ISSN 0377-9556 (PRINT) ISSN 2383-9457 (ONLINE)
약학회지 제 59 권 제 6 호 251~258 (2015)
Yakhak Hoeji Vol. 59, No. 6
DOI 10.17480/psk.2015.59.6.251

藥學會誌

쥐 대식세포에 대한 고추나무(*Staphylea bumalda*) 잎의 항염증 효과 검증

김정화 · 이재권*,#
충북대학교 약학대학, *충북대학교 사범대학 생물교육과
(Received September 22, 2015; Revised October 25, 2015; Accepted October 29, 2015)

Anti-inflammatory Effects of *Staphylea bumalda* Leaves Extracts in Murine Macrophages

Jeong Hwa Kim and Jae Kwon Lee*,#
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
**Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

Abstract — Aim of the present study was to investigate whether methanol extract from the leaves of *Staphylea bumalda* could be used to suppress lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophage cell lines, Raw 264.7 cells. The extract reduced nitric oxide (NO), cyclooxigenase-2 (COX-2) and pro-inflammatory cytokines production from LPS-stimulated Raw 264.7 cells. These inhibitory effects were associated with decreases in the phosphorylation of MAP kinases and the activity of NFκB signal pathways. Our results indicate that *Staphylea bumalda* significantly inhibits the inflammatory activity of activated macrophages, suggesting that *Staphylea bumalda* could be a potential candidate for the treatment of inflammatory disease.

Keywords □ *Staphylea bumalda*, nitric oxide, cytokine, anti-inflammation, macrophages

고추나무(*Staphylea bumalda*)는 한국·중국·일본 등지에 분포하는 고추나무과 낙엽성 떨기나무이다.[1] 높이는 3~5 m이고, 가지는 둥글며 회록색이다. 잎은 겹잎으로 마주 나고, 잎자루는 길이가 3~8 cm이다. 잎은 타원형 또는 타원형 모양 달걀 모양이다. 5~6월에 가지 끝에 원추꽃차례로 흰 꽃이 핀다. 목재는 나무못 · 젓가락 또는 땔감으로 이용되며 어린잎은 식용한다. 학술지에 보고된 고추나무의 약리효능은 없다. 다만 민간요법에서 고추나무의 어린 잎이 호흡기 질환과 염증을 완화시킨다는 보고가 있다.

대식세포(macrophage)는 감염체에 대한 식작용(phagocytosis)을 나타내는 대표적인 백혈구로서 항원제시 기능도 가지고 있다. 대식세포의 이 같은 기능은 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 박테리아 물질에 의해 활성이 증가되며, interferon(IFN)와 같은 체내 면역증강 물질에 의해서도 활성이 증가된다. 활성이 증가된 대식세포는 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6), 산화질소(nitric oxide, NO) 등을 분비하여 감염체에 대한 식작용 및 암세포에 대한 세포독성을 나타낼 뿐만 아니라 조력 T 세포와 자연살해세포의 활성을 증가시키고, B 세포의 성숙 및 클론의 팽창을 촉진시켜 초기 면역작용에 중요한 역할을 한다.[2,3] 그러나 대식세포로부터 분비된 면역 증강 성분들의 분비가 지나치거나 이상 분비현상이 일어나게 되면 염증 반응을 일으키게 되며 염증현상이 지속되면 심각한 질병으로 이어지게 된다.

본 연구에서는 고추나무 잎 추출물이 대식세포에 의해 발생하는 염증반응의 진행을 억제 또는 차단할 수 있는지 실험하였다. 본 연구의 결과는 염증 반응을 조절 할 수 있는 새로운 항 염증 소재를 소개하고 있으며, 고추나무의 새로운 응용 분야를 제시하고 있다.

#**Corresponding Author**
Jae Kwon Lee
Department of Biology Education, College of Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
Tel.: 043-261-2734 Fax.: 043-260-3361
E-mail: chemokine@cbnu.ac.kr

재료 및 실험방법

추출물의 제조

고추나무 잎을 음용수로 2~3회 씻어내고 건조기로 건조한 후 파쇄기를 이용하여 분쇄 후 냉동 보관(–20°C)하였다. 보관된 건

조물 800 g에 100% 메탄올(MeOH) 20 l를 가하여 상온에서 4일간 추출한 다음 추출물을 거즈로 1차 여과하였다. 3000×g에서 3분간 원심분리하고, 상등액 만을 취하여 0.2 μm filter로 여과한 후 감압 농축하였다.

실험 재료

LPS는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, WST-8은 Takara Bio Inc.(Takara Bio Inc., Japan)에서 구입하였다. Cyclooxigenase-2(COX-2), IκB, p38, ERK, JNK, pERK, β-actin의 단클론 항체와 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, U.S.A)에서 구입하였으며, p-p38, pJNK는 Cell Signaling Technology, Inc.(Cell Signaling, U.S.A.)에서 구입하였다. TNF-α, IL-1β, IL-6의 ELISA Kit는 R&D(Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

쥐 대식세포 세포주인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Hyclone Laboratories, Logan, UT, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone Laboratories), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 혼합한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

세포 독성 측정

96 well plate에 Raw 264.7 세포를 5×10^5 cells/well(100 μl)으로 첨가하고 다양한 농도로 추출물을 전 처리하였다. 1시간 후 LPS(1 μg/ml)를 처리하고 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 음성대조군(control)에는 아무런 처리를 하지 않았다. 암실에서 WST-8 시약을 처리하고 1시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 흡광도(450 nm)를 측정하였다.

