

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of *Decaisnea insignis* 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 June 5, 2014 / Revised August 8, 2014 / Accepted August 8, 2014

This study was conducted to explore new nutraceutical resources from the plant kingdom possessing biological activities. To fulfill this purpose, the anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Decaisnea insignis* ethanol extract (DIEE) were evaluated. First, DIEE possessed potent scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), similar to ascorbic acid used as a positive control. Moreover, DIEE inhibited lipopolysaccharide (LPS)- and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced reactive oxygen species (ROS) in RAW 264.7 cells. Furthermore, DIEE induced the expression of an anti-oxidative enzyme, heme oxygenase 1 (HO-1), and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), in a dose-dependent manner. The modulation of the HO-1 and Nrf2 expressions might be regulated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and their upstream signaling pathways. On the other hand, DIEE suppressed LPS-induced nitric oxide (NO) formation without cytotoxicity. The inhibition of the NO formation was the result of the down-regulation of inducible NO synthase (iNOS) by DIEE. The suppression of NO and iNOS by DIEE might be modulated by their upstream transcription factors, nuclear factor κ B (NF- κ B), and activator protein 1 (AP-1) pathways. Taken together, these results provide important new insights that *D. insignis* possesses anti-oxidative and anti-inflammatory activities. Therefore, it might be utilized as a promising material in the field of nutraceuticals.

Key words : Anti-inflammatory activity, anti-oxidative activity, *Decaisnea insignis*, upstream transcription factors

서 론

생명체의 호흡과 대사과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 세포 손상을 일으킬 뿐 아니라, 세포 내 주요 염증 유발 인자를 활성화시킴으로써 염증을 초래한다[11]. 이러한 산화적 스트레스는 암, 뇌 질환, 당뇨, 심혈관계 질환, 호흡기 질환 등 생체 내에서 발생하는 수많은 질병의 원인이 되며, 노화를 일으키는 직·간접적 원인으로 작용한다[3, 8, 16, 32, 33]. 즉, 세포가 적정 수준의 항산화 물질의 보호를 지속적으로 받지 못하면 활성산소 등 자유라디칼(free radical)에 의한 산화적 스트레스에 계속적으로 노출되어 결국 질병과 노화를 초래하게 된다[11]. 따라서 항산화능은 외부의 스트레스에 대응할 수 있는 다양한 생리활성의 근간이 되므로 인체에 발생하는 수많은 질병에 대응하기 위해서는 강

한 항산화능을 보유한 생리활성 소재의 개발이 매우 중요하다[20, 21, 34].

대표적인 세포 방어 이상화효소계 항산화 효소(cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme)로 알려진 heme oxygenase (HO)-1, NAD(P)H dehydrogenase 1 (NQO1), thioredoxin reductase 1 (TrxR1) 등의 유도는 산화적 스트레스를 방어하는 중요한 기전 중 하나로 다양한 외부 자극으로부터 세포를 보호하는 화학적 보호기전(chemoprevention)에 중요한 역할을 한다[7, 43]. 특히 천연 유래의 다양한 식용식물생리활성물질(dietary phytochemical)은 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절되는 이상화 효소계 항산화 효소의 발현 증가를 통해 화학적 보호 기능을 나타내며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38과 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt와 같은 상위신호전달기전의 영향을 받는다[17, 22, 24, 38]. 이러한 화학적 보호 기전은 항산화 활성을 기초로 하여 암, 염증, 뇌 질환, 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 밝혀지고 있어 그 중요성이 매우 크다[4, 18, 36, 41].

염증은 외부자극에 대한 생체조직의 방어 기전으로 지속적인 염증 반응은 조직의 손상을 유발하여 암을 비롯한 각종

*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.

