

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포와 마우스 귀 조직에 대한 양파(*Allium cepa* L.) 껍질 에탄올 추출물의 항염증 효과

안나경¹ · 강보경¹ · 김꽃봉우리² · 김민지¹ · 배난영¹ · 박지혜¹ · 박선희¹ · 안동현¹

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract from Onion (*Allium cepa* L.) Peel on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells and Mice Ears

Na-Kyung Ahn¹, Bo-Kyeong Kang¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Min-Ji Kim¹, Nan-Young Bae¹, Ji-Hye Park¹, Sun-Hee Park¹, and Dong-Hyun Ahn¹

¹Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science and

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University

ABSTRACT Inflammation is a complex process involving a variety of immune cells, which defend the body from harmful stimuli. However, pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators can also exacerbate diseases such as cancer. Onion peel contains several phenolic compounds, including quercetin at an amount 20 times greater in peel than edible flesh. Therefore, in this study, the anti-inflammatory effects of onion peel ethanol extract (OPEE) were investigated lipopolysaccharide-induced inflammatory response. In our results, NO production decreased in a dose-dependent manner. Secretion of IL-6, TNF- α , and IL-1 β was suppressed by 44%, 53%, and 60% respectively, at 100 μ g/mL. Moreover, OPEE also suppressed expression of COX-2, iNOS, NF- κ B, and MAPKs in a dose-dependent manner. Formation of mice ear edema was reduced at the highest dose tested compared to the control, and reduction of ear thickness was observed in the histological analysis as well. In the acute toxicity test, no mortality was observed in mice administered 5,000 mg/kg body weight of OPEE over a 2-week observation period. These results suggest that OPEE may have significant effects on inflammatory factors and be a potential anti-inflammatory material.

Key words: anti-inflammatory effect, NF- κ B, MAPKs, pro-inflammatory cytokines, onion peel

서 론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년초로서 quercetin, quercitrin, rutin 등과 같은 flavonoid와 황 화합물인 allyl propyl disulfide 및 diallyl disulfide 등의 phytochemical이 풍부하여 다양한 생리적인 기능을 지닌 식품이다(1,2). 특히 quercetin은 양파의 주요 flavonoid 성분으로 주로 당과 결합하여 배당체 형태로 많이 존재한다. 가식 부위에는 0.01% 함유되어 있으며 껍질로 갈수록 함량이 높아져 양파 껍질에는 순 무게의 6.5%에 달하는 quercetin이 함유되어 있다(1).

양파는 국내 생산량 중 약 10% 정도는 가공품으로 이용되고, 가공 시에 발생하는 껍질이나 뿌리와 같은 부산물은 사료로 이용되거나 폐기 처분되고 있는 실정이다(3). 식품의

가식부로 이용되지 못하는 양파 껍질에서 생리적인 기능을 확인하여 기능성 식품소재로 활용 가능성을 확인하는 것은 경제적으로도 큰 가치를 지닌다고 할 수 있다. 또한 이러한 양파 껍질을 이용한 연구는 폐자원을 활용한다는 면에서 의미가 있다.

양파 중에는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 4',7-diglycoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 3,4'-diglycoside, quercetin aglycone, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside 등의 flavonoid류가 함유되어 있으며, 이 중 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 구성되어 있다(4). Bilyk 등(5)은 flavonol의 농도가 양파 종류에 따라 변화가 크고 색을 가진 마른 껍질에 특히 flavonol 함량이 높아 2.5~6.5%로 많은 양이 함유되어 있다고 보고하였다. 또한 양파 육질 성분 중 flavonol 함량이 안쪽 부분에서 바깥 부분으로 갈수록 증가하며 양파 껍질 부분의 flavonol 53% 이상이 aglycone 형태인 quercetin(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)이라고 보고하였고, Middleton(6)은 quercetin

Received 30 July 2015; Accepted 22 September 2015

Corresponding author: Dong-Hyun Ahn, Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr, Phone: +82-51-629-5831

aglycone이 염증반응을 억제한다고 보고하였다.

염증 질환은 물리적 충격이나 화학물질 및 세균의 감염 등의 외부 자극에 대한 생체 방어기작이며, 지속적인 염증반응은 조직의 손상을 촉진시켜 결과적으로 관절염, 당뇨병, 동맥경화 및 암 등을 발생시키는 원인이 된다(7,8). 염증반응이 일어나면 대식세포는 nitric oxide(NO), inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), interleukin(IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor(TNF)- α 와 같은 염증매개물질을 분비한다.

Lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포에서 감염 초기에 반응하는 그람 음성균의 외막 성분으로 LPS의 과도한 자극은 대식세포에서 cytokine과 같은 전 염증성 매개물질을 분비시킨다(9). Cytokine의 분비는 신호전달경로에서 extracellular signal-regulated kinases(ERK), p38 kinase(p38), c-jun N-terminal kinase(JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)와 nuclear factor kappa B(NF- κ B)에 의해 조절되어 활성화가 일어나게 된다(10).

지금까지 개발된 항염증제는 크게 스테로이드계와 비스테로이드계로 나눌 수 있다. 그러나 이러한 항염증제는 위염, 신장염 및 심장질환 등을 초래하여 인체 내 안전성 면에서 문제점을 가지고 있어 그 사용이 제한되고 있기 때문에, 최근에는 천연자원에서부터 안전한 항염증 소재를 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐만 아니라 일상생활에서도 섭취 가능한 식품 중 항염증제로 이용하기 위한 물질이 계속 탐색되고 있다(8,11). 양과 껍질에 관한 연구는 항산화 효과(1), 피부주름 개선 효과(12)에 대한 연구들이 보고되고 있으나 아직까지 미진한 편이다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에 양과 껍질 에탄올 추출물을 처리한 후 cytokine 및 염증매개 물질의 분비에 미치는 영향에 대해 조사하여 항염증 효과에 대해 알아보고, 천연 항염증제로서의 이용 가능성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 양과 껍질은 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후 이를 분말화하고 진공 포장하여 -20°C에서 저장하며 사용하였다.

양과 껍질 에탄올 추출물 제조

양과 껍질 분말에 10배 양의 80% 에탄올을 가하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하였고, 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 추출한 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)

로 농축하여 사용하였고, 양과 껍질 에탄올 추출물의 수율은 6.38%였다.

실험동물

생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)로부터 구입하여 귀 부종 실험에 사용하였으며, 생후 10주령의 암컷, BALB/c 마우스는 단기 독성 평가 실험에 사용하였다. 마우스는 온도 20 \pm 2°C, 습도 50 \pm 10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다(승인번호 2014-01).

세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

Nitric oxides 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응(13)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여 2.5 \times 10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 분주하고 5% CO₂ incubator(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1 μ g/mL의 LPS와 0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL의 양과 껍질 에탄올 추출물(OPEE)을 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

세포독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포(1 \times 10⁶ cells/mL)를 96-well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1 μ g/mL의 LPS와 OPEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL)로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 22시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 그 후 각 well에 dimethyl sulfoxide를 첨가하고 이를 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도[obti-

cal density (O.D.)를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation index (\%)} = \frac{\text{Sample 흡광도}}{\text{Control 흡광도}} \times 100$$

Pro-inflammatory cytokines 분비량 측정

세포배양액 내의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β cytokine의 분비량을 ELISA kit(Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% 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-1 β 의 경우 biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후 이를 다시 PBST로 세척한 다음 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정

배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 Sheeba와 Asha(14)의 방법에 따라 iNOS 및 COX-2의 경우 cytosol lysis buffer[50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40]를 이용하였으며, NF- κ B의 경우 nucleus lysis buffer(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 정량하였으며, 30 μ L의 lysate를 Laemmli(15)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등(16)의 방법을 참고하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(Bio-Rad)에 200 mA에서 1시간 동안 전사시킨 후, 5% skim milk가 포함된 TBSS(tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2 및 NF- κ B의 발현량을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- κ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정

하였다. 2차 항체로 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1~3분간 반응시킨 다음 각각의 단백질 밴드는 Gene tool(GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

MAP kinase(JNK, ERK, p38) 발현량 측정

MAPKs의 발현에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1 \times 10⁶ cells/mL로 18시간 전 배양하고 OPEE를 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μ g/mL)로 처리하여 30분 배양하였으며, 이후의 실험은 iNOS, COX-2 및 NF- κ B 발현량 측정과 동일한 방법으로 진행하였다. p-JNK, p-ERK, p-p38의 발현량을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse JNK, ERK 및 p38을 이용하여 1:5,000으로 희석하여 사용하였다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

