

석사학위논문

세이지 (*Salvia officinalis*) 추출물의  
항염증 효과



제주대학교 대학원

생명과학과

현 은 아

2003년 12월

세이지 (*Salvia officinalis*) 추출물의  
항염증 효과




지도교수 김 세 재

현 은 아

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2003년 12월

제주대학교 중앙도서관  
현은아의 이학 석사학위 논문을 인준함

|       |       |   |
|-------|-------|---|
| 심사위원장 | 고 석 찬 |  |
| 위 원   | 유 은 숙 |  |
| 위 원   | 김 세 재 |  |

제주대학교 대학원

2003년 12월

Anti-inflammatory Effect of *Salvia officinalis* L. Extract

Eun-A Hyun

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF LIFE SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a multi-functional mediator, which plays an important role in regulating various biological functions *in vivo*. NO production by inducible nitric oxide synthase (iNOS) in macrophages is essential for the defense mechanisms against microorganisms and tumor cells. However, over-expression of iNOS by various stimuli, resulting in over-production of NO, contributes to the pathogenesis of septic shock and some inflammatory and auto-immune disease.

Primary pro-inflammatory cytokines are a trio : tumor necrosis- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukine -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukine-6 (IL-6). These cytokines initiate and regulate the acute-phase inflammatory response during infection, trauma, or stress and appear to play an important role in the immune process.

Methanol extracts from 21 foreign herbs, which are cultivated in Jeju-Do, were screened for their effects on NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . MeOH extracts of chicory, pepper mint, ground ivy, rosemary, german chamomile, blue gum tree, sagy, and feverfew showed potent inhibition of NO production. Hexane and ethylacetate (EtOAc) fraction of sage (*Salvia officinalis* L.) inhibited the protein and mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in LPS stimulated RAW 264.7 cells at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Also, incubation of RAW 264.7 cells with the fraction of hexane or EtOAc (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inhibited the LPS induced nitrite accumulation and the LPS/INF- $\gamma$  induced iNOS protein. And this inhibition of iNOS protein is correlated with the inhibition of iNOS mRNA expression. Thus, the suppressant effects of the solvent fraction of sage

on LPS-stimulated NO production seemed to be mediated through inhibition of iNOS gene transcription. Above results suggest that extract of sage may have anti-inflammatory activity through the inhibition of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), iNOS and NO.

**Key word:** inflammation, *Salvia officinalis* L., tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, nitric oxide, inducible nitric oxide



# 목 차

|  |     |
|--|-----|
| A B S T R A C T .....  | i   |
| 목 차 .....  | iii |
| LIST OF TABLES .....   | v   |
| LIST OF FIGURES .....  | vi  |
| <br>   |     |
| I. 서 론 .....   | 1   |
| <br>   |     |
| II. 재료 및 방법  |     |
| 1. 허브 .....  | 4   |
| 2. Sage ( <i>Salvia officinalis</i> )의 추출 .....                              | 4   |
| 3. 세포 배양 .....   | 4   |
| 4. <i>In vitro</i> cytokine 생성 및 정량 .....                                    | 4   |
| 5. mRNA Expression .....   | 7   |
| 5-1. RNA 분리  |     |
| 5-2. RT-PCR  |     |
| 6. Immunoblotting .....  | 9   |
| 7. Nitric oxide 측정 .....   | 9   |
| <br>   |     |
| III. 결 과   |     |
| 1. 21종 허브의 염증성 생체지표 억제 효과 탐색 .....   | 10  |
| 2. Sage 용매분획 추출물의 TNF- $\alpha$ 및 IL-6 억제효과 .....                            | 10  |
| 3. Sage 용매분획 추출물의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향 ..... | 10  |
| 4. Sage 용매분획 추출물의 iNOS의 mRNA 발현 및 protein level에 미치는 영향 .....                | 14  |
| 5. Sage 용매분획 추출물의 NO 생성 억제 활성 측정 .....                                       | 14  |

|          |       |    |
|----------|-------|----|
| IV. 고찰   | ..... | 20 |
| V. 인용 문헌 | ..... | 22 |
| VI. 요약   | ..... | 27 |



## LIST OF TABLES

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1.</b> Herbs used for assay of anti-inflammatory effect .....  | 5  |
| <b>Table 2.</b> Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes<br>in RT-PCR analysis .....                                     | 8  |
| <b>Table 3.</b> The effect of herb extract (MeOH extract) on the production of<br>TNF- $\alpha$ , IL-6 and NO in RAW264.7 cells .....             | 11 |
| <b>Table 4.</b> The effect of solvent fractions of <i>S. officinalis</i> on LPS induced TNF- $\alpha$<br>and IL-6 release in RAW264.7 cells ..... | 12 |





## LIST OF FIGURES

- Figure 1.** Systematic purification using solvent partitioning from *Salvia officinalis* L. .... 6
- Figure 2.** Inhibitory effects of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) in LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimulated RAW264.7 cells. .... 13
- Figure 3.** Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of iNOS in LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-stimulated RAW264.7 cells. .... 15
- Figure 4.** Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the protein level of iNOS activated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus IFN- $\gamma$  (50 U/ml) in murine Macrophage cell line RAW264.7. .... 16
- Figure 5.** The effect of solvent fractions of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells. .... 17
- Figure 6.** The effect of hexane fraction of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells. .... 18
- Figure 7.** The effect of EtOAc fractions of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells. .... 19

## 서 론

최근 우리나라에서도 국민소득의 증가와 함께 의학 및 생명과학의 발달로 인하여 평균 수명이 증가하는 추세이고, 국민들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 여러 측면에서 건강 유지와 치료를 위한 생리활성 물질에 관한 연구가 광범위하게 연구되고 있다. 그중 항암, 항염증, 면역기능조절과 항산화 물질의 분리에 대한 연구가 많이 이루어지고 있고, 그 가치가 높아 의약품 및 기능성 식품의 개발이 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

허브(Herb)는 라틴어의 herba에서 비롯된 ‘푸른 풀’이라는 뜻이지만 현대에 와서는 줄기, 잎, 꽃, 뿌리 등의 부위가 인간에게 유용하게 이용되는 식물의 총칭의 의미로 쓰이고 있다. 허브는 대략 2,500여종으로 꿀풀과, 국화과, 미나리과, 백합과 등이 있으며, 고대 이집트시대 이래 지금까지 서구에서 약초 혹은 향초로서 사용되어져 왔다 (Ryoo *et al.*, 1998 ; Chung and Kim., 2000). 그리고 우리 나라와 중국, 일본에서 향신채소로 사용되는 고추, 양파, 생강, 파 등과 쑥, 냉이, 인삼, 삼백초 등 한방 처방전에 들어가 있는 모든 식물들도 넓게는 허브의 범주에 넣을 수 있다 (Lee *et al.*, 2000).