산화질소 생성량 측정

세포 독성 측정과 동일한 과정을 통하여 준비한 세포의 배양 상등액을 well당 50 μl씩 새로운 96 well flat bottom으로 옮긴 후, 상등액 50 μl와 Griess 시약(5% phosphoric acid에 녹인 1% sulfanilamide+멸균 증류수에 녹인 1% α-naphthylamide) 50 μl를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 다음 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

웨스턴 블럿(Western blot)

Raw 264.7 세포를 6 well plate(1.5×10^6 cells/ml)에 추출물과 LPS를 각각 처리하여 일정 시간 배양 후 원심분리 방법으로 세포를 수거하였다. 회수한 세포를 Proprep(Intron, Seoul, Korea)으로 분쇄하여 세포 추출물을 준비한다. 준비된 시료는 bicinchoninic acid(BCA)법으로 총 단백질량을 구하였다. 정량 된 단백질을 동일한 농도로 12% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) 막에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 동안 blocking 하였다. β-actin, inducible nitric oxide synthase(iNOS), COX-2, p38, ERK, JNK, p-p38, pERK, pJNK 단백질의 발현은 각각의 단 클론 항체를 이용하여 확인하였다.

Cytokine 측정

Raw 274.7 세포를 6 well plate에 0.5×10^6 cells/ml로 분주하고 다양한 농도의 추출물과 LPS(1 μg/ml)를 각각 처리한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 후 상등액을 수거하여 cytokine 량을 효소면역분비법으로 측정하였다. TNF-α, IL-1β와 IL-6는 ELISA Kit(R&D, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험 방법은 manufacturer's instruction에 따랐다.

통계적 검증

실험 결과는 mean±SD로 나타냈으며, t-test의 통계처리 방법으로 통계적 유의성을 검정하였다.

실험 결과

대식세포에 대한 고추나무 잎 추출물의 독성

고추나무 잎 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 실험군은 대식세포(Raw 264.7 cell)에 고추나무 잎 추출물을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 그리고 100 μg/ml의 농도로 1시간 전 처리한 후, LPS(1 μg/ml)을 처리하였다. 음성 대조군은 무처리군(control) 또는 LPS(1 μg/ml)만 처리한 실험군으로 하였다. 양성 대조군에는 100 nM 이상에서 apoptosis 유도 효과가 알려져 있는 Trichostatin-A(TSA)를 100, 200 nM로 처리하였다. 각 실험군은 24시간 배양 후 WST-8을 이용하여 세포에 대한 독성을 비교하였다. 실험결과 TSA는 100 nM 이상의 농도에서 세포독성을 나타내는 반면, 고추나무잎 추출물은 100 μg/ml 농도까지의 모든 실험농도에서 Raw 264.7 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

고추나무 잎 추출물이 산화질소 생성에 미치는 영향

고추나무 잎 추출물의 산화질소 생성 억제효과를 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포에 Fig. 1에서와 동일한 조건으로 고추나무 잎 추출물과 LPS를 처리 한 후, 세포 배양 상층 액에서 산화질소 생성을 측정하였다. Fig. 2(A)의 결과에서와 같이 음성 대조군(Control)에서는 산화질소가 검출되지 않았지만, LPS 만 처리

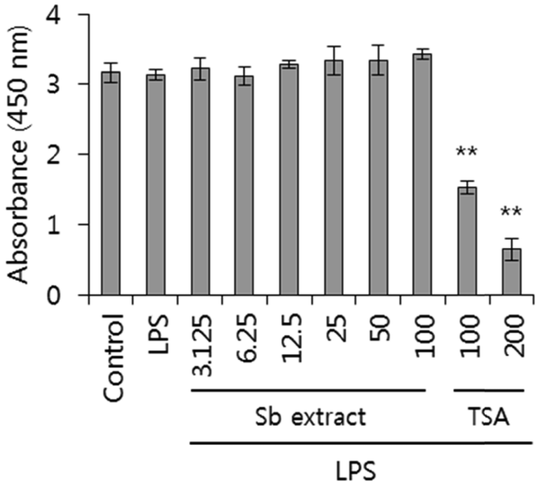

Fig. 1 – Cytotoxicity of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on Raw 264.7 cells. Cells were treated with various concentrations (3.125~100 μg/m*l*) of extract and TSA. After 24 hour cytotoxicity was determined by measuring the absorbance at 450 nm after WST-8 regent addition. The values shown here are means±S.D. of three independent experiments. **p<0.01 as compared to the control cells.

한 양성 대조군에서 20 μM 정도의 산화질소가 생성 되었다. 고추나무 잎 추출물을 전 처리한 실험 군에서는 고추나무 잎 추출물의 농도 의존적으로 산화질소 생성이 유의적으로 감소하였다, 고추나무 잎 추출물 100 μg/m*l*에서는 2.6 μM의 산화질소를 생성하였다.