OPEE의 항염증 효과를 *in vivo* 모델을 이용하여 검증하기 위하여 각각 Kim 등(17)과 Saraiva 등(18)의 방법에 의거하여 귀 부종 측정 및 조직 관찰을 진행하였다. ICR 마우스에 OPEE를 10, 50 및 250 mg/kg body weight 농도로 200 μ L씩 경구 투여하였다. 한 시간 후 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 μ L/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 OPEE를 100 mg/mL 농도로 20 μ L씩 도포하고 15분 뒤 5% croton oil을 20 μ L씩 도포하였다. 6시간 뒤 diethylether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxylin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다. 부종 생성율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Edema formation (\%)} = \frac{\text{Sample group의 귀 두께}}{\text{Control group의 귀 두께}} \times 100$$

단기 독성 평가

단기 독성 평가는 OECD test guide line(19)을 참고하여 Balb/c 마우스(n=5)를 실험 시작 전에 4~6시간 정도 절식시킨 후에 OPEE를 300, 2,000 및 5,000 mg/kg body weight 농도로 경구 투여하였다. 6시간 동안 비정상적인 행동 등의 경과를 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

세포독성 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 염증반응에서 중추적인 역할을 수행하며 항염증 효과를 평가하는 염증모델로 많이 사용된다. 이에 따라 RAW 264.7 세포를 이용하여 OPEE의 세포독성을 MTT assay에 의하여 평가하고자 하였다. 그 결과 LPS만 처리한 대조구와 비교 시 OPEE 처리 농도에 따른 세포생존율의 변화를 보이지 않았으며, OPEE가 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하고 다음 실험을 진행하였다(Fig. 1A).

NO 생성량 측정

활성산소의 일종인 NO는 높은 반응성을 가진 생체생성분자로 염증유발에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. iNOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시켜 인체 면역염증반응에서 중요한 역할을 하지만, 과도하게 생성될 경우 만성염증질환 등의 문제점이 발생하기도 한다(20). OPEE 처리에 의한 NO 생성량을 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후, OPEE를 각 농도별로(0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL) 첨가하고 생성된 NO를 Griess 법을 이용하여 측정하였다. OPEE를 처리하였을 경우 NO 생성량이 LPS 처리구보다 유의적으로 감소함을 확인하였다. LPS만을 처리한 positive control의 경우 negative control과 비교하여 10 배 이상 분비량이 증가하였으나, 100 µg/mL 농도에서는 50% 이상 감소한 것을 확인하였다(Fig. 1B). 따라서 OPEE가 NO 분비량을 억제함으로써 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 본 연구 결과는 Kim 등(21)이 양파 대체양념으로 널리 사용되는 삼채 뿌리 메탄올 추출물이 300 µg/mL 처리군에서 LPS만을 처리한 군과 비교했을 때 50% 수준까지 NO 생성이 감소된다고 보고한 결과와 비교하여 더 높은 NO

저해능을 보이는 것을 확인하였다. 또한 여러 flavonoid 중 주성분으로 quercetin을 함유하고 있어 항염증 효과를 가지는 껍질 에탄올 추출물이 NO 생성량에 있어 80 µg/mL 농도로 처리하였을 때 50% 이상 감소 효과를 가진 것과 유사한 정도의 저해능이 있음을 확인하였다(22).

염증관련 cytokines 분비량 측정

OPEE가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS 처리 후 OPEE를 농도별로 처리하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량은 LPS 처리에 의해 각각 378.21±7.80 pg/mL, 1,792.14±4.73 pg/mL 및 50.14±5.20 pg/mL로 PBS 처리구보다 현저히 증가하였으며, OPEE 처리에 의해 그 분비량이 농도 의존적으로 감소함을 보였다(Fig. 2). 특히 OPEE를 100 µg/mL 농도로 처리 시 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량은 각각 209.38±6.82 pg/mL, 843.08±20.28 pg/mL 및 20.72±3.47 pg/mL로 LPS 처리구에 비해 각각 44%, 53%, 60% 감소함을 확인하였다. 활성화된 macrophage는 IL-6, TNF-α, IL-1β와 같은 전염증성 cytokine을 분비함으로써 염증반응을 유도한다. TNF-α는 면역반응 초기에 분비되는 전염증성 세포활성물질로 T cell과 대식세포를 활성화시키고 염증성 매개체들의 발현을 증가시켜 천식이나 류마티스 관절염 등 여러 가지 염증성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다(23,24). 또한 IL-6는 조직 손상에 대한 발열반응을 초래하고, IL-1β는 T cell을 활성화시켜 B-cell의 성장과 분화를 자극함으로써 염증 반응에 관여한다고 알려져 있다(25,26). 따라서 본 연구 결과는 OPEE 처리에 의해 전염증성 cytokine들의 분비량이 감소됨으로써 항염증 효과를 나타냄을 보였다. 이는 Kang 등(27)이 양파 껍질 열수 추출물의 항염증 효과에서 추출물 100 µg/mL 처리 시 IL-6, TNF-α, IL-1β의 분비량이 LPS 처리구에 비해 38%, 41%, 34%의 감소하였다고 보고하여, 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 항염증 효과가 더 뛰어난 것을 확인하였다.

