



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

RAW 264.7 세포에서 제주조릿대
(*Sasa quepaertensis* Nakai) 잎 추출물의 전
염증 매개인자 생성 억제 효과

지도교수 김 세 재

황 준 호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2006년 12월

황준호의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2006년 12월

Inhibitory effects of *Sasa quepaertensis* Nakai
leaf extract on the production of pro-
inflammatory mediators in RAW 264.7 cell

Joon-Ho Hwang

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Philosophy

200 . .

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Won-Teak Kim of life science

(Name and signature)

DEPARTMENT OF LIFE SCIENCE
GRANUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Sasa quepaertensis Nakai is a native plant, which is distributed throughout Halla mountain of Jeju Island. In order to evaluate its potentiality as bioresource in human health, I investigated the effect of *S. quepaertensis* leaf extract on expression of pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. NO is an important biological mediator in the living organism that is synthesized from L-arginine using NADPH and molecular oxygen. However, the overproduction of NO which is catalyzed by iNOS, a soluble enzyme and active in its dimeric form, is cytotoxic. Immunostimulating cytokines or bacterial pathogens activate iNOS and generate high concentrations of NO through the activation of inducible nuclear factors, including NF κ B. Ethylacetate (EtOAc) fraction of the *S. quepaertensis* leaf extract inhibited the production of NO, PGE₂, iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. Also, it effectively inhibited mRNAs expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . In addition, EtOAc fraction inhibited the phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase and transactivation of nuclear factor- κ B (NF- κ B). These results indicate that EtOAc fraction suppresses the production of pro-inflammatory mediators via inhibition of NF- κ B transactivation and ERK1/2 phosphorylation. Therefore, I suggest that *S. quepaertensis* leaf is a promising agent for anti-inflammatory agent and chemopreventive strategies.

Key word : *Sasa quepaertensis*, inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, nuclear factor- κ B, prostaglandin E₂, Cytokines

목 차

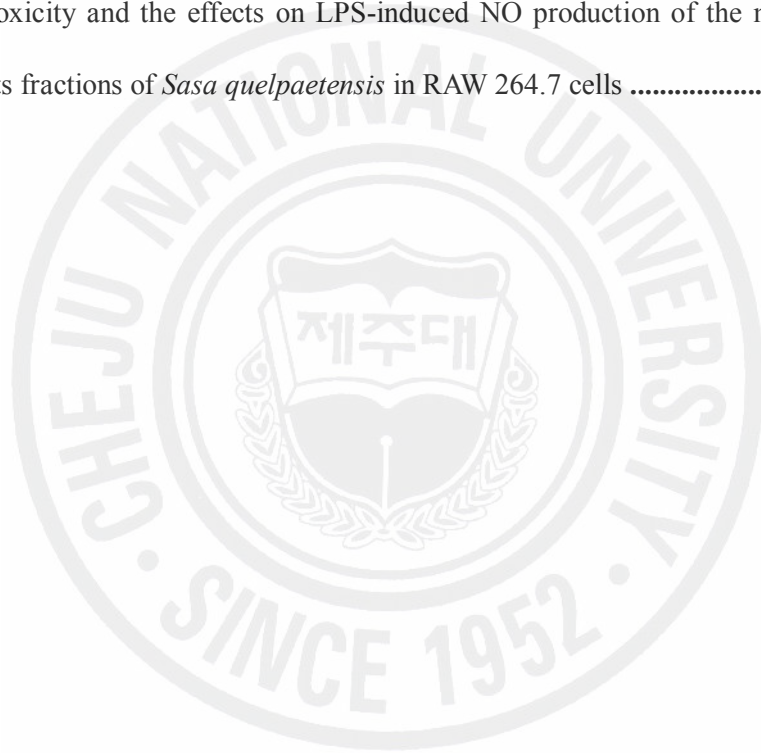
ABSTRACT	i
목 차	ii
LIST OF TABLE	iv
LIST OF FIGURES	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시료 채취와 추출	4
2. 세포 배양	4
3. 세포 독성 측정	5
4. NO와 PGE ₂ 정량	5
5. Immunoblotting	6
6. RNA 분리 및 RT-PCR	7
7. Luciferase activity assay	10
8. iNOS enzyme activity assay	10
9. 통계학적 분석	11
III. 결 과	13
1. 제주조릿대 잎 메탄올 추출물과 그 분획물들의 세포 독성 및 NO 생성 억제 활성	13
2. 제주조릿대 잎 에틸아세테이트 분획물의 전염증 매개인자 생성 억제 효과		

.....	13
1) NO 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향	13
① NO 생성 저해 활성화	13
② iNOS 단백질 및 mRNA 발현 저해 활성화	13
2) PGE ₂ 생성과 COX-2 유전자 발현	20
① PGE ₂ 생성 저해 활성화	20
② COX-2 단백질 발현 저해 활성화	20
③ COX-2 mRNA 발현 저해 활성화	20
3) Cytokines mRNAs 발현 억제 활성화	25
3. NFκB 전사활성화 및 ERK1/2 인산화에 미치는 영향	25
1) NFκB 전사활성화 억제	25
2) ERK1/2 인산화에 미치는 영향	25
IV. 고찰	30
V. 인용 문헌	34
VI. 요약	42

LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products 9

Table 2. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the methanol extract and its fractions of *Sasa quepaetensis* in RAW 264.7 cells 15



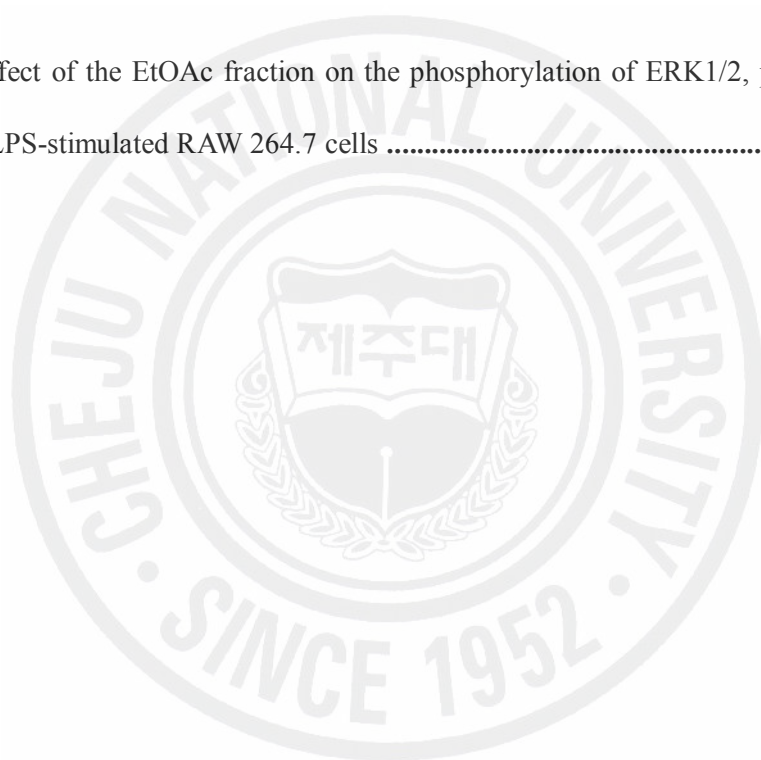
LIST OF FIGURES

Figure 1. Systematic purification by using solvent partition from <i>Sasa quelpaertensis</i>	12
Figure 2. Effect of the EtOAc fraction on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	16
Figure 3. Effect of the EtOAc fraction on the iNOS protein expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	17
Figure 4. Effect of the EtOAc fraction on the iNOS mRNA expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	18
Figure 5. Effect of the EtOAc fraction on iNOS enzyme activity	19
Figure 6. Effect of the EtOAc fraction on the PGE ₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	22
Figure 7. Effect of the EtOAc fraction on the COX-2 protein expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	23
Figure 8. Effect of the EtOAc fraction on the COX-2 mRNA expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	24

Figure 9. Effect of the EtOAc fraction on the TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNAs expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells 27

Figure 10. Effect of the EtOAc fraction on the LPS-induced NF- κ B transcriptional activation 28

Figure 11. Effect of the EtOAc fraction on the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells 29



I. 서 론

척추동물은 외부 감염이나 피부조직의 모세혈관이 손상되면 활세포(synovial cell)가 활발하게 증식되고 결합 조직 내부로 림프구(lymphocyte)의 침윤과 더불어 섬유모세포(fibroblast) 및 대식세포(macrophage) 수가 증가한다. 이로 인해 임파구에서 분비되는 인터루킨(interlukin)은 effector 임파구를 활성화시키고 hyaluronidase, elastase 및 collagenase와 같은 각종 분해효소 및 prostaglandin 등의 염증 매개물의 형성을 촉진하여 결합조직을 파괴시키는 염증이 유발된다(Deby, 1988; Shimizu와 Wolfe, 1990).