고추나무 잎 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향

고추나무 잎 추출물에 의한 산화질소 생성 억제효과에 대한 원인을 분석하기 위하여 산화질소의 생성을 촉진하는 주효소인 iNOS 생성 량을 웨스턴 블럿으로 확인하였다. iNOS의 생성은 50, 100 μg/m*l*의 고추나무 잎 추출물을 세포에 전 처리한 후 LPS를 첨가하고 6시간 후에 세포 추출액을 이용하여 웨스턴 블럿으로 확인하였다. Fig. 2(B)와 (C)의 결과에서와 같이 LPS(1 μg/m*l*)의 처리에 의해 증가된 iNOS의 생성은 고추나무 잎 추출물의 처리에 의해 감소되었다.

고추나무 잎 추출물이 COX-2 생성에 미치는 영향

고추나무 잎 추출물의 추가적인 항염증 활성을 검증하기 위하여 전 염증성 인자인 COX-2의 발현을 실험하였다. COX-2 생성 억제효과를 확인하기 위하여 Raw 264.7 세포에 Fig. 2(B)에서와 동일한 조건으로 고추나무 잎 추출물과 LPS를 처리 한 후, 세포 추출액을 이용하여 COX-2의 생성을 측정하였다. Fig. 3(A)와 (B)의 결과에서와 같이 음성 대조군(Control)에서는 COX-2의 생성이 검출되지 않았지만, LPS 만 처리한 양성 대조군에서 COX-2의 생성이 급격히 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. LPS에 의한 COX-2의 생성은 고추나무 잎 추출물의 전 처리 농도 의존적으로 감소되었다.

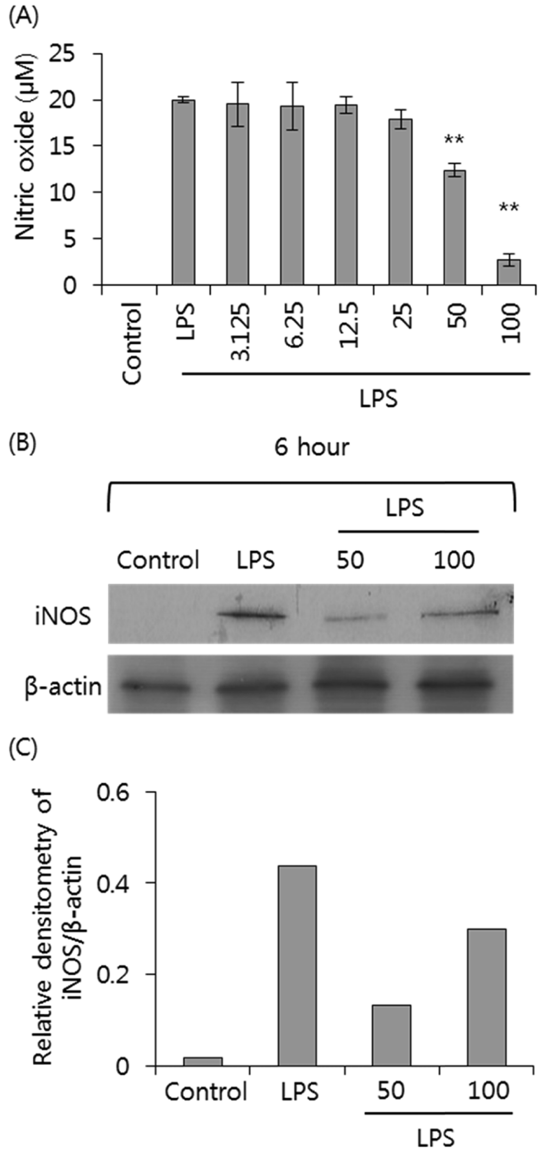

Fig. 2 – Effects of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on the nitric oxide production of the Raw 264.7 cells. (A) Raw 264.7 cells were treated with various concentrations (3.125~100 μg/m*l*) of extract. After 24 hour the culture supernatant were subjected the nitric oxide assay. The values shown here are means±S.D. of three independent experiments. **p<0.01 as compared to the cells treated with LPS. (B) The cells were treated with LPS (1 μg/m*l*) or extract of *Staphylea bumalda's* leaves (50 and 100 μg/m*l*) for 6 hour. Total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared and the resolved proteins by western blot were analyzed by anti-iNOS antibody. Anti-β-actin antibody was used as a control. (C) Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of β-actin levels. Western blot analysis was performed in triplicate and all of them showed similar results.

