pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 4, pp. 342~348 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.4.342

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

감귤류 과피 추출물의 항염증 효과

이숙현 · 서석종 · 이경혜[1]* · 양종범[1] · 최성업[1] · 박성수[2]
성균관대학교 생명과학과, [1]동남보건대학교 식품생명과학과, [2]제주대학교 식품영양학과

Anti-Inflammatory Effect of Peel Extracts from Citrus Fruits

Sook-Hyun Lee, Seok-Jong Suh, Kyoung-Hae Lee[1]*, Jong-Beom Yang[1], Sung-Up Choi[1], and Sung-Soo Park[2]
Dept. of Biological Science, Sungkyunkwan University, Gyeonggi 440-746, Korea
[1]Dept. of Food Science & Biotechnology, Dongnam Health College, Gyeonggi 440-714, Korea
[2]Dept. of Food Science & Nutrition, Jeju National University, Jeju 690-708, Korea
(Received July 31, 2013/Revised August 16, 2013/Accepted October 28, 2013)

ABSTRACT - The following study was presented to investigate the anti-inflammatory effect of peel extracts (PE) from three citrus fruits: *Citrus unshiu*, *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus hallabong*. According to this study, cytotoxicity, NO-production and protein levels of iNOS (inducible nitric oxide synthase) in macrophage cell were analyzed, which had been incubated in murine macrophage cell line RAW 264.7 cell of PE from those three citrus fruits. According to *Citrus unshiu* peel extracts (CUP), *Citrus limonia* Osbeck peel extracts (CHP) and *Citrus hallabong* peel extracts (CLP) treatment, the result showed that there was no cell growth inhibited below 2 mg/mL. Comparing the NO-production of the cell with LPS (100 ng/mL) and the treatment without LPS, significant increase of NO-production was detected. However NO-production also showed decrease trend, as the concentration increased. For each treatment, at the concentration of 1 mg/mL, NO-ihibitory activity showed significant result with following order: CUP > CHP > CLP. According to the result from Western blot, the inhibitory activities of iNOS protein from CUP and CHP showed fairly similar performances. Also inhibitory activity of COX-2 showed the following order: CUP > CHP> CLP. There was no doubt that all the treatments of CUP, CHP and CLP have anti-inflammatory effect and also that the inhibitory activity of the CUP treatment was the strongest among those three.

Key words : citrus fruit, peel extracts, anti-inflammatory effects

감귤은 운향과(Rutaceae), 감귤속(Citrus) 식용식물로 과피에는 carotenoid, terpene류, bioflavonoid 등이 풍부하여 건강기능성 소재로의 이용가치가 있다고 보고되고 있다[1-6]. 이러한 phytochemicals가 함유된 과일을 다량 섭취할 경우 항산화효과, 항암 및 항염증 작용 등이 있어 각종 만성질환에 대한 예방효과가 있는 것으로 알려져 있다[7-10].

염증은 감염으로 인한 인체 조직손상을 막는 방어기전으로 발전, 발열, 통증과 같은 증상을 수반한다. 이러한 염증반응이 장기간 지속적으로 반복될 경우 신경퇴행성질환과 같은 각종 만성질환과 암 등을 발병할 수 있는 요인이 된다[11-14]. 대식세포(macrophage)는 인체내 면역반응에서 일산화질소(nitric oxide; NO)와 프로스타글란딘(prostaglandin; PG)과 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 염증매개물질 생성에 관여하고 이를 조절한다. 이러한 염증매개물질은 염증반응을 유도하며, 숙주의 면역반응이 적절하게 대응하지 못할 경우 염증성 질환을 유발한다[15-17].

Nitric oxide synthase (NOS)에는 neuronla NOS, endothelia NOS, inducible NOS (iNOS)가 있는데, 이중 iNOS에 의한 NO생성이 절대적으로 많으며, 과도하게 생성될 경우 존직손상, 유전자 변이 등을 야기한다[18,19]. 그 외 cyclooxygenase (COX)는 혈소판 형성, 신장기능 유지, 위벽 보호 등의 정상적인 생체기능에 작용하는 COX-1과 발열과 통증에 관여하며 염증반응에 발현하는 COX-2로 분류된다[12,20,21]. 이와 같이 염증반응에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 염증성 매개물질인 일산화질소(nitric oxide; NO)와 프로스타글란딘(prostaglandin; PG)E_2을 생성한다[22,23]. 따라서 염증반응으로부터 생성되는 NO와 PGE_2와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다[24,25].

