천식 및 알레르기 제 32 권 제 2 호
Vol. 32, No. 2, Jun., 2012

□원 저□

Lipopolysaccharide로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 녹차세포수의 항염증 효과

[1]중앙대학교 의과대학 피부과학교실, [2]아모레퍼시픽 기술연구원

김민영[1] · 손인평[1] · 김소영[1] · 송이섭[1] · 장희경[2] · 유세진[2] · 백석윤[2] · 강학희[2] · 김범준[1]

Anti-inflammatory Effect of Green Tea Cell Water in Activated Raw 264.7 Cells with Lipopolysaccharide

Min Young Kim[1], In Pyeong Son[1], So Young Kim[1], Yi Sub Song[1], Hui Kyoung Chang[2], Se Jin Yoo[2], Seok Yun Baek[2], Hak Hee Kang[2] and Beom Joon Kim[1]

[1]Department of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, [2]Amore Pacific R&D Center, Yongin, Korea

Background: The biochemical properties of green tea extracts can generally be divided into 4 aspects: antioxidative, anticarcinogenic, anti-inflammatory and antiradiation activities. Green tea extracts have 20-fold more antioxidative activity than vitamin C and also have a wide range of anti-inflammatory activity. Therefore, it is presumed that it would play a role in the treatment of chronic inflammatory disorders. Pathophysiology of immunologic disorders involves overexpression of proinflammatory mediators, including nitric oxide (NO) and prostaglandin E_2 (PGE_2).
Methods: After the treatment of different concentrations for Green Tea Cell Water in lipopolysaccharide (LPS)-treated Raw 264.7 cells, the levels of NO and PGE_2 were measured in the media. Furthermore, we analyzed the expression levels of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), and phosphorylation of inhibitory kappa Bα using western blot.
Results: Green Tea Cell Water suppressed the LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in a concentration-dependent manner. Phosphorylation of the inhibitory-κB was also inhibited.
Conclusion: Our results suggest that Green Tea Cell Water may be a significant inflammatory factor and can be used a therapeutic modality in managing chronic inflammatory diseases. **(Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2012; 32:115-121)**

Key words: Green Tea Cell Water; Anti-inflammation; Nitric oxide; Prostaglandins; Raw 264.7

서 론

녹차는 동백나무과(*Theaceae*) 동백나무속(*Camellia*)의 식물로 그 잎을 우려내어 차의 형태로 오랫 동안 약용으로 음용되었다. 최근 많은 연구에서 녹차의 효과가 알려지면서 차의 성분과 그 약리 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다.[1)] 차 잎에는 카테킨과 플라보노이드 등의 폴리페놀 성분이 포함되어 있으며, 특히 플라보노이드가 가장 강력한 항산화 기능을 하는 것으로 알려져 있다.[2)] 또한 녹차 내의 페놀성 물질은 항암,[3)] 항알레르기,[4)] 심장질환 예방,[5)] 당뇨병 예방[6)]에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 그 중에서도 카테킨은 혈압강하,[7)] 혈소판응집저해활성,[8)] 항산화,[9,10)] liquid radical에 의한 DNA 손상을 억제하는 효능[11)]을 가지는 등의 다양한 생리활성이 연구되어 있다. 녹차와 관련된 연구는 과거 녹차 추출물에만 국한되어 있었으나 최근에는 녹차 추출물 이외에도 녹차세포수에 대한 관심이 점점 커지고 있다. 녹차 추출물과 녹차세포수가 가지는 대표적인 항염증기능은 면역세포의 활성을 조절하는 기전에 의해 발생한다고 알려져 있다.[12,13)]

대식세포 및 단핵구는 대표적인 면역세포인데, 외부에서 침입한 세균들에서 유래된 성분들이나 체내 다른 면역세포에서 분비한 사이토카인에 의해 활성화된다.[14)] 내독소로 잘 알려져 있으며 그람-음성균의 외막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)의 자극은 Raw 264.7과 같은 대식세포 또는 단핵구에서 tumor necrosis factor-α, interleukin (IL)-6, IL-1β와 같은 염증유도 사이토카인과 nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2)와 같은 염증성 매개물질을 분비시킨다. 이러한 염증성 매개물

