

Euptelea pleiosperma 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성

진경숙¹, 박정애¹, 이지영¹, 강지숙¹, 권현주^{1,2}, 김병우^{1,2*}

¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터

²동의대학교 생명융합학과

Received: March 7, 2014 / Revised: April 7, 2014 / Accepted: April 7, 2014

Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Euptelea Pleiosperma* Ethanol Extract

Kyong-Suk Jin¹, Jung Ae Park¹, Ji Young Lee¹, Ji Sook Kang¹, Hyun Ju Kwon^{1,2}, and Byung Woo Kim^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, ²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Republic of Korea

In this study, the anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Euptelea pleiosperma* ethanol extract (EPEE) were evaluated using *in vitro* assays and cell culture model systems. EPEE possessed a more potent scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl than the ascorbic acid used as a positive control. EPEE effectively suppressed lipopolysaccharide (LPS), in addition to hydrogen peroxide induced reactive oxygen species on RAW 264.7 cells. Furthermore, EPEE induced the expression of the anti-oxidative enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), dose and time dependently. The modulation of HO-1 and Nrf2 expression might be regulated by mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3 kinase/Akt as their upstream signaling pathways. On the other hand, EPEE inhibited LPS induced nitric oxide (NO) formation without cytotoxicity. Suppression of NO formation was the result of the down regulation of inducible NO synthase (iNOS) by EPEE. Suppression of NO and iNOS by EPEE may be modulated by their upstream transcription factor, nuclear factor κ B, and AP-1 pathways. Taken together, these results provide important new insights into *E. pleiosperma*, namely that it possesses anti-oxidative and anti-inflammatory activities, indicating that it could be utilized as a promising material in the field of nutraceuticals.

Keywords: *Euptelea pleiosperma*, anti-oxidative activity, anti-inflammatory activity, upstream transcription factor

서론

생명체의 대사과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 산화적 스트레스의 유발을 통해 세포조직에 치명적인 손상을 유발하며 암, 뇌 질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병, 천식 등 생체 내에서 발생하는 수 많은 질환의 원인이 될 뿐 아니라, 노화를 일으키는 직·간접적인 원인물질로 작용하는 것으로 알려져 있다[3, 7, 12, 24, 25]. 또한 염증은 외부자극에 대한 생체조직의 방어 기전의 하나로 지속적인 염증 반응은 조직의 손상을 일으켜 암을 비롯한 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다[5, 8].

이에 따라 최근 많은 연구들이 항산화 및 항염증 활성을 바탕으로 한 생리활성 보유 신소재 개발 및 그 활성 기전의 규명에 주력하고 있으며 특히 천연유래 소재로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명하여 기능성 소재로서의 가능성을 타진하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[16, 17, 26].

대표적인 cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme으로 알려진 heme oxygenase (HO)-1, NAD(P)H dehydrogenase 1 (NQO1), thioredoxin reductase 1 (TrxR1)의 유도는 산화적 스트레스를 방어하는 중요한 기전 중 하나로 다양한 carcinogen으로부터 세포를 보호하는 chemoprevention에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[6, 33]. 특히 천연에서 유래한 다양한 dietary phytochemical은 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절되는 phase 2 detoxifying antioxidant enzyme의 발현 증가를 통해 chemopreventive function을 나타내며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), and

*Corresponding author

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

E-mail: bwkim@deu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

p38과 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt와 같은 상위신호 전달기전의 영향을 받는다[13, 18, 20, 28]. 이러한 chemoprevention은 항산화 활성을 기초로 하여 함암 뿐만 아니라 염증, 뇌 및 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 알려져 있어 그 중요성이 더욱 커지고 있다[4, 14, 27, 31].

