

Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage.

Ye Jin Kim¹, Dae-Yeul Son^{2*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of Herbal Food Science, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea

LPS로 염증이 유도된 Raw 264.7 대식세포에서 대추(*Zizyphus jujube*) 잎 분획물의 염증매개물질 억제

김예진¹ · 손대열^{2*}

¹경북대학교 식품영양학과, ²대구한의대학교 한방식품약리학과

Abstract

Zizyphus jujube leaf fractions (ZLFs) showed no cytotoxic effects of up to 100 µg/mL, while the anti-inflammatory effects of ZLFs were analyzed by checking the productions of nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), cyclooxygenase-2 (COX-2), and inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-6 in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw264.7 macrophage up to the concentration of 100 µg/mL. ZLFs (100 µg/mL) demonstrated a strong anti-inflammatory activity that reduced 61~85% of NO and 71~100% of PGE₂ production in the LPS-stimulated Raw264.7 macrophage. Even the low ZLFs concentration of 1 µg/mL have reduced NO and PGE₂ production by 34~64%. Expressions of COX-2 protein were also effectively inhibited by the ZLFs. Furthermore, the TNF-α, IL-1β, and IL-6 production were significantly suppressed through the treatment of ZLFs at concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL. In the order of the *Zizyphus jujube* leaf water fraction (ZLWF) < buthanol fraction (ZLBF) < ethyl acetate fraction (ZLEF) showed anti-inflammatory activity. In particular, the ethyl acetate fraction ZLEF at 100 µg/mL showed an excellent anti-inflammatory activity by reducing the production of NO, PGE₂, COX-2, and inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6) in the level of Raw264.7 macrophage without LPS-stimulation or even better. The results of our study suggest the potential of ZLEF for use as an excellent anti-inflammatory inhibiting mediator and may be used as a therapeutic approach to various inflammatory diseases.

Key words : nitric oxide, pro-inflammatory, lipopolysaccharide, *Zizyphus jujube* leaf fractions

서 론

염증반응은 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진 되는데, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다(1). 대식세포(macrophage)는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 인체 내에서 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로, 인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 백혈구이다. 외부의 자극으로 인해 활성화된 대

식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유발함으로써 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등을 유발하고, 질환을 악화시키게 된다(2).

내독소의 하나인 lipopolysaccharide(LPS)는 Raw264.7 macrophage에서 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-6(IL-6), interleukin-1β(IL-1β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키며, nitric oxide(NO), prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증매개물질을 분비한다. 염증상태에서는 cyclooxygenase-2(COX-2)와 NO synthase(NOS)가 유도되어 과량의 PGE₂, NO 등이 생성 되며 여러 가지 질병 및

*Corresponding author. E-mail : dyson@dhu.ac.kr
Phone : 82-53-819-1434, Fax: 82-53-819-1272

암 발병(carcinogenesis)이 촉진된다(3). 특히 NO를 생성하는 효소인 NOS와 다양한 prostaglandins(PGs)의 생합성을 매개하는 효소인 cyclooxygenase(COX)가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다(4). 이와 같이 NO 및 PGs가 염증반응과 밀접하게 관련되어 있어, 이들의 생성과 생성에 관여하는 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 특히 화학적인 약품이 아닌 천연물이나 한약 재료가 의한 염증 질환 치료제 및 치료보조제가 각광 받고 있으며 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다(5).

본 실험에서는 대추 잎(*Zizyphus jujube* leaf) 메탄올 추출물을 이용하여 비극성에서 극성의 용매로 분획물을 제조하여 각 분획물의 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서의 염증매개물질이 증가되었을 때, 이를 억제하는 효과를 검증함으로써 대추 잎 분획물의 염증제거 기능성 소재로서의 이용가치를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 대추 잎(*Zizyphus jujube* leaf, ZL)은 2012년 경북 경산시 대추농장에서 수확하여 세척 및 자연 건조한 후, 유효 성분의 추출이 용이하도록 분쇄하여 사용하였다.

시약

Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, phosphate-buffered saline(PBS) 등의 세포배양용 시약은 Lonza(Walkersville, MD, USA)사에서 구입하였고, lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulphoxide(DMSO)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Mouse IL-1 β , IL-6, TNF- α ELISA kit는 Pierce(Rockford, IL, USA)에서 구입하였고, Prostaglandin E2(PGE₂) ELISA kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 그 외 본 실험에서 사용한 모든 시약은 분석용 1등급 이상으로 사용하였다.

