

Antioxidative and Anti-inflammatory Activities of *Ardisia arborescens* Ethanol Extract

Kyong-Suk Jin¹, Ji Young Lee¹, Hyun Ju Kwon^{1,2} and Byung Woo Kim^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received April 8, 2014 / Revised June 3, 2014 / Accepted June 3, 2014

In this study, the antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract (AAEE) were evaluated using *in vitro* assays and a cell culture model system. AAEE exhibited potent scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), similar to ascorbic acid, which was used as a positive control. Moreover, AAEE effectively suppressed lipopolysaccharide (LPS)- and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced reactive oxygen species (ROS) in RAW 264.7 cells. Furthermore, AAEE induced the expression of antioxidative enzymes, heme oxygenase 1 (HO-1), and thioredoxin reductase 1 (TrxR1), in addition to their upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), in a dose-dependent manner. The upstream signaling pathways of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) might regulate the modulation of HO-1, TrxR1, and Nrf2 expression. On the other hand, AAEE inhibited LPS-induced nitric oxide (NO) formation, without cytotoxicity. Suppression of NO formation was the result of AAEE-induced down-regulation of inducible NO synthase (iNOS). The suppression of NO and iNOS by AAEE might be modulated by their upstream transcription factor, nuclear factor (NF)- κ B, and activator protein (AP)-1 pathways. Taken together, these results provide important new insights into the antioxidative and anti-inflammatory activities of *A. arborescens*. AAEE might represent a promising material in the field of nutraceuticals.

Key words : Anti-inflammatory activity, anti-oxidative activity, *Ardisia arborescens*, upstream transcription factor

서 론

생명 유지의 기본 단계인 호흡과 대사과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 세포조직에 치명적인 손상을 일으키며, 암, 뇌 질환, 동맥경화, 당뇨병, 천식 등의 질병 뿐만 아니라 노화의 직·간접적인 요인으로도 작용하는 것으로 알려지고 있다[3, 7, 12, 24, 25]. 또한 염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어 기전이나, 지속적인 염증 반응은 조직의 손상을 일으켜 암을 비롯한 각종 질병을 유발한다[5, 8]. 이러한 관점에서 기능성 소재가 보유한 항산화능은 다양한 생리활성의 밑바탕이 되며 특히 산화적 스트레스와 염증에 의해 쉽게 발생하는 여러 가지 질환에 대응하기 위해서는 강한 항산화능을 보유한 생리활성 소재의 개발이 매우 중요하다. 이에 따라 최근 많은 연구들이 항산화 및 항염증 활성을

보유한 신소재 개발 및 그 활성 기전의 규명에 주력하고 있으며 특히 천연소재로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명하여 기능성 소재로서 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[16, 17, 26].

대표적인 cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme으로 알려진 heme oxygenase (HO)-1과 thioredoxin reductase 1 (TrxR1)의 유도는 산화적 스트레스를 방어하는 중요한 기전 중 하나로 다양한 외부 자극으로부터 세포를 보호하는 chemoprevention 과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[6, 33]. 특히 천연물에서 유래한 dietary phytochemical은 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절되는 phase 2 detoxifying antioxidant enzyme의 발현 증가를 통해 chemopreventive function을 나타내는 경우가 많으며, 이러한 일련의 과정은 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), 그리고 p38과 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt와 같은 상위신호전달기전의 영향을 받는다[13, 18, 20, 28]. 이러한 chemoprevention은 항산화 활성을 기초로 하여 암뿐만 아니라 염증, 뇌 및 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 알려지고 있어 그 중요성이 더욱 커지고 있다[4, 14, 27, 31].