Nitric oxide (NO)는 NO synthases (NOSs)에 의해 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 생성되는 유리기로(Palmer 등, 1988), 체내 방어 및 신호 전달, 혈관 확장 등의 2차 신호전달자로서 다양한 생리기능을 가진다(Monacada 등, 1991; Nathan, 1992; Knowles와 Mocada, 1992). Constitutive NOS (cNOS)는 신경세포에 존재하는 neuronal constituent NOS (ncNOS)와 내피세포에 존재하는 endothelial constitute NOS (ecNOS)가 있으며, cNOS에 의한 NO의 생성은 생체내 항상성 조절에 중요한 역할을 한다(Kawamata 등, 2000). 그러나 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 constitutive NOS와는 달리 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 발현된다(Lee 등, 2000). 이들 조직에서 발현된 iNOS 는 장시간 동안 많은 양의 NO를 생성하게 되어 염증과 종양을 유발하며(Nathan, 1992), 조직의 손상과 유전자의 변이 및 신경 등의 손상을 초래한다(Stuehr 등, 1991; Weisz 등, 1996). 이러한 염증반응과 관련된 NO와 prostaglandin E₂ (PGE₂)는 iNOS 및

cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 형성된다.

대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응시에는 NO와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다(Hihuchi 등, 1990). 그람 양성균의 세포외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포외막으로부터 방출되어 패혈증과 쇼크를 일으킨다. LPS는 RAW 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구에서 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , interleukin-6 (IL-6) 합성을 증가시키며, 특히 TNF- α , IL-1 β 는 iNOS의 발현을 유도한다(Hihuchi 등, 1990; Willeaume 등, 1995; McDaniel 등, 1996)

예로부터 조릿대의 속껍질을 죽여(竹茹)라 하고, 잎은 담죽엽(淡竹葉) 혹은 죽엽(竹葉)이라 하였으며(장 외, 2002), 담죽엽은 청열제번(淸熱除煩), 이뇨, 열병으로 인한 목마름, 소아경기로 사용되었다(동의학연구회, 1995; 박종희, 2004). 또한 귤피죽여탕(橘皮竹茹湯)이라는 이름으로 귤의 껍질과 함께 사용하여 격열(膈熱), 위허(胃虛), 해역(咳逆) 등에 사용하였다(장 외, 2002).

조릿대속 식물은 빠른 근경번식으로 인해 군락을 이루고 년 평균 기온이 10℃ 이상, 평균 강수량이 1000 mm 이상 지역에서 서식한다. 바람이 적고 경사가 30° 이하로 토심이 30cm 이상 되는 지역에 주로 분포하는데, 우리나라에서는 개마고원을 제외하고는 전 지역에서 왕성한 군락을 이루고 있다(김과 고, 2004). 이중 유일하게 한라산에만 분포하는 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)는 한라산국립공원 전역에 우점도가 높은 주요 하층식생으로 자리잡고 있다. 제주조릿대의 탁엽의 발생은 4월부터 이루어지고, 5월부터 8월까지 본엽이 형성되고, 9월경에는 제주조릿대의 특징 중 하나인 잎 가장자리의

퇴색(pseudovariegation)이 시작된다(김과 고, 2003).

현재까지 보고된 조릿대속에 대한 연구는 매우 미진하다. 생태학적 연구로는 *Sasa borealis*에 대한 잎, 줄기, 지하경 등 형태적 특성과 생장시기에 대하여 보고를 하였다(Cha와 Lee, 2002). 조릿대속의 성분에 대한 연구는 충청북도 속리산에서 채집한 *Sasa borealis* 잎에서의 flavone의 배당체 성분 분리 보고(Yoon 등, 2000)와 *Sasa veitchii* (Carr.)에서 6가지의 새로운 flavonolignans에 대한 보고가 있다(Nakajima 등, 2003). 그리고 생리활성에 대한 연구로는 DPPH, Nitrite 소거활성과 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay법을 이용하여 높은 환원당 함량과 항산화 활성이 유의적 관계가 있다고 보고된 바 있다(Lee와 Moon, 2003). 그 외, 3T3-L1 세포주에서 인슐린의 작용을 향상시킨다는 보고(Ko 등, 2006)와 HL60 세포, L1210 세포 등의 암세포주에서 세포독성 및 활성산소 소거활성에 대한 보고가 있다(박, 2003). 그러나 현재 제주조릿대에 대한 보고는 생육특성 및 종 다양성에 대한 변화 등 생태학적 측면의 연구(김과 고, 2003; 2004)가 거의 대부분이며, 한라산 식물상에서 우점도를 차지하는 제주조릿대의 대한 생리활성 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 제주도 특산자원인 제주조릿대가 유용자원으로서 활성 가능성이 있는지를 평가하기 위하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서 전염증성 매개자인 NO의 생성량, iNOS, COX-2의 발현 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 cytokine에 미치는 영향을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채취와 추출

실험에 사용된 제주조릿대 잎은 2005년 4월에 제주시 조천읍 교래리 소재 물чат오름 해발 717m 지역에 분포하는 조릿대 중 일년생 잎만을 선별하여 채취하였다. 채집된 시료는 수돗물로 2-3번 씻어내고 동결건조기를 사용하여 완전히 건조한 후 파쇄기로 미세하게 파쇄시켜 사용시까지 냉동보관(-20℃)하였다. 조릿대 잎 건조물 800 g에 80% 메탄올(MeOH) 20 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 추출하여 상층액을 회수하였다. 이 과정을 2회 반복(x 2)한 후 얻어진 상층액을 진공펌프를 이용하여 필터한 후 감압농축하여 조릿대 메탄올 추출물 115.69 g을 수득하였다. 그리고 조릿대 메탄올 추출물 115.69 g을 증류수 2 L에 현탁시킨 후에, 각각 헥산(Hexane, 2 L × 3), 에틸아세테이트(EtOAc, 2 L × 3), 부탄올(n-BuOH, 2L × 3), 물(H₂O) 순으로, 즉 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매분획하여 4개의 분획물을 얻었고, 각각의 분획물을 진공 동결건조하여 시료로 사용하였다(Figure 1). 시료는 phosphate buffered saline (PBS) 에탄올(EtOH) 비율 1:1로 녹였고, 에틸아세테이트 분획물은 100% 에탄올에 녹여 실린지필터(pore size 0.45 nm)로 걸러서 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂

항온기에서 배양하였다.

3. 세포 독성측정

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well micro plate에 2×10^5 cells/well 로 넣고, 18시간 배양 후 여러 가지 농도의 시료와 100 ng/ml의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)을 첨가한 후 전 배양조건과 동일하게 24 시간 동안 배양하였다. 이후 100 μ l의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 2 mg/ml을 넣고 1시간 동안 배양 한 후 배지를 제거하였다. 200 μ l dimethylsulfoxide (DMSO)를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Bio-tek, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 농도에 대한 흡광도 값을 구하였으며, 시료를 처리하지 않은 흡광도 값과 비교하여 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 세포 독성 정도를 평가하였다. 세포독성은 다음 식에 의해 산출하여 TC_{50} 값으로 평가하였고, 이때 TC_{50} 은 50%의 세포독성을 나타내는 농도이다.

$$\text{세포독성(\%)} = (\text{Control OD}_{540} - \text{Sample OD}_{540}) / \text{Control OD}_{540} \times 100$$

4. NO와 PGE₂의 정량

10% FBS가 첨가된 배지에 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/well 밀도로 심어 여러 가지 농도의 시료를 처리한 후 LPS (100 ng/ml)를 가하여 24시간 배양하였다. Griess 시약을 이용하여 세포배양액에 존재하는 nitrite의 형태의 NO 양을 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% N-1-naphylethylen diamine in 2.5(v/v)

phosphoric acid] 100 μ l를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO_2)를 standard로 비교하였다. NO 생성 억제율은 다음 식에 의해 산출하여 IC_{50} 값으로 평가하였고 이때 IC_{50} 은 NO 생성을 50% 저해하는 농도이다.

$$\text{NO 생성 억제율(\%)} = (\text{Control OD}_{530} - \text{Sample OD}_{530}) / \text{Control OD}_{530} \times 100$$

그리고 생성된 PGE_2 는 ParameterTM PGE_2 Assay kit(R&D systems, USA)를 이용하여 정량 하였다.

5. Immunoblotting

RAW 264.7 세포(2.0×10^6 cells/well)를 6 well plate에 심어 18시간 배양을 하였다. 이 후 각 농도 별 시료와 LPS (100 ng/ml)를 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였고, 세포를 2-3 회 PBS로 세척 후 100 μ l의 0.1 M PMSF, 0.1 M NaO_4 , 0.5 M NaF, 5 mg/ml aprotinin과 leupeptin이 첨가된 RIPA lysis buffer (Upstate Biotechnology, USA)를 가하여 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 세포막 성분 등은 제거하였다. 단백질의 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 30 μ g/ml의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한 후 poly vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200mA로 90분 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 PVDF 막은 5% skim milk가 첨가된 blocking buffer (Tirs-buffered daline-0.1% (w/v) Tween-20 :

TBS-T)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 1차 항체와 반응하였다. 1차 항체 반응은 1/5,000 inducible nitric oxide synthase antibody (Calbiochem, USA), 1/5,000 COX-2 antibody (BD Transduction Laboratories, USA), 1/1,000 phospho-ERK1/2 antibody (Santa Cruz, USA), 1/1,000 ERK1/2 antibody, 1/1,000 p38 MAP kinase antibody, 1/1,000 phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) antibody, 1/1,000 SAPK/JNK antibody, 1/1,000 phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody (Cell Signaling Tech, USA), 1/10,000 β -actin antibody clone AC-74 (Sigma, USA)를 사용하여 하루 밤 동안 4°C에서 실시하였다. TBS-T로 3회 수세한 후 2nd antibody peroxidase-conjugated 된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. ECL detection reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)로써 확인하였고, 각 단백질 발현은 LabWorks Imaging and Analysis Software (UVP Labworks, USA)로 분석한 후 β -actin에 대한 발현양으로 보정하여 정량화 하였다.