최근에는 천연소재를 이용한 여러 가지 만성질환에 대

*Correspondence to: Kyoung-Hae Lee, Dept. of Food Science & Biotechnology, Dongnam Health College, Gyeonggi 440-714, Korea
Tel: 82-31-249-6433, Fax: 82-31-249-6430
E-mail : khlee@dongnam.ac.kr

한 예방·치료 효과 및 염증반응에 관여하는 효소들을 억제하는 천연 항염증물질에 관한 연구들이 진행되고 있으나, 아직까지 미흡한 실정이다[26]. 또한 감귤류 관련 국내외 연구로는 항산화 효과[1,27], 한라봉추출물에 대한 항균 유효성과 안전성[28], 레몬의 피부상재균에 대한 항산화 및 항균효과[29], 감귤과피의 활성산소종 소거활성[30], 건조밀감-녹차의 향기성분 분석[31] 등이 보고된 바 있으나, 감귤류를 이용한 항염증에 관한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 감귤류 중 온주밀감(*Citrus unshiu*), 레몬(*Citrus limonia* Osbeck), 한라봉(*Citrus hallabong*) 각각의 과피추출물을 이용하여 활성화된 대식세포주 Raw264.7에 대한 세포독성, 염증관련 매개물질인 lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 세포의 NO생성과 세포내 염증관련 단백질 발현양상을 측정함으로서 항염증 작용에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용된 감귤류는 온주밀감(*Citrus unshiu*), 레몬(*Citrus limonia* Osbeck), 한라봉(*Citrus hallabong*) 세 품종으로 2012년 제주도에서 재배 수확된 것을 제주감귤농협을 통하여 구매하여 4°C의 저온저장고에 보관하여 사용하였다.

세포 및 시약

대식기 murine macrophage cell line RAW 264.7세포는 한국세포주은행에서 구입하였고, DMEM high glucose medium, fetal bovine serum (FBS)과 penicillin/streptomycin은 WelGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Cell Proliferation kit II (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide; XTT)는 Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany)에서 구입하였고, lipopolysaccharide (LPS), sodium nitrite, griess reagent, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Primary antibody (iNOS SC7271, COX-2 SC1745)와 secondary antibody (HRP-conjugated anti-mouse, anti-goat immunoglobulin G)는 Santa Cruz biotechnology, Inc. (Texas, USA)에서 구입하였다.

시료 추출물 제조

본 실험에 사용된 온주밀감(*Citrus unshiu*), 레몬(*Citrus limonia* Osbeck), 한라봉(*Citrus hallabong*)은 제주도에서 수확된 것으로, 농약 및 불순물 제거를 위해 선별 세척 후 과피를 분리하여 사용하였다. 분리한 과피는 실온에서 3시간 동안 건조한 후 고속믹서로 분쇄한 후, 각 분말 일정량을 취하여 약 2배의 methanol을 가하여 추출한 후 진공농축기(Centrivap benchtop centrifugal vacuum concentrator, LABCONCO, MO, USA)로 24 mmHg 조건하에서 감압농축하여 황색의 분말상태로 −20°C로 냉동저장하였고, 사용 시에 DMSO로 녹여 분석시료로 사용하였다. 이때 감귤류 세 품종 원료를 전처리하여 얻은 시료의 수율은 온주밀감과피추출물(CUP)은 0.78%, 레몬과피추출물(CLP)은 0.63%, 한라봉과피추출물(CHP)은 0.76%이었다.

세포배양

한국세포주은행에서 분양받은 murine macrophage cell line RAW264.7세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM (dulbeco's modified eagle medium) high glucose medium배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

세포독성 측정

감귤류 과피추출물에 대한 세포독성은 Roche사의 방법에 준하여 측정하였다. Murine macrophage cell line RAW264.7 세포를 96-well plate (SPL, Korea)에 세포수가 5×10^3 cells/well이 되게 분주하고 80% confluence로 CO_2 incubator에서 배양하였다(24hrs, 37°C, 5% CO_2). 배양 후 serum-free media로 세척하고, CUP, CHP, CLP를 0, 0.25, 0.50, 1, 2 mg/mL 농도별로 각각 처리하여 37°C에서 24시간 배양하였다. Well 당 XTT 시약을 50 μl 처리하여 4시간 반응 시킨 후 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader (Molecular Devices, USA)로 490 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 세포의 생육억제율을 백분율로 나타내었다.

