화가 거의 없는 것으로 확인하였다. 놀랍게도 iNOS의 경우 10, 20, 50 μM 의 daucosterol의 처리에 따라 각각 0.52, 0.8, 0.18 fold로 그 발현 유도양이 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 3B).

결과적으로 RAW 264.7 세포에 β -sitosterol 처리 시에는 LPS 처리에 따른 발현양보다 6-fold 이상으로 TNF- α 의 발현이 더 증가하였으며 iNOS의 경우는 처리 농도 의존적으로 그 발현 유도양이 더 증가하고 있음을 확인하였다. 이와 반대로 daucosterol의 처리시에는 TNF- α 의 발현 유도를 LPS 처리시 발현양과 유사한 수준으로 억제하고, iNOS 유전자 발현 유도를 농도 의존적으로 LPS 처리시 발현양 수준 이하로 억제하고 있음을 확인하였다.

β -sitosterol 및 daucosterol 처리가 TK-1 세포주 내 염증 관련 유전자의 발현량 변이

TK-1 세포는 대식세포를 포함하여 많은 세포에서 제공하는 다양한 면역 신호에 따라 cytokine을 분비하여 Th1, Th2 반응을 나타내는 면역 T 세포 유래 세포주이다. 본 실험에서는 TK-1세포에 β -sitosterol과 daucosterol 처리 시의 염증 관련 유전자의 발현량의 변화를 확인하고자 하였다. β -sitosterol을 12시간 동안 처리한 TK-1 세포의 경우, COX-2 유전자의 발현은 10 μM 처리 시 0.68 fold, 20, 50 μM 처리 시에 각각 1, 0.92 fold로 발현양이 감소하는 것으로 확인하였다(Fig. 4A). TNF- α 의 경우 10 μM 처리 시에 1.9 fold로 증가하였으나 20, 50 μM 처리 시에 오히려 0.84, 0.2 fold 수준으로 β -sitosterol 처리 농도 의존적으로 발현이 감소하였다. IL-6의 경우는 10 μM 에서 0.3 fold로 감소하였으며 20 μM 에서는 1.9 fold로 증가하는 것으로 나타났다. 특이하게 iNOS의 경우 10 μM 처리 시에 0.3 fold 수준으로 그 발현양이 감소하였으나 RAW 264.7 세포에서와 동일하게 고농도인 50 μM 처리 시에 1.45 fold 이상으로 발현양이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4A).

또한, daucosterol을 TK-1 세포에 12시간 동안 처리한 경우 COX-2 유전자의 발현은 양성대조군과 유사한 발현양을 보였지만, 50 μM 처리 군에서 그 발현양은 1.16 fold로 약간 증가하였다. 놀랍게도 TNF- α , IL-6, iNOS의 경우, LPS 처리시에 증가하였던 발현양과 비교하여 daucosterol을 처리했을 때, 그 발현양이 거의 검출되지 않을 만큼 급격하게 감소한 것으로 확인되었다(Fig. 4B).

결과적으로 TK-1 세포에 고농도 β -sitosterol 처리 시 TNF- α 의 발현 증가를 0.2 fold 수준으로 현저하게 억제하고, iNOS의 경우 저농도 처리시에는 감소하고 고농도 처리시에는 농도 의존적으로 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 이와 반대로

daucoosterol의 처리시에는 TNF- α , IL-6, iNOS 등의 발현양이 LPS만 처리된 대조군에 비해 크게 감소하여, 염증 유도가 억제되는 것으로 추정된다.

