제주도 자생 제주아그배 (*Malus micromalus* Makino) 추출물의 항산화와 항염증 활성

이주엽 · 강민철 · 이정아 · 고광효 · 김봉석 · 한종헌 · 김세재[1] · 김기옥*

(재)제주하이테크산업진흥원 생물자원산업화지원센터, [1]제주대학교 자연과학대학 생명과학과

Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Ethanol Extract of *Malus micromalus* Makino in Jeju Island

Ju-Yeop Lee, Min-Chul Kang, Jung-A Lee, Kwang-Hyo Ko, Bong-Seok Kim, Jong-Heon Han, Se Jae Kim[1], and Gi-Ok Kim*

Jeju Bio-Industry Development Center, Jeju Hi-tech Industry Development Institute, Jeju, 690-121, Korea, [1]Department of Life Science, College of Natural Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea.

Abstract The antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract of *Malus micromalus* were studied *in vitro*. Ethanol extract of *M. micromalus* showed scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and nitric oxide (NO) radicals. In addition, ethanol extract of *M. micromalus* inhibited the generation of superoxide anion (O_2^-) radical and uric acid by xanthine oxidase. We also investigated the effect of ethanol extract of *M. micromalus* on NO production in a lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells. Ethanol extract of *M. micromalus* significantly inhibited NO production and this inhibitory action was not due to the cytotoxicity. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) was markedly down-regulated by ethanol extract of *M. micromalus*. These results indicate that the inhibitory action of ethanol extract of *M. micromalus* on NO production in LPS-stimulated macropages might be due in part to abrogation of iNOS and COX-2 protein induction. Taken together, this study suggests that ethanol extract of *M. micromalus* could contribute to the chemoprevention and therapy of oxidative stress and inflammation.

Keywords: *Malus micromalus*, antioxidant, anti-inflammatory, nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2

서 론

천연물로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 질병에 대한 치료 및 예방제 또는 건강보조제로서 식물자원이 널리 이용되고 있다. 천연 항산화제로는 α-tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있는데, 이러한 항산화 효과가 있는 물질들은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성 물질이다. 식물 유래의 2차 대사산물들은 자유유리기 (free radical)와 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지한다는 것이 생체 실험결과 밝혀졌다(1-2). 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며(3), 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다(4). 천연물로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 질병에 대한 치료 및 예방제 또는 건강보조제로서 식물자원이 널리 이용되고 있다. 최근 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 염증질환과 류마티스관절염, 천식과 같은 만성 염증질환이 증가하

***Corresponding author**
Tel: +82-64-720-2333, Fax: +82-64-720-2331
e-mail: Kimgk350@jejuhidi.or.kr

는 추세이다. 염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다(5). 염증을 일으키는 요인 중에서 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonine, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관생성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발된다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등과 같은 질환의 요인이 되기도 한다(6). Nitric oxide (NO)는 NO synthases (NOSs)에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 생성되는 유리기로, 체내 방어 및 신호전달, 혈관 확장 등의 2차 신호전달자로서 다양한 생리기능을 가진다(7-10). NOSs는 물리화학적 성질에 따라 3종류의 동종 효소로 분류된다. 이 중에 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)는 세포에 지속적으로 존재하기 때문에 constitutive NOS로 분류되며(11), 상대적으로 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 등에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon-γ (INF-γ) 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α)등의 자극제들에 노출되는 경우에 발현되는 inducible NOS (iNOS)가 있다. iNOS에 의해 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(12-14). 그리고 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 생성은 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다(15-16). 제주아그배 (*Malus micromalus* Makino)는 개아그배나무 또는 좀아그배나무라고도 하며, 제주도 한라산록에서 자생하는 낙엽관목이고 5~6월에 개화하여 9월에 열매가 열리는 식물이다(17-18). 정원수나 가구재로 활용이 되고 있고 과실은 하리 (下痢) 치료에 효과가 있다고 알려져 있는 정도이며 그 생리활성에 대한 연구 보고는 없는 실정이다. 본 연구는 제주아그배가 기능성 생물 소재로서의 활용 가능성이 있는지를 평가하기 위하여 제주아그배 추출물의 다양한 생리활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