오래 전부터 허브는 소화촉진, 방부, 항균, 강장, 염증치료, 식욕부진, 살균, 노화방지, 감기치료, 혈액순환 촉진 등의 작용을 이용하여 요리에 첨가하기도 하고 민간요법, 아로마테라피로 이용되어 왔다 (Ryoo *et al.*, 1998).

한편, 국내의 산야에서 자생하는 냉이, 검정콩, 결명자, 쑥, 청미래덩굴 (Lee *et al.*, 2001) 등과 rosemary와 sage, thyme (Dorman *et al.*, 2003), clove (Shobana and Naidu, 2000), chervil (Fejes *et al.*, 2000) 등이 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 일본에서는 감초추출물, rosemary 추출물 등이 천연 항산화제로 개발 시판되고 있다 (Lee *et al.*, 2000). 그리고, 산국의 sesquiterpene lactones (Nam *et al.*, 1997)와 마늘의 diallyl disulfide (Park *et al.*, 2001)가 각각 복수암과 유방암 세포 억제효과가 나타내어 항암효과가 있다고 보고 되어있다. 또한, 녹차 잎에서 얻어지는 polyphenolic fraction과 polyphenol이 동물실험에서 각각 항염증과 항산화 효과가 있다고 보고되어 있다 (Singh *et al.*, 2002). 그리고, 녹차에 함유되어 있는 epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 성분은 동물실험과 사람의 골관절염 연골조직에서 유래된 연골세포에서 염증성 매개물질 억제효과를 나타낸다고 보고 되어있다 (Lin

and Lin, 1997 ; Ahmed *et al.*, 2002). 또한, *Pinus maritima* (Cho *et al.*, 2000)와 *Phyllanthus amarus* (Kiemer *et al.*, 2003), 개오동의 catalposide (An *et al.*, 2002)와 도꼬마리의 8-*epi*-xanthatin (Lee *et al.*, 1998), 구절초의 linarin (Han *et al.*, 2002)은 murin macrophage cell line 인 RAW 264.7에서, feverfew의 parthenolide은 HeLa cells에서 탁월한 항염증 효과를 나타내었다. (Kwok *et al.*, 2001). 또한, 동물을 이용한 염증 모델에서 sagy의 ursolic acid (Baricevic *et al.*, 2001)와 손바닥선인장 추출물(Park *et al.*, 1998)은 항염증 효과가 보고되었다.

최근, 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 염증질환과 류마티스관절염, 천식과 같은 만성 염증질환이 증가하는 추세이다. 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다 (Kim, 1988). 염증을 일으키는 요인 중에서 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등과 같은 질환의 요인이 되기도 한다. (Willoughby, 1971).

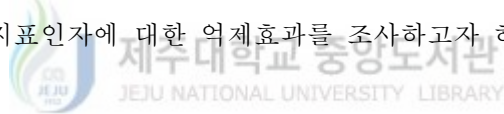
Gram-negative bacteria의 세포외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포외막으로부터 방출되어 gram-negative sepsis 와 septic shock를 일으킨다. LPS는 RAW264.7와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 pro-inflammatory cytokine 인 tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )을 증가시키고, 특히 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도한다.

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간동안 다량의 nitric oxide (NO)를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다 (An *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 1998).

근래에는 기존에 사용되던 소염진통제와 비스테로이드제제와 같은 화학합성 약물들의 부작용에 의해 천연물로부터 항염증 효과가 있는 물질을 분리 이용하려는 시도

가 활발히 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 제주도에서 재배되는 허브 21종에 대하여 염증유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 생체 지표인자 억제 활성을 탐색하였다.

그 중 세이지 (sage ; *Salvia officinalis* L.)는 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 줄기는 30~90 cm로 자라며 포기 전체에 강한 향기가 있다. 그리고, 예로부터 만병통치약으로 널리 알려진 역사가 오래된 약용식물이며, 지중해연안과 유럽남부에 분포하며 잎을 민간에서 약용 혹은 부향제로 사용된다. 세이지 잎은 강장작용 외에 신경계통이나 소화기계통에 뛰어난 약효가 있으며 방부, 항균, 항염 등 살균 소독작용이 있어 각종 염증에 소염제로 사용되었고, 또한 해열, 구풍, 정혈작용도 알려져 있다. 또한, 세이지를 육류요리에 넣으면 지방을 분해시키는 역할을 하고 소화를 촉진시킨다고 알려져 있다 (최, 1998). 세이지 잎의 생리활성에 의한 연구는 대부분이 항산화 활성 연구 (Dorman *et al.*, 2003 ; Cuppett *et al.*, 1998 ; Bandoniene *et al.*, 2002 ; Santos-Gomes *et al.*, 2002 ; Hohmann *et al.*, 2003)에 치중되어 왔고 항염증과 관련된 연구는 미약한 수준이다. 따라서, 본 연구에서는 RAW 264.7 세포주에서 세이지를 중심으로 염증성 생체지표인자에 대한 억제효과를 조사하고자 하였다.



## 재료 및 방법

### 1. 허브

Table 1과 같이 21여종의 허브가 시료로 사용되었다. 21종의 서양허브는 제주도에 도입되어 재배되는 종류로, 붉은뿔허브팜 (제주도 한경면)에서 구입하였으며, 4월에 채취하였다.

### 2. Sage (*Salvia officinalis*)의 추출

채집한 Herb를 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 미세말 시료 (2 g)를 80% methanol (MeOH)로 2회 교반 추출 후 여과하여 감압농축하여 용매를 증발시켰다. 추출물을 phosphate-buffered saline (PBS)와 ethanol을 1:1 비율로 혼합된 용액이나 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 실험시료로 사용하였다.

본 실험에 이용한 세이지는 미세말 시료 (65 g)를 80% methanol (MeOH) 로 추출하여 얻은 추출물(12.18 g)을 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획 (1.45 g), ethylacetate (EtOAc) 분획 (1.73 g), butanol (n-BuOH) 분획 (1.22 g), H<sub>2</sub>O 분획 (4.97 g)을 얻어 실험시료로 사용하였다 (Figure 1).