고 찰

본 연구는 면역 연구에서 일반적으로 사용하는 대식세포주인 RAW 264.7과 연구가 부족한 T 세포주인 TK-1을 이용하여 각 세포주 내 면역관련 유전자의 발현 차이를 분석하고, 그 결과를 바탕으로 산약 추출물의 면역보조제로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 산약의 주요 기능성 성분인 dioscin, diosgenin을 배제하고 추가적인 성분 추출 과정을 통해 β -sitosterol과 daucosterol을 분리하였으며, HPLC와 NMR 분석을 통해 동정하였다. 분리된 각 성분의 면역관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하기에 앞서, LPS 처리로 염증반응을 유도한 결과, RAW 264.7 세포와 TK-1 세포 모두에서 TNF- α 와 IL-6, 그리고 iNOS의 발현양이 24시간까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이는 기존 논문들에서 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 TNF- α 와 IL-6의 경우 6시간에서 가장 높은 발현양을 나타내고 이후 감소하는 것으로 보고되고 있고, COX-2와 iNOS의 경우 12시간에 높은 발현양을 나타내고 이후 24시간까지 발현양이 지속되거나 증가된다고 보고된 점들과 비교하였을 때는 일부 차이를 보여, 실험 조건에 따라 발현양의 차이가 있을 수 있음을 나타내고 있다[4, 7, 16, 19].

본 실험에서는 LPS로 처리한 대식 세포주 RAW 264.7과 T 세포 유래 TK-1 세포에 산약에서 분리한 β -sitosterol과 daucosterol을 농도별로 12시간 동안 처리한 후 면역반응에 관련된 유전자의 mRNA 발현양을 분석하였다. RAW 264.7의 경우 12시간 동안 50 μM 의 농도로 β -sitosterol 처리시 TNF- α 와 iNOS는 3 fold 이상의 발현 증가를 보였다. 하지만 COX-2와 IL-6의 발현양은 거의 증가하지 않았다(Fig. 2A). 최근에 Kurano, M. et al. 은 RAW 264.7 세포에 저농도(8 μM , 16 μM)의 β -sitosterol 처리 시에는 IL-6의 분비량은 약간 증가하고, 160 μM 처리시에는 오히려 감소하고 있음을 보였으며, TNF- α 는 저농도 처리시에 거의 변화가 없으며 고농도(160 μM) 처리 시에 약 2 fold로 증가하고 있음을 보고되어 본 연구결과에서 LPS 처리시의 발현양과 비교하여 β -sitosterol 처리시의 IL-6의 발현증가양과 유사하였으며 TNF- α 의 발현증가양은 일치하는 것을 확인하였다[14]. 또한 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에 *Triticum aestivum*의 새싹에서 추출한 β -sitosterol을 처리하였을 때 TNF- α 의 발현 유도를 억제하지 못한다는 결과도 보고된 바 있다[18]. 이와 비교하여 본 연구에서는 T 세포 유래 TK-1에 β -sitosterol을 저농도로 처리했을 때 TNF- α 와 IL-6는 2 fold 정도로 발현양이 증가하고 고농도 처리시에는 LPS만 처리한 대조군에 비교하여 오히려 감소하였다. 이에 반하여 iNOS의 발현양은 저농도 처리시에 감소하였으나 고농도