책임저자 : 김범준, 서울시 동작구 흑석로 102
중앙대학교 의과대학 중앙대학교병원 피부과학교실,
우: 156-755
Tel: 02) 6299-1525, Fax: 02) 823-1049
E-mail: beomjoon@unitel.co.kr
투고일: 2012년 2월 13일, 심사일: 2012년 5월 21일
게재확정일: 2012년 5월 22일
Copyright ⓒ 2012 The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology

질은 효과적인 염증반응을 유도하며 생체나 조직에서 물리적이거나 화학적 물질에 의한 자극이나 세균 감염 등에 의한 다양한 기질 변화에 대응하기 위한 숙주의 방어작용으로 빠르게 활성화된다. 하지만 이러한 숙주에서의 면역반응이 적절하지 못할 경우, 특정 기능에 장애를 초래할 수 있는 염증성 질환이 발생할 수 있다.[15-19)]

포유 동물에서의 nitric oxide synthase (NOS)는 Type I, II, III의 3 종류가 화학적 성상에 따라 동종 효소로 나누어진다. Type I인 neuronal NOS, Type II인 endothelial NOS는 세포 내에 항상 존재하지만, Type III인 inducible NOS (iNOS)는 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 자극들에 노출되는 경우에만 발현된다.[20,21)] NO는 NOS 중 iNOS에 의한 생성이 절대적으로 많으며 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하고 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 가지고 있다.[22,23)] 염증상태에서의 과도한 NO 생성은 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다.[24,25)]

다른 염증인자인 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 나뉘어지는데, 이는 다양한 세포에서 다른 발현 경향을 나타낸다. COX-1은 정상적인 생체기능에 작용하지만, COX-2는 염증반응 부위에서 발현이 된다. COX-2에 의해 생성되는 PGE_2는 통증, 발열에 관여하는 염증 매개체로서 염증반응, 면역반응에 관여하고 혈관신생(angiogenesis)을 촉진시키는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.[26-29)] 이러한 proinflammatory gene들의 유도는 전사인자의 활성화에 의해 일어나게 되며, nuclear transcription factor-kappa-B (NF-κB)는 세포의 부착, 분화 및 염증반응에 관련된 유전자들의 발현에 중요한 역할을 하는 대표적인 전사인자이다. Inhibitory protein-κB (I-κB)와 복합체를 이루어 세포질 내에 존재하는 NF-κB는 활성화되면 I-κB가 인산화되고 분리되면서 시작된다. 활성화된 NF-κB는 핵 내로 전이되어 promoter region에 있는 κB 결합자리에 결합하여 여러 염증 매개물질의 전사를 촉진한다.[30,31)]

본 연구는 차의 효소를 불활성화시킨 생엽에서 분리한 즙액의 수분과 향기성분을 얻고 정제한 투명한 액체인 녹차세포수(*Green Tea Cell Water*)의 염증성 질환에 대한 활용 가능성을 확인하기 위하여 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에서 염증 작용에 영향을 주는 염증관련인자 PGE_2와 NO의 생성량을 확인하였으며 염증 반응이 일어날 때 세포 내에서 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF-κB와 phosphorylated IκBα (p-IκBα) 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 시료의 추출

실험에 사용한 녹차세포수는 아모레퍼시픽에서 제조, 공급 받아 사용하였다. 자세한 공정은 다음과 같다. 녹차는 제주 설록차 옥록2번을 사용하였으며, 차나무로부터 생엽을 채취한 즉시 증열 과정을 거쳐 차의 효소를 실활하였고 1차 조분쇄 과정을 한 다음 착즙액과 고형분으로 분리하였다. 이 과정에서 얻은 착즙액을 증류하여 증류액 분리를 하였고 특수 여과과정을 거친 후 살균과정까지 완료하여 최종산물을 추출하였다.

2. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)을 사용하였다. *Escherichia coli* LPS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sodium nitrite, Griess reagent, Phenylmethylsulfonylfluride는 Sigma Chemical Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, PGE_2 ELISA Kit는 R&D system Inc. (Minneapolis, MN, USA), COX-2, NF-κB p65 antibody는 Santa Cruz biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA), iNOS antibody는 BD biosciences (San Jose, CA, USA), p-IκBα antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), IκBα antibody는 Abcam (Cambridge, MA, USA)을 사용하였다.