6. RNA 분리 및 RT-PCR

세포(2.0×10^5 cells/well)를 6 well plate에 심어 18 시간 전 배양하고, 여러 농도(0, 32, 63, 125, 250 μ M)로 시료와 LPS (100 ng/ml)를 동시 처리하여 배양하였다. Total RNA는 TRI Reagent (MRC, Cincinnati, OH)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI reagent를 첨가하여 균질화 한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리(13000 rpm, 10 min) 하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리(13000 rpm, 10 min)하여 RNA를 침전시키고 75%의 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에

녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm 의 비율이 1.6-1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA 시료를 실험에 사용하였다.

cDNA 합성은 Improm-II™ cDNA kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 1 µg 의 total RNA를 oligo (dT) primer, dNTP (0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 Improm-II™ reverse transcriptase (2 U)를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 1시간, 70°C 에서 10분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)은 1 µl cDNA, 4 µM의 각 primer sets (Table 1)와 10X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (iNtRON, Korea)를 혼합한 후 증류수를 가하여 반응액을 25 µl로 맞추는 다음 Bio-Rad PCR 기기를 이용하여 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 55-57°C/45초, 70°C/60초 간 18-27 회 증폭하였으며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV transilluminator (SLB MylmaggeTM)에서 특정 band를 확인하였다. 각 결과에 대한 분석은 LabWorks Imaging and Analysis Software (UVP labwork, USA)을 사용하였다. RT-PCR에서 사용된 primer의 염기서열과 예상되는 생성물의 크기는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products

Gene	Primer sequences		Fragment size(bp)
iNOS	Forward	5'-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3'	497
	Reverse	5'-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'	
COX-2	Forward	5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'	696
	Reverse	5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'	
TNF-α	Forward	5'-TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3'	374
	Reverse	5'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3'	
IL-1β	Forward	5'-CAG GAT GAC ATG AGC ACC-3'	447
	Reverse	5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'	
IL-6	Forward	5'-GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG-3'	308
	Reverse	5'-TGC TGG TGA CAA CCA CGG CC-3'	
β-actin	Forward	5'-AGG CTG TGC TGT CCC TGT ATG C-3'	395
	Reverse	5'-ACC CAA GAA GGA AGG CTG GAAA-3'	

7. Luciferase activity assay

RAW 264.7 세포(5.0×10^3 cells/well)를 96 well plate에 18시간 동안 전 배양하고, 10 ng/well의 pNF- κ B-Luc (Stratagene, La Jolla, Calif., USA), 4 ng/well의 pRL-TK-luc (Promega, Madison, WI), 36 ng/well의 sperm DNA 그리고, FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 well 당 0.3 μ l씩을 혼합 한 후 DMEM 배지를 가하여 반응액을 30 μ l 로 맞춘 다음 30 분간 실온에서 반응시켰다. 이것을 각 well에 첨가하여 24시간 동안 세포배양기에서 배양하였다. 24 시간 후에 LPS (100 ng/ml)와 시료를 넣고 24시간 동안 배양하였다. Luciferase 활성은 Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega, USA)을 사용하여 측정하였다. 우선 FBS-free DMEM 배지로 96 well plate를 2회 세척한 후, 각 well에 30 μ l의 FBS-free DMEM를 가하여 Dual-Glo Luciferase reagent를 well 당 30 μ l씩 가하여 15분간 반응시켰다. FLUOstar OPIMA (BMG Labtech, USA) 장비를 이용하여 Firefly를 측정하고, Renilla의 측정은 Dual-Glo Stop & Glo reagent 30 μ l을 각 well에 넣고 15분간 반응 후 측정하여 Firefly의 값을 Renilla로 보정하여 그래프화 하였다.

8. iNOS enzyme activity assay

RAW 264.7 세포(1.0×10^6 cells/ml)를 cell culture dish (100 mm)에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지에 LPS (100 ng/ml)를 가하여 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 PBS로 2-3회 세척하고 300 μ l의 lysis buffer (20 mM sodium phosphate buffer pH 6.7, 0.1 M PMSF, 5 mg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)을 첨가하여 1 시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 10 min)하여 세포막 성분 등을 제거하였다.

단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 단백질을 96 well plate에 200 μ g를 넣고, reaction buffer I (20 mM sodium phosphate buffer, 800 μ M NADPH, 8 mM L-arginine, 40 μ M FAD)을 넣고 상온에서 3시간 동안 반응 후 reaction buffer II (0.1 U/ml nitrate reductase, 0.1 mM NADPH, 5 μ M FAD)을 가하여 37 $^{\circ}$ C 에서 15분간 더 반응시킨 후, 10 U/ml lactic dehydrogenase, 10 mM pyruvate를 첨가하여 반응을 중지하였다. 여기에 Griess 시약을 첨가하여 생성된 NO의 양을 측정하여 효소의 활성정도를 평가하였다(Wang 등, 2001).

9. 통계학적 분석

실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타냈으며 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 분석하였다.

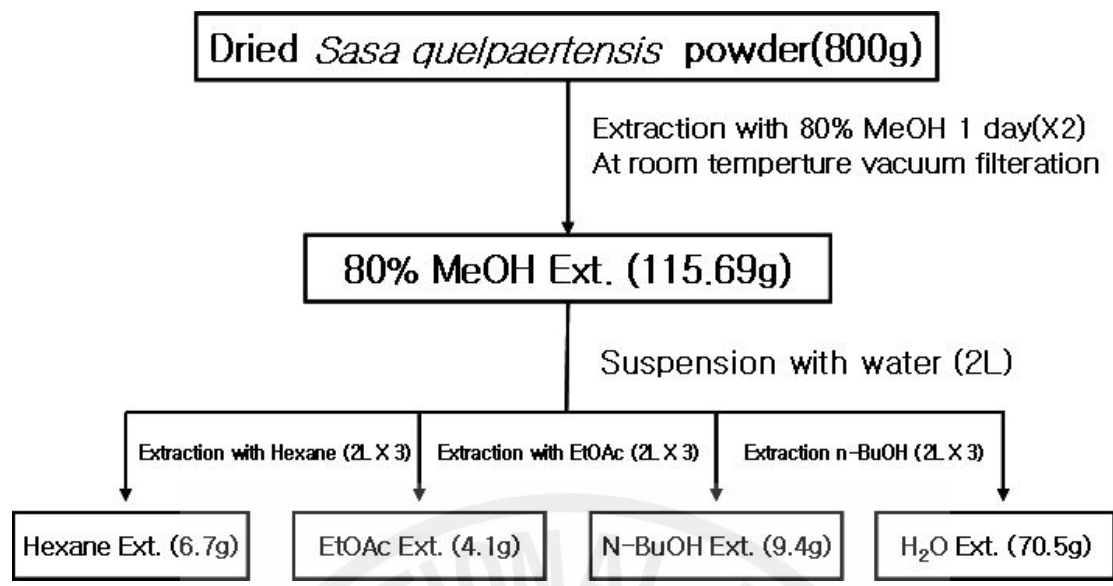


Figure 1. Systematic purification by using solvent partition from *Sasa quepaertensis*

III. 결 과

1 제주조릿대 잎 메탄올 추출물과 그 분획물의 세포 독성과 NO 생성 억제 활성

RAW 264.7 세포에서 제주조릿대 잎 메탄올 추출물과 그 분획물의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC₅₀ 값과 세포독성 TC₅₀ 값을 산출하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 여러 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 LPS로 유도되는 NO 생성에 대한 억제 활성 (IC₅₀ = 68.6 µg/ml)이 가장 높았다. 특히, 에틸아세테이트 분획물은 세포독성을 고려한 NO생성 억제 활성인 선택지수(6.8)는 여러 분획물 중에서 가장 양호하였다. 따라서 후속실험은 EtOAc 분획물을 사용하여 수행하였다.

2. 제주조릿대 잎 에틸아세테이트 분획물의 전염증 매개인자 생성 억제 효과

1) NO 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

① NO 생성 저해 활성

RAW 264.7 세포에서 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성 억제와 세포독성을 조사하였다. 세포에 LPS를 처리하면 NO의 생성이 30 µM로 현저히 증가하였다. 그러나 LPS와 EtOAc 분획물(32, 63, 125, 250 µg/ml)을 동시 처리한 실험군에서는 NO 생성량(18, 12, 5, 3 µM)이 현저히 감소하였다 (Figure 2). 동일한 농도에서 세포독성은 관찰되지 않았다(Figure 2).

