

## LPS로 유도된 RAW 264.7 cell로부터 NF- $\kappa$ B 조절 억제와 마우스 모델을 통한 큰잎모자반 에탄올 추출물의 항염증 효과

강보경<sup>1</sup>, 김꽃봉우리<sup>2</sup>, 김민지<sup>2</sup>, 박시우<sup>1</sup>, 박원민<sup>1</sup>, 안나경<sup>1</sup>, 최연욱<sup>1</sup>, 배난영<sup>1</sup>, 박지혜<sup>1</sup>, 안동현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품공학과/식품연구소

<sup>2</sup>부경대학교 수산과학연구소

Received: April 29, 2015 / Revised: June 4, 2015 / Accepted: June 6, 2015

### Anti-inflammatory Effect of *Sargassum coreanum* Ethanolic Extract through Suppression of NF- $\kappa$ B Pathway in LPS Induced RAW264.7 Cells in Mice

Bo-Kyeong Kang<sup>1</sup>, Koth-Bong-Woo-Ri Kim<sup>2</sup>, Min-Ji Kim<sup>2</sup>, Si-Woo Bark<sup>1</sup>, Won-Min Pak<sup>1</sup>, Na-Kyung Ahn<sup>1</sup>, Yeon-Uk Choi<sup>1</sup>, Nan-Young Bae<sup>1</sup>, Ji-Hye Park<sup>1</sup>, and Dong-Hyun Ahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

<sup>2</sup>Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Republic of Korea

The anti-inflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract (SCEE) was investigated using lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in this study. It was shown that there was no cytotoxicity in the viability of macrophages treated with SCEE when compared to the control. The production of NO was considerably suppressed by SCEE, approximately up to 50% at 100  $\mu$ g/ml. This significantly decreased levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . In addition, the expression of iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B was suppressed by SCEE treatment. In *in vivo* testing, the croton oil-induced mouse ear edema was attenuated by SCEE and there were no mortalities in mice administered with 5000 mg/kg body weight of SCEE over a 2 week observation period. From these results, SCEE inhibits the release of LPS-induced pro-inflammatory cytokines and mediators, suggesting that SCEE could be a potential agent for anti-inflammatory therapies.

**Keywords:** *Sargassum coreanum*, anti-inflammation, nuclear factor kappa B, ear edema

## 서 론

체내의 염증 반응은 상처나 세균 감염 등의 물리적, 화학적 자극이 일어날 때 손상 부위를 복구시키는 신체 방어 기전 중 하나이며, 자극이 가해지면 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다[10]. 하지만 지속적인 염증반응은 오히려 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등 기능 장애를 유발하며, 관절염 및 암 등의 발병과 깊은 연관을 갖고 있다[11]. 대식세포(macrophage)는 염증 반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있으며, 자극에 노출되거나 면역세포들이 분

비하는 사이토카인 등에 의해 활성화되며, 감염초기에 nitric oxide (NO)와 cytokine을 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다[7]. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX)의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등으로 바뀌는 과정 및 nitric oxide (NO)의 대량 생성에 관여하게 되며, 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 알려져 있다[8, 16]. 이 중 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, NOS는 constitutive NOS와 inducible NOS로 나누어진다. 특히 iNOS는 외부자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 다량의 NO를 생산하

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

며 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진한다고 보고되고 있다[12]. 또 다른 주요 염증 매개인자인 COX는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 효소이며, COX-2는 growth factors, cytokine 및 lipopolysaccharide 등 다양한 자극에 의해서 macrophage나 monocyte 등의 세포에서 다량 발현되고 이로 인해 발생된 prostaglandin은 종양의 세포사멸을 억제하고 혈관생성을 유도하여 종양생성에 관여한다[1]. 또한, 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor의 합성을 조절하는 transcription factor이다[4]. NF-κB는 p50과 p65로 구성되어 핵 안으로 들어가 전사인자로서 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증관련 cytokine을 합성하며, 일반적으로 세포질에서 inhibitor NF-κBα (IκBα)와 결합함으로써 NF-κB의 작용이 억제된다[17]. 이들의 활성 조절은 염증반응을 조절하기 위한 핵심요소로서 NF-κB의 활성을 조절하여 염증 반응을 완화시키는 천연소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근 각광받고 있는 천연물의 하나로 해조류를 들 수 있다. 해조류는 종류와 시기에 따라 다양한 성분의 차이를 보이며 육상식물과는 다른 구조로 항균[18], 고지혈증 개선[21], 콜레스테롤 침착 방지[9] 등의 생리활성이 보고되고 있으며, 그 중에서도 갈조류는 fucoidan, phycocolloids, phlorotannins 등과 같은 생리활성물질로부터 항산화, 항응고, 항암 등의 다양한 생리활성을 보인다고 알려져 있다[5]. 따라서 본 연구에서는 갈조류에 속하는 대표적인 해조류로서 큰잎모자반 (*Sargassum coreanum*)을 이용하여 항염증 효과를 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)은 부산 연화리에서 채취하였으며 이를 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후 분말화하고 진공 포장하여 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