3. 세포의 배양

Murine macrophage Raw 264.7 세포는 penicillin/streptomycin 100 unit/mL와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양했으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다. Raw 264.7 세포를 12 well plate에 각각 분주하고 24시간 배양한 후 serum free 배지로 교환하였다. 그 후 LPS 100 ng/mL와 interferon-gamma (IFN-γ) 10 ng/mL를 녹차세포수 50, 100, 200 μL/mL의 농도와 함께 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

4. 세포독성 측정

Raw 264.7 세포의 생존율을 측정하기 위해 MTT 분석법으로 세포독성을 측정하였다. 녹차세포수를 농도별로 처리하고 세포 배양 24시간이 지난 후 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 처리한 뒤 37°C 배양기에서 4시간 동안 추가 배양시켰다. 배양 후 상등액을 제거하고 MTT 환원에 의해 형성된 formazan에 DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 ELISA microplate

reader (SoftMax Pro5, Molecular Devices, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. NO와 PGE_2 생성 저해능 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess reagent를 이용하여 세포 배양액 중 존재하는 NO_2의 형태로 측정하였다. Raw 264.7 세포를 12 well plate에 접종하고, 녹차세포수 50, 100, 200 μL/mL 농도와 LPS 100 ng/mL, IFN-γ 10 ng/mL를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액과 Griess reagent를 1 : 1로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

PGE_2의 측정은 세포배양액을 취해 PGE_2 ELISA Kit를 사용하여 R&D kit의 지시에 따라 정량하였다.

6. Immunoblot analysis

Raw 264.7 세포에 24시간 전 배양을 하고, LPS와 IFN-γ와 함께 녹차세포수를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 처리한 세포 및 대조군을 수집하여 SDS-PAGE 분석방법을 통해 단백질 분석을 수행하였다. 세포를 2~3회 Hank's Buffered Salt Solution로 세척 후 완충용액을 사용하여 세포를 용해시킨 후, 세포용해액을 15,000 RPM으로 4°C에서 30분 동안 원심분리하였고 잔해 물질을 제거한 뒤 상등액인 단백질 추출액을 얻었다. 단백질을 Bio-Rad 시약으로 정량하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 PVDF membrane으로 gel의 단백질을 blot시켰다. 5% skim milk로 blocking 후 iNOS, COX-2, (p)-IκBα와 IκBα 1차 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 rabbit, goat와 mouse secondary antibody를 반응시키고 ECL detection reagents (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

7. 통계학적 분석

실험치의 값은 mean±standard deviation으로 그래프를 표시하였으며 Students t-test를 시행하여 $P<0.05$ 미만의 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 각 데이터는 n=3으로 진행한 독립 실험을 세 번 실시하여 얻어진 값을 평균±표준편차(mean±standard error of the mean)로 나타냈다.

결 과

1. 녹차세포수의 Raw 264.7 세포에 대한 독성

Raw 264.7 세포에 대한 녹차세포수의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT 분석법을 수행하였다. 녹차세포수를 50, 100, 200 μL/mL의 농도로 처리하여 24시간 후에 세포 생존율을 확인한 결과 녹차세포수에 대해 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

2. 녹차세포수의 NO 생성 억제 효과

녹차세포수가 항염증효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 녹차세포수가 Raw 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포에 LPS와 IFN-γ를 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 NO 생성이 증가하였으며, 이에 200 μL/mL 녹차세포수를 처리한 실험군에서는 통계적으로 유의하게 NO 생성이 감소하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

3. 녹차세포수의 PGE_2 생성 억제 효과

녹차세포수가 항염증효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 ELISA kit를 이용하여 PGE_2 생성억제효과를 측정하였다. 본 실험에서 LPS에 의해 Raw 264.7 세포에서 PGE_2의 생성이 뚜렷하게 증가하였으며 녹차세포수를 처리한 군과 LPS와 IFN-γ를 처리한 군을 비교하였을 때 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 녹차세포수의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 저해 효과