제주아그배 건조물을 마쇄기로 갈아서 70% 에탄올 (EtOH) 3 L에 침적하고, 실온에서 24시간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이렇게 얻어진 여액을 40℃에서 회전농축기를 이요 농축하여 70% 에탄올 추출물을 수득하였다. 그리고 제주아그배 70% 에탄올 추출물을 증류수 0.5 L에 현탁시킨 후에, 각각 핵산 (*n*-hexane, 0.5 L × 3), 에틸아세테이트 (EtOAc, 0.5 L × 3), 부탄올 (*n*-butanol, 0.5 L × 3), 물 (H_2O)을 순으로, 즉 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매분획하여 4개의 분획물을 얻었고, 각각의 분획물을 진공 동결건조하여 시료로 사용하였다(Fig. 1).

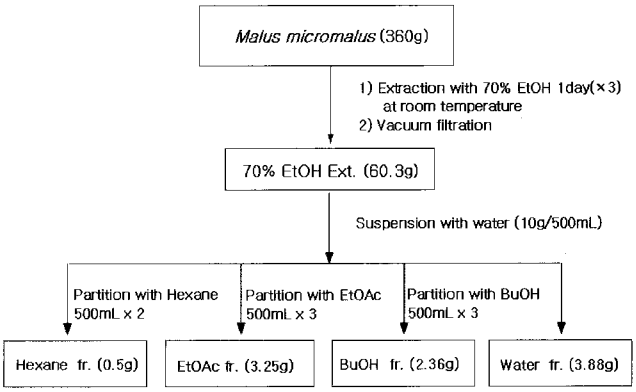

Fig. 1. Systematic purification of *Malus micromalus*

DPPH 자유유리기 소거 활성 측정

전자공여능 (electron donating ability) 측정은 Blosis(19) 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다. 즉, 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료 각각을 96 well plate에 100 μL씩 분주 하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA), trolox를 사용하였다.

Nitric oxide 소거 활성 측정

자연적으로 nitric oxide를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 nitric oxide 소거 활성을 검색하였다. 10 mM SNP 용액 100 μL에 시료를 농도별로 첨가하고 25℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess 시약 [2.5% (v/v) phosporic acid에 1% (w/v) sulfanilamide와 0.1% (w/v) naphylethylenediamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 잔존하는 아질산염 (nitrite)의 양으로 nitric oxide 소거 활성을 산출하였다.

Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성 측정

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, superoxide의 양은 nitroblue tetrazlium (NBT) 환원방법으로 560 nm에서 측정하였다. 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5)

100 μL에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다.

세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 uint/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin (GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

세포 독성 측정

시료가 세포의 생존율에 미치는 영향을 3-(4,5-dimehtylthiazol)-2,5-diphen yltetrazolium bromide (MTT)법에 의하여 측정하였다(20). RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/mL이 되게 준비하여 24시간 전 배양 후, 시료를 농도별로 처리하였다. 세포 배양 후 배양액을 제거하고 MTT (Sigma) 용액 500 μg/mL을 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 200 μL를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (μQuant, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 농도에 대한 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 독성 정도를 조사하였다.

Nitric oxide (NO) 정량

RAW264.7 세포를 1.0×10^5 cells/mL로 조절한 후 48 well plate에 넣고 18시간 전 배양을 하였다. 이 후 여러 가지 농도의 시료를 1시간 동안 전 처리한 후 LPS (100 ng/mL)를 가하여 24시간 내지 48시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess시약 100 μL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 standard로 비교하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 100 μL의 lysis buffer을 첨가, 30분~1시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 protein assay kit (Bio-Rad)를 사용하여 정량하였다. 30~50 μg의 단백질을 8~12% mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 15 V로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. 반응이 끝난 뒤 여러 가지 1차 항체 (1 : 500-1 : 2000)가 들어있는 5% skim milk에서 1시간 (25℃) 또는 24시간 (4℃)동안 반응시킨 후, TTBS로 3회 세척하고 2차 항체 (1:1000)와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

