Korean J. Plant Res. 28(2):145-152(2015)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2015.28.2.145

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

까마귀쪽나무 열매와 잎의 항염증 효과 비교 연구

남궁승[1], 장선아[2], 손은화[3], 박종필[3], 손은수[4], 구현정[5], 윤원종[6],
권정은[2], 정용준[2], 맹 학[2], 한효상[7]*, 강세찬[2]*

[1]강원대학교 물리치료학과, [2]가천대학교 생명과학과, [3]강원대학교 생약자원개발학과, [4]한국과학기술정보연구원 미래기술분석실,
[5]한국농수산대학 특용작물학과, [6]제주테크노파크 생물종다양성연구소, [7]중부대학교 보건행정학과

Comparative Study of *Litsea japonica* Leaf and Fruit Extract on the Anti-inflammatory Effects

Seung Namkoong[1], Seon-A Jang[2], Eun-Hwa Sohn[3], Jong Phil Bak[3], Eunsoo Sohn[4], Hyun Jung Koo[5], Weon-Jong Yoon[6], Jung-Eun Kwon[2], Yong Joon Jeong[2], Xue Meng[2], Hyo-Sang Han[7]* and Se Chan Kang[2]*

[1]Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea
[2]Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
[3]Department of Herbal Medicine Resources, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea
[4]Department of future technology analysis, Korea Institute of Science and Technology Information, KISTI, Seoul 130-741, Korea
[5]Department of Medicinal and Industrial Crops, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju 560-500, Korea
[6]Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seogwipo 697-943, Korea
[7]Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

Abstract - The present study aimed to investigate comparative anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit and leaf extract considering the balance of safety and efficacy. Dose response studies were performed to determine the inhibitory effects of 70% EtOH extract of leaf (L70%) on the pro-inflammatory enzymes expression, COX-2/PGE2 and NO/iNOS, and pro-inflammatory cytokines production, IL-1β, IL-6, and TNF-α in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. We also examined comparative effects of 30 and 70% EtOH extract of fruits (F30% and F70%) at low concentration (10 ㎍/㎖) in the same conditions. L70% at 50 and 100 ㎍/㎖ showed inhibitory effects on almost all the inflammatory mediators we examined except for COX-2 regulation, but there were no effects at 10 ㎍/㎖. Since 100 ㎍/㎖ of L70% have 18.2% cytotoxicity, we compared the effects of fruit extract, F30% and F70% at 10 ㎍/㎖ on the regulation of NO/iNOS, PGE2, IL-1β, IL-6, and TNF-α and obtained that fruit extacts are more efficacious and safe than leaf. This study suggests that the 30% EtOH fraction of L. japonica fruit could be a good candidate for development as a functional food supplement in the prevention of inflammatory disorders.

Key words - Anti-inflammatory, Fruit, Leaf, Lipopolysaccharide, *Litsea japonica*

서 언

까마귀쪽나무(*Litsea Japonica*)는 한국과 일본의 남부지역에 분포하는 상록엽소교목으로 국내에서는 제주도, 울릉도, 남해안 섬에 주로 자생한다(Min *et al.*, 2003). 까마귀쪽나무속(*Litsea*)은 설사, 구토, 뼈의 통증, 산후조리 목욕제, 영아의 산통(colic), 다양한 신경성 질환에 관련되어 사용되어졌다는 보고가 있으나(Jiménez-Pérez *et al.*, 2011), 실제 까마귀쪽나무 *L. japonica*에 대한 생리활성 연구는 많이 이루어지지 않은

*교신저자(E-mail) : sckang73@gachon.ac.kr; hanhs@joongbu.ac.kr
*Se Chan Kang and Hyo-Sang Han contributed equally.

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.
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.