시료 추출

대추 잎의 무게 10배량의 80% 메탄올로 상온에서 24시간 3회 반복하여 추출하였다. 얻어진 메탄올 추출물은 여과하여 농축 후 동결 건조하였다. 동결된 대추 잎 80% 메탄올 추출물은 증류수에 현탁하여 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 에틸 아세테이트 분획물(*Zizyphus jujube* leaf ethyl acetate fraction, ZLEF), 부탄올 분획물(*Zizyphus jujube* leaf butanol fraction, ZLBF), 물 분획물(*Zizyphus jujube* leaf water fraction, ZLWF)을 얻

었다.

세포배양

Murine의 대식세포주인 Raw264.7 세포는 한국 세포주 은행(KCLB40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였으며 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 5% CO₂를 유지하며 배양하였고, 20 passages 미만의 세포만을 실험에 사용하였다.

세포독성 및 nitric oxide(NO) 측정

대추 잎 분획물의 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 측정하였다. 배양된 세포를 96-well plate에 1 \times 10⁴ cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양 후 배지를 교환하였으며, 각 시료를 농도별로 처리하여 이를 다시 24시간 배양한 후에 MTT 시약(5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상층 액을 제거하였다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO 100 μ L를 첨가하여 녹이고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포만 배양한 control의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

NO 측정은 세포를 24-well plate에 3 \times 10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 시료를 농도별로 처리하여 1시간동안 배양 후 각 well에 LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후에는 배양 상층 액 100 μ L를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며 LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 각 시료의 NO 생성 저해활성을 확인하였다.

PGE₂ 및 염증성 cytokine 측정

Raw264.7 macrophage를 24-well plate에 3 \times 10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 시료를 농도별로 처리하여 1시간동안 배양 후 각 well에 LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 상층액을 취하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 PGE₂의 생성량을 측정하였다.

PGE₂의 측정은 제조사의 분석 방법에 따라 정량하였다. 즉, goat anti-mouse polyclonal antibody로 코팅된 96 well plate에 준비된 standard 및 sample을 각각 150 μ L씩 넣는다. Primary antibody solution을 50 μ L씩 첨가하여 실온에서 1시간 반응시키고, PGE₂ conjugate를 50 μ L 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 4번 세척 후 substrate solution 200 μ L씩 처리하여 실온 암소에서 30분간 반응시킨 후, stop solution을 100 μ L씩 첨가하여 반응을 종결시켜 450 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Optizen, Daejeon, Korea)를 이용

하여 흡광도를 측정하고 PGE₂ 값을 계산하였다.

Cytokine의 측정은 제조사의 분석방법에 따라 각 cytokine에 반응하는 항체가 코팅된 96 well plate에 준비된 standard와 sample들을 각 50 µL씩 분주하여 실온에서 2시간 배양하고 3회 세척한 다음 biotinylated antibody reagent를 well당 50 µL씩 분주하여 실온에서 1시간 배양하였고, 3회 세척한 다음 Streptavidin-HRP solution을 well당 100 µL씩 분주하여 30분간 배양하고, 3회 세척 후 마지막으로 TMB substrate solution을 각 well당 100 µL씩 분주하여 실온 암소에서 반응시켰다. Stop solution(0.16 M sulfuric acid) 100 µL씩 첨가하여 반응을 정지시키고, 450 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Optizen)를 이용하여 흡광도를 측정하여 정량하였다.

COX-2 단백질 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 100 µL의 lysis buffer를 첨가하여 강하게 vortex 후에 15분간 냉장 보관하였다. 같은 작업을 3번 반복하여 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준화 하여 Bradford assay를 사용하여 정량화하였다. 30 µg protein을 10% Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하여 이를 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane에 55V로 90분간 전사하였다. 그리고 PVDF membrane을 5% skim milk에서 1시간 방치한 뒤 1차 항체를 4°C에서 16시간 반응시켰다. 다시 Tris-buffered saline and tween 20(TBST)로 세 번 세척한 뒤 2차 항체를 상온에서 1시간 반응 시킨 뒤 TBST로 세 번 세척하고 Amersham ECL western blotting detection reagent와 반응시켜 LAS 4000을 이용하여 현상 후 분석하였다.