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-51-890-2914

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

생체 내 염증 반응은 대식세포(macrophage)에서 생산되는 염증 매개인자(inflammatory mediators)로부터 유래되는데 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생산되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase 2 (COX-2)에 의해 생산되는 prostaglandin E2 (PGE2) 등이 대표적이다. 외부 자극에 의해 과량 생산된 염증 매개인자는 tumor necrosis factor- α , interleukin 1 β 등과 같은 사이토카인을 분비하여 다양한 염증 반응을 유발한다[14, 15]. 염증 반응의 대표적인 세포 실험계 중 하나인 RAW 264.7 murine macrophage에 염증 유발인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하면 iNOS와 COX-2의 발현 유도에 의한 NO와 PGE2 등 염증 매개인자의 생성 및 이를 통한 사이토카인 분비량 증가가 나타나며 이러한 일련의 과정은 염증 상위신호전달기전인 nuclear factor (NF)- κ B와 activator protein (AP)-1에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[20, 22, 28]. 그러므로 이러한 염증 매개인자와 그 상위신호전달기전을 효과적으로 제어할 수 있는 물질들이 염증의 예방 및 치료를 위한 소재로서 주목 받고 있다.

*Ardisia arborescens*는 자금우과(Myrsinaceae)에 속하는 소고목이며 동아시아 지역, 특히 중국에 분포한다. 일반적인 높이는 2~5 m이고, 개화시기는 2~4월이며, 9~11월에 열매를 맺는다. 뿌리를 약용으로 사용하며 고열, 감기 및 두통에 사용하는 것으로 알려져 있으나 그 구체적인 효능에 대해서는 알려진 바 없으며, 특히 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 전혀 알려진 바 없다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *A. arborescens* 95% 에탄올 추출물(AAEE)이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 *in vitro* assay system 및 cell culture model system을 이용하여 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

A. arborescens 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *A. arborescens* 95% 에탄올 추출물(AAEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-084)하여 사용하였으며 추출 과정은 다음과 같다. *A. arborescens*의 줄기 부위를 건조 및 파쇄한 후, 95% 에탄올을 용매로하여 45°C에서 15분간 초음파 추출 후 2시간 정치시키는 과정을 하루 10회씩 반복하여 총 3일간 추출을 수행하였다. 추출이 완료된 시료를 filter로 여과하여 고형물을 없애고 45°C에서 감압농축(N-1000SW, EYELA, Japan)한 후 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정을 통한 AAEE의 항산화능 분석

AAEE의 항산화능 보유 유무와 정도를 1,1-diphenyl-2-

picryl hydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석을 이용하여 분석하였다[7]. DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다[11].

DPPH radical scavenging activity 측정을 위해 AAEE를 농도별(0.4~12.8 μ g/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 μ l와 각 시료 160 μ l를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(inhibitory concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH radical 소거 활성 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 ascorbic acid를 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 murine macrophage의 배양

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 murine macrophage cell line인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin (Pen/Strep)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다 [23].

AAEE의 세포생존율 분석

활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인함과 동시에 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 AAEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 Water Soluble Tetrazolium (WST) assay를 통해 수행하였다. WST는 수용성의 tetrazolium salt로서 살아있는 세포와 반응하여 오렌지색 수용성 formazan을 생성한다. 기존의 세포생존율 분석 시약인 MTT는 낮은 용해도의 formazan 생성과 배지 제거 과정에 의한 오차의 범위가 큰 단점이 있어 이를 대체하기 위한 다양한 방법이 개발되어 왔으며, 그 중 WST는 시료 자체의 세포 독성이 낮고, formazan을 녹이는 과정과 배양액의 제거과정이 필요치 않아 측정값의 유의성이 높고 편차가 적으며 부유 세포에도 적용할 수 있는 장점이 있어 최근 많이 이용되고 있는 방법이다[7, 25]. 1.0×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24 시간 동안 부착시키고, AAEE 처리 24시간 후 WST 시약을 10%로 첨가한 배지로 교체하여 한 시간 동안 37°C에서 반응시킨 다음 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위의

에서 이후 실험을 수행하였다.