### 에탄올 추출방법

큰잎모자반 건조 분말에 10배의 95% 에탄올을 가하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 동안 상온에서 교반하여 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 1,977 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였고, 이후 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co.,

Tokyo, Japan)로 농축하였으며, 농축하여 건조된 시료는 -20°C에서 보관하며 실험에 이용하였다.

### 실험 동물

ICR 마우스(생후 8주령, 수컷)을 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀 부종 및 귀 조직 실험에 사용하였으며, 단기 독성 평가 실험을 위해 Balb/c 마우스(생후 10주령의 암컷)를 사용하였다. 마우스는 온도 20 ± 2°C, 습도 50 ± 10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다.

### 세포배양

대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 100 mg/ml inactivated fetal bovine serum과 10 mg/ml penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대배양하였고, 20 passages를 넘지 않은 세포만 사용하였다.

### 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 tetrazolium-based colorimetric assay (MTT assay)를 실시하였다. RAW 264.7 cell 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml를 well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 μg/ml의 LPS와 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/ml)로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/ml 농도의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C, 1,318 × g에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(absorbance at 540 nm (Abs540))를 측정하였다. 세포 증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation Index(\%)} = \left( \frac{\text{sample Abs540}}{\text{control Abs540}} \right) \times 100$$

### Nitric Oxide 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응을 이용하여 측정하였다[10]. Raw 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 μg/ml의 LPS와 0.1, 1, 10,

50, 100 µg/ml의 추출물을 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 동량의 griess 시약(10 mg/ml sulfanilamide + 1 mg/ml naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### 염증 관련 cytokines 분비량 측정

세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.5 mg/ml Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 100 mg/ml FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 NO를 측정하였던 것과 동일한 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, o-phenylenediamine-dihydrochloride (OPD) 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 종료시킨 후, microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### iNOS, COX-2 및 NF-κB 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후, lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mg/ml deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 10 mg/ml Triton X-100, and 1 mg/ml NP-40)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 7,908 × g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA)를 사용하여 정량하였으며, 30 µl의 lysate를 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-rad, CA, USA)에 70 mA에서 1시간 30분 동안 전사시킨 후, 50 mg/ml skim milk가 포함된 TBST (tris buffered saline; pH7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking하였다.

iNOS, COX-2 및 NF-κB의 발현 양을 검토하기 위한 항체는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF-κB를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 enhanced chemiluminescence (ECL) 기질과 1-3분간 반응한 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (Syngene software)를 이용하여 가시화하였다.

### 귀 부종 측정 및 조직 관찰

ICR 마우스에 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg body weight 농도로 200 µl씩 경구 투여하였다. 한 시간 후, 오른쪽 귀에 25 mg/ml croton oil을 20 µl/ear 농도로 도포하였다. 귀 두께는 croton oil을 처리하고 5시간 후에 측정하였으며 croton oil 처리한 후 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다. 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 추출물을 100 mg/ml 농도로 20 µl씩 도포하고 15분 뒤, 50 mg/ml croton oil을 20 µl씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취시키고, 귀 조직을 절제하여 100 mg/ml formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

### 단기 독성 평가

Balb/c 마우스를 실험 시작 전에 4-6시간 정도 절식시킨 후에 추출물을 300, 2000 및 5000 mg/kg body weight 농도로 경구 투여하였다. 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 결과를 관찰하였고 2주까지 지속적으로 관찰하였다.