통계처리

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD로 표시하였다. 또한 각 분획물에서 얻어진 결과에 대한 통계분석은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하여 유의성이 있는 경우, 신뢰구간 p<0.05에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

추출 수율

계통적 추출법으로 물질을 추출하면 시료에 있는 유기화합물 중에서 비극성 물질로부터 극성이 큰 원자단을 가진 물질 순으로 추출된다. 비극성 용매인 ethyl acetate에서는

saponin, 당, 배당체, 유기산, tannin, alkaloid 등이 추출되며, 극성이 큰 물에서는 tannin, 배당체, 당, 점액, 단백질, 염류 등이 용출된다(6). 각 분획물의 추출 수율은 극성이 클수록 높아져 대추 잎 물 분획(ZLWF)에서 42.1%로 가장 높게 나타났으며, 부탄올(ZLBF)과 에틸 아세테이트(ZLEF) 분획물에서 각각 13.9%와 19.0%로 확인되었다(Table 1).

천연물의 효능이 뛰어나도 추출수율이 낮으면 생산 효율이 낮아 경제성이 떨어지지 때문에 천연물을 이용가치를 높이기 위해 추출 수율의 측정은 중요하다(7). 본 실험을 통해 대추 잎의 높은 추출 수율이 확인되었고, 비극성용매보다 극성 용매에서 추출 수율이 더 높게 확인되었다.

Table 1. Extraction yield (%) of *Zizyphus jujube* leaf using three different kinds of solvents water, ethyl acetate and butanol

Sample	Solvents	Yield (%)
<i>Zizyphus jujube</i> leaf	water (ZLWF)	42.1
	ethyl acetate (ZLEF)	13.9
	butanol (ZLBF)	19.0

세포독성 및 NO 생성량

세 가지 서로 다른 용매를 이용해 추출된 대추 잎 분획물의 세포독성을 측정하기 위해 Raw264.7 macrophage의 세포 생존율을 MTT assay로 분석하였다. 세포 MTT 반응에서 80% 이상의 생존율을 보인 경우 세포독성이 없는 것으로 판단되어지며, 본 연구에서 확보된 세 종류의 대추 잎 분획물 모두는 1~100 µg/mL 농도에서 세포 생존율 100% 이상을 나타내어 Raw264.7 macrophage에 대해 독성을 나타내지 않는 것이 확인되었고(Fig. 1(A)), 추가적인 항염증 실험도 1~100 µg/mL 농도에서 진행하였다.

LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage는 NO의 생성이 현저히 증가되었으나(44.5 µM), 대추 잎 물, 부탄올, 에틸 아세테이트 분획물(*Zizyphus jujube* leaf fractions, ZLFs)들을 농도별로 처리한 Raw264.7 macrophage에서는 LPS를 처리하지 않은 정상군(5.23 µM)에 가까운 NO 생성량을 나타내어, 염증이 유도되었을 때 ZLFs 처리가 효과적으로 NO의 생성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1(B)). ZLFs는 분획물 종류에 따라 조사된 최저 농도(1 µg/mL)에서 56~64%, 최고 농도(100 µg/mL)에서 61~85%의 NO 생성을 억제하였다. ZLWF와 ZLBF는 처리 농도 및 분획물에 따른 유의적인 차이가 없었으며, ZLEF는 100 µg/mL농도에서 가장 낮은 NO 생성량(0.70 µM)을 나타내었으며, 이는 LPS 비처리군과도 유의적인 차이를 보이는 낮은 NO 생성량을 확인할 수 있었다(p<0.05).

체내에서 염증이 일어나면 과량의 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE₂)등의 염증인자가 유도형 NO synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase(COX-2)에 의해 형성된다. NO는 NO 합성효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유

