

Murine Macrophage RAW 264.7 세포에서 구실잣밤나무 추출물의 항염증 효과

고영종^{1,2†}, 송상목^{1,3†}, 현우철¹, 양수경¹, 송창길², 이동선³, 윤원종^{1*}

¹(재) 제주테크노파크 생물종다양성연구소, ²제주대학교 생명자원과학대학 식물자원환경전공,

³제주대학교 생명자원과학대학 응용생명공학전공

Anti-inflammatory Effect of *Castanopsis cuspidata* Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells

Yeong-Jong Ko^{1,2†}, Sang Mok Song^{1,3†}, Woo-Chol Hyun¹, Soo-Kyung Yang¹, Chang-Khil Song²,
Dong-Sun Lee³ and Weon-Jong Yoon^{1*}

¹Biodiversity Research Institute, Jeju TECHNOPARK, Seogwipo-si 699-943, Korea

²Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Major of Plant Resource & Environment, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract - This study describes a preliminary evaluation of the anti-inflammatory activity of *Castanopsis cuspidata* extracts. *C. cuspidata* was extracted using 80% ethanol and then fractionated sequentially with *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate, and butanol. To screen for anti-inflammatory agents effectively, we first examined the inhibitory effect of the *C. cuspidata* extracts on the production of pro-inflammatory factors and cytokines stimulated with lipopolysaccharide. In addition, we examined the inhibitory effect of *C. cuspidata* extracts on pro-inflammatory mediators (NO, iNOS, COX-2) in murine macrophage RAW 264.7 cells. The amounts of protein levels were determined by immunoblotting. Of the sequential solvent fractions of *C. cuspidata*, the *n*-hexane, dichloromethane and ethylacetate fractions inhibited the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6), production of NO, and the protein level of iNOS and COX-2. These results suggest that *C. cuspidata* may have significant effects on inflammatory factors and may be provided as a possible anti-inflammatory therapeutic plant.

Key words - *Castanopsis cuspidata*, Pro-inflammatory factors, Cytokines, Lipopolysaccharide, RAW 264.7 cells

서 언

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins (PGs), hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다(Tizard *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2006). 그러나

지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다(Yoon *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2013). 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 nitric oxide (NO)와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다(Ding *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2012). 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 tumor necrosis factor- α , interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2006; Kim and Moudgil, 2008). 또

*교신저자(E-mail) : yyjkl@jejutp.or.kr

† These authors contributed equally to work.

한 이러한 염증매개 물질의 형성은 phospholipase A2의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다(McDaniel *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2014). 체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등의 염증인자가 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 형성된다. 이 중 NO는 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다. 일반적인 NO의 형성은 세균을 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(Mu *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004).

참나무과 식물인 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata* (*C. cuspidata*))는 상록 활엽 교목으로 지리적으로 일본, 중국, 타이완 등에 분포하며, 우리나라에서는 제주도, 완도 등 남해안 이남 지역에 분포한다(Kang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). 주로 제주에서는 하천을 따라 많이 분포하며 열매는 날로 먹거나 구워서 먹고, 떡이나 묵에 넣어서 먹기도 한다. 최근에는 열매의 영양성분 분석이나 식의약품 소재의 활용도에 연구들이 이루어졌으나 잎과 줄기 등을 이용한 여러 연구들은 미흡한 실정이다(Kang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). 본 연구에서는 자원 식물로서 활용가치가 높은 구실잣밤나무 잎 추출물을 대상으로 염증성 질환의 예방 및 치료제 개발의 기초자료로 사용될 수 있는지 탐색하기 위해 기능성을 밝히고자 극성에 따라 순차적으로 용매 분획하여 추출물 및 분획물을 가지고 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 염증성 매개체인 NO의 생성억제 효과 및 iNOS 그리고 COX-2 생성 억제 효능 및 염증성 cytokine 인 IL-1 β 와 IL-6의 억제 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

제주도 하천 일대에 자생하고 있는 구실잣밤나무(*Castanopsis cuspidata*) 잎을 2013년 9월경에 채집하였으며, 채집된 시료는 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거한 뒤 2주간 음건한 후 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

용매 계통 분획

구실잣밤나무 잎 에탄올 추출물 및 순차적 분획물의 제조는

80% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료 500 g에 80% 에탄올로 2회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전히 건조시켰다. 건조된 에탄올 추출물 20 g에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 2회 반복 실시하였다.