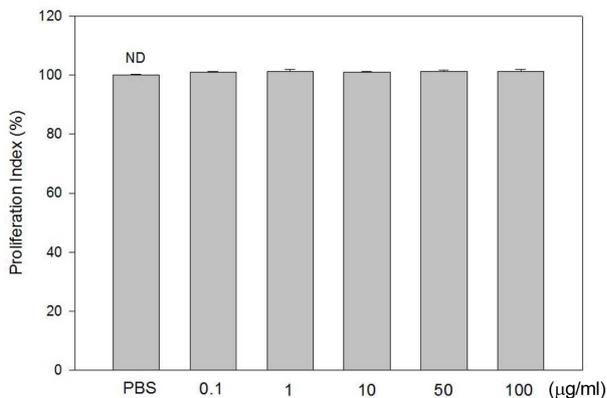
### 통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 세포 독성 측정

대식세포로부터 염증매개 물질의 억제 효과는 세포독성으로 인해 RAW264.7 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로 이러한 가능성을 배제하고자 RAW 264.7 cell에 미치는 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 추출물을 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 세포의 생존율은 모든 처리



**Fig. 1. Effect of SCEE on the proliferation of RAW 264.7 cells.** Proliferation index = (sample Abs540/control Abs540) × 100. ND means no significant difference.

농도에서 유의적인 차이를 보이지 않음을 관찰하였다(Fig. 1).

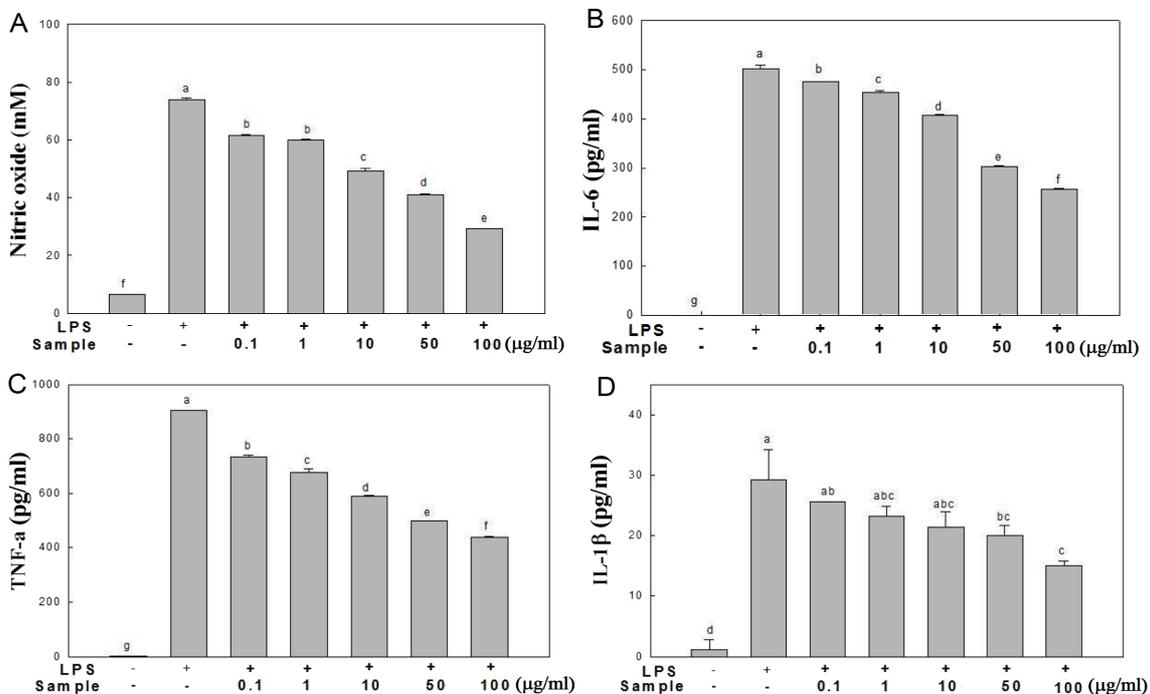
#### Nitric oxide 생성 억제 효과

병리적인 조건 하에서 NO 발현량의 과도한 증가는 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다[19]. 따라서 추출물 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후, 추출물

을 각 농도별로(0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/ml) 첨가하고 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 그 결과(Fig. 2A), 추출물을 처리하였을 경우, NO 생성량이 LPS 처리구보다 농도의존적인 감소를 보임을 확인하였다. 특히 10 µg/ml 이상의 농도로 추출물을 처리하였을 때 그 분비량이 약 25% 이상 감소한 것을 확인하였다.