### 3. 세포 배양

Murine macrophage cell line 인 RAW264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10 % fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, interferon- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ , recombinant E. coli)는 Roche로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 4. *In vitro* cytokine 생성 및 정량

TNF- $\alpha$ , IL-6 정량은 murine macrophage cell line 인 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 24 microwell plate에  $1 \times 10^6$  cells/ml 로 넣고, 18시간 동안 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고, 시료와 LPS 최종농도 (1  $\mu$ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일조건에서 6시간동안 배양하였다. 배양이 끝나

**Table 1. Herbs used for assay of anti-inflammatory effect**

| Herb             | 학 명                                | Used Part          |
|------------------|------------------------------------|--------------------|
| Marshmallow      | <i>Althaca officinalis</i> L.      | Aerial part        |
| Mallow           | <i>Malva sylvestris</i> L.         | Leaf<br>Flower bud |
| Mullein          | <i>Verbascum thapsus</i> L.        | Aerial part        |
| Chicory          | <i>Cichorium intybus</i> L.        | Aerial part        |
| Pepper Mint      | <i>Mentha piperita</i> L.          | Aerial part        |
| Blue gum tree    | <i>Eucalyptus globulus</i> LABILL. | Leaf               |
| Licorice         | <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.       | Root               |
| German chamomile | <i>Matricaria recutita</i>         | Flower bud         |
| Sage             | <i>Salvia officinalis</i> L.       | Aerial part        |
| Sweet Violet     | <i>Viola odorata</i> L.            | Aerial part        |
| Comfrey          | <i>Symphytum officinale</i>        | Aerial part        |
| Ground Ivy       | <i>Glechoma hederacea</i>          | Aerial part        |
| Cresson          | <i>Nasturtium officinale</i>       | Aerial part        |
| Indigo           | <i>Indigofera tinctoria</i>        | Stem and Leaf      |
| Pot marigold     | <i>Calendula officinalis</i> L.    | Flower bud         |
| Pansy            | <i>Viora tricolor</i> L.           | Aerial part        |
| St. John's wort  | <i>Hypericum perforatum</i>        | Stem and Leaf      |
| Rosemary         | <i>Rosmarinus officinals</i> L.    | Stem and Leaf      |
| Rue              | <i>Ruta graveolens</i> L.          | Stem and Leaf      |
| Yarrow           | <i>Acillea millefolium</i>         | Aerial part        |
| Feverfew         | <i>Tanacetum parthenium</i>        | Aerial part        |

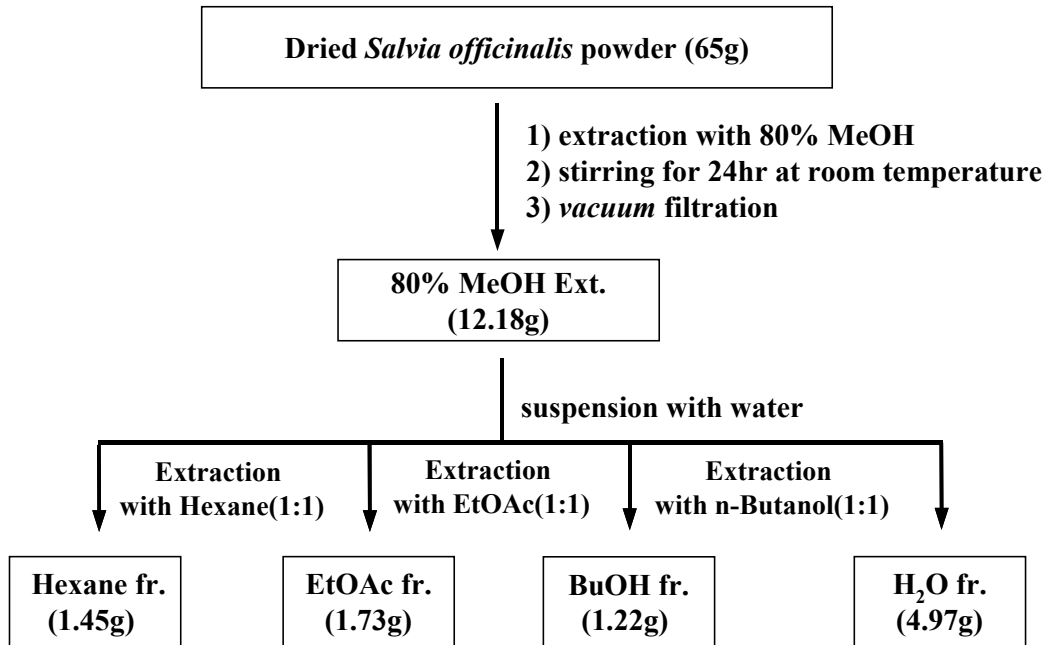


Figure 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Salvia officinalis* L.

면 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻어 mouse ELISA kit (R&D Systemes, Inc, USA)를 이용하여 정량하였다.

## 5. mRNA Expression

### 5-1. RNA 분리

RAW264.7 세포로부터의 RAW264.7 세포 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml)를 18 시간 전배양하고 10배 농도로 조제된 시험 약물과 LPS (최종농도  $1 \mu\text{g/ml}$ )를 동시 처리하여 시간별로 배양 한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화 한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리 (10,000 rpm, 10 min) 하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리 (10,000 rpm, 8 min)하여 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

### 5-2. RT-PCR



cDNA 합성은 Improm-II™ cDNA kit (Promega)를 이용하였고,  $1 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 oligo(dT)<sub>18</sub> primer, dNTP ( $0.5 \mu\text{M}$ ), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로  $70^\circ\text{C}$  5 min,  $37^\circ\text{C}$  5 min,  $37^\circ\text{C}$  60 min, 그리고  $70^\circ\text{C}$ 에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS,  $\beta$ -Actin를 증폭시키기 위하여  $2 \mu\text{l}$  cDNA,  $4 \mu\text{M}$ 의 5' 과 3' primer,  $10\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100),  $250 \mu\text{M}$  dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 최종  $25 \mu\text{l}$ 로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은  $94^\circ\text{C}/45\text{초}$ ,  $55\sim 60^\circ\text{C}/45\text{초}$ ,  $72^\circ\text{C}/60\text{초}$  30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 2와 같다.