AAEE의 Reactive Oxygen Species (ROS) scavenging activity 분석

ROS는 과량 생산 시 DNA, protein, lipid를 포함한 생체 내 분자에 산화적인 변형을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[19]. Hydrogen peroxide (H_2O_2)는 대표적인 ROS 중 하나로 소개의 항산화능을 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[29, 30, 32]. 또한 그람 음성 세균의 세포 외벽을 구성하는 주요 인자인 lipopolysaccharide (LPS)는 대표적인 염증 유발 인자로 산화적 스트레스 또한 유발하는 것으로 알려져 있어 항산화능 및 항염증 활성을 규명하기 위한 많은 연구에 사용되고 있다[1, 21]. 본 연구에서는 AAEE가 보유한 항산화능을 H_2O_2 및 LPS로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 cell에 cell permeable fluorescent dye인 50 μ M의 dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고 500 μ M의 H_2O_2 혹은 1 μ g/ml의 LPS를 농도 별 시료와 함께 처리한 후 시료에 의한 ROS 생성 억제능을 multiplate reader를 이용한 fluorescence 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

항산화 효소 HO-1, TrxR1 및 그 전사인자인 Nrf2의 발현 조절능 분석

AAEE의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1, TrxR1과 그 전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1과 p-p38, p-JNK, p-ERK, 그리고 p-Akt의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로부터 구입하였고, p-Nrf2의 일차항체는 Calbiochem (CA, USA)로부터 구입하였으며, TrxR1, Nrf2, Actin의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit, 그리고 anti-mouse 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000~5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 hybridization하였다. Membrane washing 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시킨 후 chemiluminescence detection system (Fluoro-Chem@ FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 대표적인 데이터를 제시하였다.

AAEE의 NO 생성 억제능 분석

대표적인 free radical 중 하나인 NO는 생체 내에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[10]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[23]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 cell을 24-well tissue culture plate에 well 당 1.0×10^5 cell을 seeding하여 부착시킨 후 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 식물 추출물에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

AAEE의 항염증 활성 기전 분석

AAEE가 보유한 NO 생성 억제능의 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 분석하였다. 또한 AAEE에 의한 NO 생성 및 iNOS의 발현 저해능이 NF- κ B 및 AP-1에 의해 조절될 가능성을 알아보기 위해 LPS로 유도된 NF- κ B p65와 inhibitory κ Ba (I κ Ba), 그리고 AP-1의 subunit인 c-Jun의 인산화에 AAEE가 미치는 영향을 분석하였다. Western blot hybridization을 위한 iNOS, p-p65, p-I κ Ba, 그리고 p-c-Jun의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 대상 단백질의 항체와 hybridization하였다. Membrane washing 후 HRP가 tagging된 이차항체로 한 시간 동안 반응시킨 후 chemiluminescence detection system을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 대표적인 데이터를 제시하였다.

통계 분석

실험의 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만($p < 0.05$)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

AAEE의 항산화능 분석

AAEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 먼저 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH radical scavenging activity를 분석하였다. 그 결과 Table 1에 제시된 바와 같이 AAEE의 농도 증가에 따라 강한 radical 소거능을 보여 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 μ g/ml의 시료 처리에 의해 DPPH radical 소거능이 각각 23.29, 29.17, 38.42, 55.94, 87.58, 93.21%로 나타나 50% 소거 농도를 나타내는 IC₅₀ 값이 2.69 μ g/ml로 양성

Table 1. DPPH radical scavenging activity of AAEE

Reagent	Concentration (µg/ml)	Scavenging activity (%)
AAEE	0.4	23.29±1.85
	0.8	29.17±0.55
	1.6	38.42±1.25
	3.2	55.94±3.48
	6.4	87.58±2.92
	12.8	93.21±4.16
Ascorbic acid (Positive control)	0.4	20.56±2.09
	0.8	26.34±0.62
	1.6	38.88±1.74
	3.2	64.80±1.51
	6.4	97.10±0.26
	12.8	97.62±0.10

대조군으로 사용한 ascorbic acid, 즉 vitamin C의 IC₅₀ 값인 2.29 µg/ml와 유사한 정도의 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 이에 AAEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인할 필요성이 제기되었다.