상태이다. 단지 까마귀쪽나무에서 lactones, terpenoids 및 alkaloids 등의 다양한 생리활성 물질들이 함유되어 있으며, 이들 유효 성분을 분리하고 구조를 확인하는 연구가 주로 이루어져왔다(Tanaka *et al.*, 1990; Takeda *et al.*, 1972). 까마귀쪽나무의 잎추출물에 대하여 보고된 생리활성으로는 항산화 효과, HL60 암세포의 apoptosis를 유도효과 및 항염증 효과가 있다(Kim *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2010). Min *et al.* (2003)은 까마귀쪽나무의 잎에서 litsealactond A와 B, hamabiwalactone A와 B, akolactone B, rosmarlinic acid의 5가지 lactone 성분을 분리하였고, 이 중 hamabiwalactone B와 akolactone B에서 항보체활성(anti-complement activity)이 있다고 보고하였고, Koo *et al.* (2014)도 hamabiwalactone A와 B 성분이 항통증 및 항염증 효과가 있다고 보고하였다. Lee *et al.* (2005)도 까마귀쪽나무의 잎에서 분리된 flavonoids 성분 중 tiliroside가 강력한 항보체 활성이 있다고 보고하였다. 최근 까마귀쪽나무 잎 추출물에 대하여 당뇨병성 합병증에 대한 연구가 보고되었는데, Kim *et al.* (2014)은 까마귀쪽나무는 망막의 VEGF 발현을 억제함으로써 당뇨병성 retinopathy에 예방효과가 있다고 보고하였고, Sohn *et al.* (2013)은 당뇨병 db/db 생쥐모델에서 advanced glycation end products (AGEs)의 침착을 억제함으로써 당뇨병성 신장질환의 진행을 줄인다고 보고한 바 있다. 그러나 까마귀쪽나무의 식용부위라 여겨지고 있는 열매에 대한 항염증효과 및 생리활성에 대하여 보고된 바는 거의 없다.

염증 반응은 병원체의 감염, 화학적 또는 물질적 조직 손상 등으로부터 인체를 보호하기 위해 일어나는 1차적 면역 반응이지만, 염증 반응이 과도해지면 동맥경화증, 류마티스 관절염, 천식, 기관지염, 다발성 경화증 등을 유발하는 원인이 됨으로 염증반응을 조절할 수 있는 항염증제의 개발은 다양한 만성 질환을 예방 및 치료하는데 매우 중요시되고 있다(Kaplanski *et al.*, 2003). 염증 반응의 조절은 비정상적인 자극에 대하여 다양한 면역세포가 관여하지만, 그 중 대식세포는 monocyte의 형태로 혈액 내 존재할 뿐만 아니라 분화된 형태로 인체 모든 조직 내에 분포하고 있어, 이상 자극에 대하여 즉각적으로 반응하여 염증을 유도하고 확대시키는 과정에서 매우 중요한 역할을 담당한다. 이미 대식세포는 염증 유발물질 lipopolysacharid (LPS)에 의해 cyclooxygenase-2 (COX-2)/prostaglandin E_2 (PGE_2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)/nitric oxide (NO)의 생성이 증가되고 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1 (IL-1), IL-6 분비가 증가된다고 알려져 있으며 그 세포내 신호전달경로도 알려져 있다(Hinz and Brune, 2002; Yi *et al.*, 2008). 따라서 천연물 제제의 효능 탐색 연구에 있어서 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증반응을 조절하는 연구 방법이 크게 이용되고 있다(Lawrence *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2012).

우리는 선행 연구에서 까마귀쪽나무의 에탄올 잎 추출물에서 항산화 효과와 항염증 효과를 보고하였다(Yoon *et al.*, 2010). 잎 추출물은 LPS에 의한 COX-2/PGE_2와 iNOS/NO 및 염증성 cytokine 증가에 대하여 유의적인 억제효과를 보여주었으나, 18.2%의 세포독성을 나타내었다. 이에 본 연구에서는 까마귀쪽나무를 이용하여 좀 더 부작용을 최소화시킨 소재를 탐색하기 위하여 실제 민간에서도 식용으로 사용하고 있는 안전성이 보고된 열매부분을 이용하여 저농도 범위에서의 항염증 효과를 확인하고자 잎 추출물과의 효능을 비교함으로써, 인체 안전한 항염증 조절 작용을 가진 새로운 기능성 소재를 개발하는데 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

까마귀쪽나무 잎과 열매는 제주도 서귀포시 남원읍 태흥리에서 2005년 11월경에 채집하였고, 30% 또는 70% EtOH을 이용하여 잎(185 g)과 열매(100 g)를 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 감압농축하고 동결건조 한 다음 제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소(No. JBRI-079)에서 -20℃에 보관하였다.

세포주 및 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line)은 한국세포주은행에서 분양받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO Inc, Grand lsland, NY)에 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO Inc, Grand Island, NY, USA)과 100 units/㎖의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 사용하였고, 37℃, 5% CO_2 incubator에 배양하였다.

Lactate dyhydrogenase (LDH) 측정

RAW 264.7 cell을 5×10^5 cells/㎖이 되도록 96-well plate에 깔고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에 배양한 다음, L70% 10, 50, 100 ㎍/㎖와 F30%, F70% 각 10 ㎍/㎖를 LPS 1 ㎍/㎖와 함께 24시간 동안 처리하였다. In vitro Toxicology Assay

Kit (Tox-7; Sigma Chemicals, Saint Louis, MO, U.S.A.)를 이용하여 세포가 용해될 때 세포질에서 유리되어 나오는 LDH 양을 490 ㎚의 흡광도에서 측정하였다.