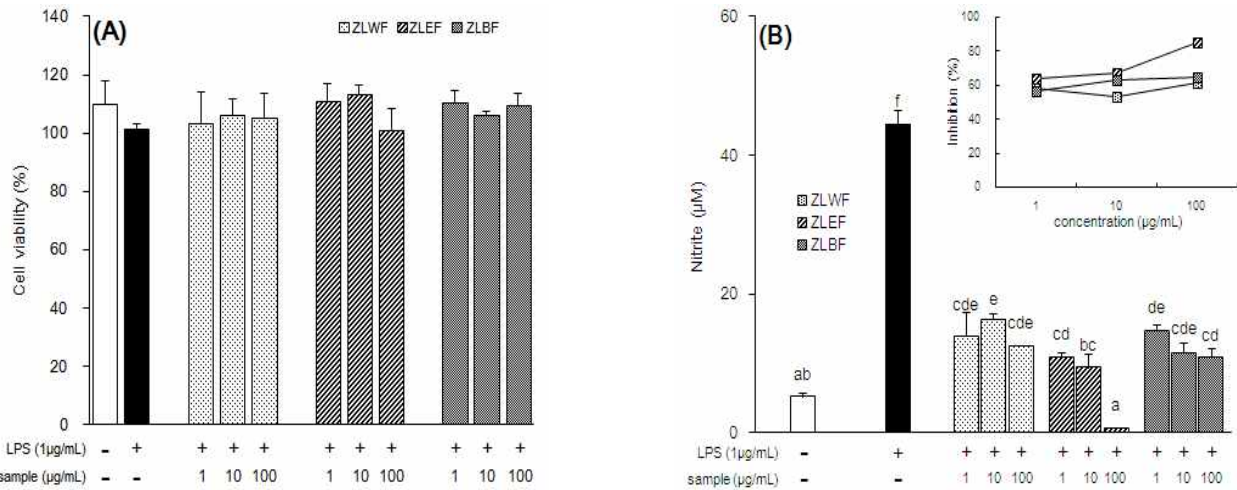


Fig. 1. Cell cytotoxicity and nitrite oxide production of *Zizyphus jujube* leaf fractions on Raw264.7 macrophage.

Cells were treated with 1-100 µg/mL of ZLFs (ZLWF, ZLEF, ZLBF) for 24 hr. (A) Cell viability was determined using the MIT assay; (B) Nitrite oxide production and inhibition rate. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments. Statistical significance is based on the difference when compared with control(only cells), p<0.05. ZLWF; *Zizyphus jujube* leaf water fraction, ZLEF; *Zizyphus jujube* leaf ethyl acetate fraction, ZLBF; *Zizyphus jujube* leaf butanol fraction.

리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 가지 생물학적인 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다(8,9). NO를 생산하는 NOS는 세포내에 존재하여 대식세포나 혈관내피세포가 활성화되거나 LPS와 같은 세균의 내독소나 여러 가지 cytokine에 의해 유도되는 형태인 iNOS의 형태가 있다. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이에 의한 세포독성은 염증반응, 세포의 돌연변이 및 종양 발생 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 염증반응과 관련된 조직 손상에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되어 있음이 보고되어 있다(10,11).

본 연구의 결과를 통해 대추 잎의 물, 부탄올, 에틸 아세테이트 분획물 모두가 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서 NO의 생성을 유의적으로 감소시키는 효과를 나타내는 것이 확인되었으며, 특히 대추 잎 에틸 아세테이트 추출물의 경우 조사된 최고 농도(100 µg/mL)에서 NO의 생성을 LPS 비처리군보다 낮게 억제하는 것이 확인되어, 세 종류의 추출물 중 NO생성을 가장 효과적으로 억제하는 후보 물질로 확인되었다.

PGE₂ 생성량 및 COX-2 단백질 발현 조절

Prostaglandin(PG)은 세포막에 존재하는 인지질에서 나온 arachidonic acid로부터 유래된 불포화지방산에 속하는 호르몬이다. 생성된 PG들 중 PGE₂는 염증 반응에 깊이 관여하며, 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 기여한다(12).

ZLFs 처리가 NO 생산을 효과적으로 억제한 것과 마찬가지로, ZLFs를 농도별로 처리한 Raw264.7 macrophage에서

PGE₂ 생성이 확실하게 저하되었고, 조사된 100 µg/mL 농도에서 ZLFs는 분획물 종류에 따라 71~100%의 PGE₂ 생성을 억제하였다. 특히 1 µg/mL의 낮은 농도 처리에서도 ZLWF(528.0 pg/mL), ZLEF(416.9 pg/mL), ZLBF(650.0 pg/mL)는 LPS 단독처리군(950.7 pg/mL)과 비교했을 때 유의적으로 PGE₂ 생성을 각각 46.3%, 55.4% 및 33.9% 감소시킴을 확인할 수 있었고(Fig. 2 (A)), ZLEF의 경우는 1 µg/mL의 낮은 농도 처리에서 LPS 비처리군(455.0 pg/mL)과 유사한 PGE₂량을 나타냈다. 분획별로 살펴보면, ZLWF는 1~100 µg/mL 농도에서 46~71%의 PGE₂ 생성저해 효과를 보였다. 농도에 따른 유의적인 차이는 없었지만, LPS 비처리군과 비교했을 때 100 µg/mL 처리 농도에서 PGE₂ 생성이 유의적으로 감소(280.7 pg/mL)됨을 확인할 수 있었다. ZLEF는 분획물중 가장 뛰어난 PGE₂ 생성저해 효과를 보였고, ZLEF 처리 농도에 의존적으로 PGE₂ 생성량이 감소되었다. ZLEF은 가장 낮은 농도 1 µg/mL에서 55% 이상의 저해 효과를 보였고, 10 µg/mL 처리 농도에서 71%, 100 µg/mL 농도에서는 100%에 가깝게 PGE₂ 생성이 저해되어 우수한 항염증 효과를 확인할 수 있었다. ZLBF는 ZLWF와 같이 1, 10 µg/mL 농도에서 LPS 비처리군과 유사한 PGE₂ 생성량을 보였고, 100 µg/mL에서 LPS 비처리군보다 유의적으로 감소된 PGE₂량(188.1 pg/mL)을 나타냈다. 이와 같은 결과는 염증반응 시, ZLFs의 처리가 주요 염증성 매개물질인 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 나타냄을 시사하고 있다.