생체 내 염증 반응은 대식세포(macrophage)에서 과량 생산되는 염증 매개인자(inflammatory mediators)로부터 유래되는데 inducible nitric oxide synthase (iNOS)로부터 생산되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase 2 (COX-2)로부터 생산되는 prostaglandin E2 (PGE2) 등이 대표적이다. 외부 자극에 의해 과량 생산된 염증 매개인자는 tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) 등과 같은 사이토카인을 생산하여 다양한 염증 반응을 일으킨다[14, 15]. 염증 반응의 대표적인 세포 실험계 중 하나인 RAW 264.7 murine macrophage에 lipopolysaccharide (LPS) 등의 염증 유발 인자를 처리하면 iNOS 및 COX-2의 발현 유도에 의해 NO와 PGE2 등 염증 매개인자의 생성 및 이를 통한 사이토카인 분비량 증가를 확인할 수 있으며 이러한 일련의 반응은 대표적인 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 각광받고 있다.

*Euptelea pleiosperma*는 Eupteleaceae과에 속하는 낙엽수이며 영춘목으로도 불린다. 동아시아 지역, 주로 중국 및 히말라야 일대에 분포한다. 잎은 식용 가능하며, 꽃과 가지의 껍질은 약용으로 알려져 있으나 그 구체적인 효능에 대해서는 알려진 바가 없으며, 특히 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 전혀 알려진 바 없다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *E. pleiosperma* 95% 에탄올 추출물(EPEE)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

E. pleiosperma 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *E. pleiosperma* 95% 에탄올 추출물(EPEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-004)하여 사용하였다. 건조 및 분쇄한 시료를 95% 에탄올을 용매로 하여 45°C에서 3일간 초음파 추출을 수행하였다. 추출이 끝난 시료를 filter로 여과하

여 고형물을 없애고 감압농축(N-1000SW, EYELA, Japan) 및 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정을 통한 EPEE의 항산화능 분석

항산화 작용의 주요 기전 중 하나인 전자공여능은 인체 내에서 생성되는 free radical의 전자를 공여함으로써 free radical에 의한 노화와 질병을 억제한다. 항산화 작용의 주요 지표로서의 전자공여능은 특히 천연물이 보유한 항산화능의 측정에 많이 사용되고 있으며[7], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석을 이용하여 측정하였다. 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 EPEE를 농도별(0.1024-12.8 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 분석하였다. DPPH radical 소거능의 백분율 공식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A - B)/C\} \times 100$$

A: sample absorbance at 520 nm

B: color control absorbance at 520 nm

C: control absorbance at 520 nm

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].

EPEE의 세포생존율 분석

활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인함과 동시에 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 EPEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 수행하였다. 1.0×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고, EPEE 처리 24시간 후 WST 시약이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시킨 다음 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 후 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 실험을 수행하였다.

EPEE의 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 소제의 항산화능의 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 EPEE가 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 전처리한 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.

항산화 효소 HO-1, TrxR1, NQO1 및 그 전사인자인 Nrf2의 발현 조절능 분석

EPEE의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1, TrxR1, NQO1과 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, NQO1, 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 hybridization 하였다. Membrane washing 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시킨 후 chemiluminescence detection system (FluoChem[®] FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

EPEE의 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 분석하였다.

EPEE의 항염증 활성 기전 분석

EPEE가 보유한 NO 생성 억제능의 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 분석하였다. 또한 EPEE에 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 B α (I κ B α), 그리고 AP-1의 subunit인 c-Jun의 인산화에 EPEE가 미치는 영향을 분석하였다. Western blot hybridization을 위한 iNOS, p-p65, p-I κ B α , 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.

데이터 처리 및 통계 분석

모든 실험 결과는 최소 3회 이상의 반복 실험을 통하여 얻은 데이터를 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 필요 시 대표적인 그림이나 데이터를 제시하였다. 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

EPEE의 항산화능 분석

EPEE의 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 EPEE의 농도 증가에 따라 강한 radical 소거능을 보여 0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 $\mu\text{g/ml}$ 의 시료 처리에 의해 DPPH radical 소거능이 각각 26.11, 40.49, 93.83, 98.00%로 나타나 50% 소거 농도를 나타내는 IC_{50} 값이 0.88 $\mu\text{g/ml}$ 로 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid, 즉 vitamin C의 IC_{50} 값인 1.53 $\mu\text{g/ml}$ 보다 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 이에 EPEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인할 필요성이 제기되었다.