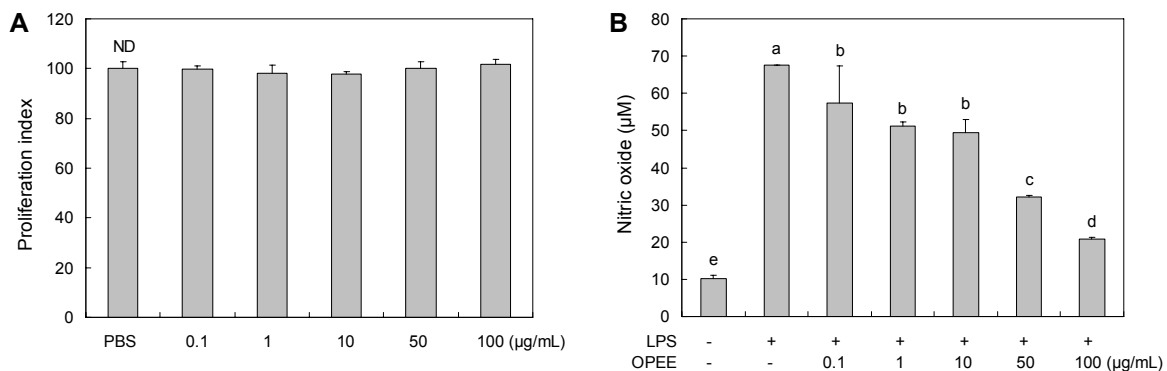


Fig. 1. Effect of onion peel ethanol extract (OPEE) on proliferation (A) and nitric oxide production (B) in RAW 264.7 cells. (A) Proliferation index=sample O.D./ control O.D.×100. ND: not significantly different. (B) Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or in combination with OPEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO levels. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