NO생성량 측정

NO생성량 측정은 세포 배양액 내의 nitrite농도를 그리스시약(Griess reagent)을 이용하였다. 실험에 사용된 대식기 murine macrophage cell line RAW 264.7세포를 12-well plate에 세포수가 1×10^5 cells/well이 되게 분주하고 80% confluence로 배양하였다. 그 후 CUP, CHP, CLP의 추출물을 처리하고, LPS (100 ng/mL)로 24시간 동안 NO생성을 유도한 뒤 배양 상등액과 Griess reagent를 1:1로 혼합하여 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 NO생성량을 측정하였다. Sodium Nitrite ($NaNO_2$)를 사용하여 standard curve를 작성한 후 NO측정에 사용하였다. NO생성량을 백분율로 나타내었다.

세포내 염증관련 단백질 발현 양상측정

세포내 염증관련 단백질발현 양상측정은 Western blot분석을 적용하여 실시하였다. 감귤류 과피추출물의 세포염증효과를 알아보기 위하여 inducuble nitric oxide synthetase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX)-2 단백질의 양을 측정하였다.

대식기 murine macrophage cell line RAW 264.7세포를 6-well plate에 세포수가 4×10^5 cells/well가 되게 분주하고 80% confluence로 배양한 후, 시료와 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 well을 pH 7.4인 PBS로 2회 세척한 후 세포를 채취하였다. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1M DTT)를 사용하여 cell lysate를 준비하였고, 4°C 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 총단백질 추출액으로 사용하였다. Bio-Radprotein assay (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였으며, 단백질 100 μg과 sample buffer (60 mM Tris-Cl; pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptaethanol, 0.1% bromphenol blue)를 혼합하여 100°C에서 10분간 끓인 후 냉각하였으며, 각 lane 별 150 V에서 전기영동하였다. PVDF 막으로 단백질을 부착하였고, 5% skim milk로 blocking하였으며, 1차 항체로 iNOS SC7271과 COX-2 SC1745을 각각 반응시킨 후, 2차 항체로 HRP-conjugated anti-mouse antibody와 HRP-conjugated anti-goat antibody로 처리하였다. 목적단백질을 동정하기 위하여 기질로 ECL (enhanced chemiluminescence, GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 사용한 후, membrane을 X-ray film에 노출시켜 LAS 4,000 image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 밴드를 현상하여 정량화하였다.

통계분석

모든 실험결과는 최소 3회 반복 측정하여 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 실험결과 자료의 통계분석은 one-way ANOVA 프로그램을 사용하여 Tukey HSD post-hoc test로 시료간의 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

감귤류 과피 추출물의 대식세포에 대한 독성

염증에 주요한 역할을 담당하는 대식세포를 이용하여 온주밀감과피추출물(CUP), 레몬과피추출물(CLP), 한라봉과피추출물(CHP)에 세포독성을 확인한 결과는 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3과 같다. CUP, CHP, CLP 처리구 각각에 대한 세포독성을 확인하기 위해 96 well plate에서 macrophage cell line RAW 264.7세포를 배양하였고 대식기 세포에 각각의 추출물을 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1 mg/mL)로 처리하였다. 24시간 후 Cell Proliferation kit II (XTT)를 사용하여 생육억제 정도를 측정하였다.

그 결과 CUP, CHP, CLP 각 처리구 2 mg/mL 이하의 농도에서는 세포생육도를 저해하지 않는 것으로 즉, 세포독성이 낮음을 확인하였다. 대식세포는 독성물질에 대항하여 면역조절에 중요한 역할을 담당하는 NO, PGE_2와 같은 2차 염증매개물질을 생산한다[32,33]. 이러한 2차 매개물질의

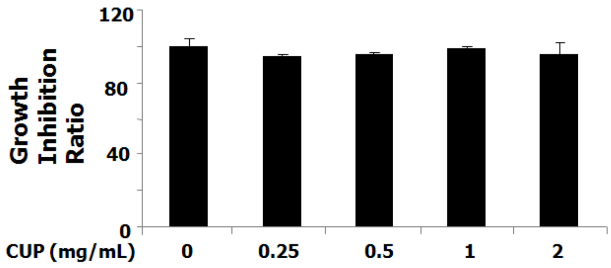

Fig. 1. Growth inhibition ratio of extracts from *Citrus unshiu* peel (CUP) on marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