AAEE의 ROS scavenging activity 분석

DPPH radical scavenging activity 분석을 통해 AAEE가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 cell에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂와 LPS를 각각 처리하여 AAEE에 의한 ROS scavenging activity를 분석하였다. AAEE는 50 µg/ml 처리시까지 세포독성을 전혀 유발하지 않았고, H₂O₂와 LPS에 의해 각각 유도된 ROS 생성이 AAEE의 처리에 의해 효과적으로 저해되는 것으로 나타나 AAEE가 DPPH radical 뿐만 아니라 세포 실험계에서 H₂O₂와 LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(Fig. 1).

AAEE가 항산화 효소 HO-1, TrxR1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

강한 항산화능을 보유한 천연 유래 소재들이 Nrf2에 의한 항산화 효소계의 발현 유도를 통해 활성을 나타낸다는 것이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 AAEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보려고 하였다[9, 27]. 이를 위해 대표적인 천연물에 의한 항산화 활성에 의해 주로 발현이 유도되는 대표적인 항산화 효소인 HO-1과 TrxR1의 단백질 발현과 그 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현 및 인산화에 AAEE가 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 Fig. 2에 제시된 바와 같이 6시간 동안 10~50 µg/ml의 시료 처리에 의해 HO-1과 TrxR1의 발현이 농도의존적인 강한 증가를 보였다. 뿐만 아니라 두 효소의 상위 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현과 인산화 또한 증가되는 것으로 나타나 AAEE에 의한 항산화 효소의 발현

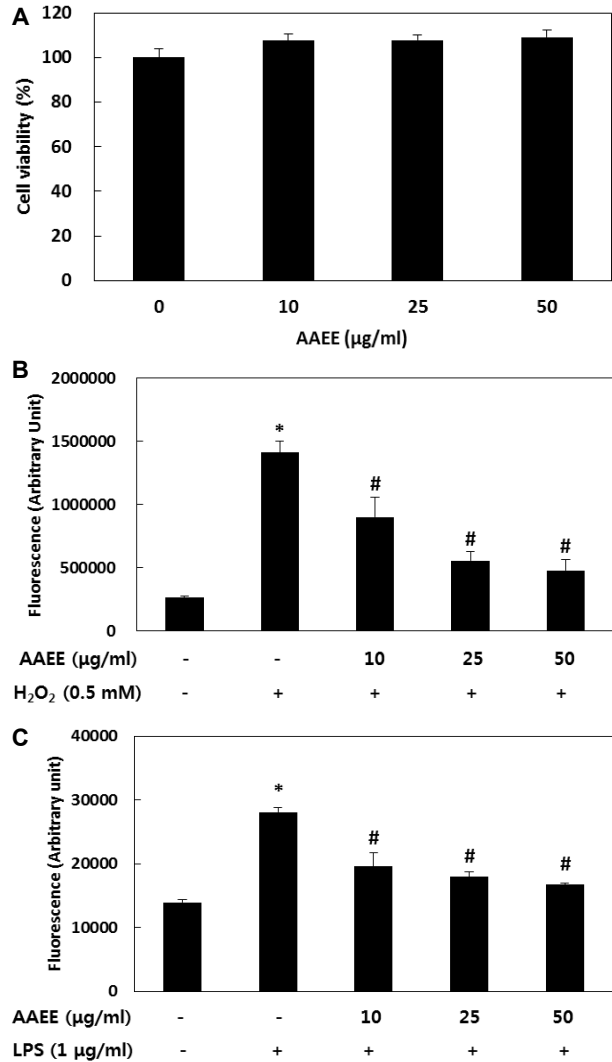


Fig. 1. Effect of AAEE on viability (A), H₂O₂- (B) and LPS- (C) induced ROS scavenging activity in RAW 264.7 cells. Values are represented as the mean ± SD (n=6). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and H₂O₂- or LPS-induced control (-/+), respectively (p< 0.05).