질병을 일으킨다[5, 9]. 생체 내 염증 반응은 대식세포 (macrophage)에서 과량 생산되는 염증 매개인자(inflammatory mediators)로부터 매개 되는데 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생산되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase 2 (COX-2)로부터 생산되는 prostaglandin E2 (PGE2) 등이 대표적이다. 이러한 염증 매개인자는 tumor necrosis factor α , interleukin 1β 등과 같은 사이토카인의 생산을 유도하여 다양한 염증 반응을 일으킨다[18, 19]. 염증 반응의 세포 실험계 중 하나인 RAW 264.7 쥐 대식세포주(murine macrophage)에 염증 유발 인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하면 iNOS 및 COX-2의 발현 유도에 의해 NO와 PGE2 등의 염증 매개인자가 과량 생성되며 이는 사이토카인 분비량 증가를 초래한다. 이러한 일련의 반응은 염증 상위신호 전달기전인 nuclear factor (NF)- κ B와 activator protein (AP)-1에 의해 조절되며 MAPKs 및 PI3K/Akt 또한 관여하는 것으로 알려져 있다[24, 29, 30, 37, 38]. 그러므로 염증 매개인자와 그 상위신호 전달기전을 효과적으로 제어할 수 있는 물질들이 염증의 예방 및 치료를 위한 소재로서 주목 받고 있다.

*Decaisnea insignis*는 Lardizabalaceae과에 속하는 낙엽관목이며 동아시아 지역, 주로 중국, 미얀마 및 히말라야 일대에 분포한다. 일반적인 높이는 5 내지 8 m이고, 개화시기는 6월이며, 9월에서 10월 사이에 씨를 맺는다. 열매는 식용 가능하며, 뿌리와 지상부는 약용으로 알려져 있으나 그 구체적인 효능에 대해서는 알려진 바 없으며 생리활성에 대해 보고된 것도 전무하다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *D. insignis* 95% 에탄올 추출물(DIEE)이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

D. insignis 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *D. insignis* 95% 에탄올 추출물(DIEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-007)하여 사용하였으며 그 추출 과정은 다음과 같다. 민간에서 약용으로 사용되는 것으로 알려진 *D. insignis* 지상부의 줄기를 건조하여 분쇄한 후, 95% 에탄올을 용매로 하여 45°C에서 3일간 15분 초음파 추출(sonication) 후 2시간 정지시키는 과정을 하루 10회씩 반복하여 추출하였다. 추출이 끝난 시료를 필터로 여과하여 잔여물을 없애고 45°C에서 감압농축(N-1000SW, EYELA, Japan)한 후 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

DIEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 항산화능의 주요 지표로 활용되고 있는 DPPH 라디칼 소거능

분석을 수행하였다[8]. DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로써, 아스코르빈산, 토코페롤, 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[15].

DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 DIEE를 농도(0.512~12.8 μ g/ml) 별로 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 대비하여 자유라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 소거 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH 라디칼 소거능 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 아스코르빈산을 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 쥐 대식세포주의 배양

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 쥐 대식세포주인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다[31].

DIEE의 세포 독성 유무 분석

활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하고, 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 DIEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 수용성(water soluble) tetrazolium (WST) 분석을 통해 수행하였다. WST는 수용성 tetrazolium 염으로서 살아있는 세포와 반응하여 수용성 formazan을 생성하는데, 시료 자체의 세포 독성이 낮고 측정값의 유의성 높아 최근 많이 이용되고 있는 방법이다[10, 26]. 1.0×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고, DIEE 처리 24시간 경과 후 WST 시약이 든 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 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

DIEE의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 소거능 분석

ROS는 과량 생산 시 DNA, 단백질, 지질 등 생체 내 고분자에 산화적인 변형을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화력의 중요한 지표로 활용된다[23].

과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)는 대표적인 ROS 중 하나로 소재의 항산화능의 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[39, 40, 42]. 또한 그림 음성 세균의 세포 외벽을 구성하는 주요 인자인 LPS는 대표적인 염증 유발 인자로 산화적 스트레스 또한 유발하는 것으로 알려져 있어 항산화능 및 항염증 활성을 규명하기 위한 많은 연구에 사용되고 있다[1, 27]. 본 연구에서는 DIEE가 보유한 항산화능을 H₂O₂ 및 LPS로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포주에 세포 침투형광염료(cell permeable fluorescent dye)인 50 µM의 di-chlorofluorescein diacetate를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고 0.5 mM의 H₂O₂ 혹은 1 µg/ml의 LPS를 농도 별 시료와 함께 처리한 후 시료의 ROS 생성 억제능의 정도를 multiplate reader를 이용한 형광 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

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

DIEE의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1, NQO1, TrxR1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot 혼성화(hybridization)로 분석하였다. 또한 Nrf2/HO-1으로 이어지는 항산화 효소계의 상위신호전달기전으로 알려진 MAPKs와 PI3K/Akt의 인산화도 함께 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, NQO1, TrxR1, Nrf2, Actin의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit, 그리고 anti-mouse 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리 후 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정된 후, 50 µg의 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 혼성화하였다. Membrane 수세 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법(chemiluminescence detection system, FluoChem[®] FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 대표적인 데이터를 제시하였다.