**Table 2. Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis**

| Gene           |   | Primer sequences                | Fragment size(bp) |
|----------------|---|---------------------------------|-------------------|
| TNF- $\alpha$  | F | 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'      | 364               |
|                | R | 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'      |                   |
| IL-6           | F | 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'      | 308               |
|                | R | 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'      |                   |
| IL-1 $\beta$   | F | 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'     | 447               |
|                | R | 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'    |                   |
| iNOS           | F | 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' | 496               |
|                | R | 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3' |                   |
| $\beta$ -Actin | F | 5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'     | 603               |
|                | R | 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'     |                   |

## 6. Immunoblotting

RAW264.7 세포 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml)를 petri dish (60 mm)에 넣고 18시간 전 배양을 하였다. 이 후 배지를 제거하고, 시료 ( $50 \mu\text{g/ml}$ )와 LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )/IFN- $\gamma$  ( $50 \text{ U/ml}$ )가 함유된 배지를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후  $300 \mu\text{l}$ 의 lysis buffer을 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 원심분리 ( $15,000 \text{ rpm}$ ,  $15 \text{ min}$ )하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다.  $20 \sim 30 \mu\text{g}$ 의 lysate를 8% mini gel SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에  $200 \text{ mA}$ 로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse iNOS (1:1000) (Santa-Cruz)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Co.)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 5~10분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

## 7. Nitric oxide 측정

RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 양은 Griess reagent로 측정하였다. RAW264.7 세포 ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml)를 24 microwell plate에 넣고 18시간 전 배양을 하였다. 이 후 배지를 제거하고, 시료와 LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )가 함유된 배지를 동시 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 배양액을 96 microwell plate에 넣고 동량의 Griess reagent [0.1% (w/v) N-1-naphthylethylen deamine, 1% (w/v) sulfanilamide in 2.5% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ]를 첨가하고 10분간 실온에서 배양한 후 ELISA reader를 이용하여  $540\text{nm}$ 에서 정량하였다. 표준농도곡선은  $\text{NaNO}_2$ 를 serial dilution하여 얻었다.

## 결 과

### 1. 21종 허브의 염증성 생체지표 억제 효과 탐색

NO와 cytokine 생성량은 LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리한 RAW264.7 세포에서 각각 Griess 시약과 ELISA assay kit를 이용하여 측정하였다 (Table 3).

21종의 허브 중에서 그라운드 아이비, 로즈마리, 유카리, 저먼 캐모마일이 NO 생성량을 30% 이상 감소시켰고, 특히, 세이지와 휘버휴는 60% 이상 감소시켰다.

그리고, 세이지가 TNF- $\alpha$  생성과 IL-6 생성을 LPS 단독 처리군에 비해 각각 33.7%, 33.7% 억제시켰으며, 포트 마리골드, 휘버휴는 IL-6 생성에서 각각 36.0%, 84.7% 억제시켰다. 따라서, 본 연구에서는 세이지 (sage)를 용매 분획화하여 이후의 실험에 이용하였다. 또한 실험에 사용된 농도는 세포독성 평가에서 독성을 나타내지 않았다 (결과는 나타내지 않음).

### 2. Sage 용매분획 추출물의 TNF- $\alpha$ 및 IL-6 억제효과

RAW264.7 세포에  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS와  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 세이지 용매분획 추출물을 동시 처리하여 염증성 cytokine 억제 효과를 mouse ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$ 를 각각 71.0%, 33.1%, IL-6를 각각 78.1%, 70.2% 억제하였다 (Table 4). 또한 실험에 사용된 농도는 세포독성 평가에서 독성을 나타내지 않았다 (결과는 나타내지 않음).

### 3. Sage 용매분획 추출물의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향

RAW264.7 세포에서 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 수준에서 RT-PCR 방법으로 분석하였다.  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리하였을 때 hexane, EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 발현을 강하게 억제하였으며, hexane 분획물이 IL-1 $\beta$  발현을 강하게 억제하였고, EtOAc 분획물은 약한 IL-1 $\beta$  발현 억제 효과를 보였다 (Figure 2).

**Table 3. The effect of herb extract (MeOH extract) on the production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and NO in RAW264.7 cells**

| Herb                | Inhibition (%) |      |               |
|---------------------|----------------|------|---------------|
|                     | Cytokine       |      | NO Production |
|                     | TNF- $\alpha$  | IL-6 |               |
| Marshmallow         | -              | -    | 6.9           |
| Mallow (Flower bud) | -              | 1.0  | 6.0           |
| Mallow (Leaf)       | -              | -    | 2.0           |
| Mullein             | 1.9            | 1.0  | 9.8           |
| Chicory             | -              | -    | 25.0          |
| Pepper Mint         | 10.2           | -    | 21.3          |
| Blue gum tree       | 9.2            | 0.6  | 52.4          |
| Licorice            | 17.7           | -    | -             |
| German chamomile    | -              | -    | 55.6          |
| Sage                | 33.7           | 33.7 | 61.8          |
| Sweet Violet        | 1.7            | 6.1  | 10.6          |
| Comfrey             | 21.1           | 2.9  | -             |
| Ground Ivy          | -              | -    | 34.8          |
| Cresson             | 3.8            | 2.4  | 18.4          |
| Indigo              | -              | -    | 17.5          |
| Pot marigold        | -              | 36.0 | -             |
| Pansy               | -              | 0.7  | 7.1           |
| St. John's wort     | -              | 6.0  | 7.9           |
| Rosemary            | -              | -    | 50.6          |
| Rue                 | 9.6            | -    | 7.6           |
| Yarrow              | -              | -    | 17.6          |
| Feverfew            | 1.6            | 84.7 | 95.9          |

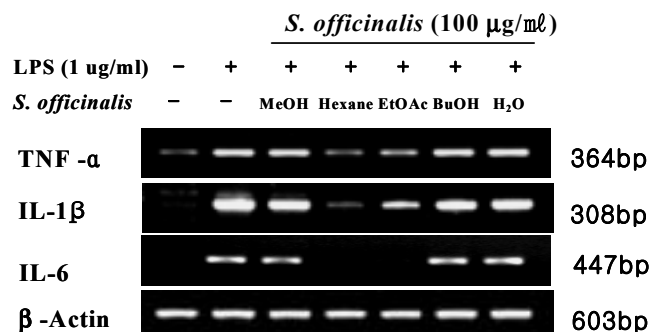
The productions of nitric oxide and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) were assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells stimulated by LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence of testing samples (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Table 4. The effect of solvent fractions of *S. officinalis* on LPS induced TNF- $\alpha$  and IL-6 release in RAW264.7 cells**

| Fraction         | Inhibition (%) |       |
|------------------|----------------|-------|
|                  | TNF- $\alpha$  | IL-6  |
| MeOH             | 33.72          | 33.65 |
| Hexane           | 71.03          | 78.05 |
| EtOAc            | 33.09          | 70.24 |
| BuOH             | -              | -     |
| H <sub>2</sub> O | 2.29           | 2.28  |

The productions of TNF- $\alpha$  and IL-6, were assayed from culture supernatant of RAW264.7 Cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) stimulated by LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) in the presence of testing samples ( $100 \mu\text{g/mL}$ ).