세포 배양

대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS)와 penicillin-streptomycin 100 units/100 μ g/ml이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

Nitric oxide (NO) assay

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 추출물 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약 100 μ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 비교하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

RAW 264.7 세포로부터의 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 실시하였다. cDNA 합성은 cDNA 합성 kit (Promega, madison, WI, USA)를 가지고 1 μ g의 total RNA를 oligo(dT) 18 primer, dNTP (0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2U)로 70°C 5분, 25°C 5분, 37°C 60분,

그리고 70°C에서 10분 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 2 µl cDNA, 4 µM의 5'과 3' primer, 10X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit *Taq* polymerase (Promega, Madison, WI, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 µl로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR cycle은 iNOS와 COX-2는 94°C/45초, 56°C/45초, 72°C/60초, 30회 이고 β-actin는 94°C/45초, 58°C/45초, 72°C/60초, 30회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 밴드를 확인하였다(Table 1).

Immunoblotting

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척 한 후 1 mL의 RIPA buffer (sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 30분 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다. 30 µg의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS (pH 7.4, 1L 기준 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g

Tris)) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1:1000, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 COX-2의 발현양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

세포독성 평가(LDH assay)

RAW 264.7 세포(1.5 × 10⁵ cells/ml)를 DMEM 배지에 추출물 시료와 LPS (1 µg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 µl와 reconstituted substrate mix를 50 µl를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 µl의 stop solution을 넣은 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

Table 1. Sequences of primer and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size (bp)
iNOS ^z	F	5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
COX-2 ^y	R	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	696
	R	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	
IL-1β ^x	F	5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'	447
	R	5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	
IL-6 ^w	F	5'-GTA CTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R	5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
β-actin	F	5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

^ziNOS : inducible nitric oxide synthase, ^yCOX-2 : cyclooxygenase-2, ^xIL-1β : interleukin-1β, ^wIL-6 : interleukin-6.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과에 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차(SD)를 구하여 신뢰수준 95%(p<0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물 및 분획물의 수율

구실갯밤나무 잎 시료(500 g)를 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 조추출물 128 g (25.69%)을 얻었다. 그리고 여기서 얻어진 에탄올 추출물(20 g)을 10배량의 증류수로 현탁 시킨 후에 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH) 등을 순차적으로 분획하여 헥산 층에서 1.25 g (6.28%), 디클로로메탄 층에서 1.28 g (6.44%), 에틸아세테이트 층에서 4.05 g (20.28%), 부탄올 층에서 5.06 g (25.33%) 및 잔사인 물 층에서 8.15 g (40.78%)의 분획물을 얻었다. 각 순차적 분획물의 수율은 Table 2에 나타내었으며, 추출에 사용한 구실갯밤나무 80% 에탄올 추출물의 수율은 약 18.25%였다. 에탄올 추출물에 대한 각 순차분획물 중 헥산 분획물 수율이 6.28%로 가장 낮았고, 물 분획물이 40.78%로 가장 높은 수율을 보였다(Scheme 1).