② iNOS 단백질 및 mRNA 발현 저해 활성

제주조릿대 및 EtOAc 분획물의 NO 생성 저해 활성이 시료의 NO 소거 활성으로 인한 것이 아니라 iNOS의 단백질의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 immunoblot과 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. LPS를 단독처리 하였을 때 iNOS 단백질 발현양이 증가하는 것을 확인하였으며, EtOAc 분획물을 32, 63, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 처리하였을 때 iNOS 단백질은 농도 의존적으로 감소하였다. EtOAc 분획물 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군은 시료를 처리하지 않은 것과 비교하였을 때 약 40% 정도의 단백질 발현 저해 활성을 나타내었다(Figure 3). RT-PCR로 분석한 iNOS의 mRNA 발현 또한 농도 의존적인 감소를 나타내었다. EtOAc 분획물을 63 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 군에서 iNOS의 mRNA 발현양은 LPS만을 처리한 실험군에 비하여 약 50% 정도의 감소된 mRNA 발현양을 보였다(Figure 4).

제주조릿대 및 EtOAc 분획물이 효소 활성에 영향을 미치는 가를 조사하기 iNOS의 효소 억제 활성을 분석하였다. EtOAc 분획물을 32, 63, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 실험군 모두에서 iNOS 단백질 효소 활성의 변화는 관찰되지 않았다. 이 실험에서 양성 대조군으로 쓰인 1400W는 나타내지 않았다 (Figure 5). 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포주에서 EtOAc 분획물의 NO 생성 억제 활성은 iNOS mRNA와 단백질 합성을 저해를 통해 일어나는 것으로 효소 활성과는 관련이 없음을 확인할 수 있었다.

Table 2. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the methanol extract and its fractions of *Sasa quelpaertensis* in RAW 264.7 cells.

<i>Sasa quelpaertensis</i>	TC ₅₀ ¹⁾ (μg/ml)	IC ₅₀ ²⁾ (μg/ml)	Selectivity index ³⁾
MeOH extract	>2000	1341.7 ± 4.9	>1.8
Hexane fraction	240.1 ± 19.8	175.0 ± 9.6	1.4
EtOAc fraction	465.2 ± 10.2	68.6 ± 0.1	6.8
BuOH fraction	>2000	>2000	-
Water fraction	>2000	>2000	-

¹⁾ TC₅₀ is the concentration producing 50% toxicity in RAW 264.7 cells.

²⁾ IC₅₀ is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

³⁾ Selectivity Index = TC₅₀ / IC₅₀

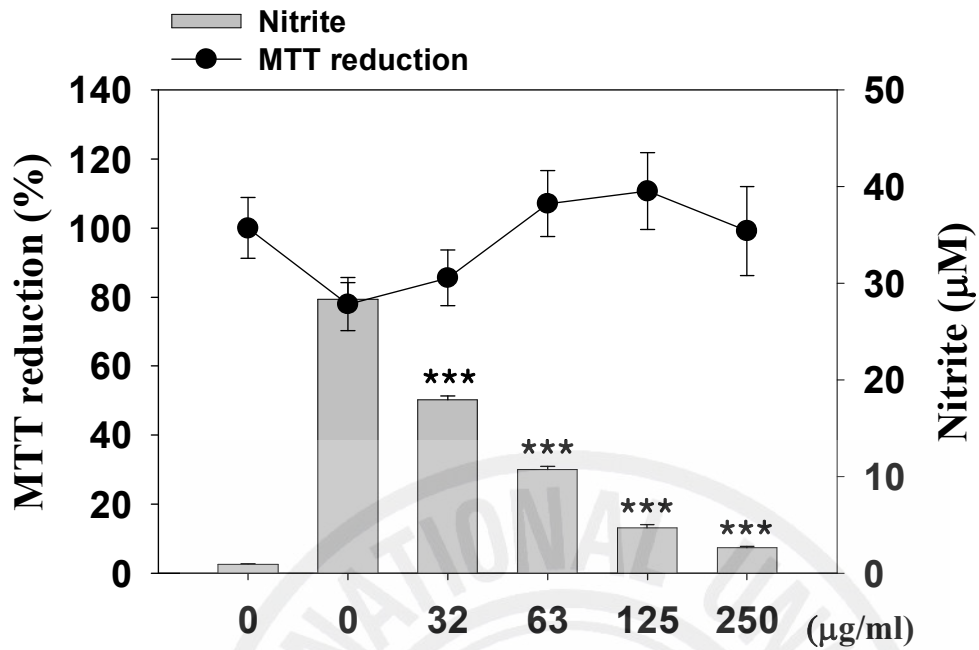
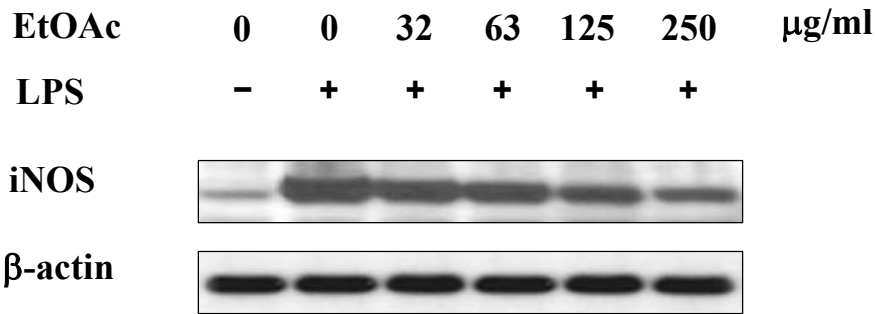


Figure 2. Effect of EtOAc fraction on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations of EtOAc fraction for 24 h. *** $P < 0.001$ vs LPS alone-treated cells

(a)



(b)

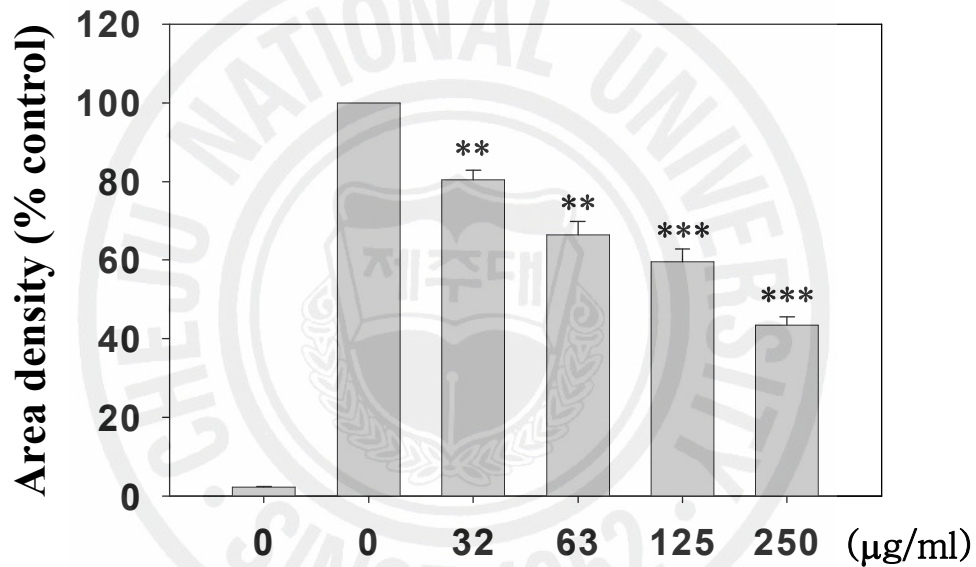
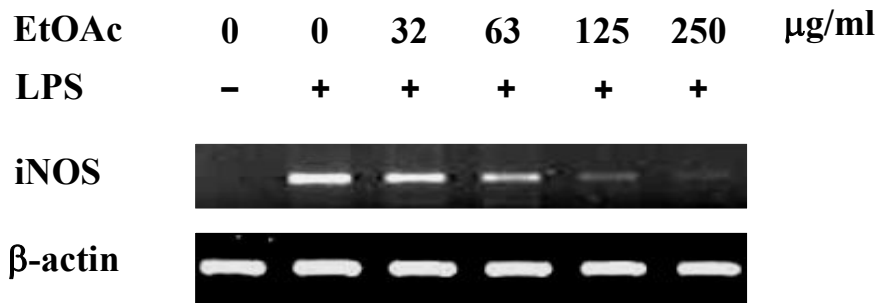


Figure 3. Effect of EtOAc fraction on the iNOS protein expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of EtOAc fraction for 24 h. (b) Quantification of iNOS protein expression was performed by densitometric analysis. The relative level was calculated as the ratio of iNOS protein expression to β -actin protein expression. *** $P < 0.001$ vs LPS alone-treated cells. Data are expressed in area density as the mean \pm S.E for three independent experiments.