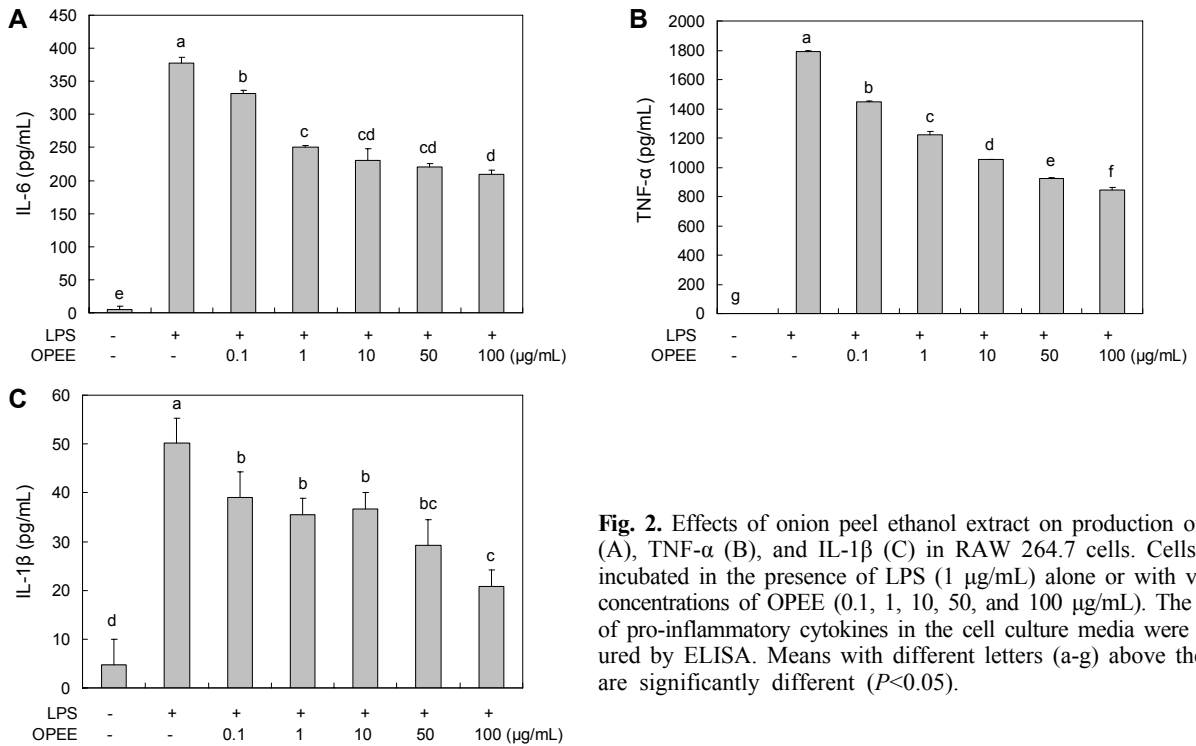


Fig. 2. Effects of onion peel ethanol extract on production of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-1β (C) in RAW 264.7 cells. Cells were incubated in the presence of LPS (1 μg/mL) alone or with various concentrations of OPEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/mL). The levels of pro-inflammatory cytokines in the cell culture media were measured by ELISA. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

iNOS 및 COX-2 발현량 측정

iNOS는 정상시에는 세포 내에 존재하지 않으나 LPS나 cytokine과 같은 염증매개물질에 의한 NF-κB의 활성화로 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성시키고 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킨다(28). 또한 COX-2는 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid를 prostaglandin E₂로 전환시키는 효소로 중양의 세포사멸을 억제하고 혈관

생성을 유도하는 데 관여한다(29). 따라서 OPEE가 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot 방법을 이용하여 세포질 내에서의 iNOS와 COX-2 단백질 발현량을 조사하였다(Fig. 3). RAW 264.7 세포에서 LPS(1 μg/mL)를 처리함에 의해 iNOS 발현이 증가하였고, OPEE를 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인하였다. 이를 통해 OPEE가 LPS에

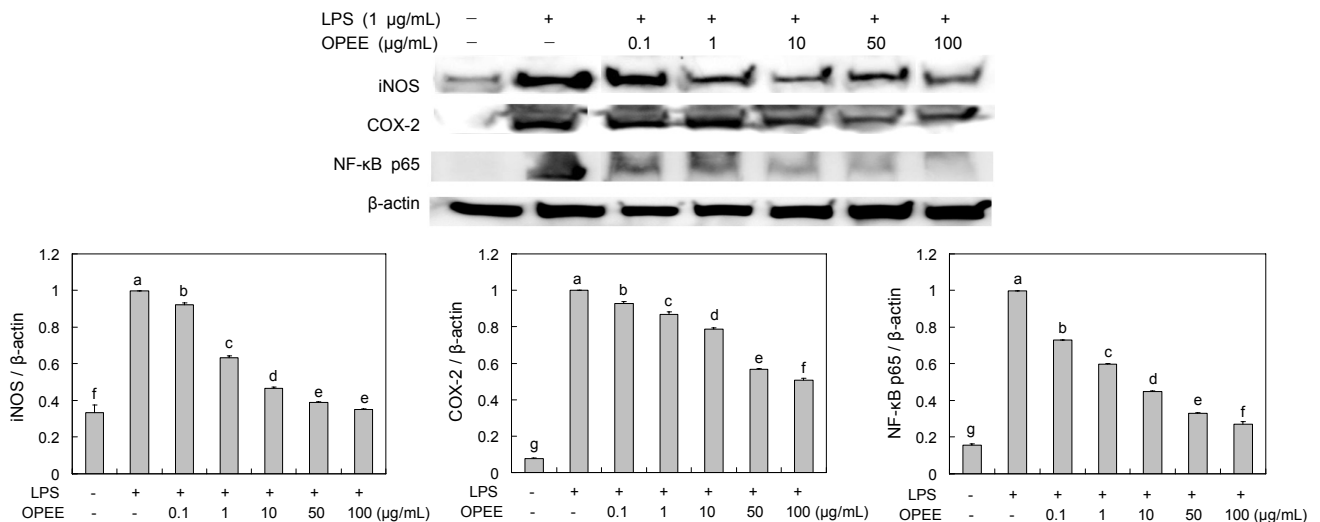


Fig. 3. Effect of onion peel ethanol extract on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF-κB p65 expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of iNOS and COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF-κB in nuclear protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of OPEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal. Means of duplicate experiments with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

의해 유도되는 iNOS의 발현을 효과적으로 억제시켜 NO의 생성량 감소에 관여한 것으로 사료된다. 또한 염증반응에서 중요한 역할을 하는 COX-2 단백질 발현 역시 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였으며, 100 µg/mL에서 그 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. Kim 등(30)은 왕귀뽕나무 잎 에탄올 추출물이 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 효과적으로 저해하여 항염증 효과가 있다고 보고하였으며, OPEE와 유사한 경향을 나타내었다.

