

## Antioxidant activity and suppression of pro-inflammatory mediator of *Corni fructus* extracts in activated RAW 264.7 macrophage

Ye Jin Kim<sup>1</sup>, Dae-Yeul Son<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Convergence, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

### 산수유(*Corni fructus*) 분획 추출물의 항산화 활성 및 RAW 264.7 대식세포에서 염증매개물질 억제 효과

김예진<sup>1</sup> · 손대열<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 바이오산업융합학부

#### Abstract

The antioxidant and anti-inflammatory effects of *Corni fructus* extracts (CEF, EtOAc extraction; CBF, buthanol extraction; CWF, water extraction) were investigated. The total phenolics of CEF (173.3 mg TAE/g) were significantly higher than those of CWF (26.7 mg TAE/g) and CBF (94.8 mg TAE/g). DPPH and ABTS free radical scavenging activity of CEF (DPPH: RH<sub>50</sub>; 25.1 µg/mL, ABTS: RC<sub>50</sub>; 36.1 µg/mL) showed even higher than that of BHA and α-tocopherol used as positive control. All three *Corni fructus* extracts in the concentration of 1~100 µg/mL were effective inhibitors of NO and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). NO production was inhibited 71.3~92.2% by CEF, 76.8~85.5% by CBF and 74.4~96.9% by CWF, respectively. CEF, CBF and CWF (1~100 µg/mL) inhibited also pro-inflammatory cytokines like TNF-α, IL-1β and IL-6 very effectively. TNF-α was inhibited up to 51.2% by CWF and IL-1β was inhibited up to 67.1% by CEF. IL-6 was best inhibited by CEF up to 58.9%. This study suggested the potential of *Corni fructus* for use as an excellent antioxidant substance and inflammatory inhibiting mediators. Therefore CEF, CBF and CWF *Corni fructus* extracts may be used for therapeutic approach to various inflammatory diseases.

Key words : antioxidant, *Corni fructus*, lipopolysaccharide (LPS), nitric oxide (NO), pro-inflammatory

#### 서 론

Superoxide radical, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 매우 강력한 산화력을 가지고 있기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되어 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암, 노화, 염증반응을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려

져 있다(1). 이러한 질병의 원인이 되는 활성산소종, 즉 생체 내 자유 라디칼을 제어하는 역할을 하는 항산화제에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 알려진 합성 항산화제 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluen)는 장기간 섭취시에 인체에 심각한 독성을 일으키는 것이 알려지면서, 최근에는 안전하면서 뛰어난 효과를 지닌 천연물 유래의 항산화제 개발이 요구되고 있다. 또한 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 염증반응이 촉진되며, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다(2).

대식세포(macrophage)는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 인체 내에서 선천적 면역반응을 담당하는 면역세포로, 인체 면역체계에서 중요한 역할을 하는 백혈구이다. 외부

\*Corresponding author. E-mail : dyson@dhu.ac.kr

Phone : 82-53-819-1434, Fax : 82-53-819-1272

Received 14 June 2016; Revised 18 August 2016; Accepted 22 August 2016.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

의 자극으로 인해 활성화된 대식세포는 염증매개물질 분비를 통해 염증반응을 유발함으로써 천식, 기관지염, 관절염, 다발성경화증, 동맥경화증, 뇌졸중, 알츠하이머병이나 피킨슨병과 같은 퇴행성뇌질환 및 바이러스 감염으로 인한 염증질환 등을 유발하고, 질환을 악화시킨다(3). 내독소의 하나인 lipopolysaccharide(LPS)는 RAW 264.7과 같은 대식세포에서 tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6(IL-6), Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키며, nitric oxide(NO), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등의 염증매개물질을 분비하여 여러 가지 질병 및 암화(carcinogenesis)가 촉진된다(4). 이러한 염증매개물질의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 특히 화학적인 약품이 아닌 천연물이나 한약재료에 의한 염증 질환 치료제 및 치료보조제가 각광 받고 있으며 연구가 활발히 진행되고 있다(5).