(a)



(b)

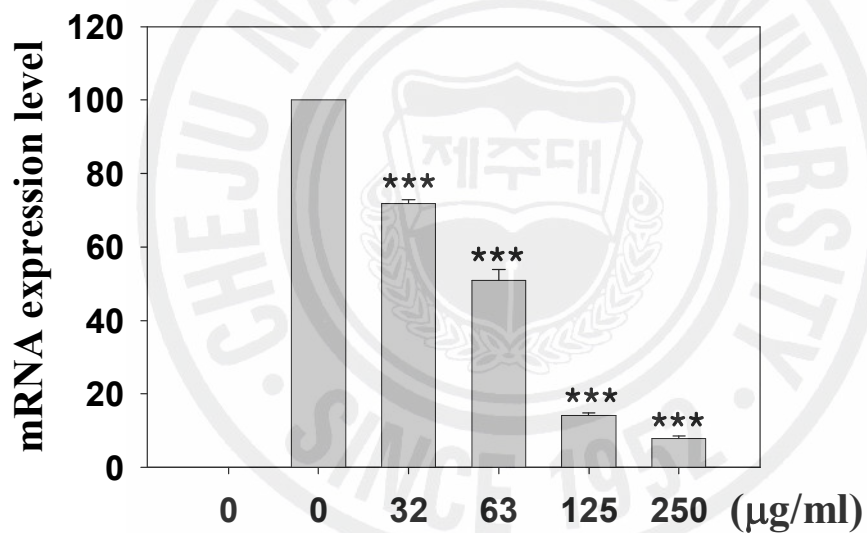


Figure 4. Effect of EtOAc fraction on the iNOS mRNA expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were co-treated with LPS(100 ng/ml) or LPS with EtOAc fraction at the indicated concentration for 6 h. Total RNA was subjected to RT-PCR (b) Quantification of iNOS mRNA expression was performed by densitometric analysis of the RT-PCR products. The relative level was calculated as the ratio of iNOS mRNA expression to β -actin mRNA expression. *** different from LPS alone, $P < 0.001$ Student's t -test.

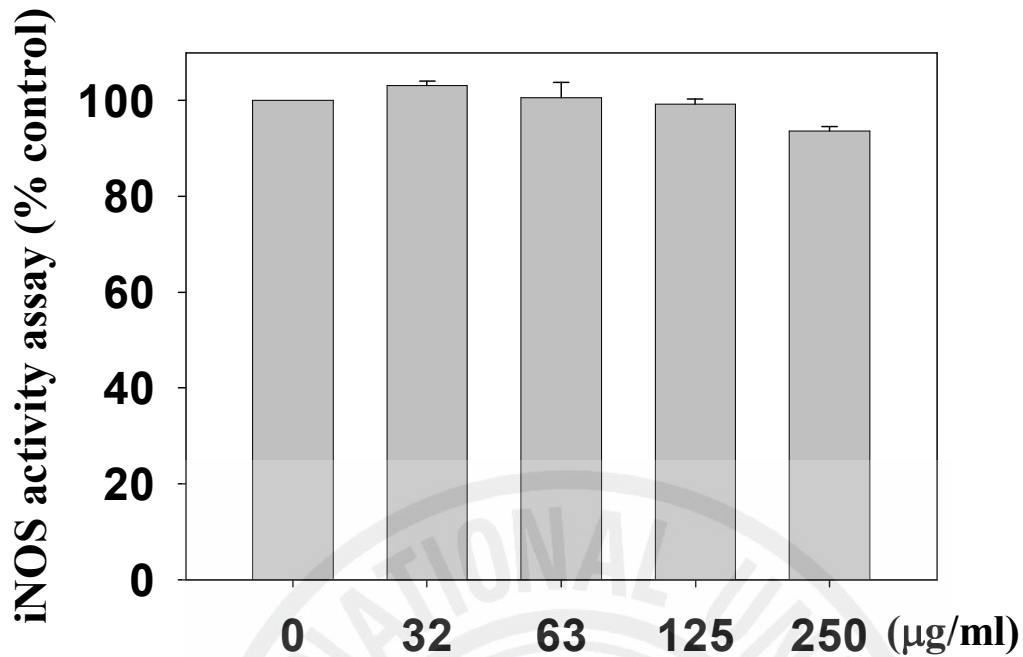


Figure 5. Effect of EtOAc fraction on iNOS enzyme activity. The iNOS activity was measured as using L-arginine as substrate and NADPH-dependent generation of nitrite, the stable oxidation products of NO. The assay was performed by incubating with 200 µg of the cytosol protein from LPS-stimulated cells, in the absence or presence of EtOAc fraction, for 180 min at room temperature in 200 µL reaction buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM NADPH, 2 mM L-arginine, 10 µM FAD. NO_3^- was reduced to NO_2^- by incubation at 37°C for 15 min with 0.1 U/mL nitrate reductase, 0.1 mM NADPH, 5 µM FAD.

2) PGE₂ 생성과 COX-2 발현 저해 활성

① PGE₂ 생성 저해 활성

RAW 264.7 세포에서 LPS (100 ng/ml)과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하여 생성된 PGE₂를 정량하였다. LPS 단독 처리하면 PGE₂ 생성이 현저하게 증가하였다(7,800 pg/ml). 그러나 EtOAc 분획물을 LPS와 동시처리하면 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 감소되었다 (Figure 6). 특히 EtOAc 분획물 125, 250 µg/ml 처리한 군에서 PGE₂ 농도는 각각 4,100, 900 pg/ml 까지 감소하였다.

② COX-2 단백질 발현 저해 활성

EtOAc 분획물의 PGE₂ 생성 저해 활성이 COX-2 단백질의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 immunoblot을 실시한 결과 LPS를 단독처리 하였을 때 COX-2 단백질 발현양은 증가하였고, EtOAc 분획물을 처리하였을 경우 COX-2 발현은 농도 의존적인 감소를 보였다. 또한, 발현양을 정량화하여 분석한 결과 EtOAc 분획물을 125 µg/ml을 처리한 군은 시료를 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 약 30% 정도의 단백질 발현량을 보여 주었다(Figure 7).

③ COX-2 mRNA 발현 저해 활성

COX-2 단백질 발현 감소가 mRNA 발현의 감소에 인한 것인지를 조사하기 위해 RT-PCR 방법을 이용하여 COX-2 mRNA 분석하였다. 농도 의존적으로 처리된 EtOAc 분획물에서 COX-2의 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였다. EtOAc 분획물을 63 µg/ml 처리하였을 때 COX-2의 mRNA 발현양은 LPS만을 처리한 실험군에 비해 약 55% 정도의 mRNA 발현율을 보였다 (Figure 8). 따라서 LPS로

자극된 RAW 264.7 세포에서의 EtOAc 분획물은 COX-2 유전자의 발현을 저해함으로써 PGE₂ 생성을 억제하는 것이라 사료된다.



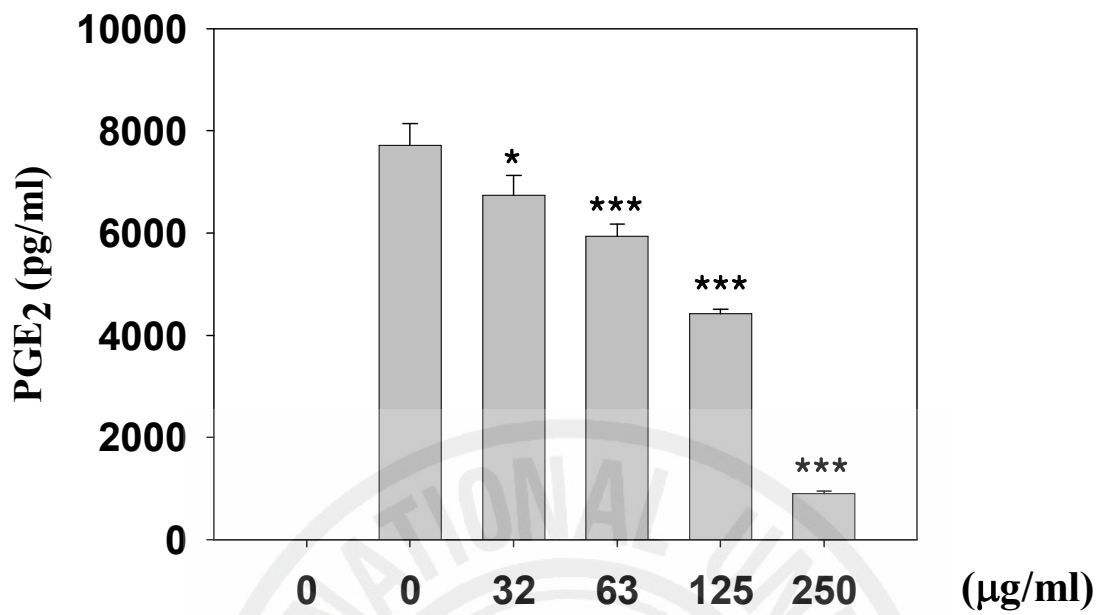
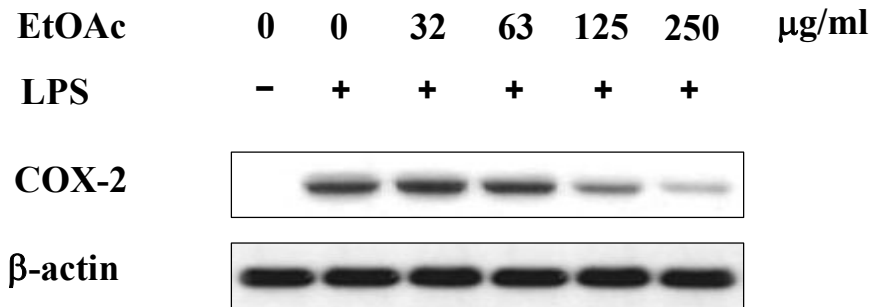


Figure 6. Effect of EtOAc fraction on the PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations (µg/ml) of EtOAc fraction for 24 h. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs LPS alone-treated cells.