Nitric Oxide (NO) 측정

RAW 264.7 cell을 5×10^5 cells/㎖이 되도록 96- well plate에 깔고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에 배양한 다음, L70% 10, 50, 100 ㎍/㎖와 F30%, F70% 각 10 ㎍/㎖를 LPS 1 ㎍/㎖와 함께 24시간 동안 처리하였다. 100 ul의 상층액을 취하여 96-well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 ul의 Griess 시약을 가하여 5분간 반응시킨 후 540 ㎚의 흡광도에서 측정하였다. $NaNO_2$의 농도별 표준곡선을 이용하여 상층액 내의 NO 농도를 계산하였다.

PGE_2 측정

RAW 264.7 cell을 5×10^5 cells/㎖이 되도록 96-well plate에 깔고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에 배양한 다음, L70% 10, 50, 100 ㎍/㎖와 F30%, F70% 각 10 ㎍/㎖를 LPS 1 ㎍/㎖와 함께 24시간 동안 처리하였다. Commercial competitive enzyme immunoassay kit (Minneapolis, USA)를 이용하여 상층액의 PGE_2를 450 ㎚의 흡광도에서 측정하였다.

Western blot assay

24시간 동안 배양한 RAW 264.7 cell을 cold PBS로 wash하고 1 × lysis buffer로 세포를 용해하였다. 원심분리기(15000 rpm, 30 min)를 이용하여 상층액을 얻은 다음 단백질 농도를 측정하고, SDS-PAGE로 분리한 후 gel을 0.2 ㎛ nitrocellulose membrane으로 옮겨 Primary antibody 및 secondary antibody에 배양하였다. ECL 기질(American Pharmacia Biotech, NY, USA)과 반응시킨 다음 필름에 노출시켜 확인하였다.

Cytokines 측정

RAW 264.7 cell을 5×10^5 cells/㎖이 되도록 96-well plate에 깔고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에 배양한 다음, L70% 10, 50, 100 ㎍/㎖와 F30%, F70% 각 10 ㎍/㎖를 LPS 1 ㎍/㎖와 함께 18시간 동안 처리하였다. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (R&D system, USA)를 이용하여 상층액의 TNF-α, IL-1β, IL-6를 450 ㎚의 흡광도에서 측정하였다.

통계분석

모든 실험결과의 측정치는 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 Student's *t*-test와 one way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 $p < 0.05$, $p < 0.01$의 유의수준에서 Ducan's multiple range test로 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물의 NO 생성 억제효과

본 연구는 까마귀쪽나무를 식이용으로 쓸 수 있도록 하기 위하여 열매를 이용한 저농도 범위에서의 항염증 효과를 찾기 위하여 진행되었다. 기존 선행 연구 내용을 바탕으로 항산화 및 항염증 효능을 보였던 까마귀쪽 나무의 잎부위를 70% EtOH로 추출하여 10, 50, 100 ㎍/㎖의 실험 농도를 정하고, 열매의 70% EtOH 추출물과 30% EtOH 추출물의 10 ㎍/㎖ 저농도에서의 항염증 효과를 비교하였다.

우선, 까마귀쪽나무의 열매와 잎추출물의 항염증 효과를 비교하기 위하여 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 유도된 NO 및 세포독성 효과를 확인하였다.

세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하고, 우선 까마귀쪽나무 잎부위의 70% EtOH 추출물(L70%)을 각각 10, 50, 100 ㎍/㎖의 농도별로 처리하여 NO 분비 억제효과와 세포독성효과를 동시에 측정하고, 상호 효능을 비교하기 위하여 10 ㎍/㎖ 낮은 농도의 까마귀쪽나무 열매부위의 30% EtOH 추출물(F30%)과 70% EtOH 추출물(F70%)을 처리하였다.

LPS를 처리하여 배양하였을 때 염증반응 유도에 의하여 증가된 NO 생성이 잎 추출물 L70%의 50 및 100 ㎍/㎖ 처리군에서 유의적이며 농도 의존적으로 억제되었다. 그러나 L70%의 10 ㎍/㎖ 저농도에서는 NO 생성 억제효과가 나타나지 않았다. 반면에, 열매 추출물 F30%과 F70%는 모두 저농도(10 ㎍/㎖)에서 LPS에 의해 유도된 NO 증가를 유의적으로 억제하였다(Fig. 1). 또한, 같은 처리 조건에서 세포독성효과를 알 수 있는 LDH 활성을 동시에 측정한 결과, LPS와 L70% 고농도 100 ㎍/㎖를 함께 처리한 군에서 29.8%의 세포독성이 관찰되었다. 이에 반하여 열매 추출물 F30% 및 F70%에 의한 세포독성효과는 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 향후 실험의 진행에 있어서 세포독성을 다소 보였던 L70%의 고농도 100 ㎍/㎖는 실험 농도에서 제외시켰다.