산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis*)의 과육으로, 가을에 성숙한 붉은색 열매의 씨를 제거한 건조한 과육을 말하며 맛이 시고 성질은 따뜻하다(6). 약리작용으로는 이뇨, 혈압강하, 항암 및 항균작용등이 알려져 있으며, 특히 지금까지 산수유 종자의 항당뇨 효과(7), 물 추출물의 항히스타민 효과(8), 항균효과(9) 및 항산화 효과(10) 등이 알려져 있으며 산수유의 주요 화학 성분에 대한 연구가 보고되어져 있다(11). 본 실험에서는 산수유 메탄올 추출물을 이용하여 비극성에서 극성의 용매로 분획물을 제조하여 각 분획물이 LPS로 염증이 유도된 mouse 대식세포 RAW 264.7 cell에서의 염증매개 물질 생산 억제에 대한 효과를 검증함으로써 산수유를 이용한 항산화 및 항염증 효과를 지닌 기능성 식품으로써의 이용가치를 높이고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 추출

본 실험에 사용한 산수유는 대구 약령시에서 구입하여 사용하였다. 추출이 용이하도록 시료를 분쇄하여 산수유 무게 10배량의 80% 메탄올을 가하여 24시간 3회 반복하여 추출하였다. 얻어진 메탄올 추출물은 여과하여 농축 후, 동결 건조하였다. 동결된 산수유(*Corni fructus*) 80% 메탄올 추출물을 증류수로 완전히 용해한 후 계통분획을 실시하였다. 분획 용매로는 ethyl acetate(EtOAc), butanol, water를 사용하였고, 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 산수유 EtOAc 분획물(CEF; 10.2%), butanol 분획물(CBF; 15.8%), water 분획물(CWF; 40.5%)을 얻었다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

추출물에 대한 총 폴리페놀 함량은 Folin-Dennis법(12)에

따라 분광광도계를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 각 시료를 dimethylsulfoxide(DMSO)에 일정농도로 녹인 후 0.5 mL씩 test tube에 취하여 증류수 7 mL을 첨가하고 Folin Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 넣고 1분간 혼합하였다. 여기에 탄산나트륨 포화용액 1 mL을 넣은 후 혼합하여 실온에서 1시간 방치시키고 760 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Optizen, Daejeon, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량을 정량하기 위해 표준물질 tannic acid를 DMSO에 녹여 일정한 농도별로 조제하고 시료와 동일한 방법으로 실험하여 검량선을 작성하고 각 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다.

### 자유 라디칼 소거능

Blois 등(13)의 방법을 변형하여  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 자유 라디칼 소거활성을 측정하였다. 즉, 각 농도별 추출물 0.1 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액 0.1 mL를 가하고 10초간 혼합한 뒤 상온에서 60분간 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 자유 라디칼 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다. ABTS 자유 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정은 Re 등(14)의 방법에 따라 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS)를 이용하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.4 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 암소에서 12시간 반응 후, 자유 라디칼이 생성된 ABTS 용액을 99% ethanol로 희석하여 700 nm에서 흡광도가  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 조정하였다. 소거능을 측정하기 위해 흡광도 값이 조정된 ABTS 자유 라디칼 용액과 시료를 동량으로 혼합하여 6분간 실온에서 반응하고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

free radical scavenging activity (%) =

$$\left\{ 1 - \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{B_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

A<sub>test</sub>: 시료 첨가구의 흡광도

A<sub>blank</sub>: blank의 흡광도

B<sub>control</sub>: 시료 무첨가구의 흡광도

### 세포배양 및 세포독성 측정

대식세포주(mouse macrophage RAW 264.7)는 DMEM에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 첨가한 것을 사용하였으며 배양기에서 37°C와 5% CO<sub>2</sub>를 유지하며 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

산수유 분획물의 세포독성 측정은 MTT assay를 사용하였다. 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양 후, 기존 배지를 교환 및 각 시료를 농도별로 처리하여 이를 다시 24시간 배양한 후에 MTT 시약(5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상층 액을 제거하였

다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO를 첨가하여 녹이고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

### NO 생성 저해 활성

LPS에 의해 유도된 NO 생성 저해 활성을 측정하기 위해 24-well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양 후, 농도별로 시료를 처리하고 1시간 뒤, 염중유도물질 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상층액 100  $\mu\text{L}$ 를 취하여 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분간 반응시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

### 염증성 cytokine 및 PGE<sub>2</sub>의 측정

Cytokine 측정을 위해 24-well plate에  $3 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 시료를 농도별로 처리하여 1시간 배양 후, 각 well에 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고 24시간 배양하였다. 상층액을 취하여 ELISA kit(DB OptEIA™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) 및 PGE<sub>2</sub>의 생성량을 측정하였다.