Nitric oxide 생성억제 효과

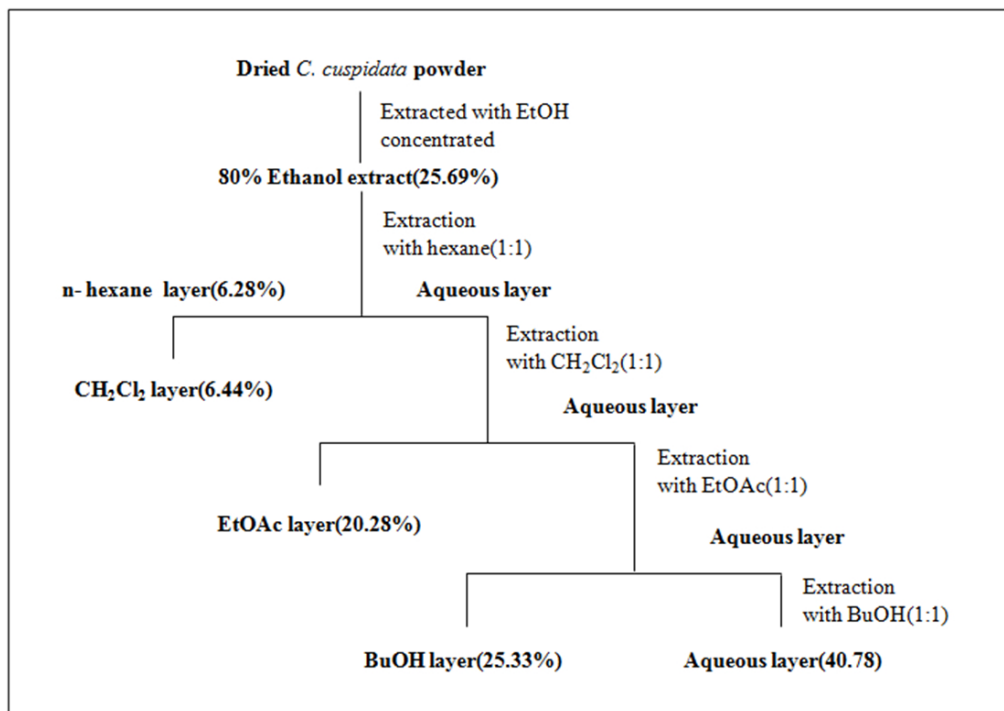
활성산소 중 하나이며, 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 구실갯밤나무 추출물과 분획물의 효과를 확인하였다. 생성된 NO 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 그 결과 80% 에탄올 추출물, 헥산과 디클로로메탄 분획물에서 대조군

Table 2. Effect of NO production on treated concentration of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidata* in RAW 264.7 cells

Samples	Inhibition (%)	
	100 ug/ml	50 ug/ml
80% EtOH	47.43	30.54
n-hexane	37.73	14.01
CH ₂ Cl ₂	91.99	81.57
EtOAc	72.22 ^z	58.57
ByOH	N/D	N/D
H ₂ O	N/D	N/D

The production of nitric oxide was assayed from culture medium of cells co-treated with LPS (1 μg/ml) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidata* (100 and 50 μg/ml).

^zcytotoxicity.



Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *C. cuspidata*.

인 LPS 단독처리군에 비해 높은 NO 생성 억제효과를 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 1). 특히 디클로로메탄 분획물인 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 세포독성 효과도 보이지 않으면서 우수한 NO 생성 억제효과를 보였다.

iNOS 및 COX-2 생성 억제 효과

RAW 264.7 세포에 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 사용하여 iNOS와 COX-2의 생성을 유도한 후 구실갯바나무 잎 추출물과 분획물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 억제 정

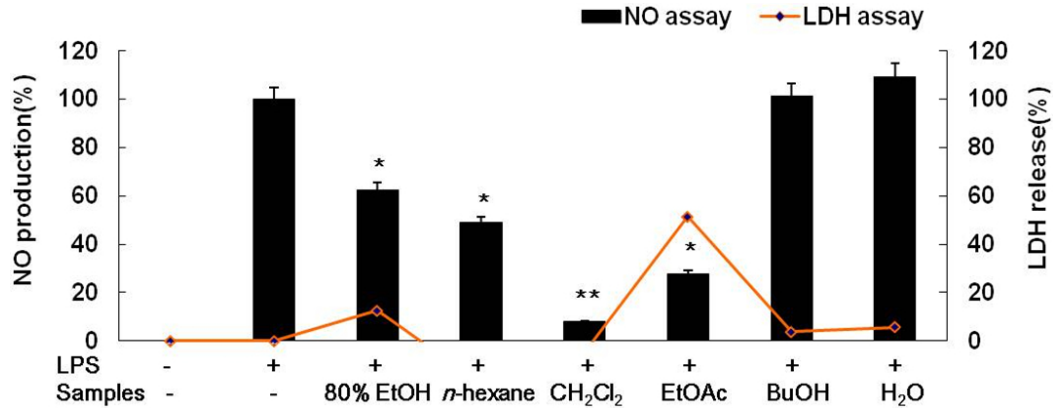


Fig. 1. Effect of 80% EtOH extract and solvent fractions from *C. cuspidata* extracts on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide (NO) was assayed in the culture medium of cells co-treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions from *C. cuspidata* extracts (100 $\mu\text{g/ml}$). Values are the mean \pm standard deviation (SD) of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