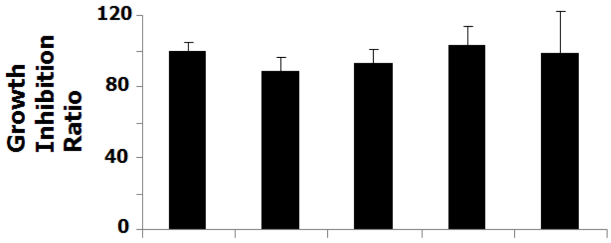

Fig. 2. Growth inhibition ratio of extracts from *Citrus limonia Osbeck* peel (CLP) on marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

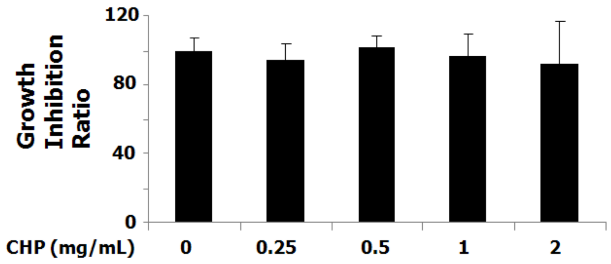

Fig. 3. Growth inhibition ratio of extracts from *Citrus hallabong* peel (CHP) on marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

생산이 과도할 경우 만성염증, 자가면역질환 등을 일으킨다[34]. 감귤류 3종 과피처리구의 추출물 최고농도 1 mg/mL까지는 세포독성이 나타나지 않는 범위내에 있으므로 세포사멸이 나타나지 않는 농도내에서 실험을 진행하였다.

감귤류 과피추출물의 NO억제능 검정

CUP, CHP, CLP 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해, 그리스시약을 사용하여 NO생성 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6과 같다. Murine macrophage Raw 264.7세포에 CUP, CLP, CHP로 각각 0.25, 0.5, 1 mg/mL CUP, CLP, CHP 추출물과 20 mg/mL LPS를 24시간 동안 처리하였고, CUP, CLP, CHP 추출물의 항염증효과를 확인한 결과, 생성된 NO측정치는 LPS를 100 ng/mL로 처

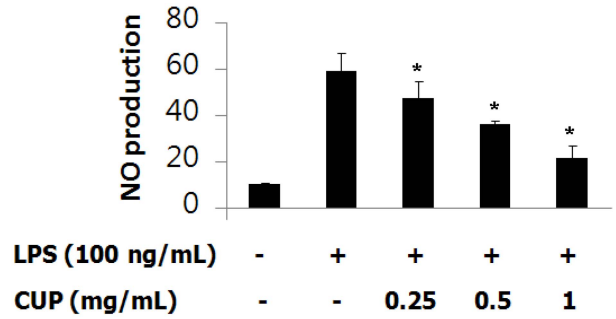

Fig. 4. Effect of extracts from *Citrus unshiu* peel (CUP) on the production of $NaNO_2$ in marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

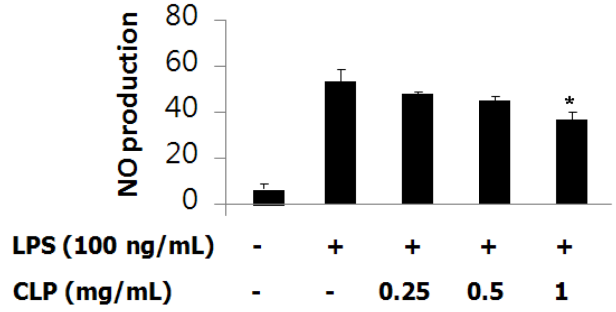

Fig. 5. Effect of extracts from *Citrus limonia Osbeck* peel (CLP) on the production of $NaNO_2$ in marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

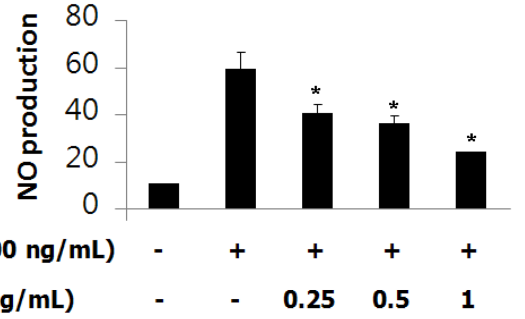

Fig. 6. Effect of extracts from *Citrus hallabong* peel (CHP) on the production of $NaNO_2$ in marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

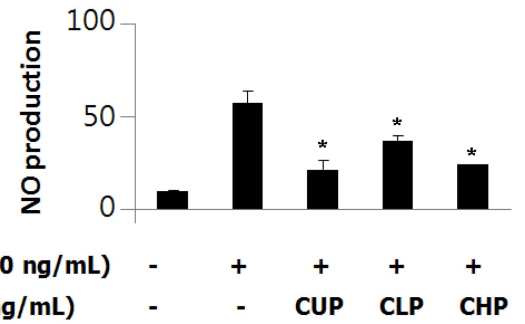

Fig. 7. Effect of extracts from various Citrus fruits peel on the production of $NaNO_2$ in marcrophage cell (Raw 264.7) at 1 mg/mL concentration.
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

리한 세포의 NO생성량을 LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교했을 때 상당량이 증가했음을 알 수 있었고, 추출물을 농도별로 처리했을 때 농도가 증가할수록 NO생성량은 감소하였다.