### 통계처리

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, 평균(mean)±표준편차(SD)로 표시하였다. 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS 18.0을 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA) 분석을 시행하였고 유의차가 있는 항목에 대해서는 Student's t-test를 시행하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 함량

산수유 분획물의 총 폴리페놀 함량은 26.7 mg TAE/g에서 179.3 mg TAE/g 범위로 측정되었으며, EtOAc 분획물(CEF)에서 179.3 mg TAE/g로 가장 높게 측정되었다. Water 분획물(CWF)에서는 26.7 mg TAE/g로 분획물중 가장 낮은 함량이 측정되었다(Table 1).

자연계에 널리 존재하며 특히, 식물의 2차 대사산물로써 다량 존재하는 폴리페놀 계열의 화합물은 phenolic hydroxyl(OH) 그룹을 가지고 있어 자유 라디칼에 전자를 제공하여 항산화제로서 역할을 하는 주요한 물질로 알려져 있다(15,16). 천연물의 항산화 효과는 폴리페놀 함량에 비례하므로 폴리페놀 함량이 높을수록 항산화 효과가 뛰어나다(17). 특히 EtOAc는 폴리페놀계열의 물질 추출에 용이한 것으로 알려져 있어 추출 용매로 널리 사용되어지고 있다.

본 실험에서도 EtOAc 분획물(CEF)에서 폴리페놀 함량이 가장 높게 확인되었고, 다음으로 BuOH 용매 추출물(CBF)에서 높은 함량이 확인되어 CWF에 비해 CEF 및 CBF에서 높은 항산화 활성이 나타날 것으로 예측되었다.

**Table 1. Total polyphenolic contents of fractions obtained from the *Corni fructus*.**

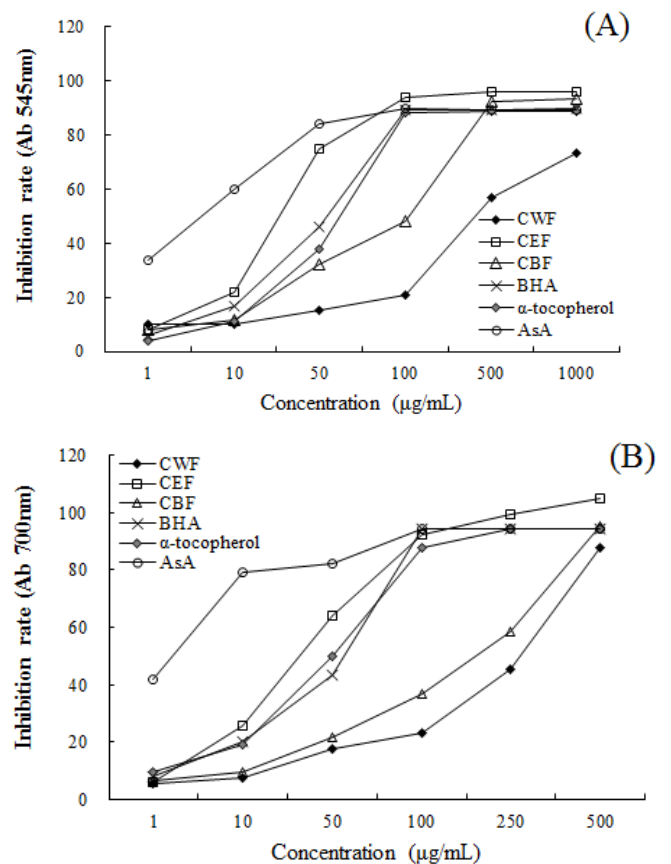
Sample	Total polyphenoles <sup>1)</sup> (mg TAE/g)
<i>Corni fructus</i> water fraction, CWF	26.7±2.76 <sup>2)</sup>
<i>Corni fructus</i> ethyl acetate fraction, CEF	179.3±3.51 <sup>c</sup>
<i>Corni fructus</i> butanol fraction, CBF	94.8±2.95 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Total phenolic content expressed in mg of tannic acid equivalents (TAE) per gram of dry weight of fractions.