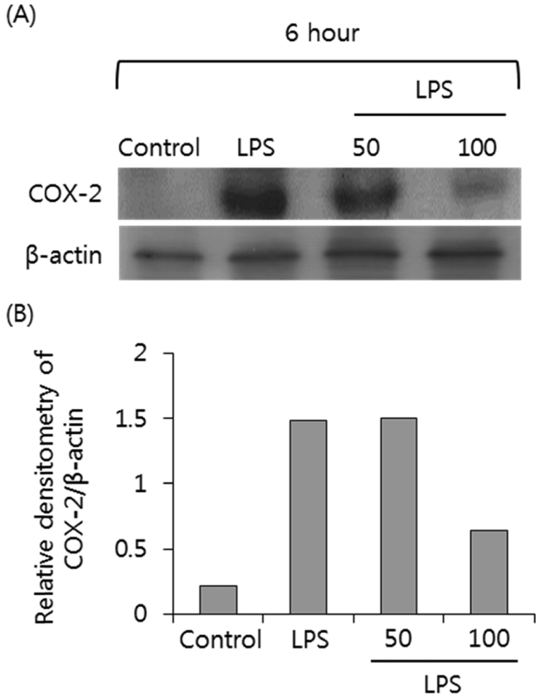

Fig. 3 – Effect of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on COX-2 production in Raw 264.7 cells. (A) Cells were pretreated with extract of *Staphylea bumalda's* leaves (50 and 100 μg/m*l*) for 1 hour, LPS (1 μg/m*l*) was then added. After 6 hour, total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared and the resolved proteins by western blot were analyzed by anti-COX-2 antibody. (B) Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of β-actin levels. Western blot analysis was performed in triplicate and all of them showed similar results.

고추나무 잎 추출물이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향

고추나무 잎 추출물의 또 다른 항염증 효과를 확인하기 위하여 활성이 증가된 대식세포로부터 분비되는 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 분비량을 효소면역분비법으로 분석하였다. Cytokine의 양을 측정하기 위하여 세포에 고추나무 잎 추출물를 농도 별로 전 처리 한 후, LPS를 처리하였다. 24시간 후 세포 배양 상층액에서 cytokine의 양을 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 무처리 대조군(Control)은 세 종류의 cytokine이 거의 분비되지 않은 반면, LPS의 처리에 의해 모든 cytokine의 생성은 급격히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. IL-1β와 IL-6의 생성은 고추나무 잎 추출물의 농도 의존적으로 감소되었다. TNF-α의 생성도 고추나무 잎 추출물의 처리에 의해 감소되었으나 통계적인 유의성은 없었다.

고추나무 잎 추출물이 IκB 발현에 미치는 영향

NFκB는 염증 반응 유도에 중요한 세포신호전달 단백질로서 활성이 증가되기 위해서는 먼저 IκBα가 분해되어야 한다. 그러므로 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성에 대한 기전연구로서

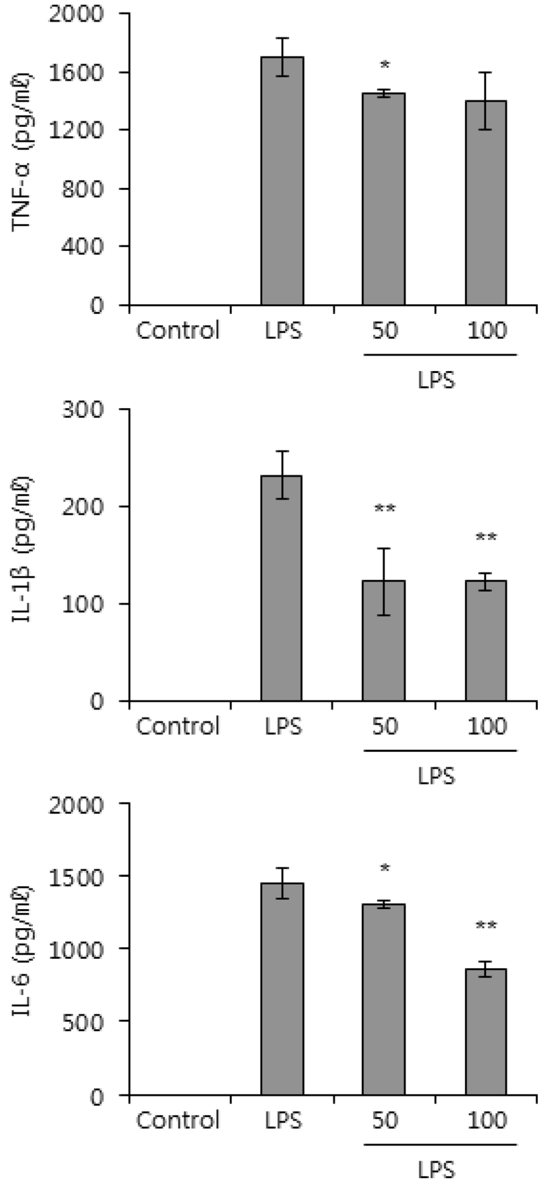

Fig. 4 – Effects of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on TNF-α, IL-1β, and IL-6 production in Raw 264.7 cells. Cells were treated with 50 and 100 μg/m*l* of samples or LPS (1 μg/m*l*) for 24 hour. The culture supernatant, which was subject to enzyme immunoassay of cytokines, was harvested. The values shown are means±S.D. of three independent experiments. *p<0.05; **p<0.01 as compared to the cells treated with LPS.