DIEE의 NO 생성 억제능 분석

대표적인 자유라디칼 중 하나인 NO는 생체 내에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[14]. 이러

한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[31]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 1.0×10⁵ cell을 분주하여 배양한 후, 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 24시간 동안 농도 별 시료 처리에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

DIEE의 항염증 활성 기전 분석

DIEE가 보유한 NO 생성 억제능의 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 분석하였다. 또한 DIEE에 의한 NO 생성 및 iNOS의 발현 저해능이 NF-κB 및 AP-1에 의해 조절될 가능성을 알아보기 위해 LPS로 유도된 NF-κB p65와 inhibitory κBα (IκBa), 그리고 AP-1의 subunit인 c-Jun의 인산화에 DIEE가 미치는 영향을 분석하였다. 이와 함께 NF-κB 및 AP-1의 상위조절인자로 알려진 MAPKs 및 PI3K/Akt의 인산화 또한 함께 분석하였다. Western blot hybridization을 위한 iNOS, p-p65, p-IκBa, 그리고 p-c-Jun의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정된 후 50 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 대상 단백질의 항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 HRP가 부착된 이차항체로 한 시간 동안 반응시킨 후 화학발광검출법을 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)±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

DIEE의 항산화능 분석

DIEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 먼저 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다. 그 결과 0.512, 2.56, 12.8 µg/ml의 DIEE에 의해 DPPH 라디칼 소거능의 정도가 각각 34.56, 67.00, 97.14%로 나타나 DIEE가 농도의존적인 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다(Table 1). DIEE에 의한 50% 라디칼 소거 농도를 나타내는 IC₅₀ 값은 1.49 µg/ml로 양성 대조구로 사용한 아스코르빈산, 즉 비타민 C의 1.37 µg/ml와 유사한 정도의 활성을

Table 1. DPPH radical scavenging activity of *D. insignis* ethanol extract (DIEE)

Reagent	Concentration (µg/ml)	Scavenging activity (%)
DIEE	0.512	34.56±1.25
	2.56	67.00±1.64
	12.8	97.14±0.08
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	30.10±0.15
	2.56	77.80±0.10
	12.8	97.49±0.06

보였다. 이에 DIEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인하고자 하였다.

DIEE의 ROS 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거능 분석에 의해 DIEE가 강한 항산화능을 보유한 소재임이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 세포주에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂와 LPS를 각각 처리하여 DIEE에 의한 ROS 소거능의 정도를 분석하였다. 먼저 ROS 소거능 분석 전 DIEE의 세포독성 유무를 살펴본 결과 24시간 동안의 시료 처리 시 50 µg/ml의 처리 농도까지 세포 독성을 전혀 유발하지 않았다(Fig. 1A). 또한 H₂O₂와 LPS에 의해 각각 유도된 ROS 생성이 DIEE의 처리에 의해 농도의존적으로 효과적으로 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 1B, 1C). 이를 통해 DIEE가 DPPH 라디칼 뿐만 아니라 세포 수준에서 H₂O₂와 LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

DIEE가 항산화 효소 HO-1, NQO1, TrxR1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

강한 항산화능을 보유한 천연 소재들이 Nrf2에 의한 항산화 효소계의 발현 유도를 통해 활성을 나타낸다는 것이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 DIEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보려고 하였다[12, 36]. 이를 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1, NQO1, 그리고 TrxR1의 단백질 발현과 그 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현 및 인산화에 DIEE가 미치는 영향을 분석하였다. 10~50 µg/ml의 시료를 6시간 동안 처리한 후 각 대상 단백질의 발현을 분석한 결과 Fig. 2에 제시된 바와 같이 세 효소 중 HO-1의 발현이 25 µg/ml 이상에서 강한 증가를 보였다. 뿐만 아니라 HO-1의 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현과 인산화 또한 농도의존적으로 증가되었고 특히 25 µg/ml 이상에서 강한 증가를 보여 HO-1의 발현 변화와 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 통해 DIEE의 항산화능이 HO-1의 발현 유도를 통해 나타나며, HO-1의 발현 유도는 Nrf2의 발현 증가와 인산화에 기인할 것으로 판단되었다[2, 7].