RNA 분리 및 RT-PCR

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 total RNA 추출은 TRIzol-reagent (Invitrogen)를 이용하여 분리하였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 Improm-II™ cDNA kit (Promega)를 이용하였고, 1 μL의 total RNA를 oligo (dT) 18 primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70℃ 5 min, 37℃ 5 min, 37℃ 60 min, 그리고 70℃에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 iNOS, COX-2, β-actin를 증폭시키기 위하여 2 μL cDNA, 4 μM의 5'과 3' primer, 10 × buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 최종 25 μL로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94℃/30초, 50~55℃/45초, 72℃/45초 20~25회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 1와 같다.

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'	
β-actin	Forward	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'	350
	Reverse	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'	

통계학적 분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험 결과이며, 이들의 평균 (mean)과 표준오차 (standard error, SE)를 산출하였으며, *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

제주아그배 추출물의 항산화 활성

제주아그배 에탄올 추출물 및 각각의 용매 분획물을 시료로 사용하여 DPPH 자유유리기 소거 활성을 측정한 결과, IC_{50} 값은 에탄올 추출물과 핵산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물에서 각각 16.1 μg/mL과 541.2 μg/mL, 1.23 μg/mL, 12.2 μg/mL, 80.9 μg/mL을 나타내었다(Table 2). 이 중 에틸아세테이트 분획물이 대조군인 butylated hydroxy anisole (BHA, IC_{50} = 4.1 μg/mL)와 Trolox (IC_{50} = 7.1 μg/mL) 보다 높은 활성을 보였다(Table 2). 제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물을 시료로 사용하여 NO 소거 활성을 산출하였다. NO 소거 활성의 IC_{50} 값은 에탄올 추출물과 핵산 분획물, 에틸아세테이트 분획물에서 각각 901.2 μg/mL과 861.5 μg/mL, 584.9 μg/mL을 나타내었고(Table 2), 부탄올과 물 분획물에서의 NO 소거 활성은 1 mg/mL에서 20~30% 정도를 나타냈다. 제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물의 xanthine oxidase 억제활성은 xanthine oxidase 억제제로 알려진 allopurinol을 양성 대조군으로 사용하여 비교하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물 모두 xanthine oxidase 억제활성을 보였고, 그 중 에탄올 추출물 (IC_{50} = 42.6 μg/mL)과 에틸아세테이트 분획물 (IC_{50} = 4.91 μg/mL)에서 높은 활성을 보였다(Table 2). 그리고 superoxide 소거활성 또한 제주아그배 에탄올 추출물 (IC_{50} = 2.7 μg/mL) 및 각 분획물에서 모두 억제활성을 보였고 그 중 에틸아세테이트 분획물 (IC_{50} = 0.61 μg/mL)에서는 양성 대조군 allopurinol (IC_{50} = 2.11 μg/mL) 보다 높은 활성을 보였다(Table 2). 따라서 제주아그배 추출물이 기존에 알려진 항산화 물질보다 활성이 좋은 유효성분을 포함하고 있을 것으로 사료된다.