녹차세포수에 의한 염증인자 NO와 PGE_2의 억제와 iNOS와 COX-2 단백질 발현의 상관성을 알아보기 위하여 immunoblot analysis를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS와 COX-2 발현을 확인하였다. LPS와 IFN-γ에 의해 iNOS의 발현이 뚜렷하게 증가하였으며, 녹차세포수의 농도가 증가할수록 iNOS의 발현이 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었

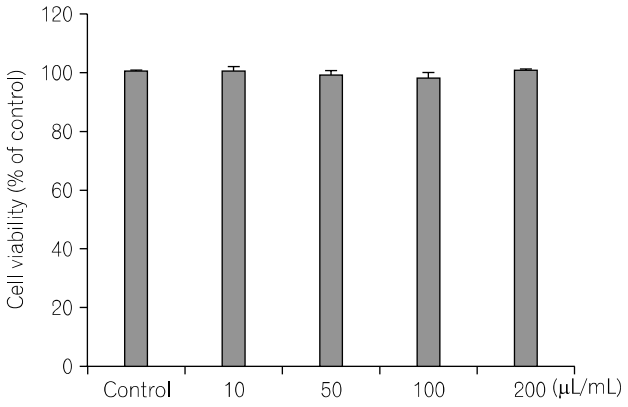


Fig. 1. The cytotoxicity of Green Tea Cell Water on Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with different concentrations of Green Tea Cell Water for 24 hours. Cell viability was determined using the 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay.

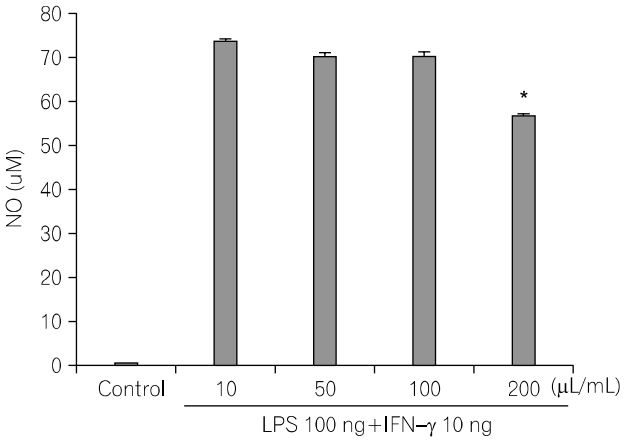


Fig. 2. Inhibitory effect of Green Tea Cell Water on lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ)-induced nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 Cells. Raw 264.7 Cells were treated with LPS (100 ng/mL), IFN-γ (10 ng/mL) and different concentrations (50, 100, 200 μL/mL) of Green Tea Cell Water. After it was incubated for 24 hours, NO synthesis in the supernatant was measured by Griess reagent as described in Material and Methods. Values represent mean±standard deviation of three independent experiments (*P<0.005).

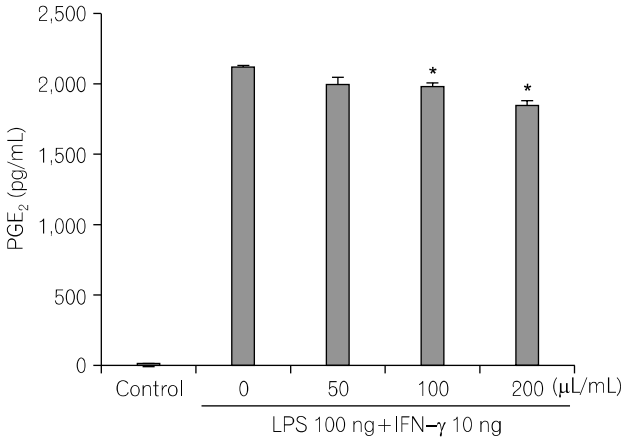


Fig. 3. Inhibitory effect of Green Tea Cell Water on lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ)-induced prostaglandin E_2 (PGE_2) production in Raw 264.7 Cells. When Green Tea Cell Water at different concentrations (50, 100, 200 μL/mL) added to LPS (100 ng/mL), IFN-γ (10 ng/mL)-activated Raw 264.7 Cells, production of PGE_2 in the cells was measured. Supernatants were then collected after 24 hours and PGE_2 concentration from supernatants was measured by R&D system, Inc. The experiment was performed as described in the menufacturer's instruction (*P<0.005).