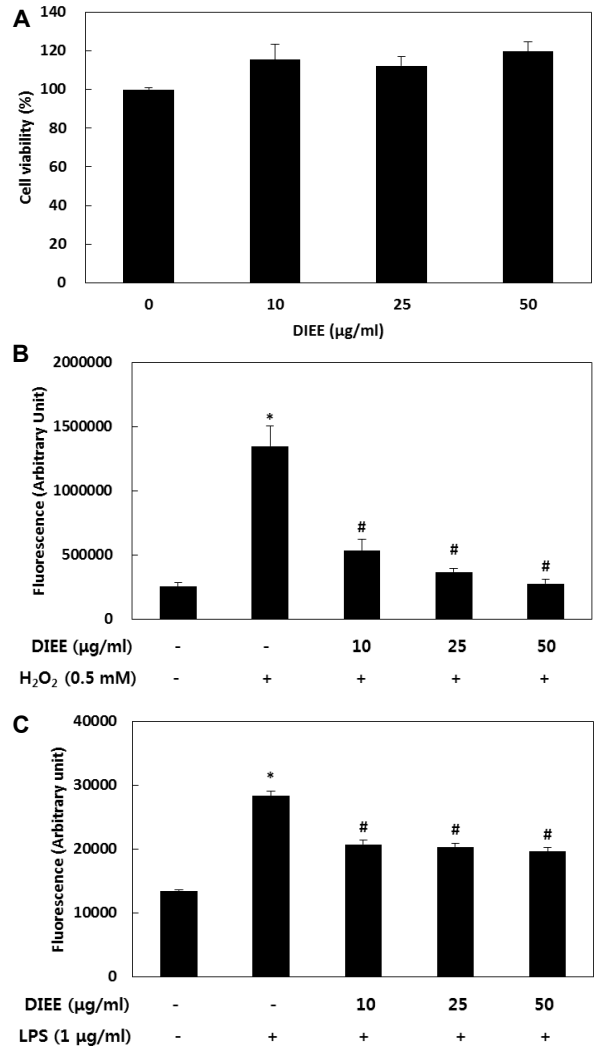


Fig. 1. Effect of DIEE on viability (A), H₂O₂- (B), and LPS- (C) induced ROS scavenging activity in RAW 264.7 cells. (A) Cells were treated with the indicated concentration of DIEE for 24 hr and viability was determined by WST assay. ROS scavenging activity of DIEE against H₂O₂ (B) and LPS (C) was analyzed using a cell permeable probe, DCF-DA. 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).

DIEE가 상위신호전달인자인 MAPKs와 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 영향

DIEE가 보유한 항산화능의 상위신호전달기전을 알아보기 위해 p38, JNK, ERK 등의 MAPKs와 Akt의 인산화에 DIEE가 미치는 영향을 분석하였다. 50 µg/ml의 시료를 처리하고 15, 30, 60, 120, 360분 경과 후 각 신호전달인자의 인산화 정도를 분석한 결과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 DIEE의 처리에 의해 p38과 JNK의 인산화가 가장 큰 변화를 보였으며 특히 p38의 인산화가 시료 처리 60분 후부터 뚜렷한 증가를 보였다. 이러

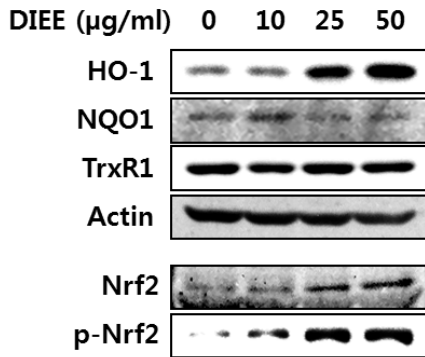


Fig. 2. Modulation of anti-oxidative enzymes, HO-1, NQO1, TrxR1, and their upstream transcription factor, Nrf2 protein expression and phosphorylation in RAW 264.7 cells by DIEE. Protein expression and phosphorylation was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