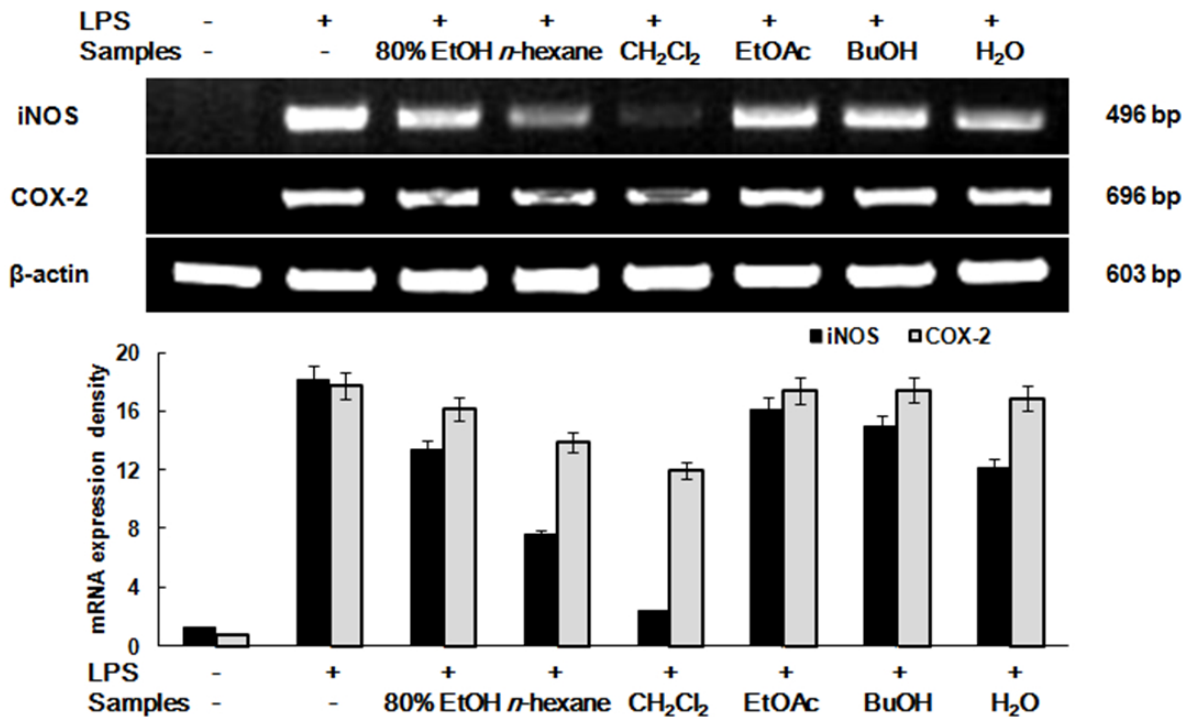


Fig. 2. Inhibitory effects of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidata* on the mRNA expression of pro-inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18h, and the mRNA expressions of iNOS and COX-2 were determined from 24 h cultures of cells co-treated lipopolysaccharide (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidata* (100 $\mu\text{g/ml}$).

