

## 청시닥나무 수피 에탄올 추출물의 항염증 효과

이한나<sup>1\*</sup> · 김진규<sup>2\*</sup> · 권규택<sup>1</sup> · 심재훈<sup>1</sup> · 김종대<sup>3</sup> · 윤정한<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>한림대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>경기과학기술진흥원 천연물신약 연구소

<sup>3</sup>강원대학교 농업생명과학대학 식품생명공학과

## Anti-inflammatory Effects of Ethanol Extract from Bark of *Acer barbinerve* Maxim

Han Na Lee<sup>1\*</sup>, Jin Kyu Kim<sup>2\*</sup>, Gyoo Taik Kwon<sup>1</sup>, Jae-Hoon Shim<sup>1</sup>,  
Jong Dai Kim<sup>3</sup>, and Jung Han Yoon Park<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Gangwon-do 200-702, Korea

<sup>2</sup>Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science &  
Technology Promotion, Gyeonggi-do 433-766, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Science,  
Kangwon National University, Gangwon-do 200-701, Korea

### Abstract

*Acer barbinerve* Maxim belongs to the Aceraceae tree family and is often consumed as an Oriental medicine. In this study, we investigated whether or not ethanol extract from the bark of *A. barbinerve* Max. (EBA) inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in Raw264.7 macrophages. EBA was fractionated using n-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ethyl acetate (EtOAc), and water. Raw264.7 cells were treated with 20 µg/mL of EBA and the EBA fractions. EBA inhibited LPS-induced nitric oxide (NO) production. Among the three fractions, EtOAc fraction of EBA (EFEBA) was the most effective in inhibiting LPS-induced NO production without significant cytotoxicity in Raw264.7 cells. EFEBA further reduced LPS-induced expression of inducible NO synthase (iNOS) proteins and its corresponding mRNA. Additionally, EFEBA decreased the mRNA levels of interleukin (IL)-6, IL-1β, and tumor necrosis factor-α in LPS-treated Raw264.7 cells. Lastly, EFEBA inhibited LPS-induced degradation of the inhibitor of kappaBα (IκBα) as well as phosphorylation of p65 nuclear factor-κB (NF-κB). These results indicate that EFEBA exhibits strong anti-inflammatory effects and can be developed as a potential anti-inflammatory agent.

**Key words:** *Acer barbinerve* Maxim, nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, nuclear factor-κB

### 서 론

최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화로 노화를 지연시키거나 암, 심장 질환을 억제하는 효능을 보이는 기능성 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 특히 단백질 분해, DNA의 손상, 돌연변이를 유발하는 자유라디칼(2)을 제거하는 작용을 하는 항산화제는 발암(3), 심장병(4), 노화(5), 염증반응(6) 등의 문제들을 억제한다. 염증은 조직의 손상에 의한 면역 반응과 일반적인 생리적 현상이다. 손상된 부위에 면역세포들의 이동과 혈관의 투과성 및 혈류 공급이 증가된다. 염증반응 과정은 손상된 조직에서의 자극, 감염, 외상으로 인한 반응의 보호작용으로 나타난다(7,8). 염증반응은 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균감염에

대한 생체조직의 방어 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다(9). 그러나 급성염증이 치유되지 않고 만성으로 진행된 염증반응은 반대로 조직손상을 촉진하여 식도, 위, 대장, 방광, 전립선암을 포함한 진행도 유도한다고 보고되고 있다(10).

Nitric oxide(NO)는 아미노산인 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 합성된다. 활성화된 대식세포는 NO를 분비하여 상피세포의 상태 변화 및 DNA의 변이와 세포 사멸 및 괴사를 유도하여 암이나 동맥경화를 유도할 수 있다(11). NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS(iNOS)의 세 가지 형태가 있으며, 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다고 알려졌다(12). 일반적으로 iNOS에 의한 NO의 생성은 박

\*The first two authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: jyoona@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-248-2134, Fax: 82-33-256-0199

테리아를 죽이거나 중양을 제거하는 면역반응의 역할을 한다(13). 염증반응에서 iNOS는 중요한 역할을 하며, gram-negative bacteria 외막의 주요 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 iNOS 및 다양한 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등을 유도한다(14). 염증반응에서 중요한 역할을 하는 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor이다(15). NF- $\kappa$ B는 p50과 p65로 구성되어 핵 안으로 들어가 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성하며, 일반적으로 세포질에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 결합함으로써 NF- $\kappa$ B의 작용이 억제된다(16).