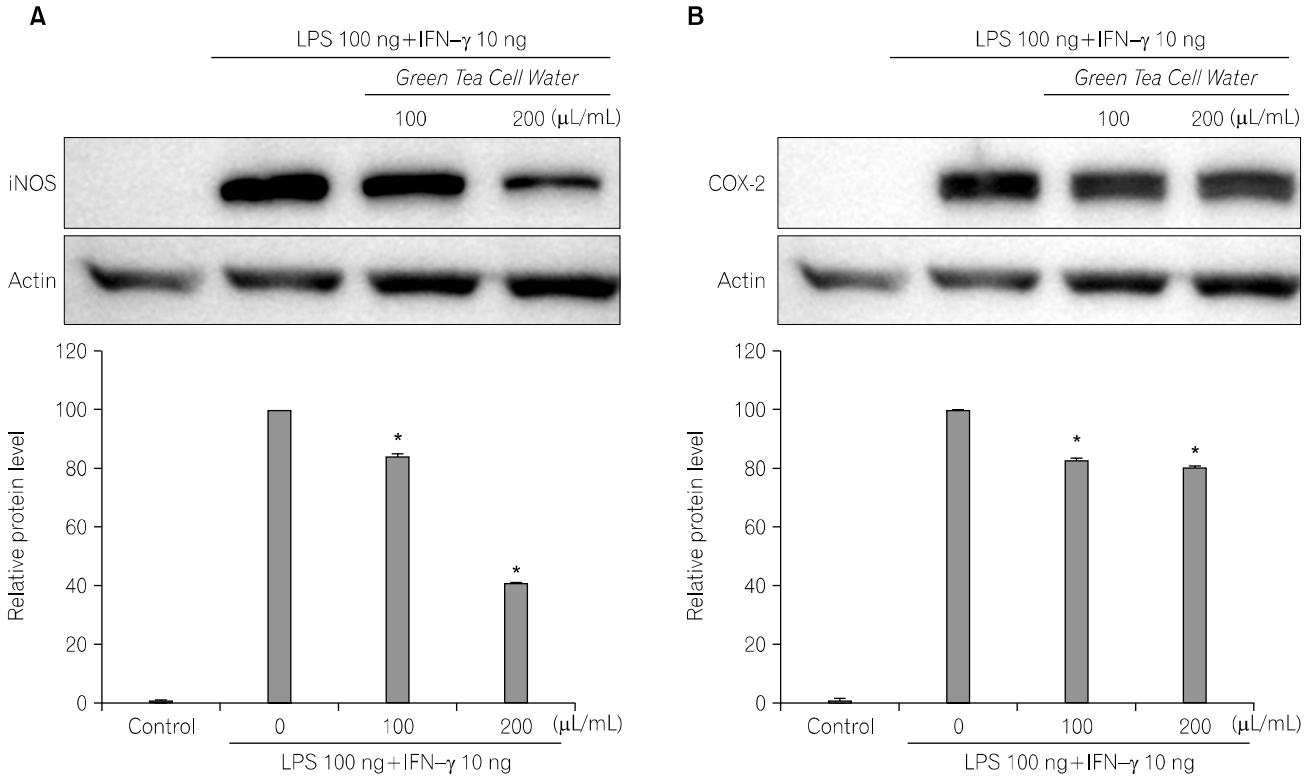


Fig. 4. Inhibitory effect of Green Tea Cell Water on lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ)-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expressions in Raw 264.7 Cells. Raw 264.7 Cells were treated with LPS (100 ng/mL), IFN-γ (10 ng/mL) and defferent concentrations (50, 100, 200 μL/mL) of Green Tea Cell Water at the same times. (A) iNOS protein expression and (B) COX-2 protein expression were determined using immunoblotting method. *P<0.05 represent significant difference compared to LPS-treated group.