NF-κB 발현량 측정

NF-κB는 염증, cytokine 반응, 세포성장조절과 같은 다양한 단계에 관여하는 전사인자로 주요 염증촉진에 관여하는 것으로 보고되어 있다(31). NF-κB p65는 염증이 유도되지 않을 경우에는 IκB와 결합한 상태로 세포질에 존재하고 있으나 신호전달경로가 활성화됨에 따라 IκB가 분해되고 NF-κB p65가 해리되어 핵 내로 이동하여 염증매개물질의 유전자 프로모터를 활성화시켜 전사가 일어나게 한다(32). 따라서 NF-κB의 발현에 OPEE가 미치는 영향을 확인한 결과(Fig. 3) LPS를 처리하였을 때 NF-κB의 발현이 크게 증가한 반면, OPEE 농도 의존적으로 발현량이 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 이는 Hwang 등(33)이 상대적으로 낮은 농도(10 µg/mL)의 발효홍삼 추출물이 NF-κB 활성을 약 50% 이상 억제한다고 보고한 결과와 비교하여 OPEE가 더 낮은 농도인 1 µg/mL에서 50% 이상의 억제 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있다. 염증 매개체들의 발현량에 미치는 OPEE의 활성 억제 효과를 종합해 볼 때 LPS에 의해 활성화되는 NF-κB의 활성 억제를 통하여 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현을 억제시키고 결과적으로 NO 및 염증성 cytokine의 생성을 억제하여 항염증 작용을 가지는 것으로 사료된다.

MAPKs 발현량 측정

MAPK는 세포의 성장, 분열, 스트레스 또는 cytokine에 의한 세포반응조절 등에 중요한 역할을 하며, ERK, JNK, p38 등이 주요한 신호전달경로로 알려져 있다(34). 활성화된 MAPKs는 NF-κB의 활성화를 비롯하여 다른 kinase를 활성화시켜 표적하는 유전자의 발현을 변화시킴으로써 세포의 여러 소기관과 효소에 영향을 주게 된다(35). 따라서 OPEE의 항염증 작용이 MAPKs 발현 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 후 추출물을 처리하여 ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 western blot을 통하여 분석하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때 3종의 MAPKs의 인산화가 모두 증가한 반면, OPEE 처리 시 농도 의존적으로 인산화를 억제함을 확인하였다(Fig. 4). 특히 JNK의 인산화는 0.1 µg/mL의 낮은 농도에서부터 현저히 감소됨을 보였으며, ERK와 p38의 인산화는 10 µg/mL 이상의 농도로 OPEE를 처리하였을 때 그 발현량이 확연히 감소됨을 보였다. 이는 Kim 등(36)이 더덕의 뿌리인 양유가 2 mg/mL 농도에서 phospho-ERK1/2, phospho-JNK1/2와 phospho-p38의 발현을 약 30% 억제시키는 것과 유사한 억제 효과를 가지는 것으로 OPEE가 NF-κB 활성 억제와 함께 MAPKs의 인산화를 억제함으로써 본 연구에서 관찰한 염증 매개성 물질들의 발현을 조절하여 항염증 효과를 나타냄을 시사한다.

귀 부종 측정 및 조직 관찰

염증은 인체의 손상 및 감염 등에 대한 일차적인 방어기작으로 발적, 발열, 부종 및 통증을 동반한다. 염증이 유발되면 혈류량이 증가하여 열감과 발적이 나타나고, 혈액 내의 neutrophils 등이 혈관 밖의 조직으로 투과되면서 부종이