EPEE의 ROS scavenging activity 분석

DPPH radical scavenging activity 분석을 통해 EPEE가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 cell에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H_2O_2 와 LPS를 각각 처리하여 EPEE에 의한 ROS scavenging activity를 분석하였다. 그 결과 Fig. 1에 제시한 바와 같이 H_2O_2 와 LPS에 의해 각각 유도된 ROS 생성이 EPEE의 처리에 의해 효과적으로 저해되는 것으로 나타나 EPEE가 DPPH radical 뿐만 아니라 세포 실험계에서 H_2O_2 와 LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

EPEE가 항산화 효소 HO-1, TrxR1, NQO1 및 상위 전사 인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

강한 항산화능을 보유한 천연 유래 소재들이 Nrf2에 의한 항산화 효소계의 발현 유도를 통해 활성을 나타낸다는 것이

Table 1. DPPH radical scavenging activity of EPEE.

Reagent	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition rate (%)
EPEE	0.1024	26.11 \pm 0.89
	0.512	40.49 \pm 0.93
	2.56	93.83 \pm 0.40
	12.8	98.00 \pm 0.61
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	31.90 \pm 0.02
	2.56	96.47 \pm 0.13
	12.8	98.41 \pm 0.17

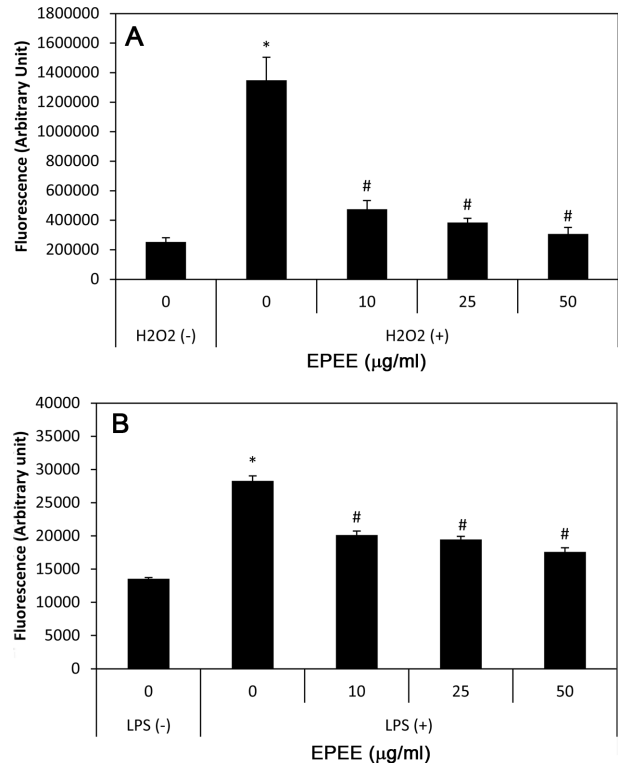


Fig. 1. Effect of EPEE on H_2O_2 - (A) and LPS- (B) induced ROS scavenging activity in RAW 264.7 cells. Values are represented as the mean \pm SD ($n = 6$). *, #Significantly different from the vehicle control [0, H_2O_2 or LPS (-)] and H_2O_2 - or LPS- induced control [0, H_2O_2 or LPS (+)], respectively ($p < 0.05$).