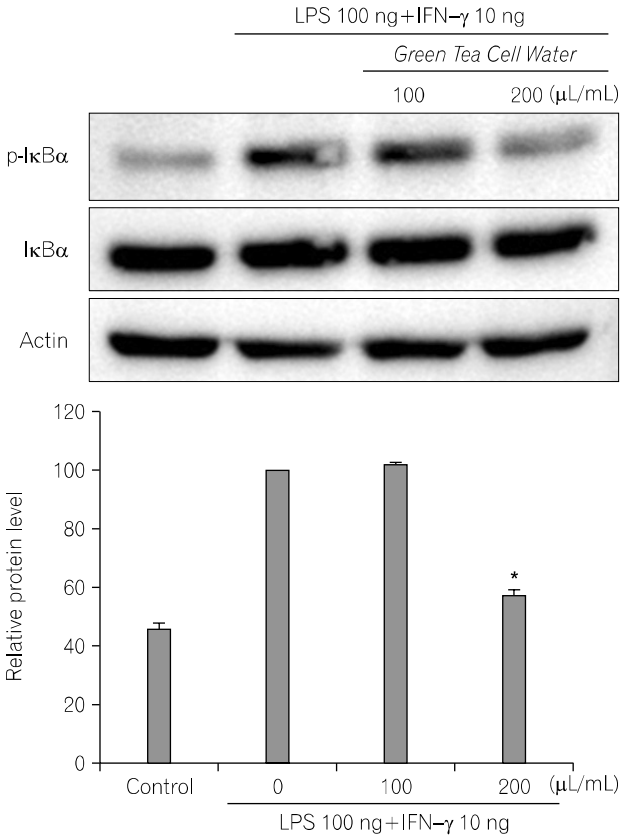


Fig. 5. Inhibitory effect of Green Tea Cell Water on lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (IFN-γ)-induced phosphorylation of inhibitory protein-κB α (IκBα) in Raw 264.7 Cells. Raw 264.7 Cells were pre-incubated for 10 minutes with indicated concentration of Green Tea Cell Water and activated for 15 minutes by LPS (100 ng/mL) and IFN-γ (10 ng/mL). Phosphorylation of IκBα expression were determined using immunoblotting method. p-IκBα = phosphorylated IκBα. *$P<0.05$ represent significant difference compared to LPS-treated group.

다(Fig. 4A). COX-2의 단백질 발현은 LPS와 IFN-γ 처리 시에 COX-2의 발현이 뚜렷하게 증가하였고, 녹차세포수를 처리한 실험군에서 COX-2 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

5. 녹차세포수의 IκBα 인산화 억제 효과

녹차세포수를 LPS와 IFN-γ에 의해 유도된 Raw 264.7 세포에 처리하여 IκBα의 인산화를 Western blot으로 확인하였다. LPS와 IFN-γ에 의해 자극된 15분 배양 대조군에서 IκBα의 인산화가 되었음을 확인하였고, 200 μL/mL의 녹차세포수를 처리하였을 때 15분 배양 실험군에서 IκBα 인산화 과정의 저해경향을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

염증성 질환에서 스테로이드나 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 주된 치료제로 많이 사용되고 있다. 하지만 NSAID는 합병증으로 위벽을 자극하여 위벽 두께를 감소시키기 때문에 위장관의 상부는 물론 하부에도 오히려 염증을 유발시킬 수도 있다. 또한 이러한 NSAID는 만성 염증성 질환의 경우 장기간 고용량으로 사용해야 하는 경우가 많아서 급성 염증성 질환에 비해 부작용 발생률이 높다. 따라서 최근 이러한 제제들을 대체할 수 있는 성분을 개발하기 위한 노력의 일환으로 biologics들이 출시되었으나 기존 NSAID에 비해 약제 비용이 수백 배에서 수천 배 가량 높아 아직까지 널리 처방되지는 못하고 있다. 그러나 최근에는 각종 천연물로부터 유효 성분을 얻으려는 시도가 계속되고 있고, 천연식물을 이용한 식이요법이나 건강보조식품의 중요성이 상대적으로 높아지면서 점차 천연물에 대한 관심 또한 늘어나고 있다.[32,33]