청시닥나무(*A. babrbinnerve*)는 단풍나무과의 낙엽 활엽 소교목으로 울릉도와 제주도를 제외한 대한민국 전역의 깊은 산에서 서식하며, 일본, 만주 등지에도 분포하고 있다. 높이는 10 m 정도까지 자라며 잎은 마주 나고 넓은 달걀 모양 또는 원형의 형태를 가지며, 민간에서는 나무껍질을 약용으로 쓰기도 한다(17). 청시닥나무 수피 EtOAc 분획물의 활성 성분으로는 methyl gallate와 이들의 배당체 화합물, catechin과 관련 유도체 화합물이 보고되었으며(18), 이들 성분은 항산화, 항균, mouse ear edema 모델에서의 항염증, 피부암 동물모델과 대장암세포에서의 항암 효능이 있는 것으로 보고되었다(19-23). 이러한 결과로 보면 청시닥나무 수피 EtOAc 분획물은 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 사료되나 이에 대한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 염증성 질환의 예방 및 치료제로서 청시닥나무의 이용 가능성을 밝히기 위하여 LPS로 염증반응을 유도한 Raw264.7 세포에서 청시닥나무 수피와 목질부의 에탄올 추출물의 항염증 효능을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Murin macrophage인 Raw264.7세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)은 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 등은 Cambrex Bio Technology(Biowhittaker, Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. LPS와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum(MTT),  $\beta$ -actin antibody는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, iNOS antibody는 BD Transduction Laboratories(Palo Alto, CA, USA)에서, anti-NF- $\kappa$ B p65(C-20) antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-NF- $\kappa$ B p65 antibody와 I $\kappa$ B $\alpha$  antibody는 Cell signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, Goat an-

ti-mouse IgG-h+I HRP conjugated와 Goat anti-Rabbit IgG-h+I HRP conjugated는 Bethyl Laboratories(Montgomery, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 시료의 추출 및 분리

청시닥나무 수피부와 목질부 각각 1 kg을 70% EtOH 용액에 약 3일간, 총 3회 반복 추출하였으며 추출액은 감압농축기로 농축하였다. 추출 수율은 수피부 10.2%, 목질부 3.0%였다. 얻어진 추출물은 물에 현탁하여 n-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 및 ethyl acetate로 순차 추출한 후 각각의 분획물을 동결 건조하여 수피부에서는 n-hexane(0.2%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(0.4%), EtOAc(4.4%) 및 H<sub>2</sub>O(5.2%)를 얻었으며 목질부에서는 EtOAc(0.4%) 및 H<sub>2</sub>O(0.6%)를 얻었다.

### 세포배양

Raw264.7 세포를 DMEM에 10% FBS, penicillin(100 U/mL) 및 streptomycin(100  $\mu$ g/mL)을 혼합한 배지를 사용하여 37°C의 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 접시바닥을 80~90% 정도 덮을 밀도로 자랐을 때 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 씻어낸 후 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

### 세포생존율(MTT assay)과 NO 생성량 측정

Raw264.7 세포를 24 well plate에 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 24시간 뒤, 1% FBS가 포함된 serum-deprivation medium(SDM)으로 12시간 이상 serum deprivation 하였다. 동일한 SDM에 LPS(1  $\mu$ g/mL)가 포함되지 않은 것 또는 포함한 배지에 청시닥나무 수피와 목질부에서 추출한 다양한 분획물을 24시간 처리하여 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로(24) 측정하였다. 청시닥나무의 수피와 목질부에서 추출한 분획물의 NO 생성 억제 능력을 조사하기 위해 위 실험의 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 Griess reagent system(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 제조사에서 제시한 방법대로 Griess 시약을 첨가하여 반응시킨 뒤 540 nm 파장에서 microplate reader(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다.