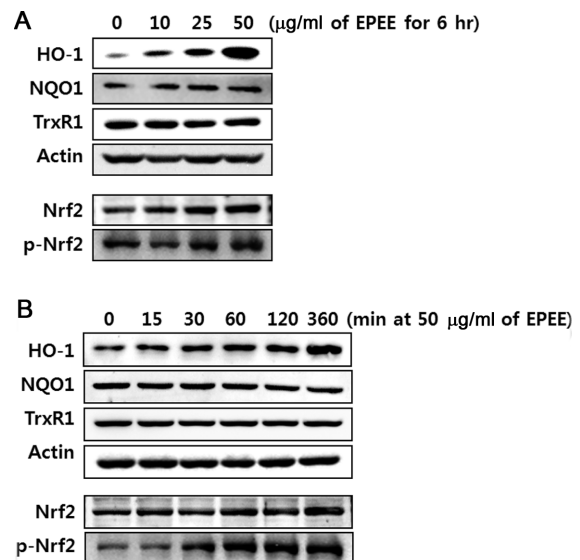


Fig. 2. Modulation of anti-oxidative enzymes, HO-1, NQO1, TrxR1, and their upstream transcription factor, Nrf2 protein expression and phosphorylation in RAW 264.7 cells by EPEE. (A) Dose dependency and (B) time course study. Actin was used as an internal control.

여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 EPEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보려고 하였다[9, 27]. 이를 위해 대표적인 항산화 효소들로 천연물에 의한 항산화 활성화에 의해 주로 발현이 유도되는 세 효소인 HO-1, TrxR1, NQO1의 단백질 발현과 그 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현 및 인산화에 EPEE가 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 Fig. 2A에 제시된 바와 같이 6시간 동안 10-50 µg/ml의 시료 처리에 의해 세 효소 중 HO-1의 발현이 강한 증가를 보였다. 뿐만 아니라 HO-1의 상위 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현과 인산화 또한 증가되는 것으로 나타나 EPEE에 의한 HO-1의 발현 증가가 Nrf2의 발현 증가 및 인산화에 의해 나타날 가능성을 보였다. 이러한 결과는 시간의 변화에 따른 발현 형태를 관찰한 Fig. 2B에서도 유사한 양상을 보여 50 µg/ml의 EPEE를 시간 별로 처리한 결과 세 효소 중 HO-1의 발현이 증가하는 것으로 나타났으며 이는 Nrf2의 발현 증가와 인산화에서 기인할 것으로 판단되었다[2, 6].

EPEE가 상위신호전달인자인 MAPKs와 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 영향

EPEE가 보유한 항산화능의 상위신호전달기전을 알아보기 위해 p38, JNK, 그리고 ERK 등의 MAPKs와 Akt의 인산화에 EPEE가 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 6시간 동안 10-50 µg/ml의 시료 처리에 의해 4종 모두 인산화가 증가되는 것으로 나타났으며 그 정도 및 경향은 다소 차이를 보여 p-38과 JNK는 농도의존적인 인산화의 증가를 보였으나 ERK와 Akt는 처리 농도에 상관없이 유사한 정도의 인산화를 나타내었다. 이러한 결과를 통해 EPEE의 항산화능이 HO-1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 발현 증가를 통해 나타나며 그러한 일련의 과정이 MAPKs와 PI3K/Akt와 같은 상위신호전달인자에 의해 나타날 가능성을 확인하였다.

EPEE의 NO 생성 저해능 분석

EPEE가 항산화능 뿐만 아니라 항염증 활성 또한 보유하

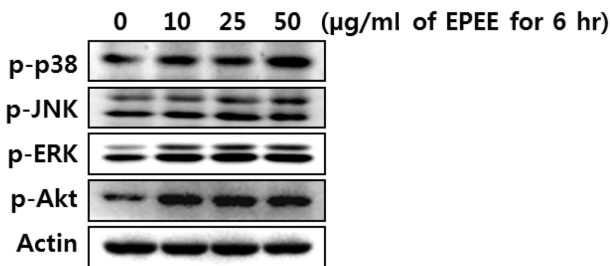


Fig. 3. Effect of EPEE on the phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt signaling molecules in RAW 264.7 cells. Actin was used as an internal control.

는지를 알아보기 위해 먼저 NO 생성에 미치는 효과를 알아보았다. LPS로 자극을 유도한 쥐 대식세포주 RAW 264.7 cell에서 농도별 EPEE의 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 EPEE가 산화적스트레스 뿐만 아니라 염증성 자극에 대한 방어능 또한 보유함을 확인하였다.