도를 확인 하였다. 그 결과, iNOS와 COX-2의 단백질 발현 양상과 마찬가지로 핵산, 디클로로메탄 분획물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 mRNA 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2). RAW 264.7 세포에 LPS (1 µg/ml)를 사용하여 iNOS의 생성을 유도한 후 큰비썬 추출물과 분획물을 50 µg/ml 농도로 처리하여 iNOS 발현을 immunoblotting를 통해 확인하였다. 그 결과 immunoblotting에 의한 iNOS와 COX-2의 단백질 생성은 핵산과 디클로로메탄 분획물에서 대조군인 LPS 단독 처리군에 비해 강한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 본 연구 결과, NO 생성 억제 효과와 초기-염증성 인자 생성 억제 효과가 가장 우수한 디클로로메탄 분획물이 iNOS의 발현 또한 강하게 억제시키는 걸로 보아 NO의 생성 억제 기전은 iNOS 발현 억제를 통해 이루어진 것으로 여겨진다.

세포 독성에 미치는 영향

LDH는 모든 세포의 세포질 안에 존재하는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매작용을 하며, LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. RAW 264.7 세포(1.5 × 10⁵ cells/ml)에 시험 약물과 LPS (1 µg/ml)를 동시 처리하여 24 h 배양한 후, LDH

assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인한 결과, 에틸아세테이트 분획물인 경우 100 µg/ml 이상의 농도에서 다소 세포독성이 나타났으나 다른 분획물에서는 세포독성이 나타나지 않았고 50 µg/ml 농도에서는 모든 추출물 및 분획물에서 세포독성이 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 1).

Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

Pro-inflammatory cytokine들은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 암축진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. TNF-α, IL-1β, 그리고 IL-6 등과 같은 cytokine들은 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있는 것으로 보고되어 왔다(Kim *et al.*, 2008). 또한 여러 염증질환과 알러지 현상에 cytokine들에 대한 항체를 처리하였을 때 증상이 완화된 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 cytokine인 IL-1β와 IL-6의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성저해에 기인하는 PGE₂의 생성 억제를 통해 pro-inflammatory factor의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다고 보고되었다(Heo *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2009). 대식세포인 RAW 264.7 세포로부터 pro-

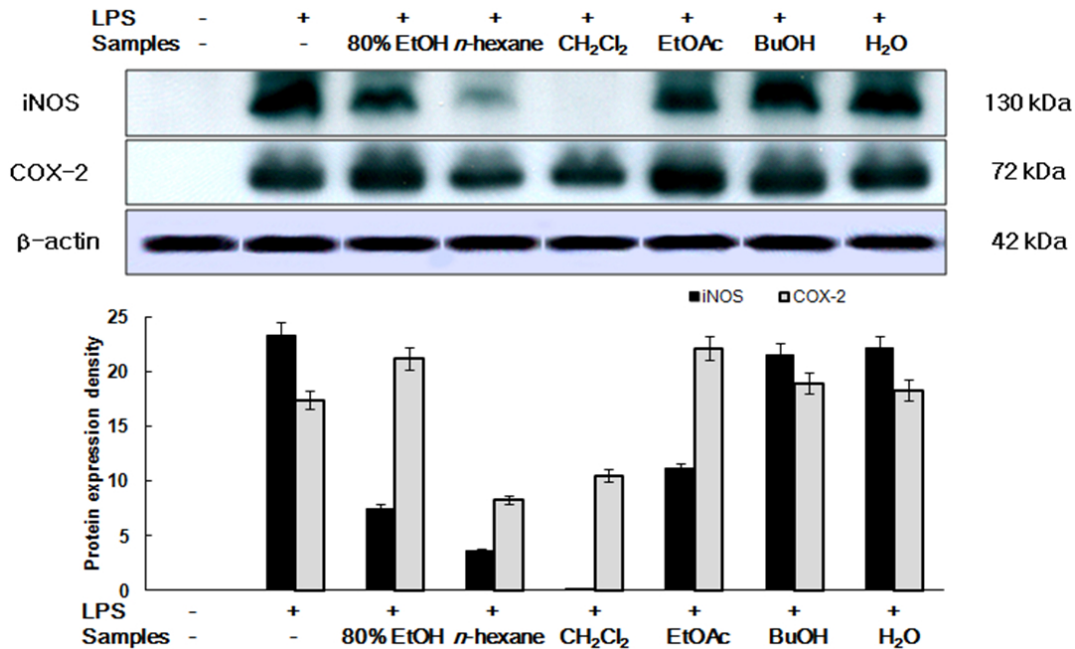


Fig. 3. Inhibitory effects of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidate* on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0 × 10⁶ cells/ml) were pre-incubated for 18 h, and the cells were co-treated with lipopolysaccharide (1 µg/ml) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidate* (100 µg/ml) for 24 h. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method.