세포내 염증반응에서 iNOS 및 COX-2에 의하여 유도된 염증인자인 NO생성은 신경독성, 신호전달 및 체내방어 등의 생리기능을 갖고 있으며, 또한 염증과 암 발생에 관여하는 등 병리적으로 중요한 작용을 한다[35,36]. NO는 아질산염을 측정하는 griess assay를 이용해 간접적으로 측정할 수 있으며, 염증반응 부위에서 NO의 과다발현은 많은 염증과 자가 면역 질환의 매개물질로 작용한다는 것은 잘 알려져 있다[37].

CUP처리구는 LPS처리구에 비해 0.25 mg/mL 농도에서는 약 80%, 0.5 mg/mL에서 약 60%, 1 mg/mL에서는 약 36% 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 4). CLP처리구 농도에서 보면, LPS처리구에 비해 0.25 mg/mL 농도에서 약 90%, 0.5 mg/mL에서는 약 84%, 1 mg/mL에서 약 69% 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 5). CHP처리구를 나타낸 Fig. 6의 결과를 보면, 각각은 LPS처리구에 비해 0.25 mg/mL 농도의 경우 약 68%, 0.5 mg/mL에서는 약 61%, 1 mg/mL에서 약 40% 감소하였음을 알 수 있었다. Fig. 7은 CUP, CLP, CHP 각 처리구에서 각 1 mg/mL 농도에서의 저해활성을 비교한 값으로, CUP > CHP > CLP 순으로 NO 저해활성이 강하게 나타났다.

이러한 NO 등은 염증매개물질로서 다양한 염증관련 질환을 유발한다고 보고된 바 있다[13,14]. 이상의 결과로 감귤류 과피의 NO저해작용은 레몬이나 한라봉보다 온주밀감 과피의 경우 NO저해활성이 크게 나타났다.

감귤류 과피추출물에 의한 대식세포의 iNOS, COX-2 단백질의 저해활성 검정

CUP, CLP, CHP 추출물의 LPS로 유도된 iNOS, COX-

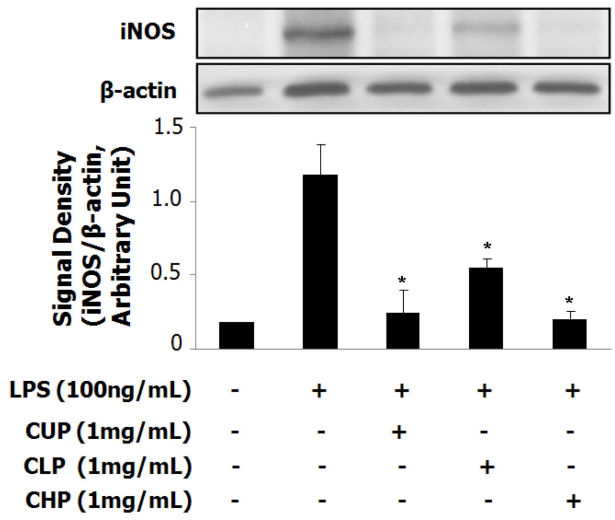

Fig. 8. Inhibitory effect of Citrust peels extracts on the protein levels of iNOS in marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

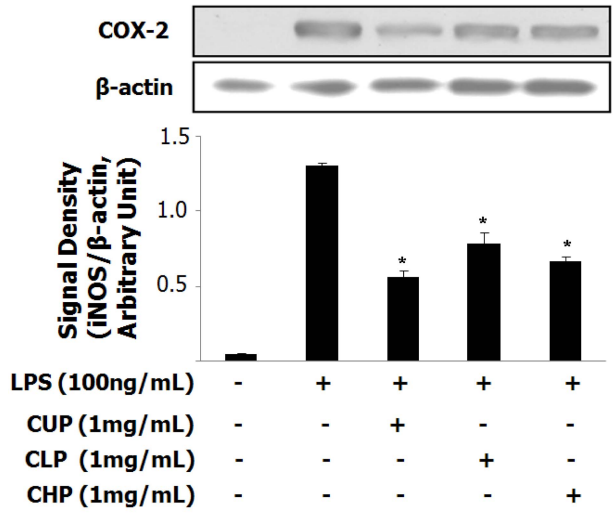

Fig. 9. Inhibitory effect of Citrust peels extracts on the protein levels of COX-2 in marcrophage cell (Raw 264.7).
Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments.
Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey HSD post-hoc test.
Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