(a)



(b)

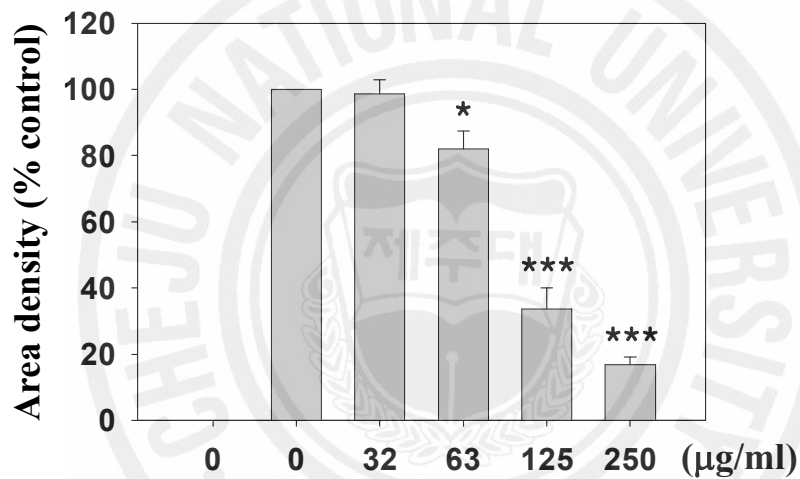
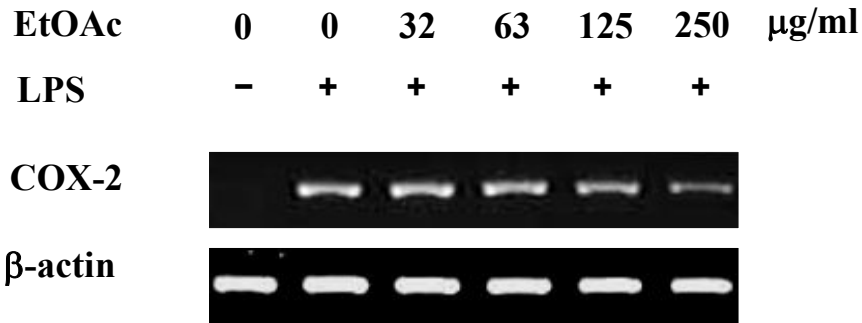


Figure 7. Effect of EtOAc fraction on the COX-2 protein expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) RAW 264.7 cells were incubated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations of EtOAc fraction for 24 h. (b) Quantification of COX-2 protein expression was performed by densitometric analysis of the western bolt analysis. The relative level was calculated as the ratio of COX-2 protein expression to β-actin protein expression. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs LPS alone-treated cells. Data are expressed in area density as the mean \pm S.E for three independent experiments.

(a)



(b)

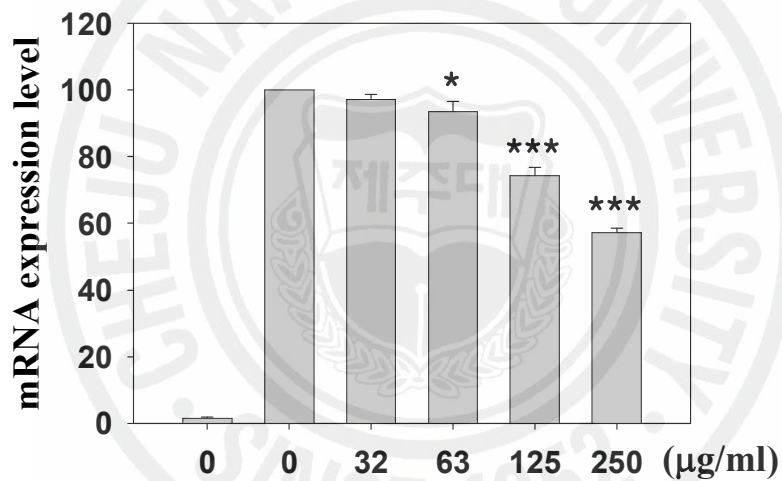


Figure 8. Effect of EtOAc fraction on the COX-2 mRNA expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) RT-PCR analysis of COX-2 mRNA expression using total RNA extracted RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS (100 ng/ml) alone or LPS with the indicated concentrations (μg/ml) of EtOAc fraction for 6 h. (b) Quantification of COX-2 mRNA expression was performed by densitometric analysis of the RT-PCR products. The relative level was calculated as the ratio of COX-2 mRNA expression to β-actin mRNA expression. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs LPS alone-treated cells.

3) Cytokine mRNA 발현 억제활성

RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine 인 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6의 mRNA 발현에 대한 EtOAc 분획물의 영향을 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 세포에 100 ng/ml LPS를 처리하였을 때 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α 의 mRNA 발현이 유도되었다. EtOAc 분획물을 LPS와 동시처리하면 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α mRNA 발현 모두 농도 의존적으로 감소하였다. 제주조릿대 EtOAc 분획물 125 μ g/ml 을 처리한 군은 LPS만을 단독 처리한 실험군에 비해서 IL-1 β 는 45%, IL-6는 40%, TNF-a는 55% 정도의 mRNA 발현 억제율을 나타내었다 (Figure 9).

3. NF κ B 전사활성화 및 ERK1/2 인산화에 미치는 영향

1) NF κ B 전사활성화 억제

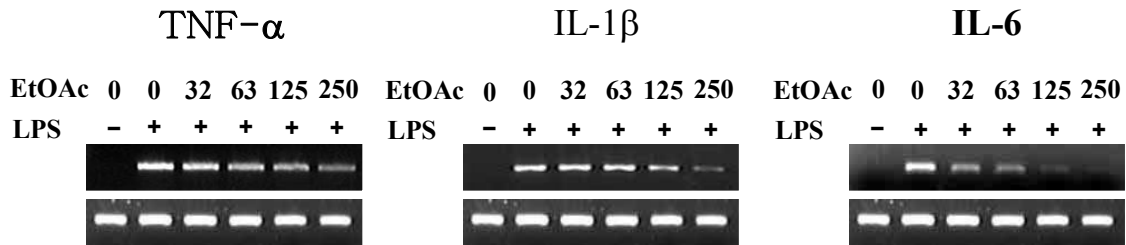
RAW 264.7 세포에서 EtOAc 분획물이 전사인자인 NF κ B 활성화에 미치는 영향을 luciferase assay 방법으로 분석하였다. LPS 단독 처리군에서 효소활성이 125,000 relative light units (RLU)를 나타내었고, EtOAc 분획물을 LPS와 동시 처리하면 농도 의존적으로 NF κ B의 전사활성을 억제하였다. EtOAc 분획물 125 μ g/ml처리군에서는 효소활성이 35,000 RLU까지 감소하였다. 그러나 250 μ g/ml EtOAc 분획물만 단독 처리한 군에서는 효소 활성이 12,000 RLU로 음성 대조군과 비슷한 수치를 나타내었다. 이는 RAW 264.7 세포에서 시료 자체에 의한 NF κ B 활성화는 일어나지 않음을 보여주는 결과이다 (Figure 10).

2) ERK1/2 인산화에 미치는 영향

제주조릿대 잎 EtOAc 분획물이 LPS (100 ng/ml)로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPK 인산화에 미치는 영향을 immunoblot 방법으로 조사하였다. EtOAc 분획물을 세포에 처리한 후 30분까지 phospho-p38과 phospho-JNK의 활성화에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그러나 phospho-ERK1/2 인 경우 시료 처리 후 24시간에서 농도 의존적인 감소 양상을 보여주었다 (Figure 11).



a)



b)

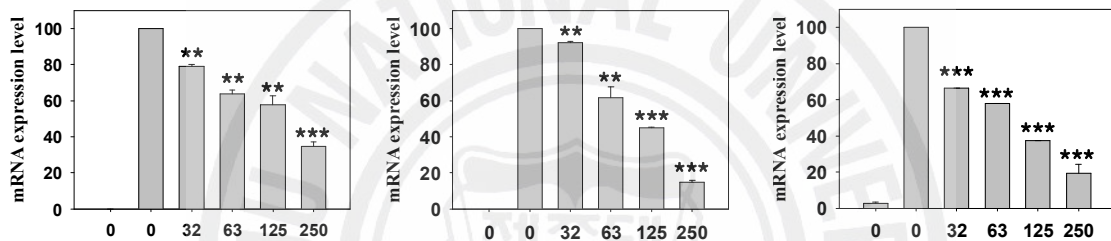


Figure 9. Effect of EtOAc fraction on TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNAs expression level in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) RT-PCR analysis of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression using total RNA extracted RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations (μ g/ml) of EtOAc fraction for 6 h (TNF-a for 4h). (b) Quantification of TNF-a, IL-1b and IL-6 mRNA expression was performed by densitometric analysis of the RT-PCR products. The relative level was calculated as the ratio of pro-inflammatory mRNA expression to β -actin mRNA expression. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs LPS alone-treated cells.