EPEE가 NF-κB 및 AP-1의 인산화에 미치는 영향 분석
EPEE가 iNOS의 발현 저해에 따른 NO 생성 억제능을 보

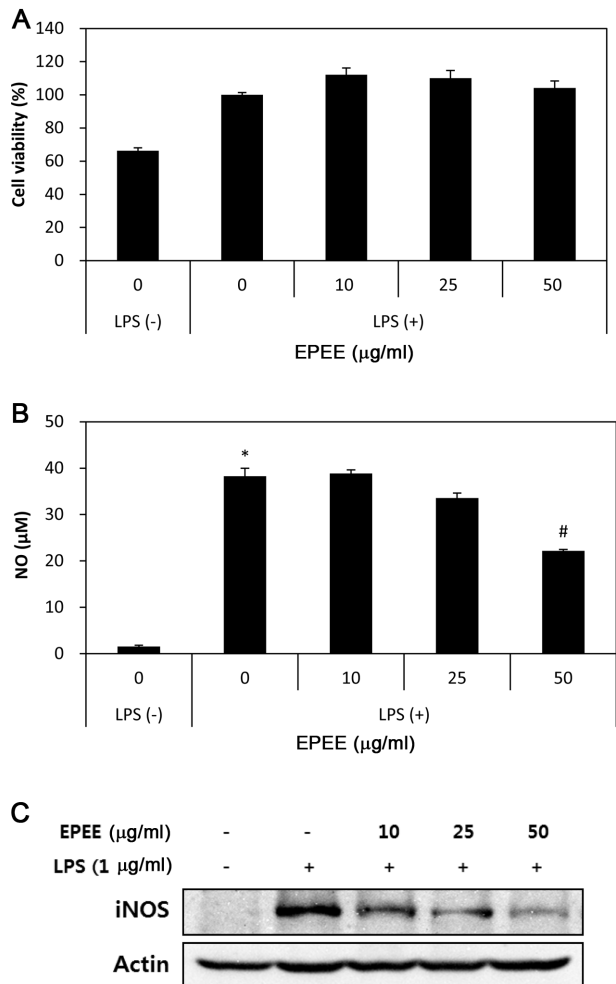


Fig. 4. Effect of EPEE on cell viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A, B) Values are represented as the mean ± SD (n = 3). *, #Significantly different from the vehicle control [0, LPS (-)] and LPS-induced control [0, LPS (+)], respectively (p < 0.05). (C) Actin was used as an internal control.

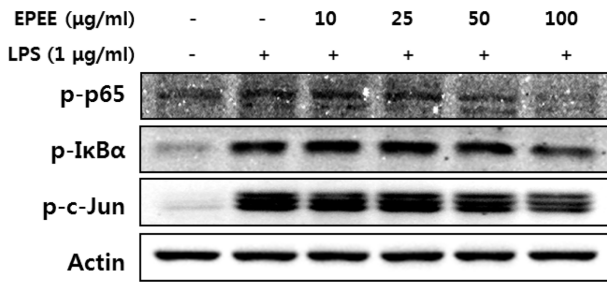


Fig. 5. Modulation of EPEE on the upstream signaling pathway for anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells. Actin was used as an internal control.

유함을 확인함에 따라 항염증 활성의 상위신호전달기전인 NF- κ B와 AP-1의 연관성을 알아보기 위해 EPEE가 LPS에 의해 유도된 NF- κ B p65와 I κ B α , 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 EPEE 농도의 증가에 따라 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 EPEE의 항염증 활성이 항염증 상위신호전달인자들의 일련의 조절 기작을 통해 이루어질 가능성을 시사하였다.

이상의 결과를 통해 EPEE가 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.