증가가 Nrf2의 발현 증가와 인산화에 기인할 것으로 판단되었다[2, 6].

AAEE가 상위신호전달인자인 MAPKs와 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 영향

AAEE가 보유한 항산화능의 상위신호전달기전을 알아보기 위해 p38, JNK, 그리고 ERK 등의 MAPKs와 Akt의 인산화에 AAEE가 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 6시간 동안 10~50 µg/ml의 시료 처리에 의해 Akt를 제외한 3종의 MAPKs의 인산화가 증가되는 것으로 나타났으며 이는 농도의존성뿐만 아니라 시간에 따른 처리에서도 증가됨을 보였다. 이러한 결과를 통해 AAEE의 항산화능이 HO-1, TrxR1

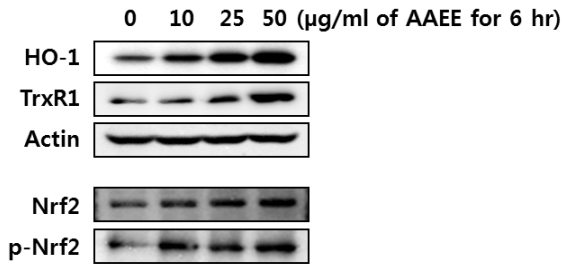


Fig. 2. Modulation of anti-oxidative enzymes, HO-1, TrxR1, and their upstream transcription factor, Nrf2 protein expression and phosphorylation in RAW 264.7 cells by AAEE. Actin was used as an internal control.

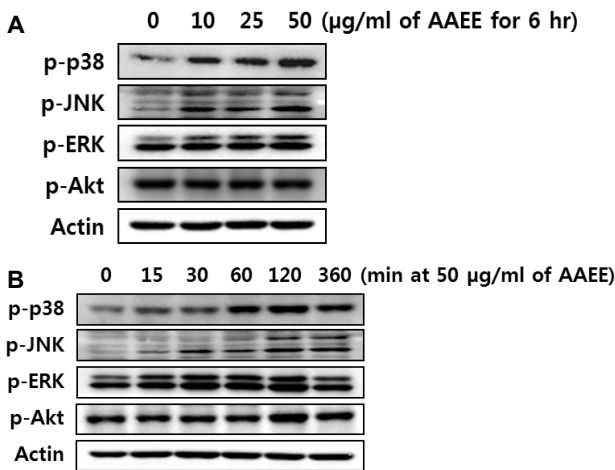


Fig. 3. Modulation of the phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt signaling molecules in RAW 264.7 cells by AAEE as dose-dependent (A) and time-dependent (B) manners. Actin was used as an internal control.

과 그 상위전사인자인 Nrf2의 발현 및 인산화 증가를 통해 나타나며 그러한 일련의 과정이 MAPKs와 같은 상위신호전달인자에 의해 나타날 가능성을 확인하였다. MAPKs의 인산화는 ROS에 의한 세포 손상을 막기 위한 항산화 효소계의 발현 조절에 필수적인 신호전달 기전이며, 강한 항산화능을 보유한 AAEE 또한 p38, JNK, 그리고 ERK의 인산화를 통해 HO-1의 발현을 유도하는 것으로 판단된다. 이는 천연 유래 추출물 및 분리화합물이 MAPKs의 인산화에 의해 유도된 HO-1의 발현 증가를 통해 항산화 및 항염증 활성을 나타냄을 보인 다른 연구들과 일치하는 결과라 할 수 있다[6, 12, 24, 33]. 한편 MAPKs 및 PI3K/Akt의 인산화는 NF-κB 및 AP-1의 활성화를 통해 세포 내 염증반응을 유발하는 주요 신호전달기전 중 하나로도 작용하여 LPS 등의 염증성 자극에 의해 유도되며 항염증 활성 보유 시료 처리에 의해 인산화가 저해된다. 이러한 MAPKs 및 PI3K/Akt의 두 가지 상반된 기작은 상호연관성을 가지며, 항산화 및 항염증 활성의 기전이 MAPKs/Nrf2/HO-1의 유도와 MAPKs/NF-κB 신호전달기전의 저해라는 이원화 방식을 통해 이루어짐이 여러 연구를 통해 밝혀

지고 있다[12, 24, 27].