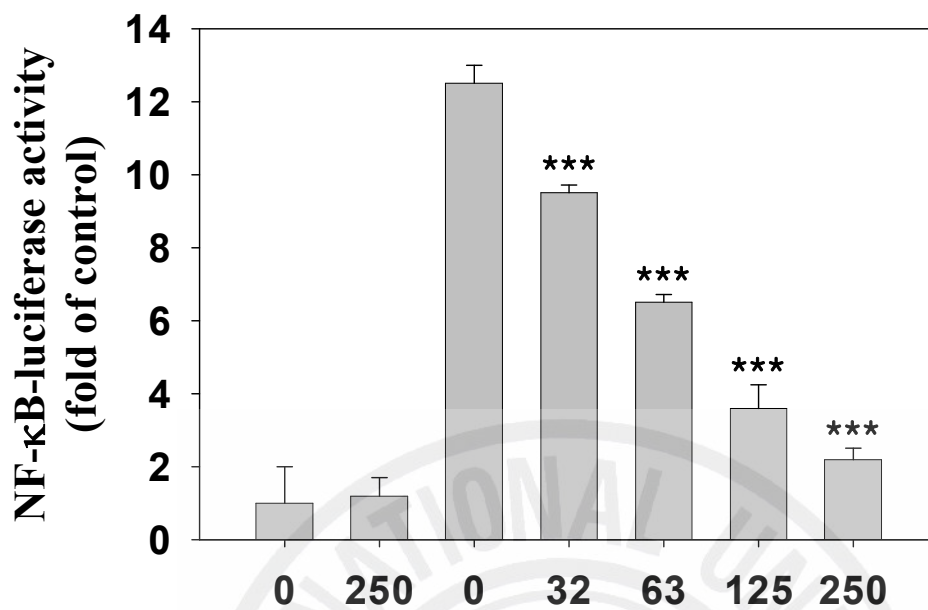


Figure 10. Effect of EtOAc fraction on LPS-induced NF-κB transcriptional activation.

Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations of EtOAc fraction for 24 h. NF-κB activation detected by luciferase reporter assays. *** $P < 0.001$ vs LPS alone-treated cells.

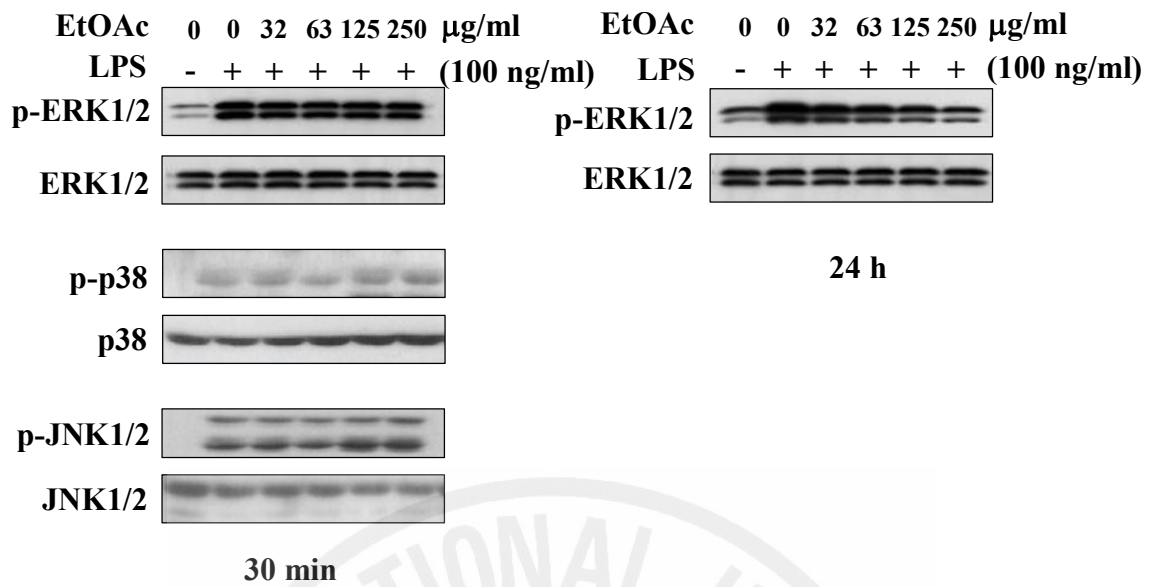


Figure 11. Effect of EtOAc fraction on the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentrations (μg/ml) of EtOAc fraction for 30 min or 24 h. The proteins level were determined by western blotting.

IV. 고 찰

본 연구에서는 제주조릿대 잎의 MeOH 추출물과 EtOAc 분획물의 항염활성 효과를 탐색하기 위하여 대식세포 모델을 이용하였다. 첫번째로 RAW 264.7 세포주에서 NO 활성과 세포독성간의 상대적 비교지수인 선택지수를 이용하여 탐색한 결과 EtOAc 분획물이 6.8로 가장 높은 상대적 NO 억제활성을 보였다(Table 2). 이런 1차적 탐색 결과를 기초로 하여 대식세포에서 NO 활성에 관여하는 인자의 상관관계를 분석하고자 iNOS 발현변화를 NO 활성과 비교 분석하였다.

NO는 대식세포에서 iNOS에 의해 L-아르기닌으로부터 만들어지며 과도한 양을 만들어서 염증 등을 유발한다(Stuehr 등, 1991). EtOAc 분획물의 NO 감소(Figure 2)가 iNOS 단백질 감소에 의한 것임을 확인한 결과, EtOAc 분획물을 처리한 RAW 264.7 세포주에서 iNOS 단백질이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 3). 또한 iNOS 단백질의 억제가 mRNA의 감소로 인한 것인지를 조사하고자, RT-PCR을 통해 iNOS의 mRNA 발현을 조사한 결과, 단백질과 마찬가지로 농도 의존적인 mRNA 수준 감소를 볼 수 있었다(Figure 4).

RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 COX-2의 발현과도 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있으며(Salvemini 등, 1995), 또한 COX-2에 의해 만들어지는 PGE₂는 염증반응을 유발하고, 유방암, 결장암, 폐암, 뇌종양 등에 관련되어 있다고 보고되었다(Bennett 등, 1977; 1980; 1982; Rigas 등, 1993). EtOAc 분획물을 농도별로 처리하였을 때 유의적으로 COX-2의 단백질과 mRNA 발현을 억제하였다(Figure 7, 8). 또한 COX-2의 산물인 PGE₂도 유의적으로

감소시켰다(Figure 6).

염증반응에 있어서 TNF- α , IL-1 β , IL-6는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 서로 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 (Palsson-McDermott와 O'neill, 2004), LPS에 의한 대식세포의 활성화와 PGE₂ 및 NO 생성 과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Conti 등, 2004). iNOS와 COX-2의 단백질과 mRNA 발현 감소를 유발한 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물이 이들에 발현에 영향을 주는지를 조사하기 위해 LPS 처리 후 6시간과 4시간에서의 mRNA 발현 수준을 조사한 결과, TNF- α , IL-1 β , IL-6 모두가 농도 의존적인 감소를 보였다(Figure 9). TNF- α , IL-1 β , IL-6는 먼지나 석면 등으로 인한 폐의 염증 유발에 중요한 조절인자이며(Vanhee 등, 1995; Driscoll, 2000; Dorger과 Krombach, 2002; Mansour과 Levitz, 2002; Yucesoy 등, 2002), TNF- α 는 LPS 반응의 주요 매개체로 선천적 면역반응과 만성 염증성 반응에 관련되며 (Lee 등, 2003), IL-1 β 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 활성화에 관여한다고 알려져 있다(Delgado 등, 2003).

iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 각 유전자는 5'-promoter regions에 2개로 예상되는 NF κ B 결합서열(binding sequence)을 가지고 있으며(Cogswell, 1994), 이들 유전자들은 공히 NF κ B에 의해 조절된다고 알려져 있다(D'Acquisto 등, 1997; kojima 등, 2000). 본 연구에서 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물은 전사조절인자인 NF κ B의 전사활성을 감소시키는 효과를 보였다(Figure 10).

RAW 264.7 세포주는 LPS에 의해 ERK1/2가 활성화 된다고 알려져 있고(Jung 등, 2004), ERK1/2 활성화는 NF κ B의 소단위체인 p65의 Ser⁵³⁶을 인산화 시키며, COX-2의 발현을 유도한다(Hu 등, 2004). Luciferase assay 통해 EtOAc 분획물은 NF κ B의 전사활성을 억제하였다 (Figure 10). 이 과정에서 ERK가 관여하는지를 알아보기 위하여 phospho-ERK1/2의 활성을 확인한 결과(Figure 11), 처리 후

30분과 1시간에서는 인산화의 변화가 없었으나 24시간에서는 농도의존적으로 phospho-ERK1/2가 감소하였다. 이는 iNOS의 발현에 phospho-ERK1/2가 필요하다는 보고(Kyriakis, 1999; Jiang 등, 2001)에 대한 사실을 뒷받침해 주는 것으로 사료된다. 즉 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물은 phospho-ERK1/2의 활성화 상태 조절을 통해 NF κ B의 소단위체인 p65의 인산화를 억제하여 NF κ B 전사활성을 조절하는 것으로 사료된다. 선행 연구에 의하면 JNK는 인산화된 c-Jun에 의해 iNOS와 COX-2의 또 다른 전사인자인 AP-1의 전사활성을 촉진하는 것으로(Eferl과 Wagner, 2003), p38은 COX-2의 mRNA 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Wilnzen 등, 1999). 그러나 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물은 이들 JNK, p38 활성화에는 유의적인 영향을 주지 못하였다(Figure 11).