### 단백질 발현 양 측정

Raw264.7 세포를 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주하고 24시간 후, SDM으로 12시간 이상 serum deprivation 하였다. LPS를 포함하지 않거나 포함한 SDM에 EtOAc fraction of ethanol extract from the bark of *A. babrbinnerve* Max.(EFEBA)를 0, 5, 10, 20  $\mu$ g/mL의 농도로 처리한 뒤 다음의 방법(25)으로 cell lysate를 수행하였다. Total cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. Total cell lysate를 4~20% gradient sodium dodecyl sulfate poly-

acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기에 따라 분리한 후, polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% non-fat dry milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 1시간 동안 교반한 후 측정하고자 하는 항체(iNOS, I $\kappa$ B $\alpha$ , P-p65, p65,  $\beta$ -actin)를 각각 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 교반하였다. 그 후 anti-mouse 또는 anti-rabbit Goat anti-Rabbit IgG-h+I HRP conjugated antibody를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 단백질 밴드는 Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore)를 사용하여 가시화 하였다. 각각의 단백질의 발현량은 Image J(ver. 1.42, NIH Image, developed and maintained by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수치화 하였다.

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

세포를 여러 농도의 EFEBA로 처리한 후, total RNA를 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출하였고, 3  $\mu$ g의 total RNA에서 cDNA를 합성하기 위하여 oligo-(dT) primer와 SuperScript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다(24). iNOS, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  그리고 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 mRNA의 발현은 real-time RT-PCR 방법으로 Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000(Corbett Life Science, Sydney, Australia)을 이용해 cDNA를 증폭시켜 측정하였다(26). 측정하고자 하는 mRNA는 GAPDH로 수치를 정량화 하였고 Rotor-gene software(ver. 6, Corbett Life Science, Sydney, Australia)를 사용하여 계산하였다. 각각의 수치는 LPS control(1  $\mu$ g/mL LPS+0  $\mu$ g/mL EFEBA)을 100%의 기준으로 나타낸 것이다. iNOS primer는 Lam1 등(27)의 논문을, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 GAPDH는 Shin 등(28)의 논문을 참고하였다. mRNA primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 제작하였다.

#### 통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 mean $\pm$ SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis system) Windows v. 8.12 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군의 평균치간의 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

### 결과 및 고찰

청시닥나무 에탄올 추출물의 NO 생성 및 세포증식에 미치는 영향

대식세포는 염증유발과 관련된 주요 세포로 그람음성균

의 내독소로 알려진 LPS와 같은 외부자극에 의해서 prostaglandins(PGs)나 NO를 포함하는 다양한 염증유발인자를 방출하여 병리적인 반응을 일으킨다(29-31). NO는 신경전달과 혈관확장 등 생리적인 기능을 조절하는 중요한 역할을 하지만, 과발현된 NO는 혈관 투과성, 부종 그리고 염증을 심화시켜 조직을 손상시키고 암으로의 진행을 촉진한다(32,33). 따라서 본 연구에서는 대식세포인 Raw264.7 세포에 LPS로 염증반응을 유도시켜 청시닥나무 에탄올 추출물 중 염증반응을 억제하는 분획물을 찾고, 그 분획물이 염증관련 단백질 및 cytokine 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Raw 264.7 세포에 LPS와 청시닥나무 에탄올 추출물의 수피의 EtOAc, hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획과 목질부의 EtOAc, H<sub>2</sub>O 분획을 20  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 MTT assay 방법으로 세포 증식능을 확인한 결과, 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1A). 대식세포의 증식에는 아무런 영향을 주지 않았으므로 LPS와 청시닥나무 에탄올 추출물의 수피와 목질부를 24시간 처리한 배지에서 염증 시 분비되는 NO를 측정하였다. 그 결과 LPS 처리에 의해 증가한 NO의 분비가 목질부보다 수피부에서 감소하였고, 수피부에서는 EtOAc 분획이