2 단백질의 저해활성을 확인하기 위해 western blotting assay를 실시하였다. Murine macrophage Raw 264.7세포에 LPS (100 ng/mL)를 처리하여, iNOS, COX-2 효소 발현을 유도하였고, 세포에 CUP, CLP, CHP 추출물을 1 mg/mL로 처리하였다. Fig. 8과 Fig. 9에서 알 수 있듯이 LPS (100 ng/mL)에 의해 iNOS, COX-2 단백질의 발현이 증가함을 확인할 수 있으며, LPS를 처리하지 않은 대조구에서는 낮은 수준의 iNOS와 COX-2 단백질이 발현되고 있음을 확인할 수 있다. 1 mg/mL 농도의 CUP, CLP, CHP 추출물은 iNOS와 COX-2 두 개의 단백질에 대해 동시에 저해활성을 가지는 것으로 나타났으며, Western blot의 결과상으로는 CUP와 CHP의 iNOS 단백질 저해활성이 비슷한 것으로 나타났다. 따라서 NO생성 저해활성과 비교해 보았을 때도 CUP와 CHP는 비슷한 정도의 NO생성 저해능을 가지는 것을 보아, CUP와 CHP는 LPS 로 유도된 NO를 비슷한 강도로 저해하는 것으로 생각할 수 있다. COX-2 효소의 저해활성은 CUP > CHP > CLP의 순으로 나타났으며, 이들 결과를 종합해 볼 때 CUP, CHP, CLP는 모두 항염증 작용을 가지고 있으며, 또한 CUP가 세 개의 추출물 중에서 가장 저해활성이 강한 것으로 밝혀졌다. iNOS의 발현은 대식세포에서 LSP에 의하여 염증매개물질이 과다 생성되는 주요한 기작이며, iNOS에 의하여 생성된 NO는 염증반응을 촉진시키고, 염증을 심화시킨다[38].

Fig. 8은 iNOS 단백질 발현량을 분석한 실험으로 murine macrophage Raw 264.7세포에 1 mg/mL CUP, CLP, CHP 추출물과 100 ng/mL LPS를 24시간 동안 처리하였다. 동일한 양의 단백질을 10% SDS-PAGE를 통해 분획하였고, PVDF membrane에 electroblot을 해서 iNOS와 COX-2의 항체를 사용하여 면역학적 방법으로 시그널을 확인하였고, 같은 membrane을 reblot하여 β-actin의 시그널을 loading control로 사용하였다. iNOS 단백질을 Raw 264.7세포에서 확인하였으며, iNOS와 β-actin의 값의 비를 그래프로 나타내었다. 추출물 처리구는 LPS 값에 비해 CUP는 약 20%, CLP는 약 46%, CHP는 약 17% 감소하였음을 알 수 있다. Fig. 9는 COX-2 단백질을 Raw 264.7세포에서 확인하였으며, COX-2와 β-actin의 값의 비를 그래프로 나타내었다. 추출물 처리구는 LPS 값에 비해 CUP는 약 42%, CLP는 약 59%, CHP는 약 50% 감소하였음을 알 수 있다. iNOS의 발현은 대식세포에서 LPS에 의하여 염증매개물질이 과다 생성되는 주요한 기작이며, iNOS에 의하여 생성된 NO는 염증반응을 촉진시키고, 염증을 심화시킨다[38,39].