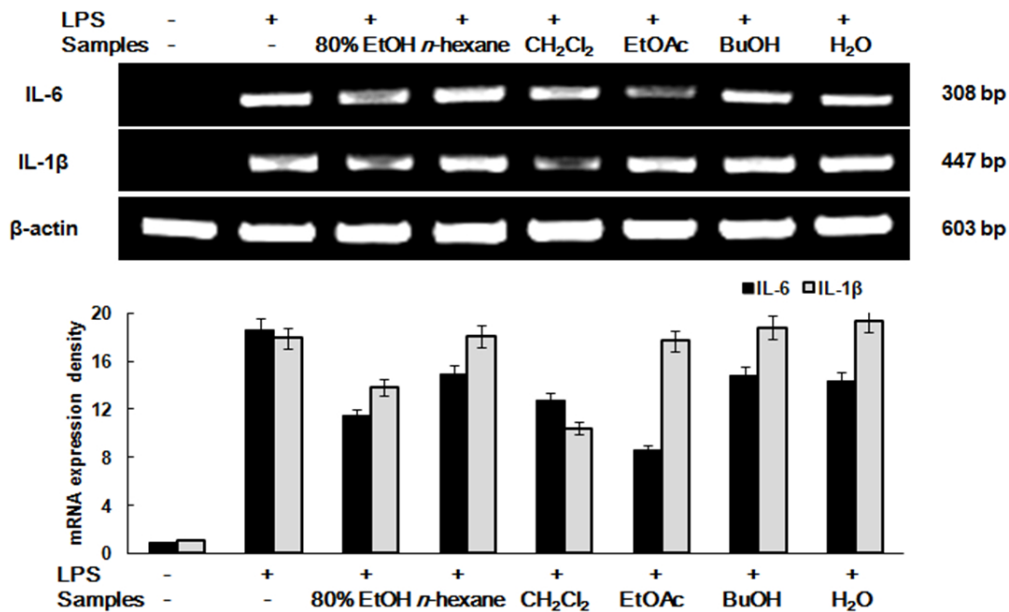


Fig. 4. Inhibitory effects of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidate* on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^6 cells/ml) were pre-incubated for 18 h, and the mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines were determined from 24 h cultures of cells co-treated with lipopolysaccharide ($1 \mu\text{g/ml}$) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *C. cuspidate* ($100 \mu\text{g/ml}$).

inflammatory cytokine의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR를 통해 확인 한 결과, LPS 자극과 함께 처리하여 IL-6와 IL-1β 생성 억제에 대한 구실잣밤나무 추출물 및 용매분획물을 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때, IL-6 생성 억제는 80% 에탄올 추출물, 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물에서 억제 효과가 나타났으며, IL-1β 생성 억제는 80% 에탄올 추출물과 디클로로메탄 분획물에서 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4).

적 요

본 연구는 구실잣밤나무(*C. cuspidate*) 잎 추출물의 항염증 활성이 염증성 매개인자 생성 저해 및 염증성 사이토카인의 억제와 관련이 있을 것으로 예상되어짐에 따라, 구실잣밤나무를 대상으로 80% 에탄올을 가지고 추출한 후 추출물을 극성에 따라 순차적으로 용매분획을 실시하여, 구실잣밤나무 80% 에탄올 추출물 및 용매분획물들이 염증반응의 주체가 되는 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성억제 효과, 그리고 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 억제 효과 및 IL-6와 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인 생성 억제효과 등을 알아보았다. 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 구실잣밤나무 80% 에탄올 추출물 및 분획물을 처