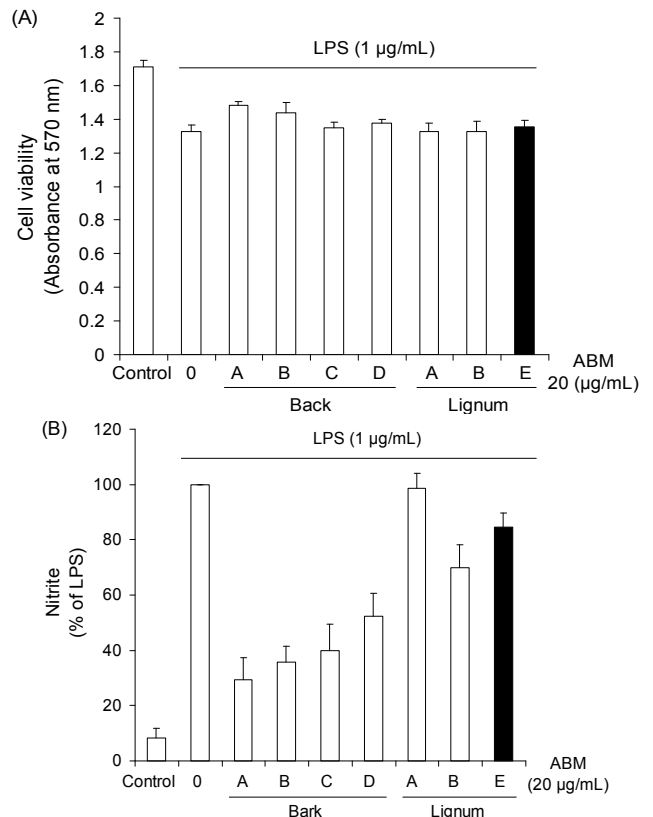


Fig. 1. *Acer barbinerve* Maxim (ABM) inhibits LPS-induced nitric oxide (NO) secretion in Raw264.7 cells. Serum-deprived Raw264.7 cells were treated with 20  $\mu$ g/mL of various fractions of ABM ethanol extract respectively. The cell viability (A) and NO productions (B) of these fractions were determined. A, ethanol extract; B, EtOAc fraction; C, hexane fraction; D, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction; E, H<sub>2</sub>O fraction. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=3). Means without the same letter differ, p<0.05.

가장 효과가 좋았다(Fig. 1B). 청시닥나무 수피 EtOAc 분획물의 주성분은 methyl gallate와 methyl gallate-4-O-β-D-glucoside로 보고된 바 있으며 특히, methyl gallate는 항염증 활성 성분으로 알려져 있어 이러한 성분이 청시닥나무 수피부 EtOAc 분획물의 항염증 활성과 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 생리활성에 대한 연구가 미진한 청시닥나무 수피부의 EtOAc 분획을 대상으로 다음과 같은 다양한 염증관련 활성 시험을 진행하였다.

EFEBAs의 NO 분비 및 iNOS 발현 억제 효과

iNOS는 LPS 및 염증성 cytokine에 의해 생성이 되면 다량의 NO를 생성하고, iNOS에 의해 생성된 NO는 다양한 자극을 통해 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(14). 앞의 실험에서 EFEBAs가 세포생존율에 영향을 미치지 않으면서 NO를 감소시키는 가장 효과적인 분획물임을 확인하였기 때문에 EFEBAs의 농도를 0, 5, 10, 20 μg/mL로 세분화하여 NO의 분비를 확인한 결과, EFEBAs의 처리에 의해 NO의 분비가 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2A). 그리고 NO의 분비 억제가 iNOS 단백질 발현 억제에 의한 것인지 조사하기 위해 Western blot를 수행하였다. 그 결과 iNOS 단백질의 발현이 LPS 처리에 의해 증가하였으며, EFEBAs 처리에 의해 감소하였다(Fig. 2B). 또한 mRNA의 수준에서 iNOS 발현을 확인한 결과 LPS에 의해 증가한 mRNA의 발현이 EFEBAs 20 μg/mL를 처리한 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 위 결과는 EFEBAs에 의한 NO의 분비 억제가 iNOS의 단백질과 mRNA의 발현 감소에 의한 것임을 증명할 수 있다.