<sup>2)</sup>Values are mean±SD. Values with different letters within the same column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

### 자유 라디칼 소거활성

산수유 각 분획물의 자유 라디칼 소거활성을 백분율로 나타낸 결과는 Fig. 1과 같으며, 소거활성을 50% 감소시키는 값은 Table 2에 정리한 바와 같다. 모든 분획물은 농도가 증가함에 따라 자유 라디칼 소거능이 증가하였다(Fig. 1).



**Fig. 1. Inhibition (%) effects of DPPH (A) and ABTS (B) radical from *Corni fructus* fractions.**

DPPH assay 결과에서, CWF는 분획물중 비교적 낮은 활성을 나타냈지만, 500~1,000 µg/mL 농도에서 56%와 73%의 높은 소거활성을 보였다(Fig.1A). CWF에 비해 폴리페놀 함량이 높게 측정되었던 CBF와 CEF는 더 높은 자유 라디칼 소거활성을 보였다. CBF경우 100 µg/mL에서 48%의 소거활성을 나타냈으며 500 µg/mL 농도 이상에서는 90% 이상의 높은 소거활성을 나타내 대조군으로 사용된 BHA (butylated hydroxyanisole, 89%), α-tocopherol(88%)과 유사한 활성을 보였다. 폴리페놀함량이 가장 높게 측정되었던 CEF(RH<sub>50</sub>; 25.1 µg/mL)의 경우 50 µg/mL의 농도에서도 73%의 우수한 자유 라디칼 소거활성을 나타내 대조군 BHA(RH<sub>50</sub>; 53.8 µg/mL)와 α-tocopherol(RH<sub>50</sub>; 71.3 µg/mL)보다 높은 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 보였고, AsA (Ascorbic acid, RH<sub>50</sub>; 4.2 µg/mL)와 유사한 활성을 확인하였다. ABTS 자유 라디칼 소거활성 측정 결과, DPPH 분석 결과와 유사한 자유 라디칼 소거능이 확인되었다(Fig. 1B), Table 2). CWF<CBF<CEF 순으로 ABTS 자유 라디칼 소거활성이 높게 측정되었으며, 특히 폴리페놀 함량이 가장 높게 측정되고 대조군인 BHA와 α-tocopherol보다 높은 DPPH 라디칼 제거 활성이 확인된 CEF(RC<sub>50</sub>; 36.1 µg/mL)는 ABTS 분석 결과에서도 대조군인 BHA(RC<sub>50</sub>; 49.5 µg/mL)와 α-tocopherol(RC<sub>50</sub>; 67.1 µg/mL)보다 높은 활성이 확인되었다.

**Table 2. IC<sub>50</sub> value of DPPH and ABTS radical scavenging activities of Corni fructus fractions.**

Sample	DPPH RH <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)	ABTS RC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
CWF	308.0±3.21 <sup>a3)</sup>	277.8±3.79 <sup>a</sup>
CEF	25.1±2.82 <sup>c</sup>	36.1±3.64 <sup>c</sup>
CBF	106.9±2.64 <sup>b</sup>	180.4±5.28 <sup>b</sup>
BHA <sup>4)</sup>	53.8±1.18 <sup>d</sup>	49.5±0.24 <sup>d</sup>
α-tocopherol	71.3±3.23 <sup>c</sup>	67.1±1.30 <sup>c</sup>
AsA	4.2±0.14 <sup>f</sup>	2.8±0.20 <sup>f</sup>