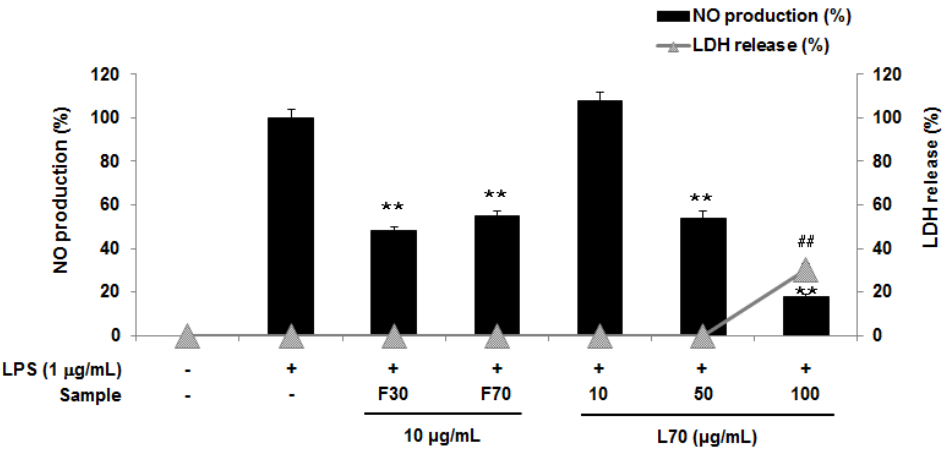

Fig. 1. The effects of *L. Japonica* leaf and fruit extract on NO production and cell cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of NO was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) for 24 h in the presence of the *L. Japonica* leaf and fruit extract. Cell viability was determined using the LDH method. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**,\#\#}p < 0.01$ versus LPS-treated group. F30% : *L. Japonica* (LJ) fruit 30% EtOH extract, F70% : LJ fruit 70% EtOH extract, L70% : LJ leaf 70% EtOH extract.

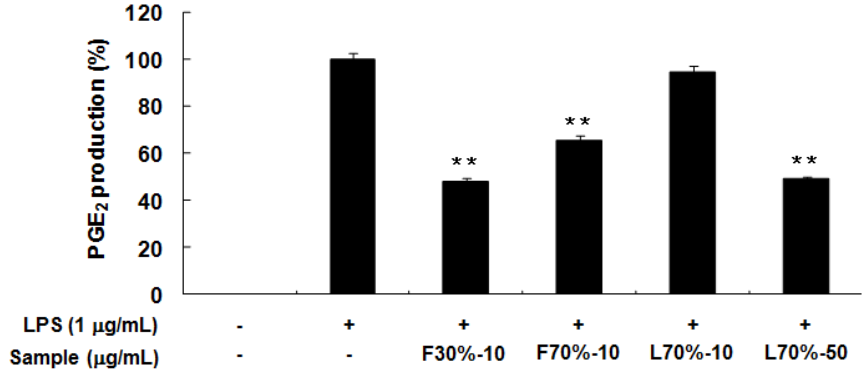

Fig. 2. Inhibitory effects of *L. Japonica* leaf and fruit extract on PGE2 production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The production of PGE2 was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) for 24 h in the presence of the *L. Japonica* leaf and fruit extract. Supernatants were collected and the PGE_2 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ versus LPS-treated group. F30% : *L. Japonica* (LJ) fruit 30% EtOH extract, F70% : LJ fruit 70% EtOH extract, L70% : LJ leaf 70% EtOH extract.