AAEE의 NO 생성 저해능 분석

AAEE가 항산화능 뿐만 아니라 항염증 활성 또한 보유하는지를 알아보기 위해 먼저 NO 생성에 미치는 효과를 알아보았다. LPS로 자극을 유도한 쥐 대식세포주 RAW 264.7 cell에서 농도별 AAEE의 처리에 따른 NO 생성량의 변화를 분석한 결과 Fig. 4에 제시된 바와 같이 10~50 µg/ml의 시료 처리에 의해 세포독성의 유발없이 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현저해에서 기인하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 AAEE가 산화적스트레스 뿐만 아니라 염증성 자극에 대한 방어능 또한 보유함을 확인하였다.

AAEE가 NF-κB 및 AP-1의 인산화에 미치는 영향 분석

AAEE가 iNOS의 발현 저해에 따른 NO 생성 억제능을 보

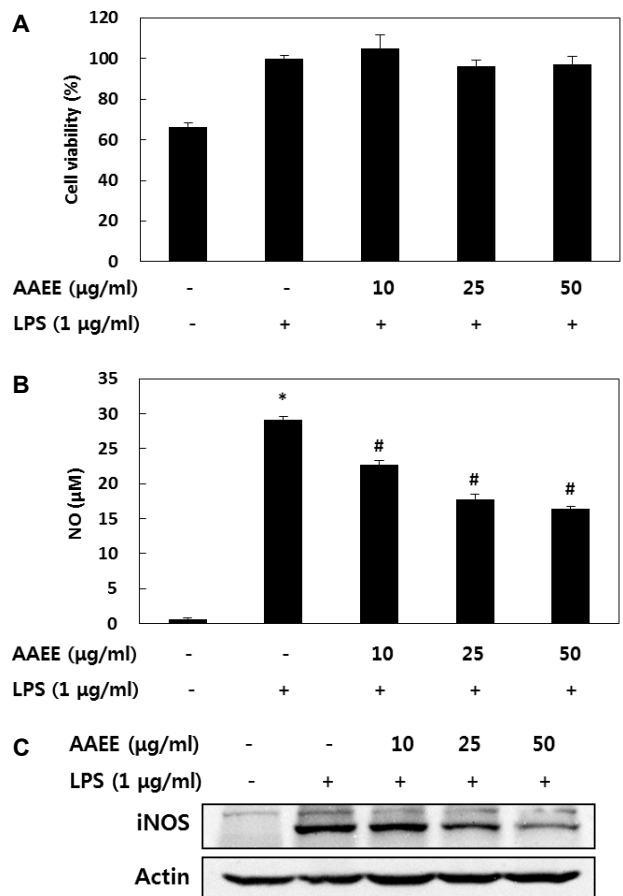


Fig. 4. Effect of AAEE on cell viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A, B) Values are represented as the mean ± SD (*n*=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and LPS-induced control (-/+), respectively (*p*<0.05). (C) Actin was used as an internal control.

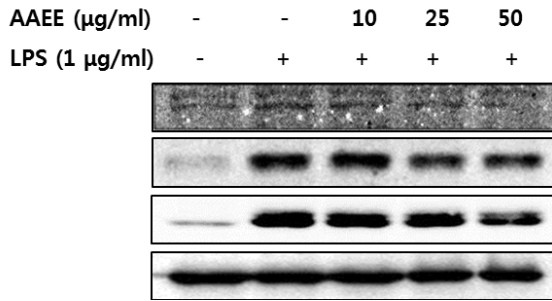


Fig. 5. Modulation of AAEE on the upstream signaling pathway for anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells. Actin was used as an internal control.