**Figure 2. Inhibitory effects of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α, IL-6, and IL-1β) in LPS (1 µg/ml) stimulated RAW264.7 cells.**

RAW264.7 Cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) were pre- incubated for 18 hr, and the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines were determined from the 6 hr culture of cells stimulated by LPS (1 µg/ml) in the presence of testing samples (100 µg/ml).

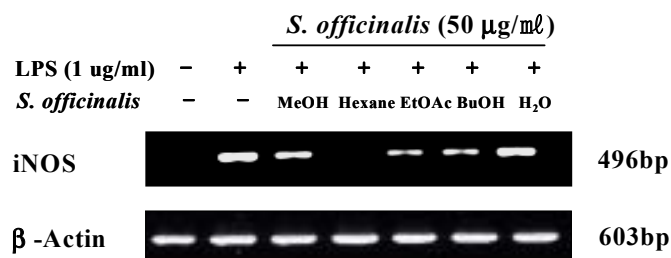


#### 4. Sage 용매분획 추출물의 iNOS의 mRNA 발현 및 protein level에 미치는 영향

RAW264.7 세포에서 iNOS의 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 조사하였다. 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때, hexane 분획물이 가장 강한 발현 억제효과를 나타내었고, EtOAc 분획물과 BuOH 분획물에서도 iNOS 발현이 현저하게 저해되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 그리고, iNOS의 protein level에 미치는 억제효과를 immunoblot 방법으로 분석한 결과, hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 iNOS 단백질이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4).

#### 5. Sage 용매분획 추출물의 NO 생성억제 활성 측정

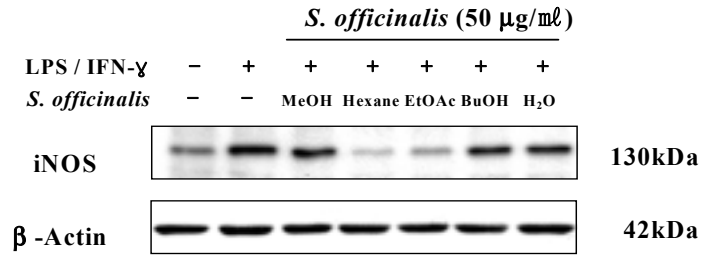
세이지 용매분획 추출물이 iNOS의 산물인 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 NO 생성량을 측정하였다. 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS와 세이지의 용매분획 추출물을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 LPS 단독 처리군에서 43.36  $\mu\text{M}$ 로 생성되었으나 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 각각 NO 생성량이 2.93  $\mu\text{M}$ , 5.54  $\mu\text{M}$ 로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). Hexane 분획물과 EtOAc 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6, 7). Hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서의 NO 생성 억제율에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 각각 16  $\mu\text{g/ml}$ , 18  $\mu\text{g/ml}$ 이었다.



**Figure 3. Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the mRNA expression of iNOS in LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )-stimulated RAW264.7 cells.**

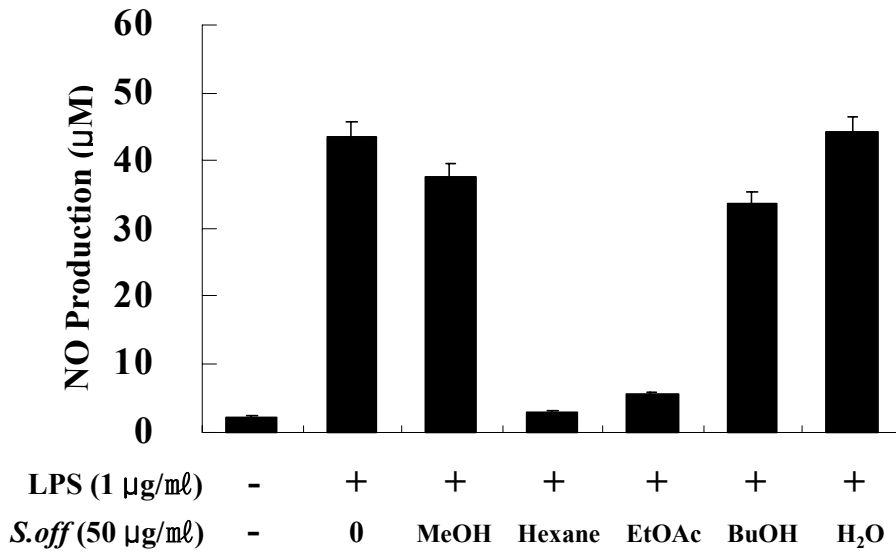
RAW264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/ $\text{mL}$ ) were pre-incubated for 18 hr, and the mRNA expression of iNOS were determined from the 24 hr culture of cells stimulated by LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the presence of testing samples (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).





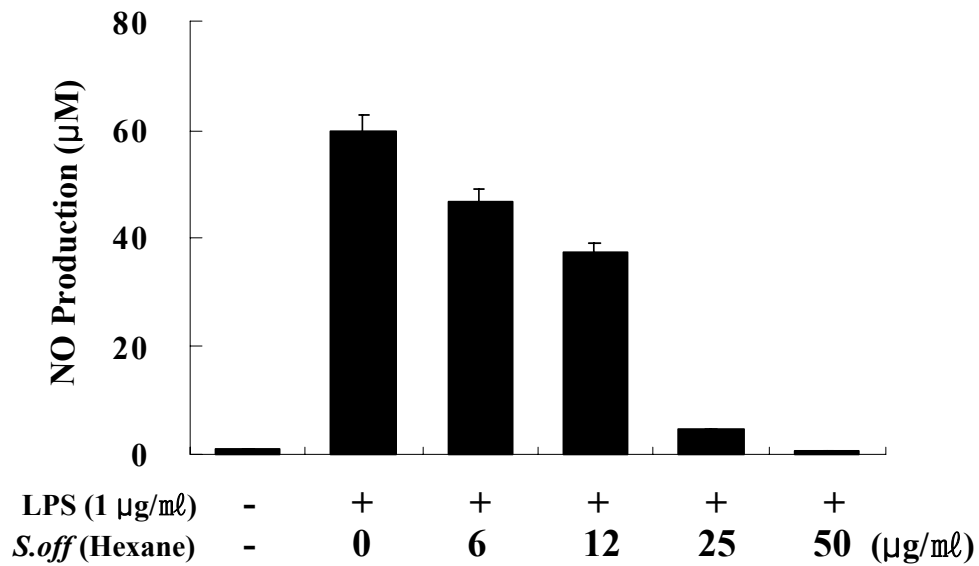
**Figure 4. Inhibitory effect of solvent fractions of *S. officinalis* on the protein level of iNOS activated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) plus IFN- $\gamma$  (50 U/ $\text{mL}$ ) in murine macrophage cell line RAW264.7.**

RAW264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/ $\text{mL}$ ) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated by LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) plus IFN- $\gamma$  (50 U/ $\text{mL}$ ) in the presence of testing samples (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hr.