또한 이러한 염증반응 매개물질인 PGE₂는 COX 라는 효소에 의해 생합성이 되며 COX는 COX-1과 COX-2로 두 종류가 존재한다. COX-1의 경우에는 생체 내의 대부분의 조직에 존재하며, PG 생성에 관여한다. 반면 COX-2는 growth factors, mitogens, cytokine 등과 같은 요인에 의해

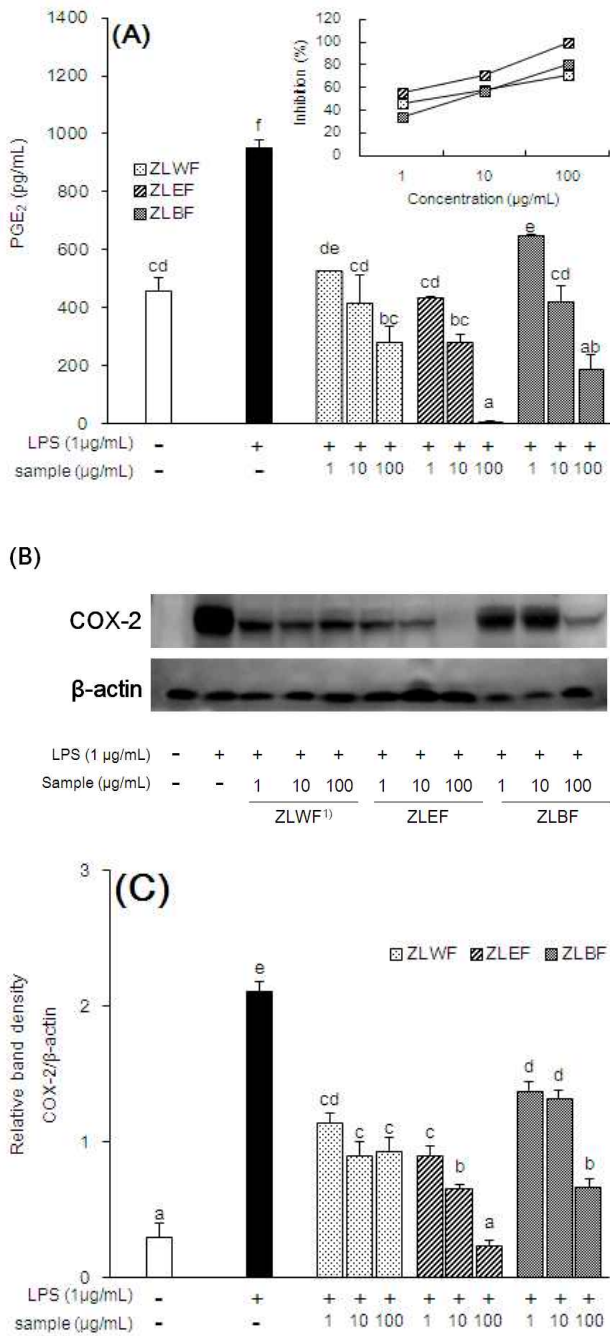


Fig. 2. Pro-inflammatory effect of *Zizyphus jujube* leaf fractions on PGE₂ inhibition and COX-2 protein expression in LPS-stimulated Raw264.7 macrophage.

Cell were treated with 1, 10 and 100 µg/mL of extracts in the presence of 1 µg/mL LPS or with LPS alone for 24 hr. (A) PGE₂ production and inhibition rate of macrophage cells; (B) Western blots of COX-2 and β-actin proteins from macrophage cells; (C) relative density of COX-2 immunoblot. The relative intensity of the LPS-stimulated group was taken to be 100%. Band intensities were quantified by densitometry and are indicated as the percent change relative to that of the LPS-stimulated group. ZLFs significantly inhibited LPS-induced PGE₂ product and COX-2 protein expression in macrophage. The experiment was repeated three times. (p<0.05, significantly different from the LPS-stimulated group). Refer to the legend in Figure 1.