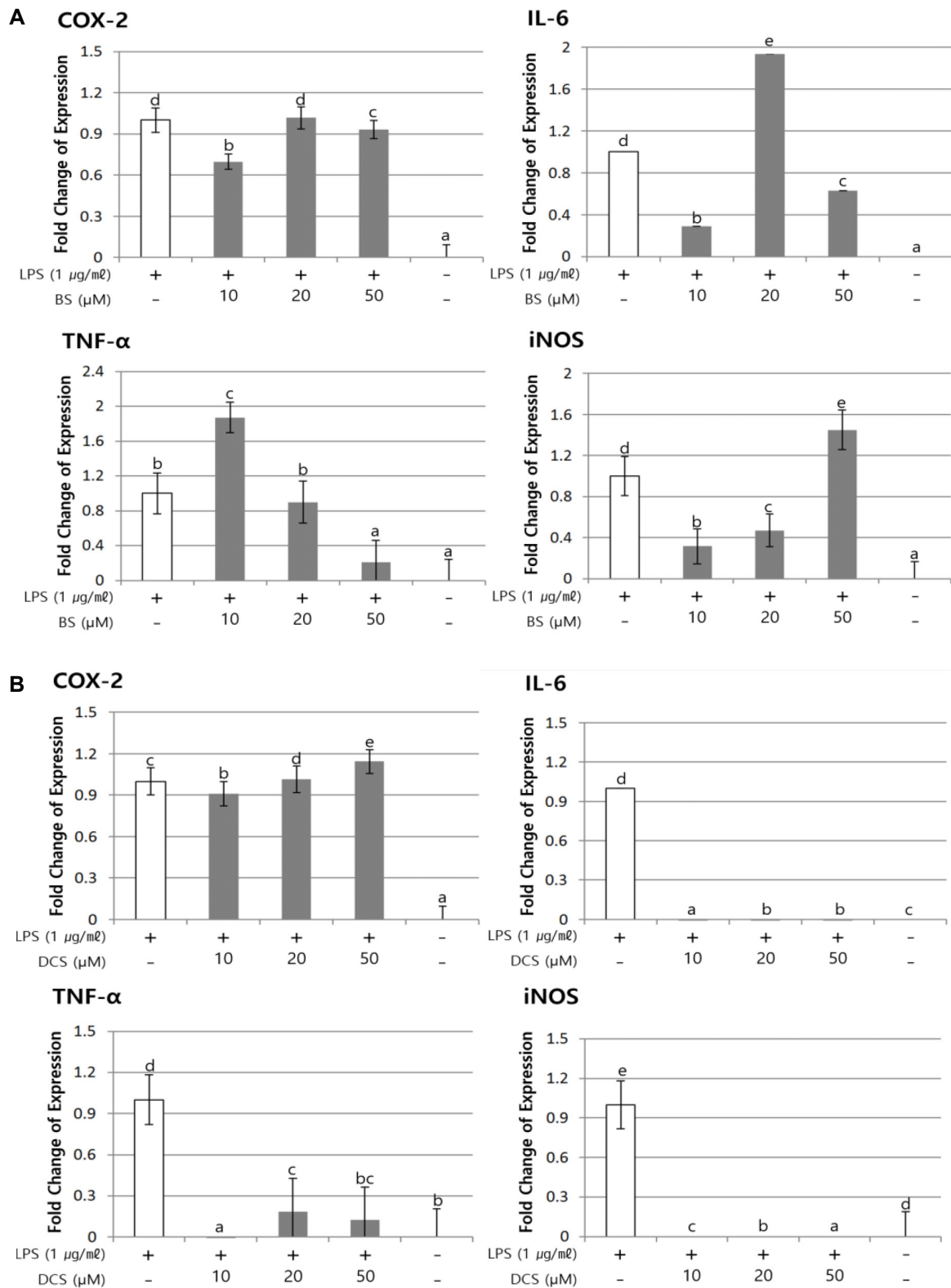


Fig. 4. COX-2, TNF- α , IL-6 and iNOS mRNA expression in TK-1 cells. (A) Cells were treated with β -sitosterol (10, 20, 50 μ M) and LPS (1 μ g/ml) for 12 hr. (B) Cells were treated with daucosterol (10, 20, 50 μ M) and LPS (1 μ g/ml) for 12 hr. And the levels of each gene expression showed relatively after comparing to level of LPS-treated TK-1 cell designed to 1. Data represent the means \pm S.D of triplicated experiments. Sharing the same alphabet indicates no significant difference between the two groups ($p < 0.05$). BS; β -sitosterol, DCS; Daucosterol.

처리시에 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 참고로 β -sitosterol을 human aortic endothelial 세포에 처리했을 때 TNF- α 의 발현과 상관없이 염증억제 효능이 있다는 결과도 보고된 바 있다[17]. 따라서 TNF- α 의 발현양과 염증반응간의 상관관계가 세포주에 따라 달라질 수 있음을 알 수 있다.