NFκB의 활성을 IκBα의 량으로 확인하였다. IκBα의 존재 량을 확인하기 위해서 고추나무 잎 추출물을 50, 100 μg/m*l*의 농도로 전 처리한 다음, LPS를 처리하고 30분과 1시간 후에 IκBα의 발현량을 웨스턴 블럿으로 확인하였다. Fig. 5(A)와 (B)에서와 같이 고추나무 잎 추출물 처리 후 30분에서 LPS 처리에 의해 감소된 IκBα의 발현은 고추나무 잎 추출물의 처리에 의해 무처리 대조군(Control) 수준으로 회복되었다. 반면 1시간이 경과한 후

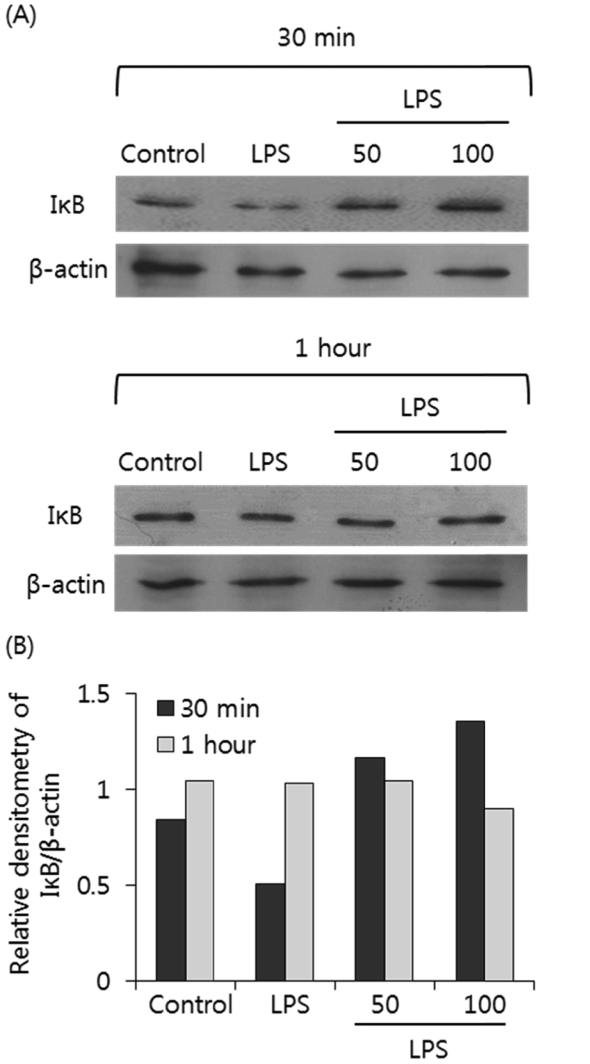

Fig. 5 – Effects of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on IκB degradation. (A) Raw 264.7 cells were treated with 50 and 100 μg/m*l* of samples or LPS (1 μg/m*l*). The total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared after 30 minute and 1 hour, and IκB was detected by Western blot analysis. The expression levels of IκB was compared with β-actin as a control. (B) Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of β-actin levels. Western blot analysis using a specific antibody was performed in triplicate and all of them showed similar results.

에는 LPS에 의해 감소된 IκBα의 발현이 회복되었다.

고추나무 잎 추출물에 의한 MAP kinases 발현 변화

MAP kinases는 NFκB와 더불어 염증 반응을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어서, 고추나무 잎 추출물의 처리에 의해 Raw 264.7 세포에서 MAP kinases의 신호가 변화되는지를 웨스턴 블럿으로 확인 하였다. IκBα에서와 동일한 조건으로 세포에 고추나무 잎 추출물을 처리한 후 10분, 20분 후에 세포를 회수하여 MAP kinases에 속하는 p38, JNK, ERK의 인산화 정도를 측정하였다. Fig. 6(A)와 (B)의 결과에서와 같이 LPS에 의해 유도되는 세포 내부의 염증신호는 p38, JNK, ERK 모두의 인산화를 유도하게 된다. 그러나 고추나무 잎 추출물의 전 처리에 의해 p38, JNK, ERK의 인산화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 고추나무 잎 추출물의 인산화 억제활성은 LPS 처리 후 10분까지는 지속되었지만 20분째에 활성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

고추나무는 주로 관상용 수목으로 여겨져 왔으며, 어린 잎을 식용으로 사용하는 정도로 이용되었다. 고추나무의 약리효능 관련 문헌을 전문적인 논문에서는 찾을 수 없다. 다만 몸에 열을 낮추고, 호흡기 질환을 완화시키며, 분만 후 산후조리에 사용 했다는 민간요법이 전해지고 있다. 본 연구에서는 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성을 검증하였다. 민간요법으로 전해지는 호흡기 질환 시 발생하는 기침증상에 대한 고추나무의 치료 효과로 미루어 볼 때 고추나무의 항염증 효과는 예측 가능한 활성이라고 할 수 있다. 그러나 실제로 발표된 고추나무의 항염증 효과 논문은 없는 상황이므로 본 연구를 통하여 체계적인 고추나무의 항염증 활성이 처음 보고되었다고 할 수 있다.