제주아그배 추출물의 NO 생성 억제 활성

항산화 기능을 가지고 있는 녹차의 폴리페놀 (polyphenol) 성분, 상황추출물 (curcumin), 로즈마리 (rosemary : *Rosmarinus officinalis Linn*)등이 염증반응을 억제하는 항염증제로 사용되고, 이들 항염증제는 염증반응을 일으키는 활성 산소를 소거시키기도 한다(21-23). RAW 264.7 세포에서 제주아그배 에탄올 추출물과 그 분획물의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC_{50} 값과 50%의 세포독성을 나타내는 농도인 TC_{50} 값을 산출하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 100 ng/mL의 LPS와 제주 아그배 에탄올 추출물과 그 분획물을 50 μg/mL 농도로 처리하였을 때, LPS 단독 처리군에서 NO 생성량이 19.95 μM로 생성되었으나 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서 각각 NO 생성량이 3.57 μM, 0.74 μM로 현저히 감소한 것을 확인할 수 있다(Fig. 2). 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 같은 농도로 처리하였을 때 세포독성은 나타나지 않았다. 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서의 NO 생성 억제율에 대한 IC_{50} 값은 각각 16.7 μg/mL, 4.1 μg/mL 이었다(Table 3). 이러한 결과는 제주아그배의 유효성분 추출을 통한 항염증 물질 연구개발에 있어서 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

Table 3. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus* in RAW 264.7 cells

Malus micromalusin	TC_{50}[1] (μg/mL)	IC_{50}[2] (μg/mL)	Selectivity index[3]
EtOH extract	>50	16.7 ± 0.5	>2.9
Hexane fraction	>50	>50	>1
EtOAc fraction	>50	4.1 ± 0.8	>12.2
BuOH fraction	>50	>50	>1
Water fraction	>50	>50	>1

[1] TC_{50} is the concentration producing 50% toxicity in RAW 264.7 cells.
[2] IC_{50} is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.
[3] Selectivity Index = TC_{50} / IC_{50}.

Table 2. Antioxidant activities of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus*

Treatment	IC_{50} (μg/mL)[1]			
	DPPH radical scavenging activity	Nitric oxide scavenging activity	Xanthin oxidase inhibitory activity	
			Uric acid generation inhibitory	Superoxide generation inhibitory
Ethanol extract	16.12 ± 1.67	901.18 ± 74.61	42.55 ± 11.51	2.73 ± 0.26
Hexane fraction	541.29 ± 34.20	861.49 ± 35.00	278.07 ± 73.75	129.6 ± 5.76
EtOAc fraction	1.23 ± 0.26	584.95 ± 88.71	4.91 ± 0.11	0.61 ± 0.08
BuOH fraction	15.24 ± 0.76	>1000	96.95 ± 5.18	3.31 ± 0.21
Water fraction	80.93 ± 1.49	>1000	>1000	16.59 ± 0.47
Trolox	4.13 ± 1.10	>1000	N/A	N/A
BHA[2]	7.03 ± 1.21	>1000	N/A	N/A
Allopurinol	N/A	N/A	1.91 ± 0.21	2.11 ± 0.91

[1] IC_{50} values were calculated from regression lines using different concentration in triplicate experiments.
[2] Butylated hydroxyl anisole. N/A : Not assay.

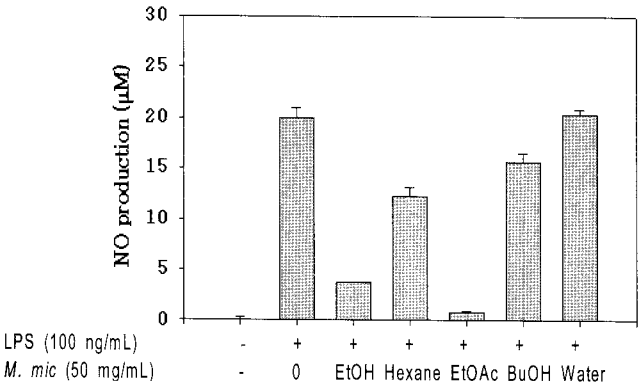

Fig. 2. Effects of solvent fractions of *Malus micromalus* on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/mL) stimulated by LPS (100 ng/mL) in the presence of testing samples (50 μg/mL). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ compared with LPS alone-treated cell.