까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물의 PGE_2 생성 억제효과

Prostaglandin E_2 (PGE_2)는 잘 알려진 염증반응 유발인자로서 통증 및 혈관의 확장 및 대식세포 등 면역세포를 염증 부위로의 이동(movement) 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Nakayama *et al.*, 2006; Yu and Chadee, 1998; Wang and Lau, 2006; Weller *et al.*, 2007). 이에 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물에 대하여 LPS에 의해 유도 증가된 PGE_2 생성에 대한 억제 효능을 확인하였다. 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도하고 까마귀쪽나무 열매 추출물 F30% 및 F70% 각 10 ㎍/㎖와 잎 추출물 L70%를 각각 10, 50 ㎍/㎖ 농도로 처리하여 세포배양액으로부터 PGE_2 생성량을 측정하였다. 그 결과, L70%는 처리 농도 50 ㎍/㎖에서 유의적으로 LPS에 의해 증가된 PGE_2 생성을 억제하였다. 단, L70% 저농도인 10 ㎍/㎖ 처리군에서는 LPS에 의해 증가된 PGE_2를 억제하지 못했다. 반면, F30% 및 F70%는 저농도 10 ㎍/㎖ 처리군에서 모두 LPS에 의해 증가된 PGE_2 생성을 각각 48 및 62%로 매우 효과적으로 억제함을 보여주었다(Fig. 2). 이러한 결과는 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물이 모두 PGE_2의 생성 조절을 통해 항염증 효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여주며, 특히 열매추출물이 잎추출물에 비하여 저농도에서도 효능이 우수하게 나타낼 수 있음을 보여준다.

까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물에 의한 iNOS 및 COX-2 발현 억제효과

염증반응에서 NO 및 PGE_2의 생성은 염증반응에 관여하는 효소인 iNOS 및 COX-2에 의해 각각 조절된다(Aktan, 2004; Markworth and Cameron-Smith, 2013). iNOS는 대표적인 염증자극에 반응하여 유도되는 단백질이며, iNOS 발현 증가를 억제함으로써 항염증 반응에 관여할 수 있다는 것은 이미 널리 알려져 있다(Aktan, 2004). 또한, COX-2는 arachidonic acid로부터 PGE_2를 생성하는데 관여하는 효소로서, 염증반응을 조절하는 중요한 단계로 작용 한다(Markworth and Cameron-Smith, 2013), 현재 임상적으로 상용되고 있는 NSAID (non-steroidal inflammatory drug) 항염증 치료제들은 COX-2의 발현을 억제 조절함으로써 항염증 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구 결과에서 나타난 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물의 LPS에 의해 증가된 NO 및 PGE_2 생성에 대한 억제조절 효과가 iNOS 및 COX-2 효소의 발현 조절에 의한 것인지 확인할 필요가 있었다. 실험결과, L70%는 저농도인 10 ㎍/㎖에서 효과가 나타나지 않았으며, 50 ㎍/ ㎍/㎖에서는 iNOS 발현을 유의적으로 감소시켰다. 반면에 F30% 및 F70%는 저농도인 10 ㎍/㎖에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 감소시켰다(Fig. 3). 이는 Fig. 1에서 나타난 NO 분비 조절에 미치는 영향과 동일한 패턴의 결과로, 까마귀쪽나무의 잎과 열매 추출물은 모두 iNOS-NO 조절경로를 거치며, 특히 열매 추출물이 잎 추출물보다는 저농도에서도 우수한 iNOS-NO 억제 조절효과가 있음을 보여준다.

한편, RAW 264.7 cell에 LPS를 처리하였을 때 예상하는 바와 같이 염증반응, 즉 LPS 자극에 의한 COX-2의 발현이 크게 유도되었으나, 열매 추출물 및 잎 추출물 처리농도에서 모두 LPS에 의해 증가된 COX-2의 발현을 억제 조절하지 않았다(Fig. 3). 이는 까마귀쪽나무의 잎과 열매추출물 모두 LPS에 의해 증가된 PGE_2의 생성은 억제하지만, 이 반응은 COX-2의 발현 조절과는 상관없이 일어난다는 것을 의미한다.

Konturek *et al.* (2005)과 Grosch *et al.* (2001)은 COX-2를 발현하지 않는 세포에서도 NSAID계의 항염증 효과가 나타난다고 보고함으로써 PGE_2의 생성에 non-COX pathway가 존재함을 보고한 바 있다. 이는 까마귀쪽나무 추출물이 염증 매개인자 PGE_2의 생성을 억제시키고 있지만, COX-2 조절에 영향을 미치지 않는 결과와 유사하다. 이는 EtOH로 추출한 까마귀쪽나무의 잎과 열매 추출물이 나타내는 LPS에 의한 PGE_2의 생성억제효과는 non-COX pathway에 의한 작용 기전이 존재함을 보여준다.