요 약

본 연구에서는 *Euptelea pleiosperma* 에탄올 추출물 (EPEE)의 항산화능과 항염증 생리활성을 *in vitro* assay system 및 cell culture model system을 이용하여 분석하였다. 먼저 EPEE의 항산화능을 DPPH radical scavenging activity로 분석한 결과 radical 소거능의 정도가 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid 보다 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 항산화효소 중 하나로 천연물에 의한 항산화능 활성에 의해 주로 발현이 유도되는 hemeoxygenase 1 (HO-1) 및 그 전사 인자인 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 단백질 발현이 EPEE의 처리에 의해 유의적으로 증가됨을 보였으며 이러한 HO-1 및 Nrf2의 발현 변화는 상위신호전달계인 MAPKs 및 PI3K/Akt에 의해 조절될 가능성을 보였다. 한편 EPEE가 LPS에 의

해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이와 같은 EPEE의 NO 생성 억제 효과는 염증 상위신호전달계인 NF- κ B 및 AP-1의 조절을 통해 일어날 가능성을 보였다. 이러한 결과를 통해 EPEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 처음으로 확인하였으며 향후 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This work was supported by Blue-Bio Industry Regional Innovation Center (RIC08-06-07) at Dong-Eui University as a RIC program under Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Busan city.

References

- Awad N, Khatib N, Ginsberg Y, Weiner Z, Maravi N, Thaler I, *et al.* 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.* **450**: e15-20.
- Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. 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 AM, *et al.* 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 17643-17663.
- Chapple SJ, Siow RC, Mann GE. 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 KD, Goh YP. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 738-749.
- Giudice A, Arra C, Turco MC. 2010. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Meth. Mol. Biol.* **647**: 37-74.
- Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**: 5319-5341.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* **140**: 883-899.
- Hu R, Saw CL, Yu R, Kong AN. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid. Redox. Signal.* **13**: 1679-1698.
- Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology

- to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox. Biol.* **1**: 244-257.
11. Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**: 412-422.
 12. Khansari N, Shakiba Y, 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.
 13. Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, Piette J, Golab J, de Witte P, et al. 2007. Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis.* **12**: 731-741.
 14. Kundu JK, Surh YJ. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**: 15-30.
 15. Kundu JK, Surh YJ. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **52**: 2013-2037.
 16. Lee JC, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, et al. 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int.* **13**: 55.
 17. Li J, Zhang H, Huang W, Qian H, Li Y. 2012. TNF- α inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr. Top Med. Chem.* **12**: 1408-1421.
 18. Li L, Dong H, Song E, Xu X, Liu L, 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.
 19. Liochev SI. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **60**: 1-4.
 20. Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, et al. 2012. Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF- κ B and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **12**: 175-181.
 21. Noworyta-Sokolowska K, Gorska A, Golembiowska K. 2013. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol. Rep.* **65**: 863-869.
 22. Park CM, Jin KS, Lee YW, Song YS. 2011. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF- κ B translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **660**: 454-459.
 23. Park CM, Park JY, Noh KH, Shin JH, Song YS. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 834-842.
 24. Pillai S, Oresajo C, 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.
 25. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1603-1616.
 26. Saw CL, Wu Q, Su ZY, Wang H, Yang Y, Xu X, et al. 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.
 27. Su ZY, Shu L, Khor TO, Lee JH, Fuentes F, Kong AN. 2013. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr. Chem.* **329**: 133-162.
 28. Tsai HH, Lee WR, Wang PH, Cheng KT, Chen YC, Shen SC. 2013. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF- κ B and AP-1 activation in macrophages. *J. Dermatol. Sci.* **69**: 122-131.
 29. Wang FW, Wang Z, Zhang YM, Du ZX, Zhang XL, Liu Q, et al. 2013. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro. *J. Cell Biochem.* **114**: 2346-2355.
 30. Yagi H, Tan J, Tuan RS. 2013. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* **114**: 1163-1173.
 31. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **100**: 30-47.
 32. Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Lee KH, Chang WY, et al. 2009. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chem. Biol. Interact.* **177**: 21-27.
 33. Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ. 2010. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol.* **34**: 523-533.