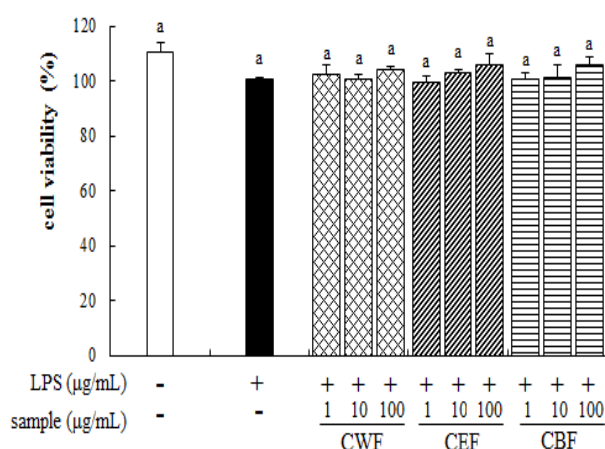
<sup>1)</sup>Concentration of test sample required to produce 50% inhibition of the DPPH radical.  
<sup>2)</sup>Concentration of test sample required to produce 50% inhibition of the ABTS radical.  
<sup>3)</sup>Values are mean±SD. Values with different letters within the same column differ significantly (p<0.05).  
<sup>4)</sup>Positive control: BHA (butylated hydroxy anisole), AsA (ascorbic acid), α-tocopherol.

식품의 산화 방지를 위해 지금까지 수많은 항산화 물질들이 개발되고 이용되어 왔는데, 합성 항산화제인 BHA 등은 가격이 저렴하고 우수한 항산화력을 나타내는 반면 과잉 섭취 시, 독성이 우려되어 사용이 기피되고 있고, 화학적 합성 첨가물에 대한 일반인들의 안전성에 대한 우려가 높아지면서 우수한 항산화 활성을 갖는 천연물을 이용하여 항산화제 개발에 연구가 집중되고 있다(18). 본 연구에서 산수유 분획물의 높은 자유 라디칼 소거활성 효과를 확인할 수 있었고, 아울러 EtOAc 분획물(CEF)은 BHA보다 우수한

소거활성을 보여, 식품산업에서 항산화제로써의 이용가치 뿐만 아니라 기능성 식품 소재로써의 이용가치도 높을 것으로 사료된다.

**세포독성**

산수유 각 분획물(1~1,000 µg/mL)의 항염증 실험을 위해 mouse macrophage RAW 264.7 cell을 사용하여 MTT assay를 통해 시료의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 1~100 µg/mL 농도에서 산수유 분획물(CWF, CEF, CBF)은 99% 이상의 생존율을 나타내 독성이 없는 것을 확인하여(Fig. 2), 1~100 µg/mL 농도 범위에서 항염증 실험을 진행하였다.