#### 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

인체에서 염증반응이 진행되기 위해서는 NO와 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증 매개물 이외에 면역 반응에서 필연적으로 염증성 cytokine이 동반되는데, 대표적인 cytokine으로는 IL-6, TNF-α 및 IL-1β이다[20]. IL-6는 단핵구를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되며 다양한 기능을 가지는 대표적인 pro-inflammatory cytokine 중의 하나로 초기 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. 종양괴사 인자인 TNF-α는 체내에서 대식세포나 림프구 등 백혈구에 의해 생성되는 cytokine으로 정상상태에서는 만들어지지 않으며 LPS 등에 의한 대식세포의 자극으로 합성되어 분비된다[14]. IL-1β는 IL-6, TNF-α와 함께 대표적인 염증성 cytokine으로 NO를 생성하게 하는 매개물질이며, 국소염증을 발생시키고 T 세포의 활성화, B 세포의 성숙 및 NK cell을 활성화시키는 cytokine이다[15]. 따라서 추출물이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을



**Fig. 2. Inhibitory effect of SCEE on the production of nitric oxide (A), IL-6 (B), TNF-α (C), and IL-1β (D) in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of SCEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/ml) in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) for 24 h. Culture supernatants were then isolated and analyzed using the Griess reagent for nitric oxide and ELISA kit for cytokines. a-g indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).

알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS처리 후, 추출물을 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 (Fig. 2B,C,D), 세가지 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ ) 모두 농도 의존적으로 유의적 감소를 보였다. 특히, 추출물을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때, 그 분비량이 각각 약 39, 45 및 31% 감소함을 보였으며, 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였을 경우 LPS 단독 처리 비교해 볼 때, 각각 약 49, 51 및 48%의 높은 분비량 감소효과를 보였다. 이러한 결과를 통해 큰잎모자반 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 염증 매개성 cytokine 을 효과적으로 억제하여 항염증 기능에 관여하는 것을 확인 하였다.

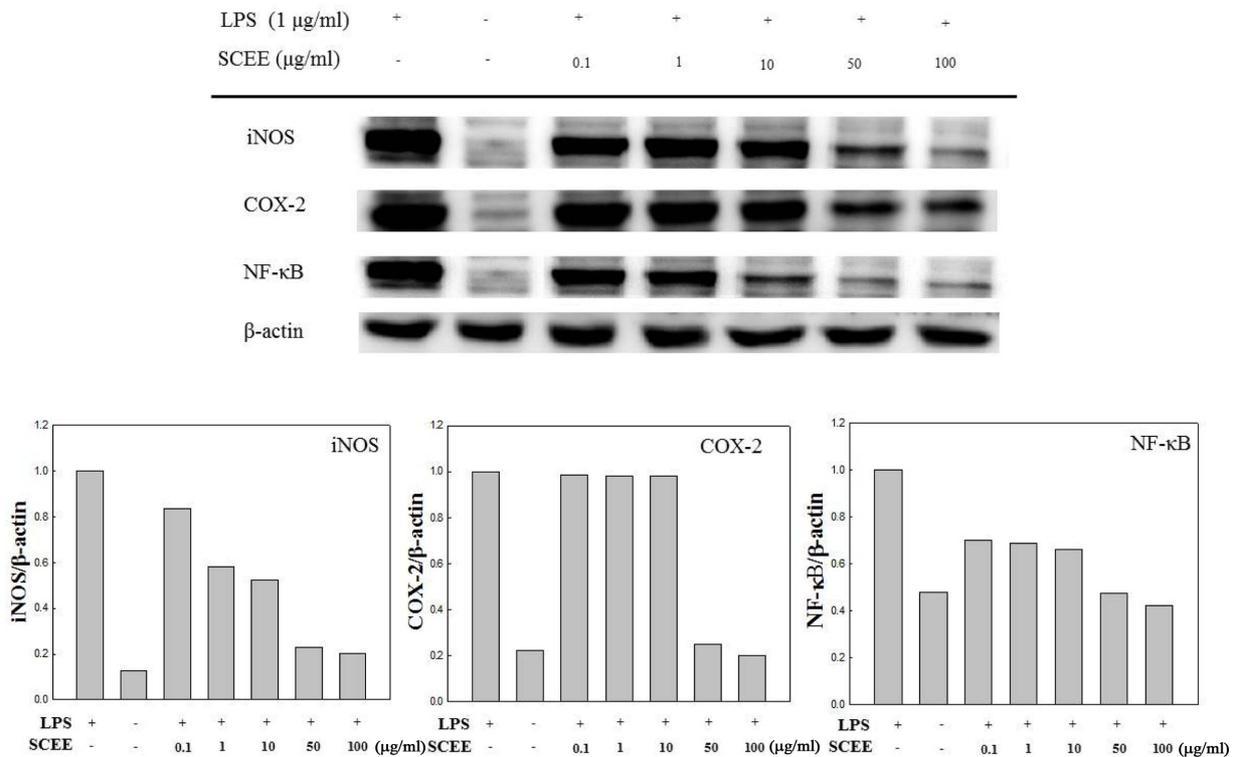
**iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B 발현 억제 효과**