Azathioprine이라는 물질은 RAW 264.7 세포주에서 iNOS 단백질과 mRNA 발현의 감소와 더불어 iNOS 효소활성도 감소 시킨다는 보고가 있다(Moeslinger 등, 2006). 이에 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물이 iNOS 효소 활성화에 영향을 미치는지를 조사하였으나, iNOS 효소활성에는 유의적인 영향을 미치지 않았다(Figure 5).

Nakajima 등(2003)은 *Sasa veitchii* (Carr.)와 *Sasa borealis*에서(Yoon 등, 2000) trisin 배당체를 분리 보고 하였고, Tricin이 RAW 264.7 세포의 항염 활성화 효과를 보고 하였다 (Moscatelli 등, 2006). 제주조릿대 또한 같은 *Sasa* 속으로써 유사한 물질을 포함하고 있을 것으로 생각된다. 그러나 제주조릿대 잎 성분들에 대한 보고가 전무하기 때문에 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

결론적으로 본 연구를 통해 제주조릿대 잎 EtOAc 분획물은 NF κ B의 전사활성 억제와 ERK1/2 신호전달 경로를 통해 iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증매개 인자의 생성을 억제한다는 사실을 규명하였다. 그러나 EtOAc 분획물에 의한 RAW 264.7 세포주에서 NF κ B의 활성화 억제와 ERK1/2 신호경로가 어떤

기전에 의해 일어나는지 또한 EtOAc 분획물의 어떤 물질이 이런 항염활성을 갖는 지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보여진다.



V. 인 용 문 헌

김현철, 고정군 (2003) 한라산 식생유형별 제주조릿대의 생육특성에 따른 종 다양성의 변화. 조사연구보고서(2호), 한라산연구소, p97-110

김현철, 고정군 (2004) 한라산 식생유형별 제주조릿대 벌채 후 생육특성 및 종 다양성의 변화, 한라산연구소(3호) 71-90

동의학연구회 (1995) 동의대백과사전, 민중서림, p950

박시원 (2003) 조릿대 추출물의 HL60 세포와 L1210 세포에 대한 세포독성 및 활성산소 소거효소, 상명대학교 자연과학연구소, 1-21

박종희 (2004) 한국약초도감, 신일상사, 서울, p88

장일무 외(2002) 동양의학과학대전 2 권, 학술편수관, 서울, p72

장일무 외, (2002) 동양의학과학대전 1 권, 학술편수관, 서울, p380

Bennett A, Carroll MA, Stamford IF, Williams F (1982) Prostaglandins and human lung carcinomas. Br J Cancer 46: 888-893

Bennett A, Carter L, Stamford IF (1980) Prostaglandin-like material

extracted from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 41:
204-208

Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, Simpson JS, Stamford IF, Zebro T
(1977) Prostaglandins and breast cancer. *Lancet* 2: 624-626

Bennett A, Del Tacca M, Stamford IF, Zebro T (1977) Prostaglandins from
tumors of human large bowel. *Br J Surg* 35: 882-884

Cha YJ and Lee KJ (2002) Morphological and physiological characteristics of
dwarf bamboo (*Sasa borealis*) growing at different stand types of deciduous
forests after clearcutting in Mt. baekwoon, Jeollanam-do, Korea. *Jour
Korean For Soc* 91: 396-404

Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP,
Gray JG (1994) NF- κ B regulates IL-1 β transcription through a consensus
NF- κ B binding site and a nonconsensus CER-like site. *J Immunol* 153: 712-
723

Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T (2004) Cytokines and fever, *Front
Biosci.* 9: 1433-1449

Dörger M, Krombach F (2002) Response of alveolar macrophages to inhaled

particulates. *Eur Surg Res* 34: 47–52.

D'Acquisto F, Iuvine T, Rombola L, Sautebin L, DiRosa M, Carnuccio R (1997) Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophage. *FEBS Lett* 418: 175–178

Delgado AV, McManus AT, Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2 and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance. *P Neuropeptides* 37(6): 355–361

Driscoll KE (2000) TNF- α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol, Lett*, pp112–113, 177–183.

Eferl R, Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 859–68.

Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T (1990) Cytolytic mechanism of activated macrophage. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425–1431

Hu J, Nakano H, Sakurai H, Colburn NH (2004) Insufficient p65 phosphorylation

at S536 specifically contributes to the lack of NF- κ B activation and transformation in resistant JB6 cells. *Carcinogenesis* 25: 1991–2003.

Jiang B, Brecher P, Cohen RA (2001) Persistent activation of nuclear factor- κ B by interleukin-1 beta and subsequent inducible NO synthase expression requires extracellular signal-regulated kinase. *Arterioscler Thromb Vas* 21: 1915–1920

Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K (2000) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Junen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28: 217–226

Knowles RG and Mocada S (1992) Nitric oxide as signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399–402

Ko BS, Jun DW, Jang JS, Kim JH and Park SM (2006) Effect of *Sasa borealis* and white lotus roots and leaves on insulin action and secretion in vitro. *Korea J Food Sci Technol* 38: 114–120

Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M (2000) Lipopolysaccharide increases cyclooxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- κ B activation. *Oncogene* 19: 1225–1231

Kyriakis JM (1999) Making the connection : coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signaling modules to extracellular stimuli and biological responses. *Biochem Soc Symp* 64: 29-48

Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effect in I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British journal of pharmacology* 139: 11-20

Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee KY, Han JW, Lee HW (2000) Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406: 301-309

Lee MJ and Moon GS (2003) Antioxidative effects of Korean bamboo trees, Wang-dae, Som-dae, Maengjong-juk, Jolit-dae and O-juk. *Korea J Food Sci Technol* 35: 1226-1232

Mansour MK, Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5: 359-365.

McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA (1996) Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32

Moesliger T, Firedl R, Spieckermann PG (2006) Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by azathioprine in a macrophage cell line. *Life Sciences* 79: 374-381

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991) Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142

Moscatelli V, Hnatyszyn O, Acevedo C, Megias J, Alcaraz MJ, Ferraro G (2006) Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-inflammatory activity. *Planta Med* 72(1): 72-74.

Nakajima Y, Yun YS and Kunugi A (2003) Six new flavonolignans from *Sasa veitchii* (Carr.) Rehder. *Tetrahedron* 59: 8011-8015

Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666

Palsson-McDermott EM, and O'Neill LA (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162

Rigas B, Goldman IS, Levine L (1993) Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 122: 518-523

Shimizu T and Wolfe LS (1990) Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 55: 1

Stuehr HHJ, Kwon NS, Weise M, Nathan C (1991) Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase : and FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Natl Sci U.S.A.* 88: 7773-7777

Vanh'ee D, Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB (1995) Cytokines and cytokine network in silicosis and coal orkers' pneumoconiosis. *Eur Respir J* 8: 834-842.

Wang MJ, Huang HM, Chen HL, Kuo JS, Jeng KC (2001) Dehydroepiandrosterone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. *J Neurochem* 77: 830-838

Weisz A, Cicatiello L and Esumi H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma Bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316: 209-215

Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T and Huez G (1995) Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm* 46: 1-12

Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, et al. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18: 4969-4980.

Yoon KD, Kim CY, Huh H (2000) The flavone glycosides of *Sasa borealis*. *Kor J Pharmacogn* 31: 224-227

Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Simeonova P, Luster MI (2002) Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. *Mol Cell Biochem* 234-235

VI. 요약

제주조릿대 (*Sasa quepaertensis* Nakai) 는 제주도 한라산 일대에 광범위하게 자생하는 식물이다. Lipopolysaccharide(LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포주에서 제주조릿대의 잎의 전염증성 매개인자들에 대한 효과를 조사하여 건강을 위한 천연물질로서의 가능성에 대해 조사하였다. NO는 생명체에서 중요한 생체 매개인자이며, NADPH와 산소를 이용하여 L-arginine으로부터 생성된다. 그러나 과도한 NO 생성물은 세포독성을 나타낸다. 면역학적인 자극을 나타내는 사이토카인 혹은 박테리아는 iNOS을 활성화하고 높은 양의 NO는 NF κ B에 의해 생성된다. 제주조릿대 잎 에틸아세테이트 분획물은 NO와 PGE₂ 그리고 iNOS와 COX-2를 농도 의존적으로 저해하였다. 또한 전염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α 의 mRNA 수준도 농도 의존적으로 감소시켰다. 그리고 에틸아세테이트 분획물은 ERK1/2 MAP kinase의 인산화와 NF κ B 활성화 억제를 하였다. 이러한 결과는 제주조릿대 에틸아세테이트 분획물이 NF κ B의 전사활성 억제와 ERK1/2의 인산화를 저해함으로써 전염증성 매개인자들에 대한 억제를 나타내는 것으로 사료된다. 본 연구결과는 제주조릿대 잎 에틸아세테이트 분획물이 항염증제로써의 활용 가능성을 제시하였다.