유함을 확인함에 따라 항염증 활성의 상위신호전달기전인 NF-κB와 AP-1의 연관성을 알아보기 위해 AAEE가 LPS에 의해 유도된 NF-κB p65와 IκBα, 그리고 AP-1의 subunit 중 하나인 c-Jun의 인산화에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 Fig. 5에 제시된 바와 같이 2시간 동안의 LPS 처리에 의해 유도된 세 전사인자의 인산화가 AAEE 농도의 증가에 따라 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 AAEE의 항염증 활성이 항염증 상위신호전달인자들의 일련의 조절 기작을 통해 이루어질 가능성을 시사하였다.

이상의 결과를 통해 AAEE가 높은 항산화능과 항염증 활성을 보유함을 처음으로 확인하였으며, 이러한 결과는 신규 소재에 대한 새로운 기능성 데이터를 구축함과 동시에 향후 생리활성 보유 기능성 소재로서의 활용을 위한 근거자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터 사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어 졌습니다.

References

- Awad, N., Khatib, N., Ginsberg, Y., Weiner, Z., Maravi, N., Thaler, I., Ross, M. G., Itskovitz-Dldor, J. and Beloosesky, R. 2011. N-acetyl-cysteine (NAC) attenuates LPS-induced maternal and amniotic fluid oxidative stress and inflammatory responses in the preterm gestation. *Am J Obstet Gynecol* **204**, 450.
- Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. and Park, B. K. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* **85**, 705-717.
- Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A. M. and Gaetano, C. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci* **14**, 17643-17663.
- Chapple, S. J., Siow, R. C. and Mann, G. E. 2012. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1315-1320.
- Chawla, A., Nguyen, K. D. and Goh, Y. P. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738-749.
- Choe, Y. J., Lee, S. Y., Ko, K. W., Shin, S. J. and Kim, H. S. 2014. Nutlin-3 induces HO-1 expression by activating JNK in a transcription-independent manner of p53. *Int J Oncol* **44**, 761-768.
- Guertler, A., Kraemer, A., Roessler, U., Hornhardt, S., Kulka, U., Moertl, S., Friedl, A. A., Illig, T., Wichmann, E. and Gomolka, M. 2011. The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. *Radiat Prot Dosimetry* **143**, 487-490.
- Giudice, A., Arra, C. and Turco, M. C. 2010. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol Biol* **647**, 37-74.
- Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem* **19**, 5319-5341.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Hu, R., Saw, C. L., Yu, R. and Kong, A. N. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1679-1698.
- Itoh, T., Koketsu, M., Yokota, N., Touho, S. and Ando, M. 2014. Reduced scytonemin isolated from *Nostoc commune* suppresses LPS/IFNγ-induced NO production in murine macrophage RAW264 cells by inducing hemeoxygenase-1 expression via the Nrf2/ARE pathway. *Food Chem Toxicol* **69**, 330-338.
- Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* **1**, 244-257.
- Kedare, S. B. and Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412-422.
- Khansari, N., Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **3**, 73-80.
- Kocanova, S., Buytaert, E., Matroule, J. Y., Piette, J., Golab, J., de Witte, P. and Agostinis, P. 2007. Induction of hemeoxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* **12**, 731-741.
- Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* **659**, 15-30.
- Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* **52**, 2013-2037.
- Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y. and Chang, H. W. 2013. Marine algal natu-