Daucosterol을 RAW 264.7 세포에 10~50 μ M로 각각 처리한 경우 COX-2, TNF- α , IL-6의 발현량은 0.7~1.2 fold 내에서 변화하는 것을 나타냈으며, 특이하게 iNOS의 경우는 0.8~0.18 fold로 발현양이 크게 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). TK-1 세포에 daucosterol을 처리한 경우에는, 놀랍게도 TNF- α , IL-6, iNOS의 발현량이 RT-PCR을 활용한 분석에서도 검출되지 않을 정도로 급격하게 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4B). Daucosterol의 면역 조절 효능 등에 관한 기존 연구결과는 매우 부족하지만, *Trachelospermum jasminoides*에서 분리한 daucosterol을 RAW 264.7 세포에 처리하였을 경우 TNF- α 의 발현 유도량이 23.3%, IL-6는 64.1%로 억제되는 것으로 보고되고 있어 본 실험의 결과와 일치하고 있음을 알 수 있다[6].

본 연구는 산약에 포함된 많은 phytosterol 중 어떤 인자가 면역 억제 조절 등에 효과적으로 작용하는지 알아내기 위하여 분리 동정한 phytosterol 중 β -sitosterol, daucosterol을 선택적으로 이용하여 연구를 수행하였다. 많은 종류의 cytokine은 면역세포의 신호전달 과정에서 면역 반응 유도 및 억제에 영향을 주는 물질로 알려져 있지만, 그 기작에 대해서는 자세하게 알려져 있지 않다. 또한 많은 식물 추출물을 이용한 면역 활성 및 항염증에 관한 실험은 주로 RAW 264.7 세포를 대상으로 진행된 반면 TK-1 세포에서의 연구는 매우 부족하다. 결과적으로 본 연구에서 β -sitosterol은 RAW 264.7 세포에서 TNF- α 와 iNOS의 발현을 유도하여 면역 상승 효과에 관여하고 TK-1 세포에서는 농도의존적으로 iNOS 발현양의 상승과 TNF- α 발현양의 감소를 유도하여 면역 억제 활성이 나타나는 것임을 제시하고 있다. 이와 더불어서 daucosterol은 RAW 264.7 세포의 iNOS 발현양을 억제하고, TK-1 세포에서는 TNF- α , IL-6, iNOS의 발현을 크게 억제함으로써 대식세포주와 T 림프구 세포주에서 모두 면역 억제 효능을 가지고 있음을 제시하였다.

최종적으로 면역증강, 면역 억제 및 염증 감소에 β -sitosterol, daucosterol이 미치는 영향에 대한 본 연구의 결과가 면역 의약품 소재 및 기능성 식품 소재로 활용될 수 있는 기초적인 정보를 제공할 것으로 사료된다[5, 11].

감사의 글

이 논문은 2016년도 안동대학교 기본연구지원사업에 의해서 수행됨.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Badillo, R. and Francis, D. 2014. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **5**, 105-112.
2. Bouic, P. J. and Lamprecht, J. H. 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. *Altern. Med. Rev.* **4**, 170-177.
3. Chae, S. W. 2005. Function and activation of NF- κ B in immune system. *Kor. J. Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* **48**, 284-288.
4. Cho, S. Y., Park, S. J., Kwon, M. J., Jeong, T. S., Bok, S. H., Choi, W. Y., Jeong, W. I., Ryu, S. Y., Do, S. H., Lee, C. S., Song, J. C. and Jeong, K. S. 2003. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol. Cell. Biochem.* **243**, 153-160.
5. Choi, G. Y. and Kim, B. W. 2010. Experimental study on the antioxidant and antimicrobial properties of *Dioscoreae Rhizoma*. *J. Int. Kor. Med.* **31**, 290-297.
6. Choi, J. N., Choi, Y. H., Lee, J. M., Noh, I. C., Park, J. W., Choi, W. S. and Choi, J. H. 2012. Anti-inflammatory effects of β -sitosterol- β -D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages. *Nat. Prod. Res.* **26**, 2340-2343.
7. Hinz, B., Brune, K. and Pahl, A. 2000. Prostaglandin E2 up-regulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 744-748.
8. Hu, W., Yang, X., Zhe, C., Zhang, Q., Sun, L. and Cao, K. 2011. Puerarin inhibits iNOS, COX-2 and CRP expression via suppression of NF- κ B activation in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. *Pharmacol. Rep.* **63**, 781-789.
9. Jeong, Y. Y. and Lee, Y. S. 2009. Protective effect of *Rhizoma Dioscoreae* on the gastric mucosal lesions induced by alcohol in rats. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **23**, 639-644.
10. Jung, D. H., Park, H. J., Byun, H. E., Park, Y. M., Kim, T. W., Kim, B. O., Um, S. H. and Pyo, S. 2010. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- κ B and AP-1 activation. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 1047-1054.
11. Kang, Y. J., Han, A. R., Min, H. Y., Hong, J. Y., Seo, E. K. and Lee, S. K. 2009. Inhibitory effects of morachalcone A on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Cancer Prev. Res.* **14**, 118-123.
12. Kim, Y. B. 2001. Current clinical practice: chronic gastritis. *Kor. J. Med.* **61**, 221-223.
13. Kum, E. J., Park, S. J., Lee, B. H., Kim, J. S., Son, K. H. and Sohn, H. Y. 2006. Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne. *J.*