한 결과를 통해 DIEE의 항산화능이 HO-1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 발현 증가를 통해 나타나며 그러한 일련의 과정이 상위신호전달인자인 p38 MAPK에 의해 조절될 가능성을 확인하였다. ROS에 의한 세포 및 조직 손상에 대한 방어기전인 항산화 효소계의 발현 유도에 있어 MAPKs의 인산화는 중요한 신호전달 기전 중 하나이며, 상기의 결과를 통해 DIEE에 의한 항산화능 또한 다수의 천연 소재 추출물 및 분리 화합물과 마찬가지로 MAPKs/Nrf2/HO-1으로 이어지는 일련의 신호전달 기전을 통해 이루어질 가능성을 확인하였다[6, 13, 25, 35].

DIEE의 항염증 활성 분석

산화적 스트레스는 염증 유발의 직·간접적 원인으로 알려져 있으며 생리활성 보유 소재의 대부분이 강한 항산화능을 통해 항염증 활성을 나타낸다[11, 20, 21, 34]. DIEE가 보유한 강한 항산화능이 상기의 실험 결과를 통해 밝혀짐에 따라 항염증 활성 또한 나타내는지 알아보기 위해 먼저 NO 생성 억제능을 분석하였다. LPS로 자극을 유도한 쥐 대식세포주

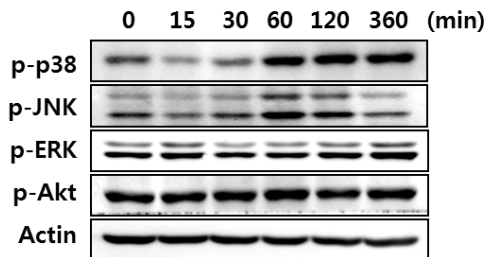


Fig. 3. Effect of DIEE on the phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt signaling molecules in RAW 264.7 cells. Phosphorylation of upstream signaling molecules was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

RAW 264.7에서 농도 별 DIEE의 처리에 따른 NO 생성량의 변화를 분석한 결과 Fig. 4에 제시된 바와 같이 25, 50, 100 µg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 DIEE가 항산화능 뿐만 아니라 항염증 활성 또한 보유함을 확인하였다.

DIEE 항염증 활성의 상위신호전달기전 분석

DIEE가 iNOS의 발현 저해를 통한 NO 생성 억제능을 보임에 따라 항염증 활성의 상위신호전달기전인 NF-κB와 AP-1의 연관성을 살펴보기 위해 DIEE의 처리가 LPS에 의해 유도된 NF-κB p65와 IκBa, 그리고 AP-1의 subunit 중 하나인 c-Jun