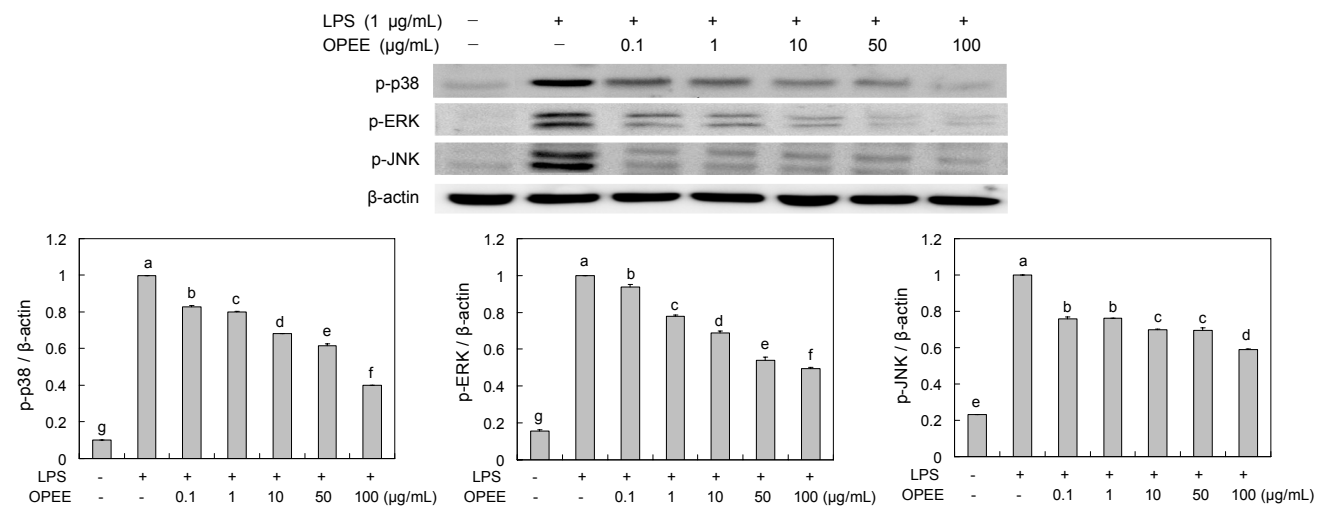


Fig. 4. Effect of onion peel ethanol extract on MAPKs expression in LPS-induced RAW 246.7 cells. The levels of p-p38, p-ERK, and p-JNK in the cytosolic protein were determined by western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of OPEE (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 30 min, and the proteins were detected using specific antibodies. For quantification, the expression data were normalized to the β-actin signal. Means of duplicate experiments with different letters (a-g) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

로 판단된다.

요 약

양파 껍질 에탄올 추출물(OPEE)의 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항염증 효과를 알아보기 위해 lipopolysaccharide(LPS)로 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 분비되는 염증 관련 매개 인자들의 발현량과 ICR 마우스모델을 이용한 귀 부종 및 조직 분석을 진행하였다. NO 및 염증성 cytokine(IL-6, IL-1 β 및 TNF- α)의 분비량이 OPEE에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. iNOS 및 COX-2의 발현량은 LPS에 의해 증가하였으나, OPEE 처리에 의해 농도 의존적으로 발현량이 감소하였다. 전사인자인 NF- κ B의 활성화와 인산화효소인 MAPKs(p-38, JNK 및 ERK)에서도 LPS에 의해 증가된 발현량이 OPEE에 의해 억제됨을 확인하였다. 따라서 NO 및 염증성 cytokine의 분비량 감소는 NF- κ B와 MAPKs의 활성 저해에 의한 것임을 확인하였다. *In vivo* 실험에서는 croton oil로 귀 부종을 유발한 마우스에 OPEE를 처리하였을 때 prednisolone 처리구와 유사한 수준으로 귀 부종이 억제되었으며, 귀 조직 관찰에서도 경피 및 진피의 두께와 진피로 침윤된 mast cell의 수도 억제됨을 확인하였다. 이상의 결과 OPEE는 항염증 소재로서 염증을 예방하거나 치료하는 데 이용 가능성이 높음을 제시한다.