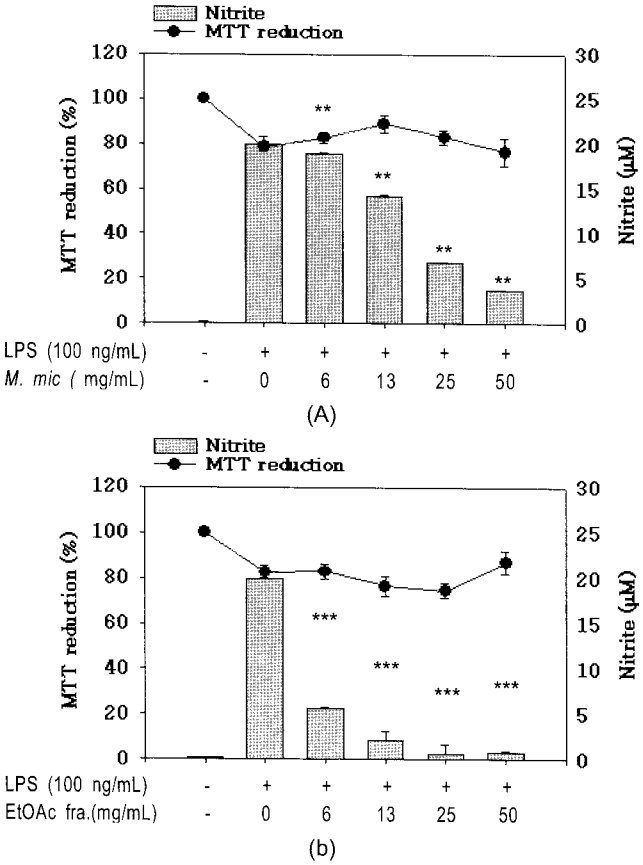

Fig. 3. Effects of *Malus micromalus* on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were treated with LPS (100 ng/mL) alone or LPS plus the indicated concentration of EtOH extract for 24h. (b) Cells were treated with LPS (100 ng/mL) alone or LPS plus the indicated concentration of EtOAc fraction for 24h. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p< 0.001$ compared with LPS alone-treated cell.

제주아그배 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA 발현 저해

RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 COX-2를 활성화하여 PGE_2와 같은 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(24-25). 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성 저해 활성이 iNOS와 COX-2 단백질의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 western blot과 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. LPS을 단독처리 하였을 때 iNOS 단백질 발현양이 증가하는 것을 확인하였으며, 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 단백질은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4). RT-PCR로 분석한 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 또한 농도 의존적인 감소를 나타냈다(Fig. 5). 에틸아세테이트 분획물을 50 μg/mL을 처리한 군에서 iNOS의 mRNA 발현양이 LPS만을 처리한 실험군에 비하여 약 80% 정도의 감소된 mRNA 발현양을 보였다. 이러한 결과로 대식세포에서 NO의 생성으로 인하여 활성화되는 COX-2의 단백질과 mRNA발현을 억제함으로써 COX-2의 활성으로부터 야기되는 염증의 심화반응을 억제 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

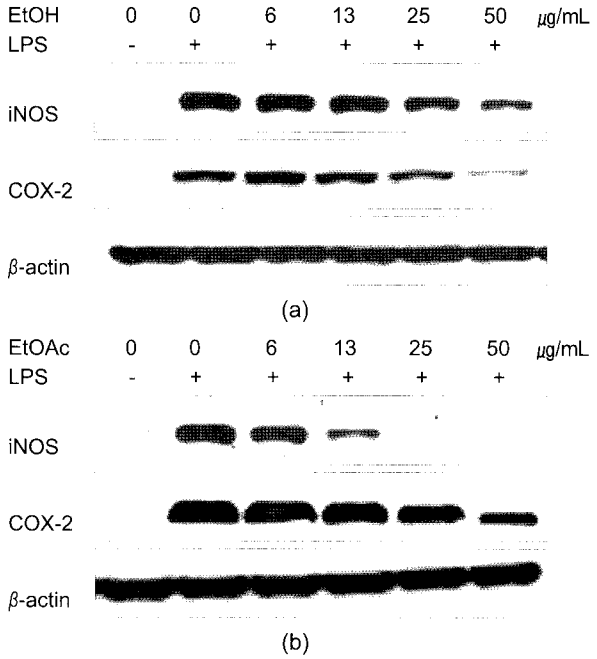

Fig. 4. Effects of *Malus micromalus* on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were pretreated with EtOH extract on for 1 h, and EtOH extract or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. (b) Cells were pretreated with EtOAc fraction on for 1 h, and EtOAc fraction or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. The cells were lysed, and the lysates were analyzed by western blot using an anti-iNOS or anti-COX-2 antibodies.