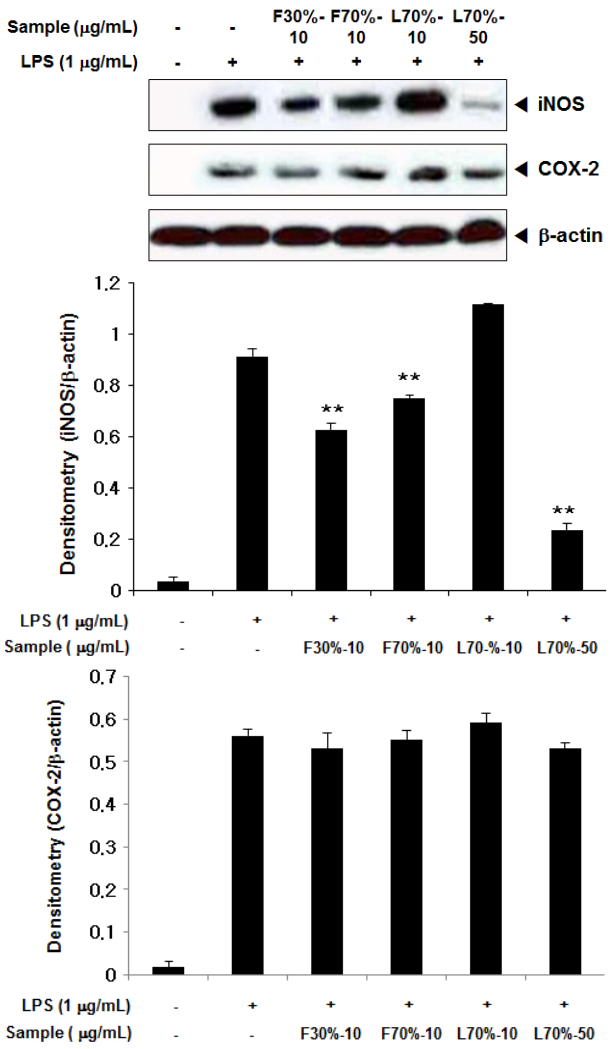

Fig. 3. Inhibitory effects of *L. Japonica* leaf and fruit extract on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pre-incubated for 24 h and then stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) for 24 h in the presence of the *L. Japonica* fruit and leaf extract. The expression levels of iNOS and COX-2 protein were determined by immunoblotting. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{*}p < 0.01$ versus LPS-treated group. F30% : *L. Japonica* (LJ) fruit 30% EtOH extract, F70% : LJ fruit 70% EtOH extract, L70% : LJ leaf 70% EtOH extract.

까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물에 의한 염증성 cytokine 분비 억제효과

Cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로서 면역세포의 활성, 증식 및 분화를 조절하여 염증반응을 매개하는 인자이다. 염증성 질환의 원인과 치료를 규명하기 위하여 cytokine의 역할은 매우 중요하며, TNF-α, IL-1β 및 IL-6은 *in vitro* 및 *in vivo* 모

두에서 염증반응을 조절하는 물질로 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 까마귀쪽나무 잎 및 열매 추출물이 LPS에 의해 증가되는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 분비 억제 조절 양상을 측정하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, 잎 추출물 L70%에서는 50 ㎍/㎖ 처리군에서 IL-1β와 IL-6에서 분비 억제가 나타났다(Fig. 4). 그러나 L70%의 저농도 10 ㎍/㎖ 처리군에서는 모두 효과를 나타내지 않았다. 이와 반면에, 열매 추출물은 같은 농도 10 ㎍/㎖의 F30%와 F70%에서 유의성에 다소 차이를 나타내었지만, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 모두에서 억제조절 효과를 나타내었다.

이러한 결과는 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물이 inflammatory cytokine인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 분비를 저해함으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 생각되며, 열매 추출물이 저농도에서도 비교적 우수한 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한, 열매의 30%와 70% EtOH 추출물을 비교하였을 때도 LPS에 의한 NO억제, PGE_2 억제, iNOS 발현억제 및 IL-1β 분비 억제작용에서 30% EtOH 추출물이 더 우수한 효과를 나타내었다.