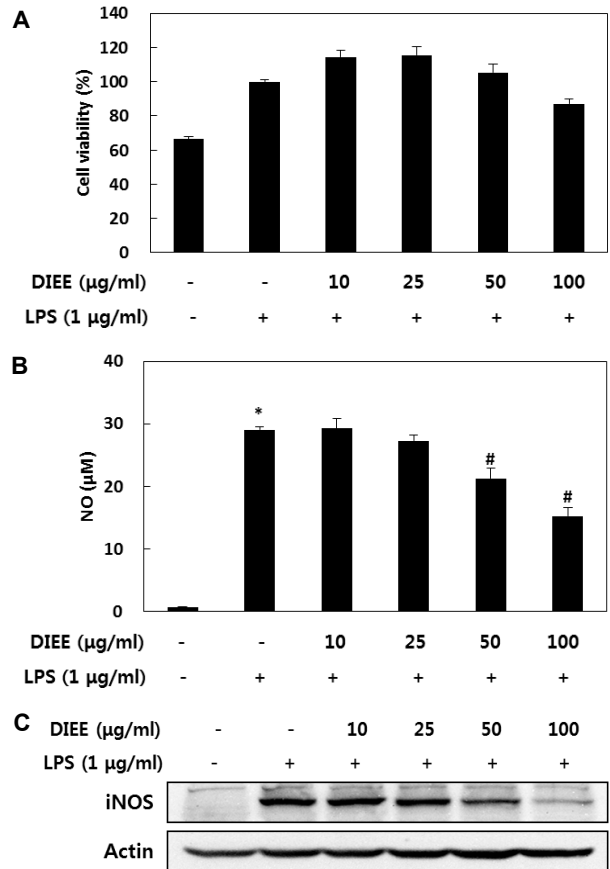


Fig. 4. Effect of DIEE on viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A) Cells were treated with the indicated concentration of DIEE with or without LPS for 24 hr, and viability was determined by WST assay. (B) Modulation of LPS-induced NO formation by DIEE was analyzed by Griess reaction. (C) iNOS protein expression was analyzed by Western blot hybridization. (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.

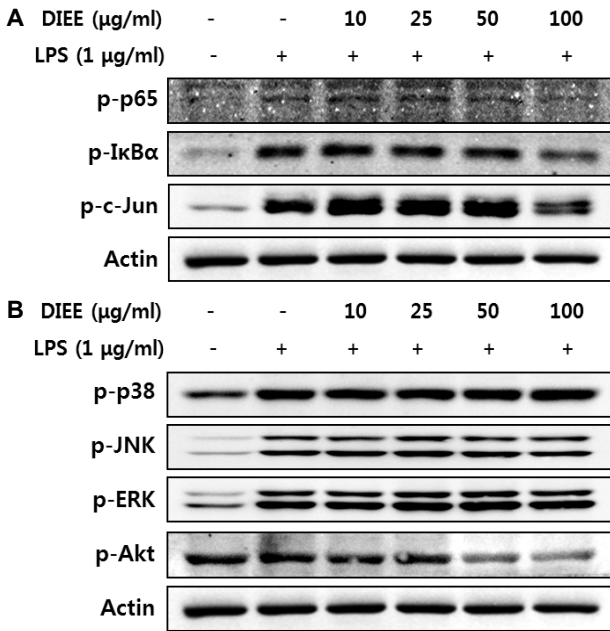


Fig. 5. Modulation of DIEE on upstream signaling pathways for the anti-inflammatory activity in RAW 264.7 cells. Phosphorylation of upstream signaling pathways such as NF-κB, AP-1 (A) and MAPKs, PI3K/Akt (B) was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

의 인산화에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 2시간 동안의 LPS 처리에 의해 유도된 세 전사인자의 인산화가 DIEE 농도의 증가에 따라 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 5A). 또한 NF-κB 및 AP-1의 염증 유도 기작이 MAPKs 및 PI3K/Akt에 의해 조절되거나 상호연관성을 가짐이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 DIEE가 MAPKs 및 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 영향을 함께 분석하였다. 그 결과 Fig. 5B에 제시된 바와 같이 MAPKs인 p-38, JNK, ERK의 인산화는 큰 변화를 보이지 않았고 Akt의 인산화는 LPS와 함께 DIEE를 처리하였을 경우에만 고농도(50, 100 μg/ml)에서 다소 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 DIEE의 항염증 활성이 NF-κB와 AP-1의 상위신호전달 조절 기작을 통해 이루어질 가능성을 시사하였다.

한편 MAPKs 및 PI3K/Akt의 인산화는 항산화 효소계를 활성화 시켜 HO-1 등의 유도를 일으키는 반면 LPS 등의 염증성 자극에 의해 유도되어 NF-κB 및 AP-1의 활성화를 통해 세포 내 염증반응을 유발하는 기전으로도 알려져 있다. 즉 MAPKs 및 PI3K/Akt는 항산화능을 보유한 시료의 처리에 의해서 인산화가 유도되는 한편 LPS 등의 염증성 자극에 의해서도 인산화가 유도되어 항산화 및 항염증 활성 보유 시료 처리에 의해 인산화가 저해되기도 한다. 이러한 MAPKs 및 PI3K/Akt의 두 가지 상반된 기작은 항산화 및 항염증 활성의 기전이 MAPKs 혹은 Akt에 의한 Nrf2/HO-1의 유도와 NF-κ

B의 저해라는 이원화 방식을 통해 이루어짐을 여러 연구 결과를 통해 시사하고 있다[13, 25, 28].