염증반응에서 macrophage는 iNOS와 COX-2를 합성하여 NO 및 prostaglandin E2(PGE_2)를 생성한다[22,23]. 염증이 발생하면 murine macrophage cell line RAW 264.7세포에 iNOS의 발현양이 증가하여 다량의 NO가 생성된다. 과도하게 생성된 NO에 의해 염증반응이 일어나고, COX-2에 의해 PGE_2가 생성된다. 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)의 하나인 celecoxib의 경우 10^{-7} μM 단위에서 Raw 264.7세포에 대한 COX-2 활성 정도[40]는 CUP 처리구 1 mg/mL에서와 유사한 결과를 보였다. 따라서 염증반응으로부터 생성되는 NO와 COX-2 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 감귤류 중 온주밀감, 레몬, 한라봉의 과피추출물(PE)에 대한 항염증 효과를 조사하였다. 감귤류 세 품종 과피추출물(PE)에 대한 murine macrophage cell line Raw 264.7세포를 배양하여 세포독성, NO생성량, 세포내 염증관련 단백질 발현 양상을 분석하였다. 그 결과 CUP, CHP, CLP 처리구의 경우 2 mg/mL 이하의 농도에서는 세포생육을 저해하지 않았다. LPS (100 ng/mL)를 처리한 세포의 NO생성량을 LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교했을 때 상당량이 증가했음을 알 수 있었고, 추출물을 농도별로 처리했을 때 농도가 증가할수록 NO생성량은 감소하였다. 각 처리구에서 각 1 mg/mL 농도에서는 CUP > CHP > CLP 순으로 NO 저해활성이 강하게 나타났다. Western blot의 결과상으로는 CUP와 CHP의 iNOS 단백질 저해활성이 비슷한 강도로 나타남을 확인하였다. COX-2 효소의 저해활성은 CUP > CHP > CLP의 순으로 나타났다. 따라서 CUP, CHP, CLP 처리구는 모두 항염증 작용을 가지고 있으며, 또한 CUP 처리구가 세 개의 추출물 중에서 가장 저해활성이 강하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 동남보건대학교 학술연구소 지원에 의하여 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kamiya, S. and Esaki, S.: Recent advances in the chemistry of the citrus flavonoids. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **18**, 38-48 (1971).
2. Monforte, M.T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Galati, E.M. and Lo Curto, R.B.: Biological effects of hesperidin a citrus flavonoid hypolipidemic activity on experimental hypercholestrolemia in rat. *Farmacology*, **50**, 595-599 (1995).
3. Laura, B.: Polyphenols; Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **6**, 317-333 (1998).
4. Lee, S.H., Park, H.J., Back, O.H., Chun, H.K., Rhie, S.G. and Lee, G.S.: Comparison of the nutritional composition of 3 kinds of citrus produced on Jeju island, Korea. *Kor. J. Commun. Living Sci*., **16**, 15-20 (2005).
5. Yoo, K.M., Park, J.B., Seoung, K.S., Kim, D.Y. and Hwang, I.K.: Antioxidant activities and anticancer effects of Yuza. *Food Sci. Industry*, **38**, 72-77 (2005).
6. Park, S.H., Lee, G.H., Kim, H.Y., Jeong, H.S., Kim, E.Y., Yun, Y.W., Nam, S.Y. and Lee, B.J.: Comparison in antioxidant effects of flour citrus fruits. *J. Fd Hyg. Safety*, **26**, 355-360 (2011).
7. van't Veer, P., Jansen, M.C., Klerk, M. and Kok, F.J.: Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.*, **3**, 103-107 (2000).
8. Sesso, H.D,, Gaziano, J.M., Liu, S. and Buring, J.E.: Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **77** 1400-1408 (2003).
9. Song, H.S.: Antioxidant activity of juices and peel extracts from Hallabong(*Citrus kiyomi×C. ponkan*) and Yuza(*Citrus junos* Tanaka), *J. Kwangju Health College*, **29**, 129-138 (2004).
10. Sesso, H.D., Buring, J.E., Norkus, E.P., Gaziano, J.M.: Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and risk of cardiovascilar disease in men. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 990-997 (2005).
11. Nathan, C.: Points of control on inflammation. *Nature*, **420**, 846-852 (2002).
12. Wang, M.T., Honn, K.V. and Nie, D.: Cyclooxygenase, prostanoids and tumor progression. *Cancer Metastasis Res*., **26**, 525-534 (2007).
13. Guslandi, M.: Nitric oxide and inflammatory bowel disease. *Eur. J. Clin. Invest*. **28**, 904-907 (1998).
14. Simons, R.K., Junger, W.G., Loomis, W.H. and Hoyt, D.B.: Acute lung injury in endotoxemic ratsis associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment role of circulating TNF- and IL-1β. *Shock*, **6**, 39-45 (1996).
15. Funk, C.D., Funk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, A.S. and Fitzgerald, G.A.: Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase; cDNA cloning, expression and gene chromosomal assignment. *FAESB J*. **5**, 2304-2312 (1991).
16. Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.: Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol*., **21**, 335-375 (2003).
17. Willoughby, D.A.: Heberden Oration, 1974; Human arthritis applied to annimal models. Towards a better theraphy. *Ann. Rheum. Dis*., **34**, 471-478 (1975).
18. Hippeli, S. and Elastner, E.F.: Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts; A review on recent developments. *Free Radic. Res*., **31**, 81-87 (1999).
19. McCatney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.F., Albina, J.E., Xie, Q.W., Nathan, C.F. and Wahl, S.M.: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med*., **178**, 749-754 (1993).
20. Islam, S.: Sweetpotato(*Ipomoea banatas* L.) leaf; Its potential effect on human health and nutrition. *J. Food Sci*., **71**, R13-R21 (2006).
21. Youn, H.S.: Anti-inflammatory effects of resveratrol, epigallocatechin-3-gallate and curcumin by the modulation of toll-like receptor signaling pathways. *Korean J. Food Sci. Technol*., **39**, 481-487 (2007).
22. Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A.: Nitric oxide; Physiology, pathophysiolohy, and pharmacology. *Pharmacol Rev.*, **43,** 109-142 (1991).
23. Wink, D.A. and Mitchell, J.B:. Chemical biology of nitric oxide; Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med*., **25**, 434-456 (1998).