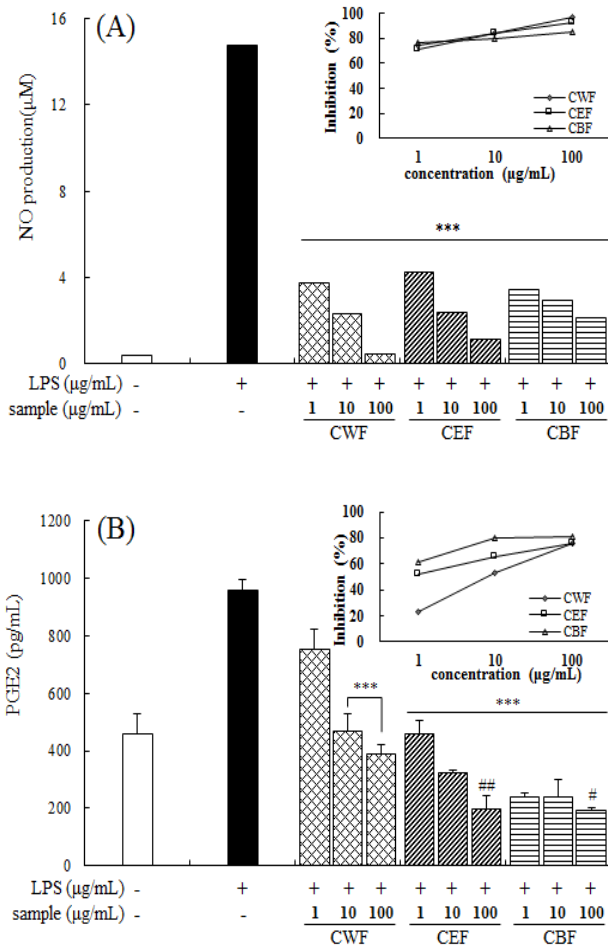


**Fig. 2. Cytotoxicity of Corni fructus fraction against RAW 264.7 cell stimulated with LPS.**

Cells were treated with 1-100 µg/mL of fractions (CWF, CEF, CBF) for 24 hr. Cell viability was determined using the MTT assay. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS alone, p<0.05.

**NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제**

LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 monocyte는 LPS를 투여하지 않은 대조군 보다 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(19), 천연물의 항염증 효과를 측정하기 위해 흔히 사용된다. 산수유 분획물은 효과적으로 염증 매개물질인 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 3A). LPS로 염증이 유도되어 NO 생성이 증가된 RAW 264.7 cell에서 산수유 분획물 처리에 따라 NO 생성이 저해됨을 확인할 수 있었고, 모든 분획물에서 LPS 단독 처리군(14.8 µM)과 비교했을 때, 유의적으로 NO의 생성이 감소되었다 (p<0.001). CWF와 CEF는 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되었고, 100 µg/mL에서는 0.5 µM(CWF)과 1.2 µM(CEF)로 LPS 비처리군(0.4 µM)에 근접하거나 유사한 NO 생성량을 나타냈다. NO는 혈액응고, 혈압 및 신경전달 기능의 조절 등 생리적 역할을 한다. 그러나 다량의 NO 생성은 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시키며 나아가 염증매개의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 또한 NO 생성은 peroxynitrite, nitrogen dioxide와 같은



**Fig. 3. Effects of *Corni fructus* fraction on the production of NO (A) and PGE<sub>2</sub> (B) in RAW 264.7 cells stimulated with LPS.**

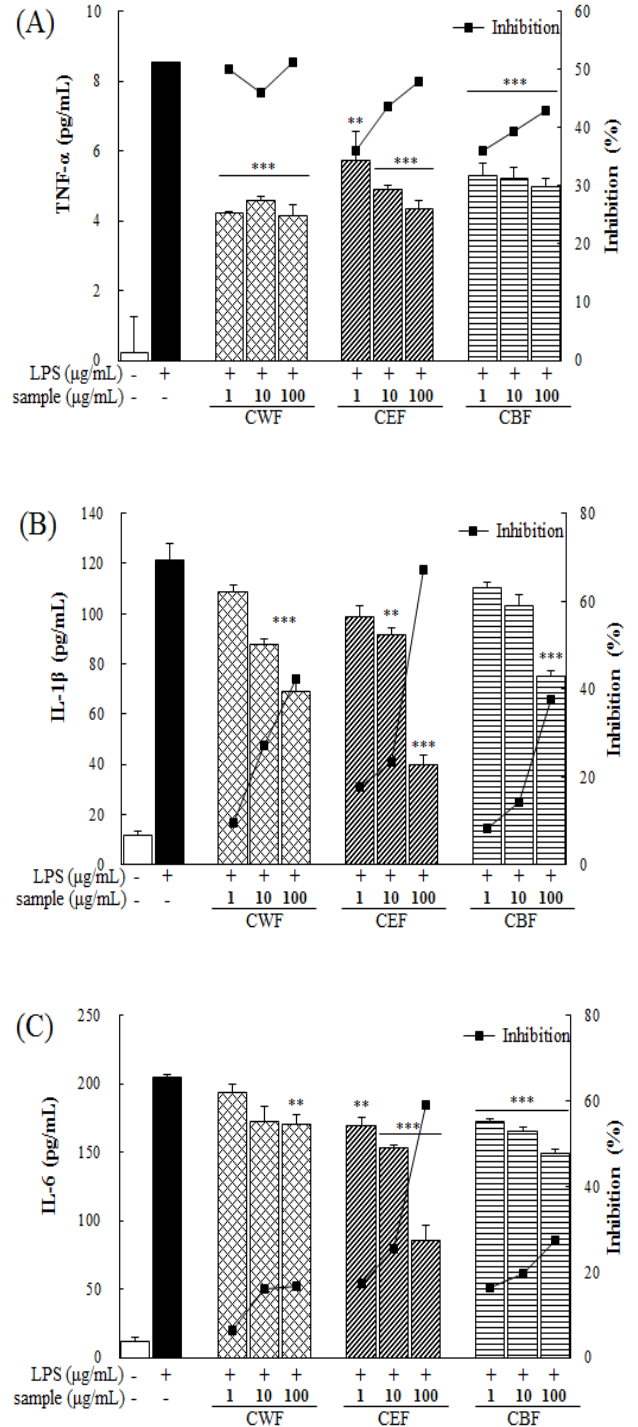
Cells were treated with 1, 10 and 100 µg/mL of extracts in the presence of 1 µg/mL LPS or with LPS alone for 24 hr (\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs LPS treatment alone, #p<0.05, ##p<0.01 vs control).