리하여 확인해본 결과, hexan, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트 분획물에서 NO의 생성억제 효과가 강하게 나타났으며, hexan과 디클로로메탄 분획물에서는 iNOS와 COX-2 생성 억제 효과가 다른 분획물에 비해 강하게 나타났으며 염증성 사이토카인 생성 억제 효능도 80% 에탄올 추출물 및 분획물들이 다소 차이는 있었지만 hexan과 디클로로메탄 분획물에서 IL-6와 IL-1β에서 생성억제 효과가 나타났다. 이러한 결과는 구실잣밤나무 잎에서 유효성분 추출을 통한 항염증 물질의 연구 또는 예방하거나 치료할 수 있는 염증 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다. 또한 구실잣밤나무 추출물로부터 염증억제 성분을 도출하고자 활성분획인 디클로로메탄 분획물에 대하여 활성성분의 분리가 진행 중이다.

References

- Ding, C., F. Cicuttini, J. Li and G. Jones, 2009. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Investig Drugs*. 18:1457-1466.
- Heo, S.J., W.J. Yoon, K.N. Kim, G.N. Ahn, S.M. Kang, D.H. Kang, A. Affan, C. Oh, W.K. Jung and Y.J. Jeon. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW

- 264.7 macrophages. Food Chem. Toxicol. 48:2045-2051.
- Jeong, J.B., S.C. Hong, H.J. Jeong and J.S. Koo. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. Kor. J. Plant Res. 25:299-307.
- Kang, J.T., N.C. Park and Y.G. Chung. 2002. Effects of the soil properties on growth of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* and *Dendropanax morbifera* stands in warm temperate forest zone. J. Korea For. Soc. 91:679-689.
- Kim J.Y., K.S. Jung and H.G. Jeong. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. FEBS Lett. 56:321-326.
- Kim, E.Y. and K.D. Moudgil. 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. Immunol. Lett. 120:1-5.
- Kim, J.H., R.A. Bachmann and J. Chen. 2009 Interleukin-6 and insulin resistance. Vitam Horm. 80:613-633.
- Lee, H.J., E.A. Hyun, W.J. Yoon, B.H. Kim, M.H. Rhee, H.K. Kang, J.Y. Cho and E.S. Yoo. 2006. *In vitro* anti inflammatory and anti-oxidative effects of Cinnamomum camphora extracts. J Ethnopharmacol. 103:208-216.
- Lee, S.J., K.W. An, T.S. Choi, H.S. Jung, J.H. Moon and K.H. Park. 2010. Component analysis and antioxidative activity of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* nut. Korean J. Food Preserv. 17:139-144.
- McDaniel M.L., G. Kwon, J.R. Hill, C.A. Marshall and J.A. Corbett. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211:24-32.
- Mu M.M., D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, I. Mori, T. Yoshida and T. Yokochi. 2001. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. J. Endotoxin Res. 7:431-438.
- Nam, J.H., J.C. Jeong, O.K. Kwon, S.Y. Hong, S.J. Kim, H.B. Soh, J.N. Lee, K.T. Lee and H.J. Park. 2013. Anti-inflammatory activity of peel extracts in color-fleshed potatoes. Kor. J. Plant Res. 26:533-538.
- Park G.H., J.H. Park, H.J. Eo, H.M. Song, M.H. Lee, J.R. Lee and J.B. Jeong. 2014. Anti-inflammatory effect of the extracts from *Abeliophyllum distichum* Nakai in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Kor. J. Plant Res. 27:209-214.
- Ren, K. and R. Torres. 2009. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. Brain Res Rev. 60:57-64.
- Ryu J.H., H. Ahn, J.Y. Kim and Y.K. Kim. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. Phytother Res. 17:485-489.
- Tizard I.R. 1986. Immunology: An introduction inflammation. 2nd ed., Saunders College Publishing, New York, USA. pp. 423-441.
- Yoon, W.J., J.Y. Moon, G. Song, Y.K. Lee, M.S. Han, J.S. Lee, B.S. Ihm, W.J. Lee, N.H. Lee and C.G. Hyun. 2010. *Artemisia fukudo* essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. Food. Chem. Toxicol. 48:1222-1229.

(Received 21 May 2014 ; Revised 1 August 2014 ; Accepted 11 September 2014)