대식세포는 면역반응에서 매우 중요한 역할을 하며 NO, PGE_2 그리고 pro-inflammatory cytokines을 포함한 다양한 염증매개물질을 조절한다.[34] 이 중 NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginin으로부터 생성되고 염증반응을 조절하는 인자 중 하나로 알려져 있으며 혈관확장, 신경전달체계, 항균물질, 면역조절 등 생체 내 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.[35-37] 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다.[38,39] 이러한 사실에 기초하여 녹차세포수가 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성 저해를 확인하기 위하여 녹차세포수를 농도별로 세포에 처리하여 생성되는 NO의 양을 측정한 결과 LPS와 IFN-γ를 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 NO 생성이 증가하였으며, 녹차세포수를 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 유의하게 NO 생성을 저해하였다(Fig. 2). 이 결과와 동일한 농도로 녹차세포수를 처리하고 24시간 후 세포독성을 확인한 결과 실험 농도 내에서 세포독성이 없었으며(Fig. 1), NO 생성 저해가 세포독성으로 인한 저해가 아님을 확인함으로써 세포 생존율에 비교하여 NO에 대하여 통계적으로 유의한 생성억제를 나타냈음을 확인할 수 있었다. 또한 Western blot으로 분석한 결과 LPS와 IFN-γ를 처리한 경우 대조군에서 iNOS 단백질 발현이 명확하게 증가되었으나, 녹차세포수를 처리한 실험군에서 iNOS 단백질 발현이 농도에 따라 감소하였다(Fig. 4). 녹차세포수의 의한 iNOS 단백질 발현억제는 NO 형성 억제와 유사한 경향을 나타냄으로써 NO 형성억제는 iNOS 단백질 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다.

COX는 중요한 생물학적 매개체인 prostaglandins, prostacyclin, thromboxans 등을 포함하는 prostanoids 형성에 관여하는 효소로써 COX-2는 염증반응 부위에서 염증반응을 매개하는 prostaglandin 합성에 관여한다. 다수의 항염증제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성억제를 나타내며 이는 COX-2의 생성 및 활성저해에 의한 것이다.[40] 본 연구에서는 Raw 264.7 세포에서 LPS와 IFN-γ에 의해 생성되는 PGE_2의 생성을 확인하였으며, 녹차세포수를 처리하였을 때 시료의 농도가 증가함에 따라 PGE_2의 생성이 통계적으로 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 Western blot을 이용하여 세포질 내에서의 COX-2 단백질 발현을 확인한 결과 LPS, IFN-γ, 녹차세포수를 동시에 처리하였을 때 COX-2 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 4). 이 결과로부터 PGE_2의 생성저해와 COX-2 발현저하가 유사한 경향을 보였으며, 이는 PGE_2 생성저해는 COX-2 발현저하 기전을 경유한 것임을 확인할 수 있었다.

여러 염증성 매개 물질들의 발현은 전사인자로 잘 알려진 NF-κB가 promoter에 작용하여 중요한 조절인자로 작용한다. 따라서 본 연구에서는 LPS와 IFN-γ로 유도된 Raw 264.7 세포에서 IκBα의 인산화 정도를 측정하여 NF-κB 전사인자가 핵 내로 전이되는 현상이 억제되는지에 대한 평가를 확인하였다. 이는 IκBα의 인산화가 NF-κB (p50/p65)의 핵 내 전이 과정에 있어서 필수적인 분자적 현상이라는 보고에 따른 것이다. 그 결과 LPS로 유도된 IκBα의 인산화 과정을 녹차세포수를 처리하였을 때 억제하는 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과로 보아 녹차세포수가 Raw 264.7 세포에서 IκBα의 인산화를 억제시킴으로써 NF-κB 유전자가 전사를 위한 활성화를 감소시키고 NO와 PGE_2의 생성저해에 영향을 주었을 것이라 생각한다.

이러한 연구결과를 통하여 녹차세포수가 LPS와 IFN-γ로 유도된 염증모델에서 NO, PGE_2 생성 및 iNOS, COX-2 단백질 발현저해 및 IκBα의 인산화 과정을 억제시킴으로써 유의한 항염증 효과가 있다는 것을 확인하였다.