이상의 결과를 통해 생리활성이 전혀 보고된 바 없는 신소재인 *D. insignis*가 강한 항산화능과 항염증 활성을 보유함을 처음으로 확인하였으며, 이러한 결과는 신규 소재에 대한 새로운 기능성 데이터를 구축함과 동시에 향후 생리활성 보유 기능성 소재로서의 활용을 위한 근거자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 현재까지 *D. insignis*에 대한 기능성 평가 및 활성 성분 분석에 대한 연구가 전무하여 지속적인 연구를 통해 *D. insignis*가 보유한 다양한 생리활성 및 그 기저 메커니즘을 밝힘과 동시에 활성 성분의 분리·규명 또한 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

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

References

1. Awad, N., Khatib, N., Ginsberg, Y., Weiner, Z., Maravi, N., Thaler, I., Ross, M. G., Itsokovitz-Didor, 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 e15-20.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Chawla, A., Nguyen, K. D. and Goh, Y. P. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738-749.
6. 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 Cancor* **44**, 761-768.
7. 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.
8. 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.
9. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
 10. 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.
 11. Harman, D. 2009. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* **10**, 773-781.
 12. 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.
 13. Itoh, T., Koketsu, M., Yokota, N., Touho, S. and Ando, M. 2014. Reduced scytonemin isolated from *Nostoc commune* suppresses LPS/IFN γ -induced NO production in murine macrophage RAW264 cells by inducing hemeoxygenase-1 expression via the Nrf2/ARE pathway. *Food Chem Toxicol* **69**, 330-338.
 14. Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* **1**, 244-257.
 15. Kedare, S. B. and Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412-422.
 16. 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.
 17. Kocanova, S., Buytaert, E., Matroule, J. Y., Piette, J., Golab, J., de Witte, P. and Agostinis, P. 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.
 18. Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* **659**, 15-30.
 19. Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* **52**, 2013-2037.
 20. 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 natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int* **13**, 55.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* **60**, 1-4.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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 toxigenic Bacillus species using CHO cell line. *J Microbiol Methods* **73**, 211-215.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Park, C. M., Cho, C. W. and Song, Y. S. 2014. TOP 1 and 2, polysaccharides from *Taraxacum officinale*, inhibit NFkappaB-mediated inflammation and accelerate Nrf2-induced antioxidative potential through the modulation of PI3K-Akt signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Food Chem Toxicol* **66**, 56-64.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 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.

36. 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.
37. Surh, Y. J., Na, H. K. and Lee, S. S. 2004. Transcription factors and mitogen-activated protein kinases as molecular targets for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Biofactors* **21**, 103-108.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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 : *Decaisnea insignis* 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성

진경숙¹ · 이지영¹ · 권현주^{1,2} · 김병우^{1,2*}

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

본 연구에서는 식물에 존재하는 신규 기능성 소재 개발의 일환으로 *Decaisnea insignis* 에탄올 추출물(DIEE)의 항산화 및 항염증 생리활성을 분석하였다. 먼저 DIEE의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능을 통해 분석한 결과 양성 대조군으로 사용한 아스코르빈산과 유사한 정도의 높은 소거활성을 보여 DIEE가 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주에서 H₂O₂ 및 LPS에 의해 유도된 ROS에 대한 DIEE의 소거능을 분석한 결과, 농도의존적인 강한 ROS 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화효소 중 하나로 항산화능 보유 천연물에 의해 발현이 유도되는 hemeoxygenase 1 (HO-1) 및 그 전사 인자인 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)의 단백질 발현이 DIEE의 처리에 의해 유의적으로 증가됨을 보였으며 이러한 HO-1 및 Nrf2의 발현 유도는 상위신호전달체인 MAPKs에 의해 조절될 가능성을 보였다. 한편 DIEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이와 같은 DIEE의 NO 생성 억제 효과는 염증 상위신호전달체인 NF-κB 및 AP-1의 조절을 통해 일어날 가능성을 보였다. 이러한 결과를 통해 DIEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 처음으로 확인하였으며 향후 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.