발현이 증가되어 다량의 PG를 생성함으로써 염증관련 질병을 유발하는 것으로 밝혀져 있다. COX-2는 일반 정상조

직에서는 그 발현 정도가 매우 낮으나 염증성 인자나 세포 성장인자, 발암원, 종양촉진인자 등의 작용에 의하여 빠르고 일시적으로 발현되며 염증 및 암세포 성장에 주요한 역할을 담당하고 있는 것으로 여겨지고 있어 COX-2의 억제제를 통해 추출물의 항염증 효과를 확인할 수 있는 것으로 알려져 있다(13).

대추 잎 분획물들이 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서 효과적으로 PGE₂ 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 결과가 PGE₂ 발현의 매개가 되는 COX-2 단백질 발현 억제에 영향을 끼치는지 확인하기 위해 western blotting을 통해 COX-2 단백질 발현정도를 측정하였다. 그 결과, LPS 비처리군은 COX-2 단백질이 거의 발현되지 않은 반면, LPS 처리군에서는 발현이 현저히 증가됨을 확인하였고, ZLFs 처리는 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서 효과적으로 COX-2 단백질 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2 (B), (C)). 이러한 결과를 통해, 대추 잎 분획물 처리는 Raw264.7 macrophage에서 LPS 처리로 증가된 PGE₂의 생성과 COX-2 단백질의 발현을 유의성 있게 억제하는 것을 확인할 수 있었고, 특별히 ZLWF와 ZLEF처리가 COX-2 단백질의 발현을 현저히 감소시키며, ZLEF의 경우 100 µg/mL 농도에서 COX-2 단백질이 거의 발현되지 못하는 것을 확인하였다. 이로써 대추 잎의 물, 부탄올, 에틸 아세테이트 분획물(ZLFs)은 COX-2 단백질의 발현제어를 통해 PGE₂ 생성을 억제하는 염증억제 작용이 확인되었으며, 특히 조사된 초고 농도 100 µg/mL에서 에틸 아세테이트 분획물(ZLEF)의 경우 다른 분획물에 비해 PGE₂의 생성과 COX-2 단백질의 발현을 LPS 비처리군보다 낮게 억제하는 것이 확인되어, 세 종류의 추출물 중 COX-2 단백질의 발현제어를 통해 PGE₂ 생성을 억제하는 염증억제 작용이 가장 탁월한 물질로 확인되었다.

염증성 Cytokine 측정

염증성 cytokine으로 대표되는 IL-1β, IL-6 및 TNF-α는 염증반응을 매개하는 물질로 특히 초기 염증반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. ZLFs이 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage가 분비하는 염증성 cytokine의 생성억제 효과를 측정하기 위해 ELISA 방법을 이용하여 염증성 cytokine의 생성량을 측정한 결과, ZLFs 처리는 LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서 증가된 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성을 효과적으로 감소시켰다(Fig. 3).

IL-1β는 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙 등에 관련하는 것으로 알려져 있는데(14), ZLFs 처리는 LPS 단독 처리군 (117.2 pg/mL)에 비해 유의적으로 IL-1β 생성량을 감소시켰다(Fig. 3(A)). ZLWF는 29~38%의 생성저해 효과를 나타냈으며 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다. ZLEF의 경우, 분획물중에서 가장 우수한 IL-1β 생성 저해효과를 보였다.

ZLEF 1 µg/mL 처리농도에서는 65.0 pg/mL의 IL-1β가 확인되어 ZLWF와 유사한 저해효과를 나타냈으나, 10 µg/mL와 100 µg/mL 처리농도에서는 각각 2.8 pg/mL와 0.7 pg/mL의 IL-1β가 확인되어 IL-1β 생성을 97% 이상 억제하는 우수한 효과를 확인할 수 있었다. ZLBF는 LPS 단독 처리군에 비해 유의적으로 IL-1β 생성이 감소되었지만, ZLWF와 ZLEF에 비해 비교적 낮은 저해효과를 나타냈다(p<0.05).