결 론

녹차세포수는 기존의 녹차 추출물이 가지고 있는 항염증기능과 항산화기능의 기전이 유사함을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다. 녹차세포수는 녹차 추출물에 비해 경제성이 높기 때문에 대량생산이 용이하고, 기존에 잘 사용하지 않는 소재를 활용한다는 측면에서 천연물 소재의 이용률을 높일 수 있을 것으로 기대한다. 향후에는 기존에 녹차 추출물이 가지고 있는 다양한 효능들에 대한 녹차세포수와의 비교평가를 시행하여 효능과 안전성에 관한 자료를 더 확보해야 할 것으로 생각한다. 또한 녹차 추출물이 가지는 다양한 생리학적 활성에 대해서 녹차세포수도 이러한 활성을 가지는지 확인한다면 좀 더 다양한 연구주제들을 도출시켜 다양한 학문의 발전에도 이바지할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구의 녹차세포수를 기증해 주신 아모레퍼시픽 기술연구원 연구진들에게 무한한 감사를 드립니다. 본 연구는 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 지역산업기술 개발사업의 연구결과로 수행되었습니다(10MB3910).

참 고 문 헌

1) Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, et al. Green tea and cancer chemoprevention. Mutat Res. 1999;428:339-44.
2) Sato T, Miyata G. The nutraceutical benefit, part I: green tea. Nutrition. 2000;16:315-7.
3) Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, et al. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. Prev Med. 1992;21:370-6.
4) Sato T, Miyata G. The nutraceutical benefit, part iv: garlic. Nutrition. 2000;16:787-8.
5) Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. J Ethnopharmacol. 2002;83:109-16.
6) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1986;32:613-22.
7) Hara Y, Matsuzaki T, Suzuki T. Angiotensin 1 converting enzyme inhibiting activity of tea component. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 1987;61:803-8.
8) Yayabe F, Kinugasa H, Takeo T. A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 1989;63:845-7.
9) Yobimoto K, Matsumoto K, Huong NT, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. Suppressive effects of vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain. Pharmacol Biochem Behav. 2000;66:661-5.
10) Matsuzaki T, Hara Y. Antioxidative activity of tea leaf catechins. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 1985;59:129-34.
11) Hiramoto K, Ojima N, Sako K, Kikugawa K. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. Biol Pharm Bull. 1996;19:558-63.
12) Singh R, Akhtar N, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. Life Sci. 2010;

86:907-18.
13) Kürbitz C, Heise D, Redmer T, Goumas F, Arlt A, Lemke J, et al. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. Cancer Sci. 2011;102:728-34.
14) Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005;4:607-18.
15) Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. FASEB J. 1991;5:2304-12.
16) Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283:G256-65.
17) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol. 2003;21:335-76.
18) Pae HO, Lee YC, Chung HT. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide: emerging therapeutic targets in inflammation and allergy. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2008;2:159-65.
19) Willoughby DA. Heberden Oration, 1974. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann Rheum Dis. 1975;34:471-8.
20) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6:3051-64.
21) Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol. 1996;10:291-316.
22) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43: 109-42.
23) Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. Biochem J. 1996;316:209-15.
24) McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J Exp Med. 1993;178:749-54.
25) Hippeli S, Elstner EF. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. Free Radic Res. 1999;31 Suppl:S81-7.
26) Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:3228-32.
27) Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, et al. harmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:12013-7.
28) Kim JY, Jung KS, Jeong HG. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS Lett. 2004;569:321-6.
29) Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:2046-50.
30) Pande V, Ramos MJ. NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. Curr Med Chem. 2005;12:357-74.
31) Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. Mol Cell Biol. 1999;19:4798-805.
32) Morita I, Schindler M, DeWitt D, Murota S, Smith W. A novel method for prostaglandin endoperoxide H synthase activity in individual intact cells. Adv Exp Med Biol. 1997;407:521-4.
33) Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. Gut. 2000;47:6-9.
34) Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, Van Dyke TE. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. Infect Immun. 2004;72:2312-20.
35) Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 2007;26:525-34.
36) Ignarro LJ. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. Adv Pharmacol. 1994;26:35-65.
37) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996;271: C1424-37.
38) Chae S, Kim JS, Kang KA, Bu HD, Lee Y, Hyun JW, et al. Antioxidant activity of jionoside D from Clerodendron trichotomum. Biol Pharm Bull. 2004;27:1504-8.
39) Arteel GE, Sies H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. FEBS Lett. 1999;462:167-70.
40) Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. Microsc Res Tech. 2003;60:64-9.