고추나무 잎은 오래 전부터 식용으로 이용되어 왔지만 활성에 대한 연구가 이루어진 바는 없다. 다만 기존에 발표된 연구 결과를 통하여 활성 성분이 보고된 바가 있다.[4] 분리 동정된 대표적인 성분들은 chromone gylcoside와 flavonoid glycosides에 속하는 물질로서 astragalin(Kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-*glucopyranoside*); 2-*methyl*-5, 7-*dihydroxy*-*chromone*-7-*O*-*β*-*D*-*glucopyranoside*; isoquercitrin; nicotiflorin; kaempferol 3-neohesperidoside; kaempferol 3-*O*-[*α*-*rhamno*-*pyranosyl*-(1→4)-*rhamnopyranosyl*-(1→6)-*β*-*D*-*glucopyranoside*]이다. 이중에서 플라보노이드(flavonoid)에 속하는 flavonol인 kaempferol의 경우 항염증 효과가 이미 알려져 있으므로 고추나무 잎 유래 kaempferol 유도체들도 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상되었다.[5,6]

기존에 발표된 연구결과에서 kaempferol은 Raw 264.7 세포로부터 산화질소의 생성을 억제하는 효과가 보고된바 있다.[7] 그러나 본 연구의 결과와는 다르게 iNOS의 경로가 아닌 다른 경로를 통하여 산화질소를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이 같은 차이는 산화질소 억제에 사용된 활성물질이 기존의 연구에서는 정제된 kaempferol을 사용한 반면 본 연구에서는 kaempferol 유도체와 다수의 다른 활성 성분이 함께 포함된 혼합물을 사용하였기 때문으로 생각되었다.

본 연구에서 염증 지표로 사용한 산화질소는 arginine으로부터 생성되는 라디칼로서 세포 내에서 염증신호 전달자로서 중요한

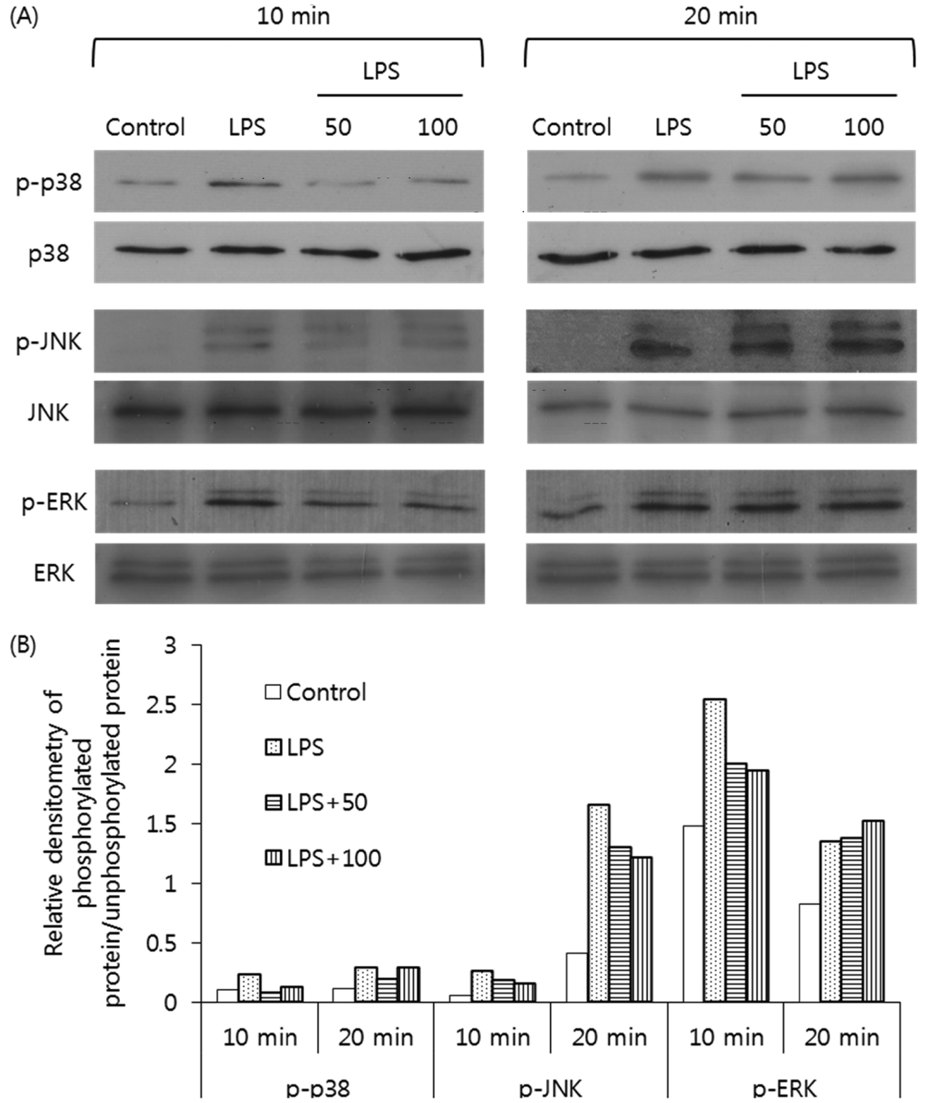

Fig. 6 – Effects of the methanol extract of *Staphylea bumalda's* leaves on phosphorylation of MAP kinases. (A) Raw 264.7 cells were treated with 50 and 100 μg/m*l* samples or LPS (1 μg/m*l*). The total protein lysate of each Raw 264.7 cell was prepared after 10 min and 20 min and cell signaling proteins were detected by Western blot analysis. The expression levels of p38 MAPK, ERK1/2 and JNK were compared with phosphorylated proteins. (B) Each immunoreactive band was digitized and expressed as a ratio of unphosphorylated proteins levels. Western blot analysis using a specific antibody was performed in triplicate and all of them showed similar results.