EFEBAs가 염증관련 cytokine의 mRNA의 발현에 미치는 영향

IL-6, IL-1β 그리고 TNF-α는 염증반응을 촉진하며 면역계를 자극하는 염증유발인자로 종양의 침습에도 관련이 있다고 알려져 있다(34). 이러한 염증성 cytokine들의 발현을 조절하는 물질은 염증반응으로 유도된 많은 질병들을 조절할 수 있음을 나타낸다. Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, IL-1β 그리고 TNF-α의 mRNA 수준을 조사한 결과 LPS 처리에 의해 cytokine의 mRNA 수준이 증가하였고, EFEBAs의 처리 10 μg/mL에서부터 IL-6와 IL-1β의 mRNA 수준이 유의적으로 감소하였으며, TNF-α는 EFEBAs의 처리 20 μg/mL에서 mRNA 수준이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3). 이는 EFEBAs가 염증반응에 관여하는 cytokine의 mRNA의 수준을 조절하므로 염증관련 cytokine의 분비에도 영향을 줄 것이라 사료된다.

EFEBAs이 NF-κB signaling 관련 단백질 발현에 미치는 영향

NF-κB는 다양한 cytokine, chemokine 그리고 growth factor를 합성하고 조절하는데 필수적인 전사인자이다(15). 일반적인 세포에서의 NF-κB는 p65와 p50의 heterodimer 형