- Life Sci.* **16**, 647-652.
14. Kurano, M., Iso-O, N., Hara, M., Noiri, E., Koike, K., Kadowaki, T. and Tsukamoto, K. 2011. Plant sterols increased IL-6 and TNF- α secretion from macrophages, but to a lesser extent than cholesterol. *J. Atheroscler. Thromb.* **18**, 373-383.
 15. Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S and Han, Y. 2007. Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine* **25**, 3834-3840.
 16. Lee, T. Y., Lee, K. C., Chen, S. Y. and Chang, H. H. 2009. 6-gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC- α and NF- κ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 134-139.
 17. Loizou, S., Lekakis, I., Chrousos, G. P. and Moutsatsou, P. 2010. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 551-558.
 18. Luyen, B. T. T., Tai, B. H., Thao, N. P., Cha, J. Y., Lee, Y. M. and Kim, Y. H. 2014. A new phenolic component from *Triticum aestivum* sprouts and its effects on LPS-stimulated production of nitric oxide and TNF- α in RAW 264.7 cells. *Phytother. Res.* **28**, 1064-1070.
 19. Ndengele, M. M., Bellone, C. J., Lechner, A. J. and Matuschak, G. M. 2000. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1 β and TNF- α gene transcription in RAW 264.7 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **278**, L1289-1296.
 20. Okoli, C. O. and Akah, P. A. 2004. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv(Araceae). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **79**, 473-481.
 21. Park, Y. M., Lim, J. H., Jeong, H. J. and Seo, E. W. 2014. Protective effects of crude mucin and saponin from *Dioscorea Rhizoma* on gastric ulcer Induced by alcohol in rats. *J. Life Sci.* **24**, 1200-1208.
 22. Park, Y. M., Lim, J. H. and Seo, E. W. 2015. Effect of *Dioscorea Rhizoma* on gastritis by acute gastric ulcer in rats. *Kor. J. Plant Res.* **28**, 1-8.
 23. Prieto, J. M., Recio, M. C. and Giner, R. M. 2006. Anti-inflammatory activity of β -sitosterol in a model of oxazolone induced contact-delayed-type hypersensitivity. *Boletin Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.* **5**, 57-62.
 24. Rankin, J. A. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Adv. Crit. Care* **15**, 3-17.
 25. Rajavel, T., Mohankumar, R., Archunan, G., Ruckmani, K. and Devi, K. P. 2017. Beta sitosterol and daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. *Sci. Rep.* **7**, 3418.
 26. Réthy, B., Kovács, A., Zupkó, I., Forgo, P., Vasas, A., Falkay, G. and Hohmann, J. 2006. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. *Planta. Med.* **72**, 767-770.
 27. Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R. and Abdollahi, M. 2014. The story of beta-sitosterol; a review. *Eur. J. Med. Plants* **4**, 590-609.
 28. Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., Elfar, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Grevenynghe, J. V., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. K., Haddad, E. K. and Sekaly, R. P. 2010. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat. Med.* **16**, 452-459.
 29. Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. 2004. I κ B kinases: Key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 72-79.
 30. Yan, H., Kermouni, A., Abdel-Hafez, M. and Lau, D. C. W. 2003. Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Lipid Res.* **44**, 424-429.
 31. Walsh, L. J., Trinchieri, G., Waldorf, H. A., Whitaker, D. and Murphy, G. F. 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4220-4224.
 32. Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R. and Jones, P. J. H. 2009. Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.* **63**, 813-820.