역할을 한다.[8] 산화질소는 LPS, IFN-γ, IL-1β, TNF-α 등의 자극에 의해 유도되는 iNOS에 의해 대식세포, 내피세포, 심근세포 등에서 분비된다.[9] 산화질소의 대표적인 활성은 혈관확장,[10-14] 대식세포에 의한 암세포 독성 증가 및 cytokine 분비 촉진[2,3] 등을 들 수 있다. 그러나 면역세포에 대한 산화질소 신호는 염증반응 유도에 중요한 작용을 한다. 비정상적으로 과 생산된 산화질소는 전염증성 매개체로 작용하게 되며 관절, 위, 폐 등에서 염증반응을 유도하고 심화시키는 역할을 한다.[15] 그러므로 본 연구에서와 같이 산화질소를 억제하는 물질의 발굴은 항염증 제제의 개발이라는 의의를 부여할 수 있다.

Cyclooxygenase(COX)도 대표적인 염증 매개 인자로서, prostacyclin과 thromboxane이 포함된 prostaglandin의 생성에 관하여하는 것으로 알려져 있다. COX에는 COX-1과 COX-2의 두 가지 분자 구조가 있는데, 염증반응의 유발은 COX-2의 활성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 평상시에는 검출되지 않다가 염증 반응에 의해 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다.[16-18] 그러므로 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물은 부작용을 최소화 시킨 항염증 제제로 사용될 수 있다.[19] 본 연구의 결과에 의하면 고추나무 잎 추출물은 농도의존적으로 COX-2의 생성을 억제함을 확인할 수 있었다.

염증의 유도에 관여하는 또 다른 물질로 본 연구에서는 전 염증성 cytokine들을 측정하였다. 대식세포에서 분비되는 TNF-α

는 대표적인 면역계의 활성을 증가시키는 cytokine으로서 대식세포에서 생성되어 염증 반응에 필요한 인자들의 생성을 촉진 한다.[20] 특히 대식세포에 의해 주도되는 염증반응에서 TNF-α는 가장 중요한 역할을 담당하게 된다.[21] IL-1β는 TNF-α와 함께 염증 반응을 유도하는데 관여하는 cytokine으로서, 특히 T 세포, NK 세포, B 세포 활성에 직접적으로 관여한다.[22,23] IL-6는 TNF-α와 IL-1β보다는 염증을 유도하는 능력은 약하지만 염증을 심화시키는 능력을 가지고 있다.[24,25]

본 연구에서는 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성을 검증하기 위하여 산화질소 및 전 염증성 cytokine들의 분비 억제 효과를 확인하였다. 이와 같은 고추나무 잎의 항염증 효과에 대한 작용 기전을 확인하기 위해 대표적인 세포 내부 면역관련 신호 분자인 NFκB와 MAP Kinases(ERK, p-38, JNK)의 활성을 웨스턴 블럿을 통해 확인하였다. NFκB는 세포의 분화 조절, 발암 유전자의 생성에도 관련이 있을 뿐만 아니라,[26] 대식세포에서 활성화 되면 iNOS나 TNF-α 등의 유전자 발현에 관여한다.[21] MAP kinases에는 p38, ERK, JNK가 속해 있으며, 이 세 분자 모두 염증과정에 큰 영향을 주고 있음이 밝혀진 바 있다.[21,27,28] 본 연구에서는 IκB를 통한 NFκB의 활성과 p38, ERK, JNK의 인산화를 통한 MAP kinases의 활성이 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성에 관여하고 있음을 유추할 수 있었다. 그러나 NFκB와 MAP Kinases의 역할을 명확하게 검증하기 위해서는 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)와 같은 추가 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 처음으로 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성을 검증함으로써 염증 조절 연구 분야에 새로운 후보 물질의 소개와 더불어 중요한 기초 자료를 제공하였다.

결 론

고추나무는 다년생 낙엽수로서 고추나무과에 속하며, 중국, 일본, 한국에 주로 분포한다. 고추나무 잎은 오래 전부터 식용으로 사용되어왔다. 본 연구에서는 고추나무 잎 메탄올 추출물의 항염증 활성을 연구하였다. 실험에는 미성숙 대식세포인 Raw 264.7 세포에 고추나무 잎 추출물을 전 처리 한 다음, lipopolysaccharide로 염증 상황을 유도한 후 항염증 활성을 실험하였다. 고추나무 잎 추출물은 염증 유도 성분인 산화질소, 전염증성 cytokine, COX-2의 생성을 억제하였다. 이 같은 고추나무 잎 추출물의 항염증 활성은 NF-κB와 MAP kinases의 신호전달 억제를 통하여 일어남을 확인하였다. 본 연구의 결과는 고추나무의 항염증 연구에 중요한 자료로 사용될 것으로 기대된다.