24. Becker, S., Mundandhara, S., Devlin, R.B. and Madden, M.: Regulation of cytokine production inhuman alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **207**, 269-275 (2005).
25. Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C. and Seibert, K.: Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 3228-3232 (1994).
26. Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D, Reboul, P. and Pelletier, J.P.: Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-niflammatory drugs. *Anuul Rheum Dis*., **62**, 501-509 (2007).
27. Hyon, J.S., Kang, S.M., Mahinda, S., Koh, W.J., Yang, T.S., Oh, M.C., Oh, C.K., Jeon, Y.J. and Kim, S. H.: Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean J. Food Cookery Sci*., **26**, 88-94 (2010).
28. Park, S.M., Lee, K.A., Yun, M.Y., Kim, Y.J. and Lee, S.H.: Study of natural preservative system using the mixture of *Scutellariae radix, Acacia nilotica, Citrus reticulata* extracted from polyhydric alcohols. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J*., **26**, 533-537 (2011).
29. Kim, J.H., Kim, M.J., Choi, S.K., Bae, S.H., An, S.K. and Yoon, Y.M.: Antioxidant and antimicrobial effects of lemon and eucalyptus essential oils against skin floras. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**, 303-308 (2011).
30. Kim, Y.D., Mahinda, S., Koh, K.S., Jeon, Y.J. and Kim, S.H.: Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **38**, 462-469 (2009).
31. Jeon, J.Y. and Choi, S.H.: Aroma characteristics of dried citris fruits-blended green tea. *J. Life Sci*., **21**, 739-745 (2011).
32. Iontcheva, I., Amar, S., Zawawi, K.H., Kantarci, A. and Vandyke, T.E.: Role for moesin in lipopolysaccharide stimulated signal transduction. *Infect. Immun*., **72**, 2312-2320 (2004).
33. Pierce, G.F.: Macrophages; Important physiologic and pathologic sources of polypeptide growth factors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*., **2**, 233-234 (1990).
34. Hilliquin, P., Borderie, D., Hernvann, A., Menkes, C.J. and Ekindjian, O.G.: Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*., **40**, 1512-1517 (1997).
35. Schmidt, H. and Walter. U.: NO at work. *Cell*, **78**, 919-925 (1994).
36. Shapira, L., Soskolne, W.A., Houri, Y., Barak, V., Halabi, A. and Stabholz, A.: Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracyclin; correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect. Immun*., **64**, 825-828 (1996).
37. Southan, G.J. and C. Szabo.: Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthaseisoforms. *Biochem. Pharmacol*., **51**, 383-394 (1996).
38. Jew, S.S., Bae, O.N. and Chung, C.H.: Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Raw-264.7 cell line. *J. Toxicol. Pub. Health*, **19**, 33-37 (2003).
39. Weisz, A., Cicatiello, 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*., **316**, 209-215 (1996).
40. Roh, G.S., Yi, C.O., Cho., Y.J., Jeon, B.T., Nizamudtinova, I.T., Kim, H.J., Kim, J.H., O, Y.M., Huh, J.W., Lee, J.H., Hwang, Y.S. and Lee, S.O.: Anti-inflammatory effects of celecoxib in rat lungs with smoke-induced emphysema. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*., **299**, L184-L191 (2010).