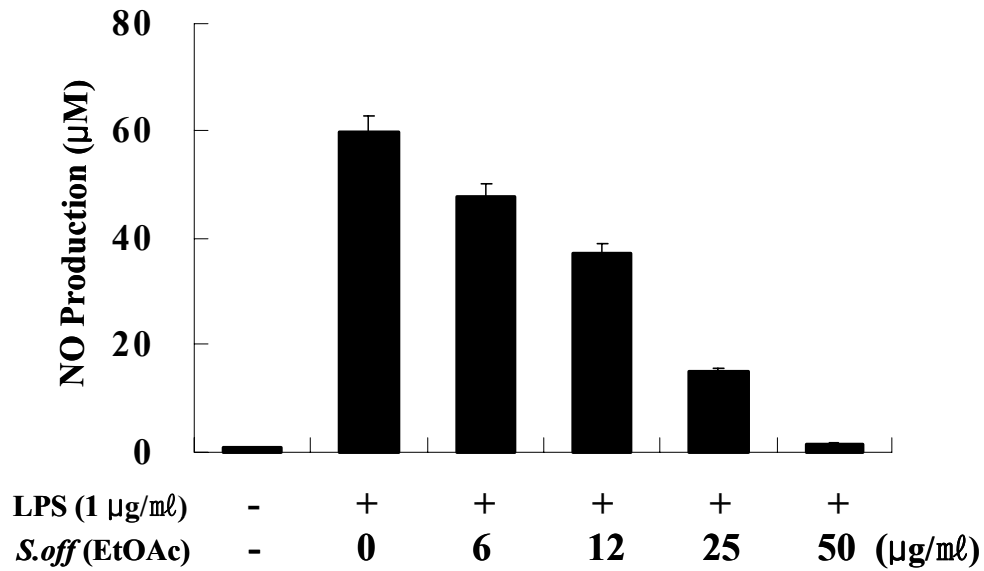
**Figure 5. The effect of solvent fractions of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells.**

The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) stimulated by LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of testing samples ( $50 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figure 6. The effect of hexane fraction of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells.**

The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) stimulated by LPS (1 µg/ml) in the presence of testing samples.



**Figure 7. The effect of EtOAc fraction of *S. officinalis* on NO production in LPS induced RAW264.7 cells.**

The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) stimulated by LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of testing samples.

## 고 찰

Nitric oxide (NO)는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 무기 저분자 라디칼로서 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절 및 종양세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 등에 관여하고 있다 (정, 1998). NO를 생성하는 효소 (NOS : nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO생성을 담당하는 constitutive NOS (c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)로 두 가지로 크게 분류된다. 하지만, 염증반응 등에 의해 생성되는 NO는 lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 또는 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )에 의해 자극 받은 대식세포, 간세포, 신장세포에서 생성되는 iNOS에 의해 유도된다 (Tezuka *et al.*, 2001).

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. 이렇게 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐 아니라, cyclooxygenase (COX)를 활성화하여 prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1998). iNOS에 의한 NO 생성은 iNOS 유전자의 발현에 의존하므로 iNOS 유전자의 발현에 영향을 주는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등과 같은 cytokine이나 다른 chemical을 억제시킴으로서 조절할 수 있다 (정, 1998).

본 실험에서는 허브에서 항염증 물질을 탐색하기 위하여 단핵식세포 모델을 이용하였다. 21종 허브의 80% MeOH 추출물 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 자극을 준 RAW 264.7 세포에 처리하여 NO 생성 억제효과, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성 억제효과를 탐색하였다. 그 결과, 치코리, 페퍼민트, 그라운드 아이비, 로즈마리, 저먼 캐모마일, 유카리 등이 NO 생성을 30% 이상 억제하였고, 특히 세이지와 휘버휴는 NO 생성을 60% 이상 억제하였다. 또한, 세이지는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성을 각각 30% 이상 억제하였고, 휘버휴는 IL-6만을 아주 강하게 억제하였다.

휘버휴는 지금까지 항염증에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 (Smolinski *et al.*, 2003), 세이지의 경우에는 아직까지 항산화실험 외에는 연구가 미약하고, 본 실험에서 NO와 TNF- $\alpha$ , IL-6생성을 모두 억제하였으므로 세이지를 분획화하여 염증성

생체지표 인자 억제 실험에 이용하였다.

RAW 264.7 세포에 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 자극시켜 세이지 (Sage ; *Salvia officinalis* L.)의 용매분획 추출물을 세포독성이 없는 농도에서 처리하여 TNF- $\alpha$ , IL-6 생성을 관찰한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$  생성과 IL-6 생성을 LPS 단독 처리 군에 비하여 생성 억제효과를 나타내었다. 또한 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 유전자의 발현을 LPS 단독처리 군에 비하여 현저하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 염증 전구물질인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 (Feldmann *et al.*, 1996), 염증 반응을 일으키는 동안 일정하게 생성된다. (Harada *et al.*, 1994). 분자적 수준에서 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 IL-6을 유의적으로 억제하는 것은 이러한 사실을 뒷받침해 주는 것이라 할 수 있다.

그리고, LPS에 의한 iNOS의 발현 정도를 mRNA 수준과 단백질 수준에서 관찰한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 LPS 단독처리 군에 비하여 iNOS 발현을 현저하게 억제되는 것을 확인 할 수 있었고, iNOS의 산물인 NO생성량도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, NO의 억제는 iNOS의 발현 저해를 경유한 것임을 알 수 있었다 (Kim *et al.*, 2002).