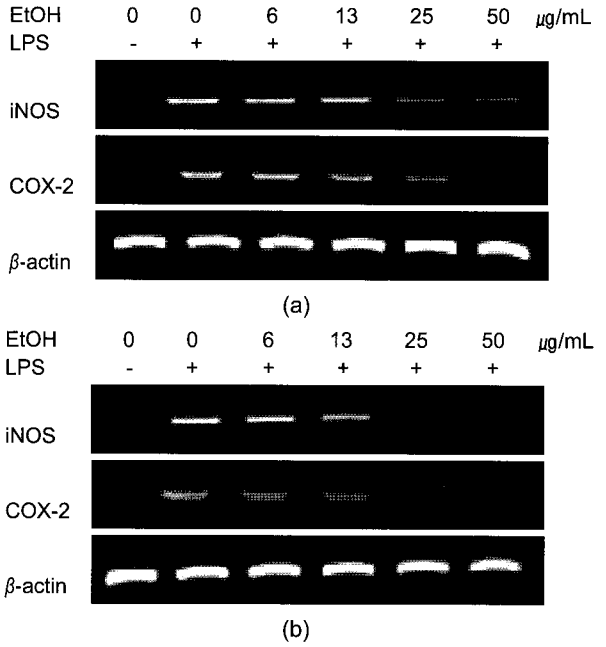

Fig. 5. Effects of *Malus micromalus* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were pretreated with EtOH extract for 1 h, and EtOH extract or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. (b) Cells were pretreated with EtOAc fraction for 1 h, and EtOAc fraction or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Total RNA was subjected to RT-PCR.

요 약

본 연구는 제주에 자생하고 있는 제주아그배의 생리활성, 즉 항산화 효과와 항염 효과를 알아보고자 수행하였다. 제주아그배의 항산화 활성을 측정하고자 비교 분석한 결과, 제주아그배 에탄올 추출물 (DPPH 소거활성 IC_{50} 값, 16.1 μg/mL; NO 소거활성 IC_{50} 값, 901.2 μg/mL; superoxide 소거활성 및 Xanthine oxidase 억제 활성 IC_{50} 값, 42.5 μg/mL, 2.7 μg/mL)은 좋은 항산화 활성을 보였고, 그 분획물 중에서는 에틸아세테이트 분획물이 항산화 활성 실험 모두에서 높은 소거활성을 나타내었다. 따라서 항산화 활성이 좋은 제주아그배의 추출물의 항염증 효과를 탐색하기 위하여 대식세포 모델을 이용하였다. LPS로 자극한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 NO 활성과 세포독성간의 상대적 비교지수인 선택지수를 이용하여 탐색한 결과 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 2.9와 12.2로 가장 높은 상대적 NO 생성 억제 활성을 보였다. 그리고 NO 생성 억제율에 대한 IC_{50} 값은 각각 16.7 μg/mL, 4.1 μg/mL으로 나타났다. 이런 결과를 기초로 하여 제주아그배의 에탄올 추출물의 NO 감소가 iNOS 단백질 감소에 의한 것임을 확인한 결과, 시료를 처리한 RAW 264.7 세포에서 iNOS 단백질이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 iNOS 단백질의 억제가 mRNA의 감소로 인한 것인지 조사하고자, RT-PCR을 통해 iNOS 의 mRNA 발현을 조사한 결과, 단백질과 마찬가지로 농도 의존적인 mRNA 발현 감소를 볼 수 있었다. 제주아그배의 에탄올 추출물을 농도 별로 처리하였을 때 유의적으로 COX-2 단백질과 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제하였다. 분획물 중에서는 NO 활성과 세포독성간의 상대적 비교지수인 선택지수가 높았던 에틸아세테이트 분획물이 에탄올 추출물보다도 NO, iNOS, COX-2의 억제 정도가 더 좋은 경향을 나타내었다.