NO를 형성하는 NOS들은 L-arginine을 L-citrullin으로 전환시키면서 NO를 생성하며, 이들 NOS는 iNOS에 의한 발현성이 절대적으로 많으며, 이는 염증 유발 등 병리적으로 중요한 작용을 한다고 알려져있다[13]. 따라서 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시

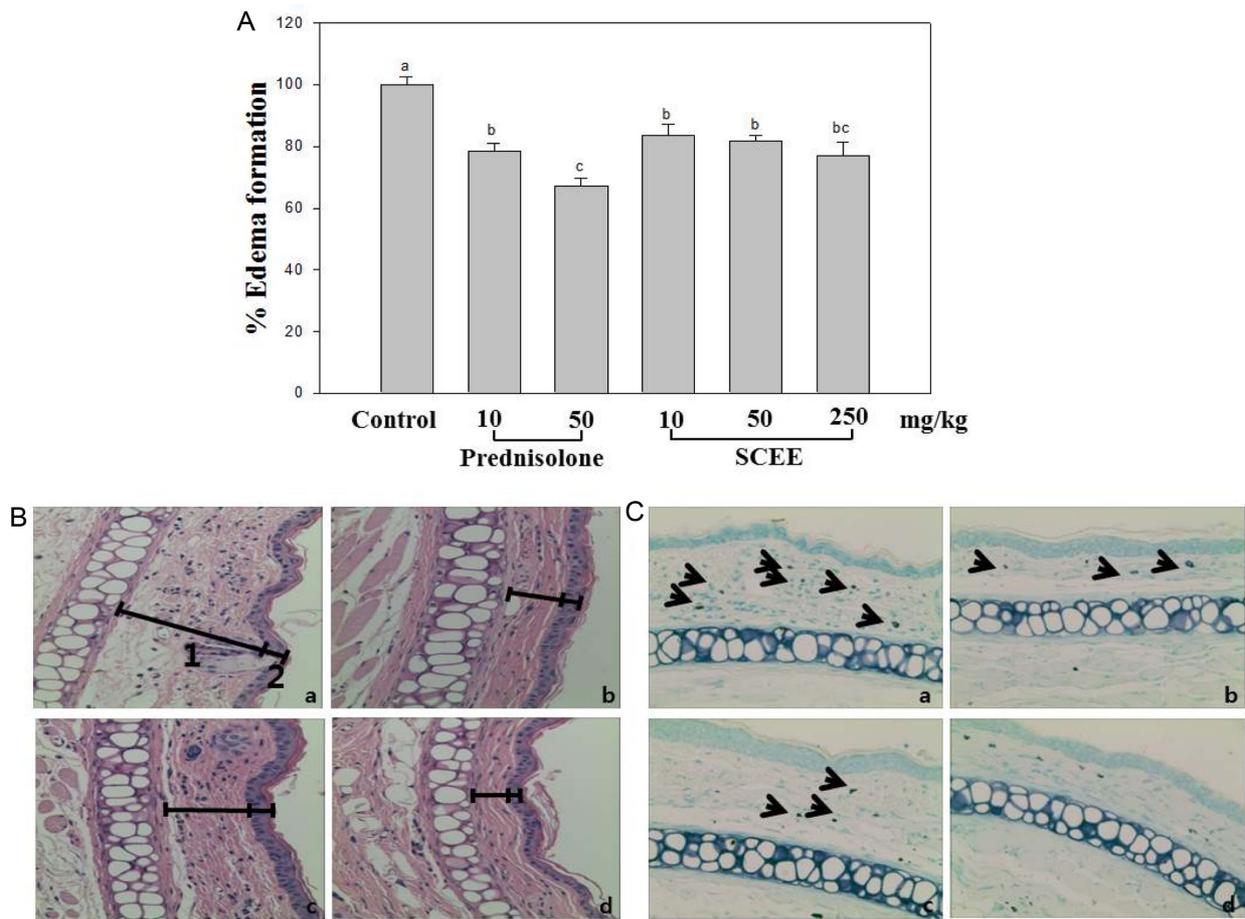
켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다[23]. 또한, COX-2는 염증 매개 물질인 PGE<sub>2</sub>의 형성에 관여하며[3], NF- $\kappa$ B는 염증반응과 관련된 유전자의 promoter에 결합하며 cytokine 및 lipopolysaccharide (LPS) 등에 대한 노출에 의해 활성화되어 COX-2 및 iNOS 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 염증 반응에서 iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인하였다. RAW 264.7 세포에 추출물을 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 iNOS 발현량을 측정 한 결과(Fig. 3), LPS 단독처리구에 의해 각 단백질의 발현량이 현저히 증가하였으나, 추출물을 처리하였을 때 그 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다. 특히 50 및 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 PBS 처리구와 유사한 발현량을 보여 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다. 이러한 결과를 종합 해 볼 때, 큰잎모자반 에탄올 추출물의 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통해 COX-2 및 iNOS 발현을 억제함으로써 PGE<sub>2</sub>와 NO의 생성을 억제함에 따라 항염증 효과를 나타낸다고 사료된다.

**귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰**

피부는 외부 환경에 의해 손상 된 부위를 복구 시키려는



**Fig. 3. Effect of SCEE on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF- $\kappa$ B p65 expression in RAW 246.7 cells.** The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of SCEE (0.1, 1, 10, 50, and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. One of the similar results from three separate experiments is represented.



**Fig. 4.** SCEE-mediated inhibition of croton oil-induced mouse ear edema (A). Photomicrographs of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of 50 mg/ml croton oil in acetone (a-c) or acetone alone (d, non-inflamed), stained with hematoxylin-eosin (B) or toluidine-blue (C). Photomicrographs recorded under light microscopy (magnification: 200 $\times$ ). Treatments: vehicle 20 mg/ml Tween 80 (a), prednisolone 0.08 mg/ear (b), SCEE 20  $\mu$ l/ear (c), and acetone (d). The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively. a-c indicates significantly different results ( $p < 0.05$ ).

일련의 생체 과정으로서 혈관확장, 부종 등의 생리 현상을 나타나며 이는 피부 염증에서 일어나는 대표적인 반응이다 [6]. 현재 사용되고 있는 합성 스테로이드제인 prednisolone 10 및 50 mg/kg과 추출물 10, 50 및 250 mg/kg 농도를 200  $\mu$ l씩 경구투여 한 후, croton oil로 염증 유발하고 귀 두께를 측정하였다. 그 결과(Fig. 4), control과 비교하여 모든 농도에서 유의적으로 귀 두께가 감소한 것을 확인하였다. 특히, 추출물 250 mg/kg 농도에서 positive control인 prednisolone 처리구와 비교하였을 때, prednisolone 10 mg/kg 처리와 유사하게 감소함을 보였다. 추출물의 귀 부종 억제 효과는 조직 관찰 결과에서도 나타났는데, croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에서 croton oil만을 처리한 경우에 비해 추출물을 100 mg/ml 농도로 처리한 경우 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아진 것을 확인하

였다(Fig. 4B). 또한, toluidine-blue 염색을 통해 조직 내 mast cell 침윤 정도를 확인한 결과(Fig. 4C), 추출물의 처리가 조직 내 mast cell 침윤을 현저히 억제함을 보였다.

#### 단기 독성 평가

기능성 식품 소재로써 이용 가능성을 알아보기 위해 World Health Organization (WHO) [22]에 따라 추출물을 300, 2000 및 5000 mg/kg 농도로 200  $\mu$ l씩 경구투여하고 2주간 행동변화 및 치사율을 관찰하였다(Table 1). 경구투여 후 4시간까지 행동 변화를 관찰하였을 때, 30분 정도 약간 흥분 상태를 보였으나 1시간 이후 진정하였으며, 2주간 치사율은 0%로 나타났다. 따라서 동물실험을 통해 추출물이 인체에도 무해 할 것으로 사료되며 새로운 기능성 식품 소재로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

**Table 1. Mortality of mice treated orally with SCEE.**

	Days after treatment							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
300 mg/kg · body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2000 mg/kg · body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000 mg/kg · body weight	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