본 실험 결과를 요약하면, 세이지의 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 iNOS의 발현 및 NO 생성 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 생성을 강하게 억제되는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 세이지의 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구와 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Ahmed, S., A. Rahman, A. Hasnain, M. Lalonde, V. M. Goldberg and T. M. haqqi. 2002. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 $\beta$ -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biology & Medicine* **33**(8): 1097-1105
- An, S.J., H.O. Pae, G.S. Oh, B.M. Choi, S. Jeong, S.I. Jamg, H. Oh, T.O. Kwon, C.E. Song and H.T. Chung. 2002. Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 productions and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *International Immunopharmacology* **2**: 1173-1181
- Bae, J.H. 1997. Effects of *Ganoderma lucidum* on the IL-1, TNF and IL-12 gene expression of macrophages. *Journal of Korean Society Food Science Nutrition* **26**(5): 978-982.
- Bandoniené, D., P. R. Venskutonis, D. Gruzdiené and M. Murkovic. 2002. Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**: 286-292
- Baricevic, D., S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, B. Simonovska, A. Krasna and A. Zupancic. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **75**: 125-132
- Cho, K.J., C.H. Yun, D.Y. Yoon, Y.S. Cho, G. Rimbach, L. Packer and A.S. Chung. 2000. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus*

*maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicology and Applied Pharmacology* **268**: 64-71

Chung, H.Y and H.B Kim. 2000. In vitro Studies on the superoxide scavenging activities, the cytotoxic and the immunomodulating effects of thirteen kinds of herbal extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology* **32**(3): 699-705.

Cuppett, S. L. and C. A. Hall. 1998. Antioxidant activity of the Labiatae. *Advances in Food and Nutrition Research* **42**: 245-271

Dorman, H. J. D., A. Peltoketo, R. Hiltunen and M. J. Tikkanen. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* **83**: 255-262

Fejes, S., A. Blázovics, A. Lugasi, É. Lemberkovich, G. Petri, Á. Kékő. 2000. in vitro antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **69**: 259-265

Feldmann, M., F. M. Brennan and R. N. Maini. 1996. Role of cytokine in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology* **14**: 397-440

Han, S.H., K.H. Sung, D.S. Yim, S.K. Lee, C.K. Lee, N.J. Ha and K.J. Kim. 2002. The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7. *Archives of Pharmacal Research* **25**(1): 170-177

Harada, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida and K. J. Matsushima. 1994. Essential involvement of interleukin-8 in acute inflammation. *Journal*



of leukocyte biology **56**(5): 559-564

Hohmann, J., D. Rédei, I. Máthé and G. Blunden. 2003. Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 427-429

Kiemer, A. K., T. Hartung, C. Huber, A. M. Vollmar. 2003. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Hepatology* **38**: 289-297

Kim, R. G., K. M. Shin, S. K. Chun, S. Y. Ji, S. H. S대, H. J. Park, J. W. Choi and K. T. Lee. 2002. *in vitro* Antiinflammatory Activity of the Essential Oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in Murine Macrophage RAW 264.7 Cell. *Yakhak Hoeji* **46**(5): 343-347

Kwok, B. H. B., B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Elofsson and C. M. Crews. 2001. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I $\kappa$ B kinase. *Chemistry & Biology* **8**: 759-766

Lee, H.J., Y.S. Jeong, S.Y. Ryu, and J.H. Ryu. 1998. Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-*epi*- xanthatin in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji* **42**(5): 540-543

Lee, J.I. H.S Lee, W.J Jun, K.W Yu, D.H Shin, B.S Hong, H.Y Cho, and H.C Yang. 2000. Screening of anticoagulant activities in extracts from edible herbs. *Journal of Korean Society Food Science Nutrition* **29**(2): 335-341.

Lee, S.E., E.M. Ju and J.H. Kim. 2001. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activity of extracts from *Smilax china* root. *Experimental*

*and Molecular Medicine* **33**(4): 263-268

- Lin, Y.L. and J.K. Lin. 1997. (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulation lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Molecular Pharmacology* **52**: 465-472
- Nam, S.H., S.D. Choi, J.S. Choi, D.S. Jang, S.U. Choi and M.S. Yang. 1997. Effects of sesquiterpene lactones isolated from *Chrysanthemum boreale* M. against sarcoma180 implanted in ICR mice. *Journal of Korean Society Food Science Nutrition* **26**(1): 144-147.
- Pak, J.U., S.J. Moon, G. Moon and J.J. Won. 1999. Effects of Semen Armenicae and Radix Trichosanthis on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells. *Journal of Korean Oriental Oncology* **5**(1): 137-150
- Park, H.L., J.M. Suh, K.S. Park, H.S. Chang, S.J. Nam, J.W. Bae, K.P. Lee, J.H. Yang and B.H. Koo. 2001. Diallyl disulfide from garlic induces apoptosis through a caspase dependent pathway in human breast cancer cell line, MCF-7. *Journal of Korean Surgical Society* **61**(2): 119-129
- Ryoo, J.W. and B.C. Cha. 1998. Mineral content and antioxidative activity in some herb plants. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* **6**(1): 28-32.
- Santos-Gomes, P. C., R. M. Seabra, P. B. Andrade and M. Fernandes-Ferreira. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science* **162**: 981-987
- Shobana, S. and K. A. Naidu. 2000. Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **62**(2): 107-110

Smolinski, A. T. and J. J. Pestka. 2003. Modulation of lopopolyxaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food and Chemical Toxicology* **41**: 1381-1390

Willoughby, D. A. 1971. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* **34**: 471- 478

김창중. 1988. 병태생리학. 계축문화사. 47

정헌택. 1998. Nitric Oxide의 생체 내 역할. *Korean society of medical biochemistry and molecular biology*. 64-66

최영진. 1998. 허브와 스파이스 가이드북. 도서출판 예가. 258-264



## 요 약

본 연구에서는 천연물 중 허브로부터 효능이 뛰어난 염증억제 활성물질을 찾고자 대식세포 모델에서 허브 추출물의 염증성 생체지표인자 억제효과를 조사하였다. 제주도 도입되어 재배되고 있으며, 서양에서 오래 전부터 약용으로 이용되고 있는 21종의 허브를 80% methanol로 추출하고 각 추출물에 대해 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성 억제효과와 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6 생성 억제효과를 탐색하였다. 그 결과, 치코리, 페퍼민트, 그라운드 아이비, 로즈마리, 저먼캐모마일, 유카리 등이 NO 생성량이 30% 이상 억제하였고, 특히 세이지와 휘버휴는 NO 생성을 60% 이상 억제하였다. 또한, 세이지는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6를 30% 이상 억제하였으나, 휘버휴는 IL-6만을 아주 강하게 억제하였다.