접수 : 2009년 6월 25일, 게재승인 : 2009년 7월 27일

REFERENCES

1. Jeong, S. J., J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baeg (2004), Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 135-140.
2. Kang, I. H., J. H. Cha, J. H. Han, S. W. Lee, H. J. Kim, S. H. Kwon, I. H. Han, B. S. Hwang, and W. K. Whang (2005), Isolation of anti-oxidant from domestic crataegus pinnatifida bunge leaves, *Kor. J. Pharmacogn.* **36**, 121-128.
3. Pratt, D. E., M. T. Huang, S. T. Ho, and C. Y. Lee (1992), Phenolic compounds in food and their effects on health (Ⅱ), antioxidants and cancer prevention, Washington DC. p54-71.
4. Kim, E. C., S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row (2005), Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect, *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **16**, 348-353.
5. Kim, C. J. (1988), Pathophysiology. *Cultural History.* 47.
6. Willoughby, D. A. (1971), Human arthritis applied to animal models towards a better therapy, *Annals of the Rheumatic Diseases.* **34**, 471-478.
7. Knowles, R. G., and S. Mocada (1992), Nitric oxide as signal in blood vessels, *TIBS.* **17**, 399-402.
8. Monacada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs (1991), Nitric oxide : physiology, pathophysiology, snd pharmacology, *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
9. Nathan, C. (1992), Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
10. Palmer, R. M., D. S. Ashton, and S. Monacada (1988), Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature* **333**, 664-666.
11. Kawamata, H., H. Ochiai, N. Mantani, and K. Terasawa (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.
12. 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-α, IL-1β and IL-6 productions and NF-κB activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Intermational Immunopharmaxology.* **2**, 1173-1181.
13. Lee, H. J., Y. S. Jeong, S. Y. Ryu, and J. H. Ryu (1998), Inhition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells, *Yakhak Hoeji.* **42**, 540-543.
14. Lee, B. G., S. H. Kim, O. P. Zee, K. R. Lee, K. Y. Lee, J. W. Han, and H. W. Lee (2000), Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach, *Eur. J. Pharmacol.* **406**, 301-309.
15. Cerutti, P. A. (1994), Oxy-radicals and cancer, *Lancet* **344**, 862-863.
16. Scott, M. G., and R. E. Hancock (2000), Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system, *Rev Immunol.* **20**, 143-149.
17. Lee, Y. N., K. S. Lee, and Y. M. Sin (2001), Wild Plants of Jeju Island, *Yeomiji Botanical Garden*, 238.
18. Lee, T. B. (2003) Coloured flora of Korea, Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea., p572.
19. Blosis, M. S. (1958), Antioxidant determination by the use a stale free radical, *Nature* **26**, 1199-1200.
20. Mosmann. T. (1983), Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods.* **65**, 5-63.
21. Parahad, R., and K. K. Sanford (1998), Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells, *Anticancer Res.* **18**, 3263-3266.
22. Al-Sereiti, M. R., K. M. Abu-Amer, and P. Sen (1999), Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officin-alis Linn.) and its theraputic potentials, *Indian. J. Exp. Biol.* **37**, 124-130.
23. Kuttan, R., P. C. Sudheeran, and C. D. Josph (1987), Tumeric and curcumin as topical agents in cancer therapy, *Tumori.* **28**, 29-31.
24. Lee, H. J., Y. S. Jeong, S. Y. Ryu, and J. H. Ryu (1998), Inhition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells, *Yakhak Hoeji.* **42**, 540-543.
25. Bennett, A., T. M. Del, I. F. Stamford, and T. Zebro (1977), Prostaglandins from tumers of human large bowel, *Br. J. Surg.* **35**, 882-884.