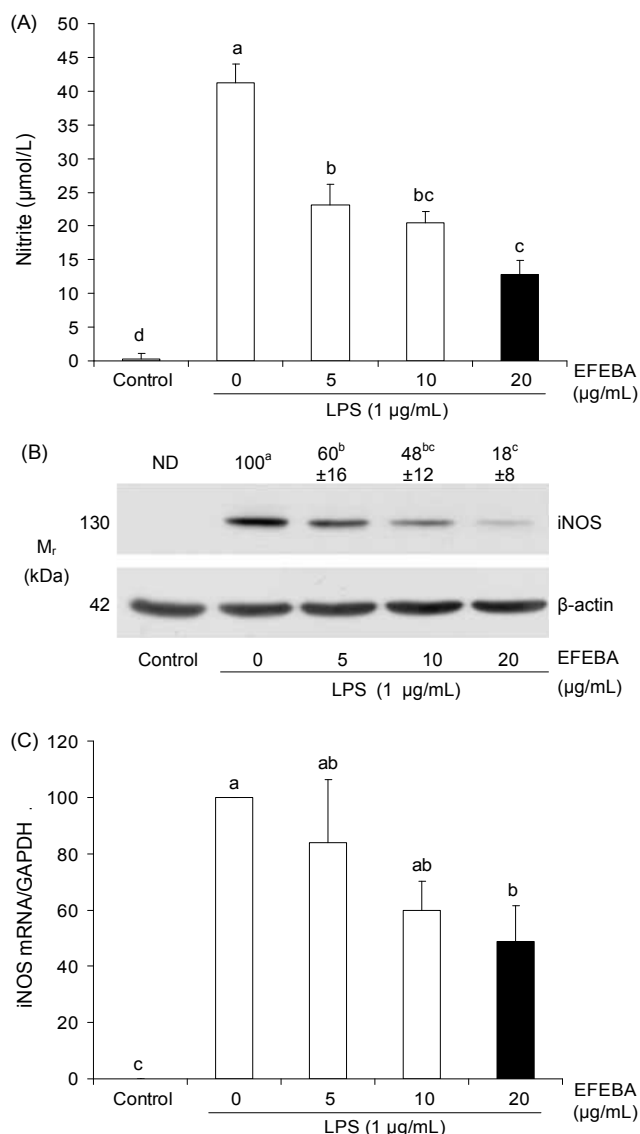
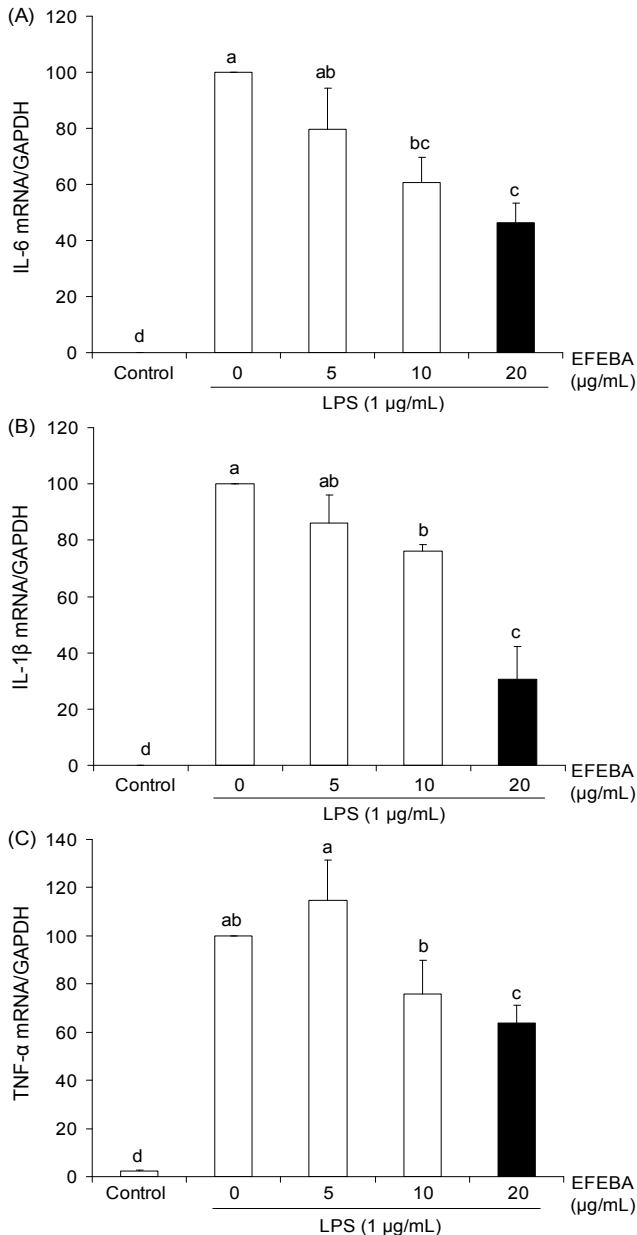


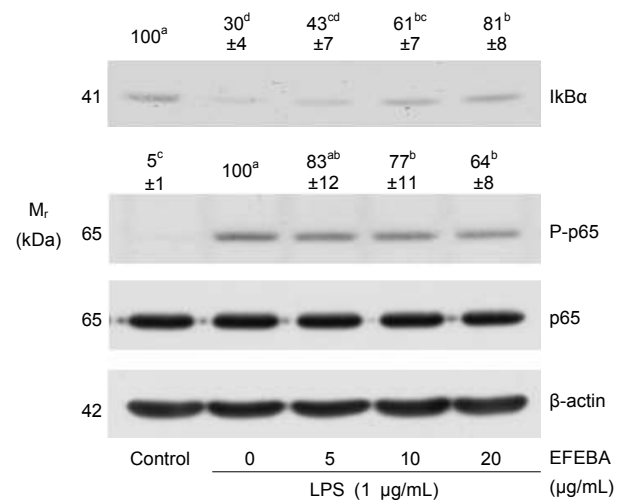
Fig. 2. EtOAc fraction of ethanol extract from the bark of *A. barbinerve* Max. (EFEBAs) inhibits LPS-induced NO secretion in Raw264.7 cells via the downregulation of iNOS expression. Serum-deprived Raw264.7 cells were treated with 0, 5, 10, 20 μg/mL of EFEBAs in the absence or presence of LPS for 24 h. NO production (A). Cell lysates were subjected to western blotting with and iNOS and β-actin antibodies (B). The relative abundance of each band was quantified, and the control levels were set at 100%. The adjusted mean±SEM (n=3) of each band is shown above each blot. Serum-deprived Raw264.7 cells were treated 0, 5, 10, 20 μg/mL of EFEBAs in the absence or presence of LPS for 6 h. Total RNA was isolated and real-time PCR was performed. The levels of iNOS mRNA were normalized with those of GAPDH (C). Each bar represents the mean±SEM (n=3). Means without the same letter differ, p<0.05.