감사의 말씀

"이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음".

References

1) Yu, Q., Matsunami, K., Otsuka, H. and Takeda, Y. : Staphylionosides A-K: megastigmane glucosides from the leaves of *Staphylea bumalda* DC. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **53**, 800 (2005).
2) Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, I. and Rachlin, E. M. : Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochembiophys. Rescommun.* **157**, 87 (1998).
3) Thomas, P. M. and Edginton, S. : Human monocyte mediated tumor cytotoxicity. *J. Immunol.* **132**, 1980 (1984).
4) Sohn, S. J., Kwon, Y. S., Kim, S. S., Chun, W. J. and Kim, C. M. : Chemical Constituents of the Leaves of *Staphylea bumalda. Natural Product Sciences* **10**, 173 (2004).
5) Park, M. J., Lee, E. K., Heo, H. S., Kim, M. S., Sung, B., Kim, M. K., Lee, J., Kim, N. D., Anton, S., Choi, J. S., Yu, B. P. and Chung, H. Y. : The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Med. Food* **12**, 351 (2009).
6) Calderon-Montaño, J. M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C. and Lopez-Lazaro, M. : A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 298 (2011).
7) Choi, I. S., Choi, E. Y., Jin, J. Y., Park, H. R., Choi, J. I. and Kim, S. J. : Kaempferol inhibits P. intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide through translational regulation in murine macrophages: critical role of heme oxygenase-1-mediated ROS reduction. *J. Periodontol.* **84**, 545 (2013).
8) Ashton, D. S. and Moncada, S. : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (1988).
9) Kubes, P. : Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut* **7**, 6 (2000).
10) Kawamata, H., Ochiai, H., Mantani, N. and Terasawa, K. : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated Raw 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* **28**, 217 (2000).
11) Lee, B. G., Kim, S. H., Zee, O. P., Lee, K. R., Lee, H. Y., Han, J. W. and Lee, H. W. : Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from Meliaazedarach. *Eur. J. Pharmacol.* **406**, 301 (2000).
12) Seo, W. G., Pae, H. O., Oh, G. S., Chai, K. Y., Yun, Y. G., Kwon, T. O. and Chung, H. T. : Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from Cudraniatricuspidata on the expression of nitric

oxide synthase gene in Raw 264.7 macrophages stimulated with interferon-and lipopolysaccharide. *Gen. Pharmacol.* **35**, 21 (2000).

13) Chiou, W. F., Chou, C. J. and Chen, C. F. : Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in Raw 264.7 macrophages. *Life Sci.* **69**, 625 (2001).

14) Seo, W. G., Pae, H. O., Oh, G. S., Kim, N. Y., Kwon, T. O., Shin, M. K., Chai, K. Y. and Chung, H. T. : The aqueous extract of Rhodiolasachalinensis root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in Raw 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 119 (2001).

15) Sharma, J. N., Al-Omran, A. and Parvathy, S. S. : Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* **15**, 252 (2007).

16) Inoue, H., Yokoyamo, C., Hara, S. and Tanabe, T. J. : Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 24965 (1995).

17) Crofford, L. J., Willer, R. L., Ristimaki, A. P., Sano, H., Remmers, E. F., Epps, H. R. and Hla, T. : Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J. Clin. Invest.* **93**, 1095 (1994).

18) Beutler, B. and Cerami, A. : The biology of cachectin/TNF - A primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 625 (1989).

19) Kurumbail, R., Kiefer, J. R. and Marnett, L. J. : Cyclooxygenase enzymes: Catalysis and inhibition. *Current. Opinion. in Structural. Biology* **11**, 752 (2001).

20) Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y., Lee, J. H. and Kim, Y. H. : Effects of Chitosan oligosaccharide on the C. albicans-induced Inflammatory Effect in mice and raw 264.7 macrophage cells. *J. Chitin. Chitosan* **12**, 15 (2007).

21) Lee, A. K., Sung, S. H., Kim, Y. C. and Kim, S. G. : Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-κBα phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British J. Pharmacol.* **139**, 11 (2003).

22) Papayianni, A. : Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren. Fail.* **18**, 725 (1996).

23) Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. : Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**, 355 (2003).

24) Hibi, M., Nakajima, K. and Hirano, T. : IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* **74**, 1 (1996).

25) Hirano, T., Matsuda, T. and Nakajima, K. : Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* **12**, 262 (1994).

26) Chen, F., Castranova, V. and Shi, X. : New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am. J. Pathol.* **159**, 387 (2001).

27) Garrington, T. P. and Johnson, G. L. : Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Cell. Biol.* **11**, 211 (1999).

28) Seo, J. H., Lim, J. W., Kim, H. and Kim, K. H. : Helicobacter pylori in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases. AP-1 and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab. Invest.* **84**, 49 (2004).