IL-6는 B cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, 염증병변에서 증가하는 것으로 알려져 있다(14). ZLFs 처리에 따라 LPS 단독처리군(204.9 pg/mL)에 비해 유의적으로 IL-6 생성이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3(B)). ZLWF의 경우 LPS 비처리군(2.5 pg/mL)에 비해서는 IL-6 생성이 증가되었지만, LPS 단독처리로 염증이 유도된 대조군에 비해서는 유의적으로 생성이 억제되었다. 1~100 µg/mL 처리 농도에 따라 유의적으로 IL-6 생성이 억제되었고 100 µg/mL농도에서 47%(107.6 pg/mL)로 가장 높은 IL-6 생성 억제효과를 나타냈다. IL-1β 생성 억제효과가 우수했던 ZLEF는 분획물중 가장 높은 IL-6 생성 억제효과를 나타냈다. ZLEF 1 µg/mL(95.43 pg/mL)의 낮은 처리농도에서도 53%의 IL-6 생성 억제효과를 나타냈고, 10, 100 µg/mL에서는 각각 94%, 99%의 우수한 IL-6 생성 저해효과를 확인할 수 있었다. ZLBF의 경우는 ZLWF와 유의적으로 유사한 IL-6 생성 억제 효과를 보였고, 100 µg/mL(105.5 pg/mL)에서 48%로 가장 높은 저해 효과를 나타냈다.

TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로서, 염증성 병변과정에서 발현이 증가되는데 대식세포와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 세포독성을 나타낸다(14). ZLWF는 앞서 살펴본 IL-1β와 IL-6 생성억제 효과에서 ZLEF, ZLBF 보다 비교적 낮은 저해효과를 보였지만, TNF-α에서는 ZLBF보다 높은 생성저해 효과를 나타냈다(Fig. 3(C)). 1 µg/mL(4.6 pg/mL)의 낮은 농도에서도 LPS 단독처리군(8.5 pg/mL)에 비해 46%의 비교적 높은 억제율로 유의적으로 TNF-α 생성이 저해되었다. 10, 100 µg/mL 농도에서는 각각 3.1 pg/mL, 2.9 pg/mL의 TNF-α 생성량을 확인하였고 두 농도 사이에 유의적 차이는 없었다. ZLEF는 10, 100 µg/mL 농도에서 LPS 비처리군(0.5 pg/mL)과 유사한 TNF-α 생성량을 나타냄으로써, 분획물중 ZLEF가 IL-β, IL-6 뿐만 아니라 TNF-α의 생성도 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. ZLBF는 분획물중 TNF-α 생성 억제율이 가장 낮게 측정되었고, 처리 농도에 상관없이 ZLWF 1 µg/mL의 수준과 같은 억제 능력을 나타냈다.

특히 염증성 cytokine인 TNF-α 및 IL-6는 iNOS의 발현을 자극하여 NO의 분비를 촉진하는 것으로 보고되고 있으며 PG, leukotrien 등의 염증매개물질의 생산에도 관여하며, 내피세포의 intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)과 같은 접착분자의 발현을 촉진시킴으로써 국소부위의 대식세포, 호중구와 같은 염증세포의 수를 증가시켜 염증반응을