- ral products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int* **13**, 55.
20. Li, J., Zhang, H., Huang, W., Qian, H. and Li, Y. 2012. TNF-alpha inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr Top Med Chem* **12**, 1408-1421.
 21. Li, L., Dong, H., Song, E., Xu, X., Liu, L. and Song, Y. 2014. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chem Biol Interact* **209**, 56-67.
 22. Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* **60**, 1-4.
 23. Lu, Y., Suh, S. J., Kwak, C. H., Kwon, K. M., Seo, C. S., Li, Y., Jin, Y., Li, X., Hwang, S. L., Kwon, O., Chang, Y. C., Park, Y. G., Park, S. S., Son, J. K., Kim, C. H. and Chang, H. W. 2012. Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF-kappaB and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW264.7 cells. *Int Immunopharmacol* **12**, 175-181.
 24. Nahirnyj, A. Livne-Bar, I., Guo, X. and Sivak, J. M. 2013. ROS detoxification and proinflammatory cytokines are linked by p38 MAPK signaling in a model of mature astrocyte activation. *PLoS One* **8**, e83049.
 25. Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. and Bhunia, A. K. 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxicogenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods* **73**, 211-215.
 26. Noworyta-Sokolowska, K., Gorska, A. and Golembiowska, K. 2013. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep* **65**, 863-869.
 27. Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R. and Immenschuh, S. 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* **80**, 1895-1903.
 28. Park, C. M., Jin, K. S., Lee, Y. W. and Song, Y. S. 2011. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF-kappaB translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol* **660**, 454-459.
 29. Park, C. M., Park, J. Y., Noh, K. H., Shin, J. H. and Song, Y. S. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* **133**, 834-842.
 30. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review. *Int J Cosmet Sci* **27**, 17-34.
 31. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* **49**, 1603-1616.
 32. Saw, C. L., Wu, Q., Su, Z. Y., Wang, H., Yang, Y., Xu, X., Huang, Y., Khor, T. O. and Kong, A. N., 2013. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. *Biopharm Drug Dispos* **34**, 303-311.
 33. Song, Y. S. and Park, C. M. 2014. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. *Food Chem Toxicol* **65**, 70-75.
 34. Su, Z. Y., Shu, L., Khor, T. O., Lee, J. H., Fuentes, F. and Kong, A. N. 2013. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr Chem* **329**, 133-162.
 35. Tsai, H. H., Lee, W. R., Wang, P. H., Cheng, K. T., Chen, Y. C. and Shen, S. C. 2013. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF-kappaB and AP-1 activation in macrophages. *J Dermatol Sci* **69**, 122-131.
 36. Wang, F. W., Wang, Z., Zhang, Y. M., Du, Z. X., Zhang, X. L., Liu, Q., Guo, Y. J., Li, X. G. and Hao, A. J. 2013. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis *in vitro*. *J Cell Biochem* **114**, 2346-2355.
 37. Yagi, H., Tan, J. and Tuan, R. S. 2013. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **114**, 1163-1173.
 38. Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J. and Zhang, F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog Neurobiol* **100**, 30-47.
 39. Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Maeng, Y. H., Lee, K. H., Chang, W. Y., You, H. J., Kin, J. S., Kang, S. S., Hyun, J. W. 2009. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact* **177**, 21-27.
 40. Zhao, C. R., Gao, Z. H. and Qu, X. J. 2010. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol* **34**, 523-533.

초록 : *Ardisia arborescens* 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성

진경숙¹ · 이지영¹ · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 생명융용학과)

본 연구에서는 *Ardisia arborescens* 에탄올 추출물(AAEE)의 항산화능과 항염증 생리활성을 *in vitro* assay system 및 cell culture model system을 이용하여 분석하였다. 먼저 AAEE의 항산화능을 DPPH radical 소거능으로 분석한 결과 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 정도의 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주를 이용한 H₂O₂ 및 LPS의 유도에 의해 생성된 ROS에 대한 소거능을 분석한 결과에서도 농도의존적인 강한 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화효소로 천연물에 의한 항산화능 활성에 의해 발현이 유도되는 HO-1, TrxR1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현이 AAEE의 처리에 의해 농도의존적으로 증가됨을 보였으며 이러한 HO-1, TrxR1 및 Nrf2의 발현 변화는 상위신호전달계인 MAPKs에 의해 조절될 가능성을 보였다. 한편 AAEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 세포독성 없이 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이와 같은 AAEE의 NO 생성 억제 효과는 염증 상위신호전달계인 NF-κB 및 AP-1의 조절을 통해 일어날 가능성을 보였다. 이러한 결과를 통해 AAEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 처음으로 확인하였으며 향후 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.