선정된 세이지 (*Sage* ; *Salvia officinalis* L.)를 계통적 추출 방법에 의하여 hexane 분획, ethylacetate (EtOAc) 분획, butanol (n-BuOH) 분획, H<sub>2</sub>O 분획을 얻어 pro-inflammatory cytokine과 iNOS, NO의 억제효과를 조사하였다.

RAW 264.7 세포에 세이지 용매분획 추출물을 처리하여 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 유도된 TNF- $\alpha$ , IL-6 생성 억제효과를 조사한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물이 TNF- $\alpha$  생성과 IL-6 생성을 LPS 단독처리 군에 비하여 생성 억제효과를 나타내었고, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 발현을 LPS 단독처리 군에 비하여 현저하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 세이지 용매분획 추출물의 처리농도는 세포독성 평가 결과 세포 독성이 나타나지 않았다.

그리고, LPS에 의해 유도된 iNOS mRNA와 단백질 수준에서의 발현 정도와 NO 생성 정도를 관찰한 결과 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 LPS 단독처리 군에 비하여 현저하게 발현이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. Hexane 분획물과 EtOAc 분획물을 농도별로 처리하여 NO 생성량을 관찰한 결과 농도 의존적으로 NO 생성이 감소함을 확인 할 수 있었다. 또한, NO 생성 억제율에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 측정하였을 때 hexane 분획물과 EtOAc 분획물에서 각각 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타내었다. 결과적으로 세이지는 초기 염증성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), iNOS와 NO를 억제함으로써 항염증 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

**Key word:** 염증, *Salvia officinalis* L., 세이지, LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, 염증성 사이토카인, NO, iNOS

## 감사의 글

대학원에 들어와 어느덧 2년의 시간이 지나고 졸업논문을 완성하게 되었습니다. 기쁘기도 하고 아쉽기도 하지만 대학원 생활에서부터 논문이 완성되는데 까지 도와주었던 분들에게 감사하는 마음을 전하고자 이 글을 씁니다.

타과에서 생명과학과로 대학원을 들어와 생물학이라는 학문을 접하는데 많은 어려움이 있었습니다. 하지만 그런 저에게 생물학을 좀더 쉽게 다가갈 수 있도록 도와주시고, 부족한 저를 잘 보듬어주신 오문유 교수님, 김문홍 교수님, 오덕철 교수님, 이화자 교수님께 감사 드립니다. 그리고, 대학원 생활동안 수업은 받지 못했지만 저에게 깊은 관심을 가져주신 이용필 교수님, 김원택 교수님께도 감사 드립니다.

생명과학과로 대학원을 들어온 순간부터 지금 이 순간에도 저에게 많은 관심을 보여주시고 논문지도를 해주신 김세재 지도 교수님 그리고, 제 논문을 심사하시느라 고생하신 고석찬 교수님 정말 감사합니다. 그리고 논문을 쓰는데 많은 지도를 해주시고 저에게 많은 관심을 가져주신 유은숙 교수님, 강희경 교수님께도 감사 드립니다.

또한 아무것도 모르는 저에게 실험의 기초부터 잘 가르쳐주시고, 제가 어려울 때 많은 도움을 주신 박지권 선생님과 정형복 선배님, 박수영 선생님, 강신해 선생님, 한상현 선배님, 김병석 선배님 정말 감사 드립니다. 그리고, 수업시간 외에는 자주 만나지 못했지만, 대학원 생활을 하는데 많은 도움을 주신 송관필 선배님, 오주영 선배님, 이동현 선생님 그리고, 조교선생님이신 김상범, 현화자 선생님 정말 감사합니다.

분자생물학 실험실에 자주 가지는 못했지만, 나를 보면 항상 반겨주는 명천오빠, 경만, 재영, 수연이 정말 고마워요. 덕분에 졸업 논문 발표도 잘 끝낸 것 같아요. 정~말로 고마워요. 그리고, 대학원 생활을 같이 하면서 정말로 많은 도움을 받았던 은미 언니, 재환 오빠, 지훈 오빠, 은주, 영준 오빠, 진영이 정말 고마워요. 수업 발표 준비를 하는데 많은 어려움이 있었는데, 4층에서 1층까지 내려와서 어려운 점들을 일일이 봐주었던 지훈 오빠 정~말 고마워요. 그리고, 비슷한 실험을 해서 그런지 실험에 대해서 많은 얘기를 나눈 영준 오빠 고마워요. 내가 많은 도움을 줬는지는 모르겠지만, 많은 얘기를 나눌 수 있어서 좋았어요. 앞으로도 실험이 잘 되었으면 좋겠어요. 화이팅!! 분자생물학 실험실에 유일한 여자 동기인 진영이~ 비슷한 점이 많아 많은

얘기를 나누었던 것 같다. 내가 실험에 대한 도움은 주지 못하고 오히려 도움을 많이 받은 것 같다. 고맙다. 앞으로 네가 원하는 것을 위해 차근차근 준비하는 것을 보면 정말 멋진 것 같애. 네가 희망하는 것 원하는 것들 모두 이룰 수 있길 바래.

의대로 처음 갔을 때 나에게 실험의 이론적인 면과 기술을 가르쳐준 상철 오빠, 혜자 언니 정말 고마워요. 2년을 약리학 교실에서 지내면서 항상 한 가족처럼 챙겨주고, 힘들 때 옆에서 도와준 약리학교실 식구들 너무 고마워요. 2년 내에 졸업논문 실험해서 논문을 쓴다는 것이 많은 어려움이 있었어요. 그래서 상철 오빠와 혜자 언니를 많이 부러워했었고 그때마다 혜자 언니의 따뜻한 말 한마디에 다시 시작했었어요. 그리고, 실험에 많은 도움을 주고 지금도 내 졸업논문에 신경을 써주는 상철 오빠, 항상 티격태격 하면서도 나에게 이것저것 챙겨주는 원종 오빠, 우리 실험실의 분위기 메이커인 재희, 지금은 우리 실험실에 없지만 얼마 전까지 우리 식구였던 혜정이 모두모두 고마워요. 앞으로 대학원 생활 열심히 하고, 모두에게 항상 행복한 일이 많았으며 좋겠어요.

그리고, 졸업논문을 쓰는데 아주 많은 도움을 주셨던 (주)붉은뭇 허브팜의 김서중 사장님 정말 감사 드립니다.

끝으로, 오늘이 있기까지 저를 키워주신 부모님, 할머니 그리고 동생들 정말로 고맙습니다. 그리고, 기쁠 때 슬플 때 항상 옆에 있어주고, 힘들 때 같이 고민해준 광섭 오빠에게도 감사 드립니다.

모두 사랑합니다.....