태로 cytosol에 존재하며, 핵으로의 이동을 막는 IκB와 결합되어 있어 전사인자로서의 역할을 하지 못하게 된다. 하지만 LPS나 cytokine 등 다양한 자극에 의해 IκB가 인산화되어 degradation이 되는데 이때 자유로워진 NF-κB는 핵으로 이동하여 전사인자로서의 역할을 하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성한다(35,36). 또 다른 면에서는 p65



**Fig. 3.** EFEBA inhibits LPS-induced mRNA of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in Raw264.7 cells. Serum-deprived Raw264.7 cells were treated with 0, 5, 10, 20  $\mu$ g/mL of EFEBA in the absence or presence of LPS for 6 h. Total RNA was isolated, reverse transcribed and real-time PCR was conducted. The levels of IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B) and TNF- $\alpha$  (C) mRNA were normalized with those of GAPDH. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=3). Means without the same letter differ,  $p < 0.05$ .

의 인산화가 진행되어 NF- $\kappa$ B의 전사활성에 다양한 자극을 준다고 알려져 있다(37). NF- $\kappa$ B signaling을 통해 EFEBA가 염증관련 인자들을 조절하는지 확인하기 위하여 Western blot를 수행한 결과 LPS 자극에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 degradation이 EFEBA의 처리에 의해 감소함을 확인하였고, LPS에 의해 증가된 p65의 인산화 역시 EFEBA의 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 EFEBA가 NF- $\kappa$ B signaling을 통해 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 억제한다는



**Fig. 4.** EFEBA inhibits LPS-induced NF- $\kappa$ B signaling in Raw264.7 cells. Serum-deprived cells were treated with 0, 5, 10, 20  $\mu$ g/mL of EFEBA for 40 min. LPS was added and incubated for an additional 20 min. Cell lysates were subjected to western blotting with I $\kappa$ B $\alpha$ , P-p65, p65 and  $\beta$ -actin antibodies. The relative abundance of each band was quantified, and the control levels were set at 100%. The adjusted mean $\pm$ SEM (n=3) of each band is shown above each blot.

것을 예상할 수 있다. 또한 청시닥나무 수피 EtOAc 분획물의 주성분중 하나인 methyl gallate는 iNOS, COX-2를 억제하며 이와 관련된 ERK1/2 signaling을 억제한다고 보고되었다(38). 위 결과를 종합하여 보면 청시닥나무수피 EtOAc 분획물의 methyl gallate가 iNOS, COX-2 등의 단백질 및 mRNA를 억제함으로써 염증을 억제한다고 사료된다.

## 요 약

본 연구를 통하여 청시닥나무의 에탄올 추출물은 쥐 대식세포인 Raw264.7 세포에 LPS로 유도된 염증반응에 미치는 효과가 있음을 확인하였다. 청시닥나무 목질부와 수피부에 에탄올을 가하여 추출한 뒤 그 추출물과 분획물의 NO 생성능 및 세포증식능을 실험한 결과 수피부의 EtOAc 분획이 세포증식능에 영향을 주지 않으면서 NO의 생성을 억제함을 확인하였다. 청시닥나무 수피부 에탄올 추출물 EtOAc 분획(EFEBA)은 Raw264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 NO의 분비와 iNOS의 단백질 및 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰고, 염증 반응 시 생성되는 IL-6, IL-1 $\beta$  그리고 TNF- $\alpha$ 의 mRNA의 발현도 현저히 감소시켰다. 또한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 degradation을 감소시키고 p65의 인산화를 감소시켜 NF- $\kappa$ B signaling을 통해 염증작용을 조절함을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 지식경제부 지역혁신센터사업(한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터)과 2012년