## 요약

본 연구에서는 큰잎모자반의 항염증 효과를 알아보기 위해 LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에 대한 큰잎모자반 에탄올 추출물의 항염증 효과를 살펴보았다. 세포내 염증매개성 cytokine (IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ ) 분비량의 측정결과, 농도 의존적으로 유의적 감소를 보였으며, 특히, 100  $\mu$ g/ml로 처리하였을 경우 LPS 단독 처리와 비교 시 약 48% 이상의 높은 분비량 감소효과를 보였다. 추출물이 iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B 발현 억제에 미치는 효과를 알아본 결과, LPS 단독처리구에 의해 각 단백질의 발현량이 현저히 증가하였으나, 추출물을 처리하였을 때 그 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다. 특히 50 및 100  $\mu$ g/ml 농도에서 PBS 처리구와 유사한 발현량을 보여 우수한 항염증 효과를 가짐을 확인하였다. 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰을 수행한 결과, 추출물 250 mg/kg 농도에서 prednisolone 10 mg/kg 처리와 유사하게 감소함을 보였다. 또한, croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에서 croton oil만을 처리한 경우에 비해 추출물을 100 mg/ml 농도로 처리한 경우 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 경피 및 진피 두께가 얇아진 것을 확인하였으며, 조직 내 mast cell 침윤을 현저히 억제함을 보였다. 이 결과를 종합해 볼 때, 큰잎모자반 에탄올 추출물이 염증 치료제로써의 소재로 이용될 가치가 충분할 것으로 사료된다.

## Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2012R1A6A1028677).

## References

- Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. 2002. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol.* **21**: 93-101.
- Celec P. 2004. Nuclear factor kappa B-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 365-371.
- Duerksen-Hughes PJ, Day D, Laster SM, Zacharidase NA, Aquino L, Gooding LR. 1992. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J. Immuno.* **149**: 2-14.
- Ghosh S, Hayden HS. 2008. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 837-848.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Antioxidant defenses. In *Free radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford Science Publications, Oxford, UK. pp. 105-159.
- Hahn DH, Sur BJ, Han DO, Park JH, Jung ET, Lee HJ, et al. 2008. Anti-inflammatory activity of dandelion in mice. *Korean J. Ori. Med. Physiol. Phthol.* **22**: 810-814.
- Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res.* **25**: 299-307.
- Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyenhaedoktang in LPS-activated macrophage cells. *Korean J. Herbal.* **24**: 39-47.
- Kim HS, Kim GJ. 1998. Effects of the feeding *Hizikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 718-723.
- Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 342-348.
- Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Ohansson C, Schmidt PT, Herulf M, et al. 2006. Rectal nitric oxide as biomaker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders. *World Gastroenterol.* **12**: 3386-3392.
- Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, et al. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappaB trans activation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol. Cells.* **23**: 398-404.
- Lim HR, Shin SW. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW264.7 macrophage cells. *Korean Sci. Pharm.* **16**: 259-264.

14. Moon JH, Go H, Shin SM, Kim KT. 2013. Anti-inflammatory effect of extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. Fruits in RAW 264.7 macrophages. *J. Soc. Korean Med. Diagn.* **17**: 263-273.
15. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. 2009. Horror auto-inflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Ann. Rev. Immunol.* **27**: 621-668.
16. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**: 24-32.
17. Majdalawieh A, Ro HS. 2010. Regulation of  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  function and NF- $\kappa\text{B}$  signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators Inflamm.* **2010**: 823-821.
18. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia Kurome*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**: 889-893.
19. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
20. Park SG, Jegal KH, Jung JY, Back YD, Byun SH, Kim YW, et al. 2014. Leonuri fructus ameliorates acute inflammation via the inhibition of NF- $\kappa\text{B}$ -mediated nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* **28**: 178-185.
21. See JH, Kim ND, Choi JS, Kim YJ, Moon YH, Lim SY, et al. 1998. Inhibitory effects of the methanolic extract of an edible brown alga, *Ecklonia stolonifera* and its component, phloroglucino on aflatoxin B1 mutagenicity in vitro (Ames test) and on benzo(a)pyrene or N-methyl N-nitrosourea clastogenicity in vivo (mouse micronucleus test). *Nat. Prod. Sci.* **4**: 105-114.
22. World Health Organization: Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine. 1992. Regional Office for Western Pacific, Manila, Philippines pp. 1-38.
23. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**: 291-316.