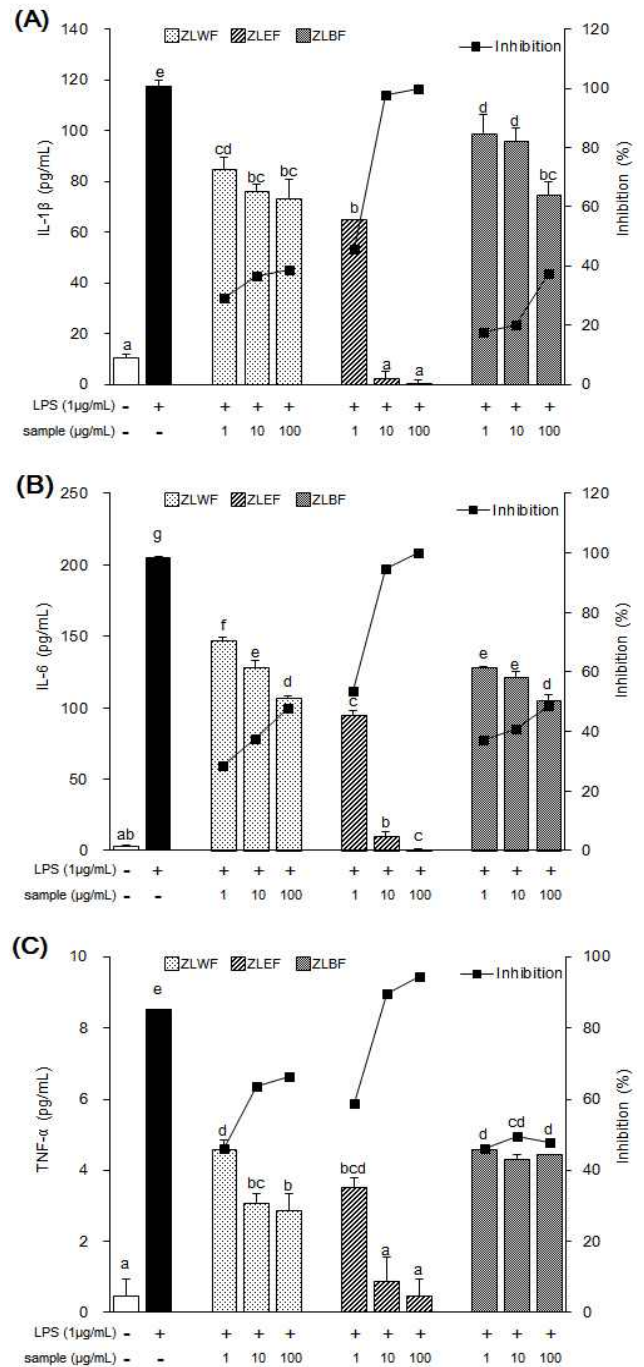


Fig. 3. Pro-inflammatory effect of *Zizyphus jujube* leaf fractions on pro-inflammatory cytokine levels (A; IL-1β, B; IL-6, C; TNF-α) of LPS-induced Raw264.7 macrophage.

The data shown represent triplicate experiments. Bars represent the mean±SD and values with different letters are significantly different(p<0.05). Refer to the legend in Figure 1.

유도하는 인자로 알려져 있다(14,15).

본 연구를 통해 대추잎 분획물은 염증 유도 시, 염증성 cytokine을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 ZLEF가 가장 뛰어난 염증성사이토카인 억제효과를 나타내 우수한 항염증 제제로서 효과를 기대해 볼 수 있을

것으로 사료된다.

요 약

LPS로 염증이 유도된 Raw264.7 macrophage에서 대추잎 분획물(*Zizyphus jujuba* leaf fractions; ZLFs)의 항염증 효과를 살펴 보기 위해 세포독성이 나타나지 않은 1, 10, 100 µg/mL 농도 범위에서 염증매개물질인 NO, PGE₂, 염증성 cytokine(TNF-α, IL-1β 및 IL-6) 생성 및 COX-2 단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과, ZLFs(ZLWF, ZLEF, ZLBF)는 처리 농도 범위에서 효과적으로 NO, PGE₂, 염증성 cytokine 생성 및 COX-2 단백질 발현을 억제하였다. 분획 용매에 따른 효과를 살펴보면 ZLWF < ZLBF < ZLEF의 순으로 높은 효과를 나타냈고, 특히 에틸 아세테이트 분획물 ZLEF은 100 µg/mL 처리 농도에서 NO, PGE₂, 염증성 cytokine 생성 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과가 LPS를 처리하지 않은 음성 대조군보다 우수하거나 비슷하여 본 연구에서 조사된 대추 잎 분획물 중 가장 뛰어난 염증 억제제 후보물질로 확인되었다.

References

1. Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes; advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-1875
2. Albina JE, Reichner JS (1995) Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz*, 3, 46-64
3. Lee SJ, Lim KT (2008) Phyto glycoprotein inhibits interleukin-1β and interleukin-6 via p38 mitogen activated protein kinase in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 377, 45-54
4. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2, 787-799
5. Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophage. *J Immunol* 144, 1425-1431
6. Chung HS, Woo WS (2001) A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice. *J Nat Prod*, 64, 1579-1580
7. Jin SY (2011) Antioxidant activities of solvent extracts from pomegranate endocarp. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 1635-1641
8. Nathan C, Xie QW (1994) Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78, 915-918
9. Lowenstein CJ, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 70, 705-707
10. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142
11. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 178, 749-754
12. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Michell JA (2002) Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Tox Oncol*, 21, 93-101
13. Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F (2007) Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: elevation of prostaglandin D2 levels. *Arthritis Res Ther*, 9, R64
14. Son JH, Kim HJ, Park TS, Jung MS (2011) Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (*Cheongdo Bansi*). *J Appl Biol Chem*, 54, 71-78
15. Yang HM, Lim SS, Kee YS, Shin HK, Oh YS, Kim LK (2007) Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 342-347

(접수 2013년 8월 5일 수정 2013년 9월 12일 채택 2013년 9월 13일)