REFERENCES

- Joung EM, Jung KH. 2014. Antioxidant activity of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts obtained as onion byproducts. *Korean J Food Sci Technol* 46: 364-368.
- Lee HA, Han SJ, Hong SH, Kim OJ. 2014. Effects of onion peel water extract on the blood lipid profiles in mice fed a high-fat diet. *Korean J Medicinal Crop Sci* 22: 203-209.
- Pak JI, Kim YW, Seo TS, Jang A. 2012. Supplementation effect of onion peel extracts on small intestine of obese mice. *J Life Sci* 22: 1477-1486.
- Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Ikegami Y, Matsuda M, Yazaki K, Agata I, Nishibe S, Noro T, Yoshizaki M, Okuda T. 1991. Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Plant Med* 57: 83-84.
- Bilyk A, Cooper PL, Sapers GM. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion tissue. *J Agric Food Chem* 32: 274-276.
- Middleton E. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439: 175-182.
- Byun MW. 2012. Anti-inflammatory activity of austroinulin from *Stevia rebaudiana* in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 456-461.
- Jeong DH, Kim KB, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2013. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Sargassum micracanthum*. *J Microbiol Biotechnol* 23: 1691-1698.
- Ko YJ, Song SM, Hyun WC, Yang SK, Song CK, Lee DS, Yoon WJ. 2014. Anti-inflammatory effect of *Castanopsis cuspidata* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Korean J Plant Res* 27: 439-446.
- Kim MJ, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Kim DG, Shin JY, Lee SK, Kim MJ, Park SJ, Song HJ. 2014. The anti-inflammatory effect of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology* 29: 21-26.
- Jeong DH, Kim KB, Kim MJ, Kang BK, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of methanol extract and n-hexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. *Life Sci* 114: 12-19.
- Jeon SM, Choi MH, Lee YJ, Shin HJ. 2013. Anti-wrinkle effect of facial mask pack containing onion (*Allium cepa*) skin extracts. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 28: 387-393.
- Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
- Sheeba MS, Asha VV. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- α and iNOS expression, which is mediated by NF- κ B regulation, in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 124: 39-44.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, Kim HP. 2002. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and *in vivo* inflammatory response. *Arch Pharm Res* 25: 329-335.
- Saraiva RA, Araruna MK, Oliveira RC, Menezes KD, Leite GO, Kerntopf MR, Costa JG, Rocha JB, Tomé AR, Campos AR, Menezes IR. 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J Ethnopharmacol* 136: 504-510.
- OECD. 2002. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. Test No. 420: acute oral toxicity-fixed dose procedure. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742001e.pdf?expires=1442476991&id=id&accname=guest&checksum=FBBDD152B70A8C56DA16EBF8DBA7B164B> (accessed Jun 2015).
- Lee E, Kim H, Yu J, Cho Y, Kim D, Shin Y, Cho Y, Kwon O, An B. 2014. Anti-inflammatory effect of *Polygonum multiflorum* extraction in activated RAW 264.7 cells with lipopolysaccharide. *Korean J Food Preserv* 21: 740-746.
- Kim CH, Lee MA, Kim TW, Jang JY, Kim HJ. 2012. Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* root methanol extract in LPS-induced RAW264.7 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1645-1648.
- Ko WM, Lee DS, Jang M, Kim KS, Lee HS, Baek HY, Oh H, Kim YC. 2013. A comparison of anti-inflammatory effects of Sophorae Flos EtOH extracts at the different flowering stages on LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells. *Kor J Pharmacogn* 44: 291-297.
- Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. 2002. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflammation* 11: 307-312.
- Beutler B, Cerami A. 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655.
- Liu M, Li J, Kong F, Lin J, Gao Y. 1998. Induction of

- immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology* 40: 187-198.
26. Dinarello CA, Endres S, Meydani SN, Meydani M, Hellerstein MK. 1990. Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acids. *Ann N Y Acad Sci* 587: 332-338.
 27. Kang BK, Kim KBWR, Ahn NK, Choi YU, Kim M, Bark SW, Park WM, Kim BR, Park JH, Bae NY, Ahn DH. 2015. Anti-inflammatory effect of onion (*Allium cepa*) peel hot water extract *in vitro* and *in vivo*. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 30: 148-154.
 28. Ito T, Ikeda U. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 257-265.
 29. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. 2002. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21: 93-101.
 30. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2012. Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1205-1210.
 31. Ghosh S, Hayden MS. 2008. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8: 837-848.
 32. Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. 2001. NF- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. *Clin Ter* 152: 249-253.
 33. Hwang SI, Ju HJ, Kim HD, Kwak TW, Yoo BH, Kim SG, Lee CW, Hwang TH, An WG. 2011. Anti-inflammatory effect of fermented red ginseng via regulation of NF- κ B signal transduction. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 25: 521-527.
 34. Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
 35. Kim JE, Kim SB, Kang OH, Shin IS, Kang SH, Lee SH, Kwon DY. 2013. Inhibitory effect of water extract from Dojuksan on LPS-induced proinflammatory cytokines production in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology* 28: 53-60.
 36. Kim BH, Lee YT, Kang KH. 2010. Codonopsis lanceolata inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 24: 80-84.
 37. Ju MS, Jeong HU, Kim HG, Park GH, Youn YS, Kim YO, Kim SY, Oh MS. 2010. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Geranii Herba. *Kor J Herbology* 25: 97-101.