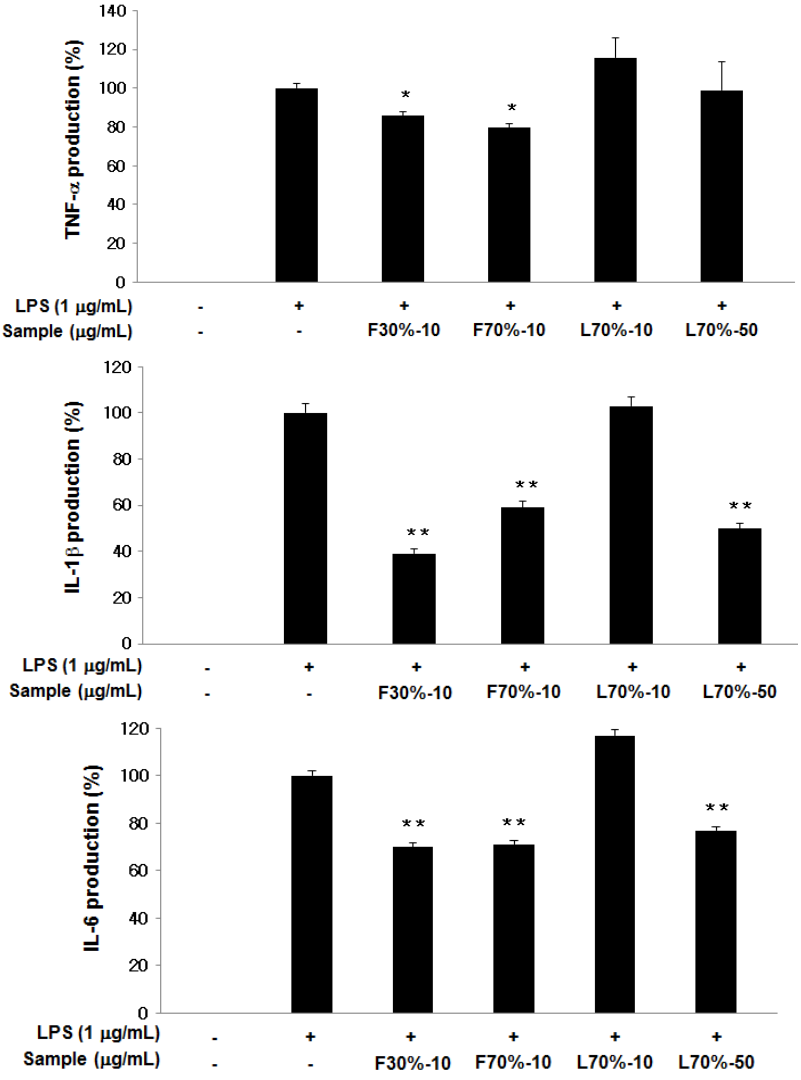

Fig. 4. Inhibitory effects of the *L. Japonica* leaf and fruit extract on production of inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pre-incubated for 24 h and then stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) for 18 h in the presence of the *L. Japonica* fruit and leaf extract. Supernatants were collected, and the (A) TNF-α, (B) IL-1β and (C) IL-6 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ versus LPS-treated group. F30% : *L. Japonica* (LJ) fruit 30% EtOH extract, F70% : LJ fruit 70% EtOH extract, L70% : LJ leaf 70% EtOH extract.

종합적으로, 까마귀쪽나무의 부위별 잎과 열매를 동일한 처리 농도 조건에서 효능적 측면과 안전성 측면을 비교해 보았을 때, 까마귀쪽나무 열매 추출물이 잎 추출물보다 염증반응에 유도 생성 증가된 NO의 억제 효능이 비교적 높았으며, 열매추출물 저농도 10 ㎍/㎖에서는 LPS에 의하여 증가된 PGE_2, TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 세포외 분비가 모두 억제되었다. 이는 까마귀쪽나무 열매가 잎에 비해 저농도에서 우수하거나 동등한 항염증 활성을 나타낼 가능성을 보여준다. 전통적으로도 열매가 잎에 비하여 안전성이 우수하다고 알려져 식용으로 사용되고 있었다는 점을 고려할 때, 까마귀쪽나무의 열매 추출물이 항염증 효과와 안전성 두가지 측면이 다소 우수함을 나타내고 있으므로, 항염증 소재 개발에 있어서 까마귀쪽나무의 열매추출물이나 그 유효성분에 대한 항염증 활성 기전 연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물의 항염증 활성을 비교하고자 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 유도된 COX-2/PGE_2와 iNOS/NO 및 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성 억제 정도를 확인하였다. 그 결과, 동일한 농도 조건(10 ㎍/㎖)에서 까마귀쪽나무의 열매 추출물이 잎 추출물에 비해 NO, PGE_2, iNOS, 염증성 cytokine인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 생성량 모두에서 억제 효능이 우수하게 나타났다. 따라서 까마귀쪽나무가 보여주는 항염증 효과적 측면과 안전성의 두가지 측면을 고려할 때, 까마귀쪽나무의 열매 추출물이 저농도에서 잎 추출물보다 항염증 효과가 우수하거나 동등하며, 그 안전성이 크다고 판단됨으로 까마귀쪽나무의 열매추출물이 항염증 효능을 가진 기능성 식품 소재로써 개발 가능성이 있음을 제시한다.

사 사

본 연구는 2014년도 강원대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다(관리번호-220140134).

References

Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. 75: 639-653.