초록 : 산약에서 분리한 β -sitosterol과 daucosterol의 RAW 264.7 세포와 TK-1 세포에서의 면역 활성 조절 효능

박민경¹ · 조세희¹ · 안태규¹ · 김도현¹ · 김소연³ · 이진욱^{1,5} · 김지인^{2,4} · 서울원¹ · 손건호³ · 임재환^{1,2*}

(¹안동대학교 생명공학부, ²안동대학교 백신산업연구소, ³안동대학교 식품영양학과, ⁴경북대학교 의과대학 생화학교실, ⁵환동해산업연구원)

많은 면역 소재 연구에서 RAW 264.7 세포를 이용한 결과는 많이 보고되어 있으나 T 세포 유래 TK-1 세포를 활용한 연구결과는 거의 보고되어 있지 않다. 또한 식물 유래 성분인 β -sitosterol의 효능 연구에 비하여 그 유사체인 daucosterol의 면역 활성 조절 기능에 관한 연구도 매우 부족하다. 본 연구에서는 산약, *D. batatas*, 에서 β -sitosterol과 daucosterol을 추출하여 분리하고 NMR 방법으로 동정하였다. 이후 분리된 phyosterols의 면역 증강 또는 억제 효능을 규명하기 위해 lipopolysaccharide로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포와 TK-1 세포에 β -sitosterol과 daucosterol을 각각 농도별로 12시간 동안 처리한 후에 염증관련 유전자인 COX-2, TNF- α , IL-6, iNOS의 상대적인 발현량을 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 대식세포주인 RAW 264.7에 β -sitosterol을 처리하였을 때, LPS만을 처리한 대조군의 발현 증가량과 비교하여 TNF- α 와 iNOS의 상대적인 발현량이 3 fold 이상 증가하였다. TK-1 세포의 경우에는 β -sitosterol의 처리 농도의존적으로 TNF- α 의 발현량은 감소하고 iNOS의 발현량은 증가하였다. Daucosterol을 RAW 264.7 세포에 처리한 경우 COX-2, TNF- α , IL-6의 발현량이 0.7~1.2 fold 정도로 변화하였으며 iNOS의 경우는 특이하게 0.8~0.18 fold로 발현량이 농도의존적으로 감소하였다. TK-1 세포에 daucosterol을 처리한 경우에는, 놀랍게도 LPS만 처리된 경우와 비교하여 상대적으로 TNF- α , IL-6, iNOS의 발현량이 급격하게 감소하는 것을 확인하였다. 결과적으로, β -sitosterol의 처리는 RAW 264.7 세포에서 TNF- α , iNOS의 발현 증가를 유도하여 면역 상승 효과에 관여하였다. TK-1 세포에서는, iNOS 발현 수준이 증가하였고, 반면에 TNF- α 발현수준은 감소하여, β -sitosterol의 면역 억제 활성을 보여주었다. Daucosterol은 RAW 264.7 세포의 iNOS 발현량을 억제하고 TK-1 세포에서 TNF- α , IL-6, iNOS의 발현을 크게 억제함으로써, 대식세포와 T 세포주에서 모두 면역 억제 효능을 보이는 것으로 판단된다.