도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (No. 2012-0004903)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Sadaki O. 1996. The development of functional and materials. *Bioindustry* 13: 44-50.
- Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 222-230.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
- Giles GI, Tasker KM, Jacob C. 2001. Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Bio Med* 31: 1279-1283.
- Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.
- Fubini B, Hubbard A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 34: 1507-1516.
- Zedler S, Faist E. 2006. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 12: 595-601.
- Mariathasan S, Monack DM. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40.
- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 6: 347-373.
- Hofseth LJ, Ying L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1765: 74-84.
- Tamir S, Tannenbaum SR. 1996. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1288: F31-F36.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Nathan C, Xie QW. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918.
- Ghosh S, Hayden MS. 2008. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8: 837-848.
- Majdalawieh A, Ro HS. 2010. Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  function and NF- $\kappa$ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm* 2010: 823821.
- Kim TW. 2010. *The Woody Plants of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd, Seoul, Korea. p 465.
- Kwon DJ, Bae YS. 2009. Phenolic compounds from the bark of *Acer Barbinerve* Max. *Mokcheae Konghak* 37: 164-170.
- Lee HY, Jeong HS. 2005. Isolation and identification of antimicrobial substance from *Canavalia gladiata*. *Food Sci Biotechnol* 14: 268-274.
- Donà M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. 2003. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol* 170: 4335-4341.
- Gorzalczy S, López P, Acevedo C, Ferraro G. 2011. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated compounds. *J Ethnopharmacol* 133: 994-998.
- Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Takayasu J, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F. 2002. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *J Ethnopharmacol* 81: 135-137.
- Lizárraga D, Touriño S, Reyes-Zurita FJ, de Kok TM, van Delft JH, Maas LM, Briedé JJ, Centelles JJ, Torres JL, Cascante M. 2008. Witch hazel (*Hamamelis virginiana*) fractions and the importance of gallate moieties—electron transfer capacities in their antitumoral properties. *J Agric Food Chem* 56: 11675-11682.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
- Cho HJ, Kim WK, Kim EJ, Jung KC, Park S, Lee HS, Tyner AL, Park JH. 2003. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G996-G1005.
- Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim JK, Kim SG, Park JH. 2008. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Nutr* 138: 17-23.
- Laml PD, Mandal PK, Hak SY, Hwang SG. 2010. Study of the molecular mechanism of anti-inflammatory activity of Bee venom in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. *Trop J Pharm Res* 9: 19-26.
- Shin NR, Lee DY, Shin SJ, Kim KS, Yoo HS. 2004. Regulation of proinflammatory mediator production in RAW264.7 macrophage by *Vibrio vulnificus luxS* and *smcR*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 169-176.
- Laflamme N, Rivest S. 2001. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15: 155-163.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
- Iezzi A, Ferri C, Mezzetti A, Cipollone F. 2007. COX-2: friend or foe? *Curr Pharm Des* 13: 1715-1721.
- Kavya R, Saluja R, Singh S, Dikshit M. 2006. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* 15: 280-294.
- Weigert A, Brüne B. 2008. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 19: 95-102.
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. 2003. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1- $\beta$ , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-361.
- Hawiger J. 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 23: 99-109.
- Nam NH. 2006. Naturally occurring NF- $\kappa$ B inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 6: 945-951.
- Schwabe RF, Sakurai H. 2005. IKK $\beta$  phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *FASEB J* 19: 1758-1760.
- Chae HS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Lee YS, Brice OO, Chong MS, Lee KN, Shin DW, Kwon DY. 2010. Methyl gallate inhibits the production of interleukin-6 and nitric oxide via down-regulation of extracellular-signal regulated protein kinase in RAW 264.7 cells. *Am J Chin Med* 38: 973-983.

(2012년 5월 21일 접수; 2012년 7월 12일 채택)