Grosch, S., I. Tegeder, E. Niederberger, L. Brautigam and G. Geisslinger. 2001. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. Faseb J. 15:2742-2744.

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. Koran J. Plant Res. 25(3):299-307.

Jiménez-Pérez, N. del C., F.G. Lorea-Hernández, C.K. Jankowski and R. Reyes-Chilpa. 2011. Essential oils in Mexican Bays (*Litsea spp., Lauraceae*): taxonomic assortment and ethnobotanical implications. Econ. Bot. 65:178-189.

Hinz, B. and K. Brune. 2002. Cyclooxygenase-2-10 years later. J. Pharmacol. Exp. Ther. 300:367-375.

Kaplanski, G., V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani and C. Farnarier. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 24:25-29.

Kim, Elvira., H.J. Boo, J.H. Hyun, S.C. Kim, J.I. Kang, M.K. Kim, E.S. Yoo and H.K. Kang. 2009. The effect of *Litsea japonica* on the apoptosis induction of HL-60 leukemia cells. Yakhak Hoeji 53:6-11.

Kim, J., C.S. Kim, I.S. Lee, Y.M. Lee, E. Sohn, K. Jo, J.H. Kim and J.S. Kim. 2014. Extract of *Litsea japonica* ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice. Endocrine 46:462-469.

Konturek, P.C., J. Kania, G. Burnat, E.G. Hahn and S.J. Konturek. 2005. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. J. Physiol. Pharmacol. 56:57-73.

Koo, H.J., W.J. Yoon, E.H. Sohn, Y.M. Ham, S.A. Jang, J.E. Kwon, Y.J. Jeong, J.H. Kwak, E. Sohn, S.Y. Park, K.H. Jang, S. Namkoong, H.S. Han, Y.H. Jung and S.C. Kang. 2014. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF-κB and JNK/p38 MAPK activation. Int. Immunopharmacol. 22:84-97.

Lawrence, T., D.A. Willoughby and D.W. Gilroy. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2:787-795.

Lee, S.Y., B.S. Min, J.H. Kim, J. Lee, T.J. Kim, C.S. Kim, Y.H. Kim and H.K. Lee. 2005. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. Phytother. Res. 19:273-276.

Markworth, J.F. and D. Cameron-Smith. 2013. Arachidonic acid supplementation enhances in vitro skeletal muscle cell growth via a COX-2-dependent pathway. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 304:C56-67.

Min, B.S., S.Y. Lee, J.H. Kim, O.K. Kwon, B.Y. Park, R.B. An, J.K. Lee, H.I. Moon, T.J. Kim, Y.H. Kim, H. Joung and H.K. Lee. 2003. Lactones from the leaves of the *Litsea japonica* and their anti-complement activity. J. Nat. Prod. 66:1388-1390.

Nakayama, T., M. Mutsuga, L. Yao and G. Tosato. 2006. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. J. Leukoc. Biol. 79:95-104.

Sohn, E.J., J.H. Kim, C.S. Kim, Y.M. Lee, K.H. Jo, S.D. Shin, J.H. Kim and J.S. Kim. 2013. The Extract of *Litsea japonica* reduced the development of diabetic nephropathy via the inhibition of advanced glycation end products accumulation in db/db mice. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2013:1-9.

Tanaka, H., T. Nakamura and K. Ichino. 1990. Butanolides from *Litsea japonica*. Phytochemistry 29:857-859.

Takeda, K., K. Sakurawi and H. Ishii. 1972. Components of the Lauraceae family-l. New lactonic compounds from *Litsea japonica*. Tetrahedron 28:3757-3766.

Wang, X.S. and H.Y. Lau. 2006. Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. Allergy 61:503-506.

Weller, C.L., S.J. Collington, A. Hartnell, D.M. Conroy, T. Kaise, J.E. Barker, M.S. Wilson, G.W. Taylor, P.J. Jose and T.J. Williams. 2007. Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE_2 receptor 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:11712-11717.

Yi, H., S.K. Heo, H.J. Yun, J.W. Choi, J.H. Jung and S.D. Park. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Draconis Resina* in Mouse Macrophage Cells. Kor. J. Herbology 23: 179-192.

Yoon, W.J., S.C. Kang, Y.M. Ham, K.N. Kim, W.H. Yang, H.J. Kim, S.Y. Park and Y.H. Jung. 2010. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Litsea japonica* leaves. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53:27-32.

Yu, Y. and K. Chadee. 1998. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. J. Immunol. 161:3746-3752.

(Received 19 September 2014 ; Revised 5 February 2015 ; Accepted 9 March 2015)