유해물질을 생성하여 암의 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(20).

Prostaglandins(PGs)은 세포막에 존재하는 인지질에서 나온 arachidonic acid로부터 유래된 불포화지방산에 속하는 호르몬이다. 생성된 PGs들 중 PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(21). PGE<sub>2</sub>의 생성저해 효과를 측정하고, 산수유 분획물의 NO 분석 결과와 유사하게 염증성 PGE<sub>2</sub>의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). LPS 비처리군(460.5 µM)과 비교했을 때, CWF 1 µg/mL(754.6 pg/mL)는 비교적 높은 생성량을 보였으나 LPS 단독처리군(958.9 pg/mL)에 비해서 유의적으로 감소됨을 확인하였고(p<0.05), 이를 제외한 모든 실험군(CWF 10~100 µg/mL, CEF 및 CBF 1~100 µg/mL)에서 LPS 단독처리군보다 유의적으로 감소되거나, LPS 비처리군과 유사하였으며, 모든 실험군(CWF 10~100 µg/mL, CEF 및 CBF 1~100 µg/mL)에서 LPS 단독처리군보다 유의적으

로 감소됨을 확인하였다(p<0.05).

NO와 PGE<sub>2</sub> 분비 조절은 급성 또는 만성 염증질환의 치료방법으로 매우 중요한 것으로 알려져 있으며, 본 실험을



**Fig. 4. Effects of *Corni fructus* fraction on the pro-inflammatory cytokine levels in LPS-induced RAW 264.7 cells (A, TNF-α; B, IL-1β; C, IL-6).**

Cells were treated with 1, 10 and 100 µg/mL of extracts in the presence of 1 µg/mL LPS or with LPS alone for 24 hr (\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs LPS treatment alone).

통해 산수유의 모든 분획물은 효과적으로 이들 염증성 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 저해함을 확인함으로써 산수유 CWF, CEF 및 CBF 모두 염증을 억제하는 뛰어난 효과가 확인되었다.

### Cytokine 측정

염증이 유도되면 대식세포와 같은 염증세포들은 NO, PGE<sub>2</sub>와 더불어 염증성 cytokine들을 생성하며 대표적인 염증성 사이토카인으로는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등이 있다. LPS 처리로 염증이 활성화된 RAW 264.7 cell은 LPS 비처리군에 비하여 유의성 있게 염증성 사이토카인의 분비를 증가시켰으며, 산수유 분획물의 처리로 염증성 사이토카인의 생성이 저해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

TNF- $\alpha$ 는 T cell과 대식세포를 활성화하고 다른 pro-inflammatory cytokine들을 증가시켜서 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다(22). 산수유 분획물의 전 농도 구간에서 LPS 단독처리군(8.5 pg/mL)에 비하여 유의적으로 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성이 감소되었으며 CWF는 최저 4.1 pg/mL로, CEF는 5.7 pg/mL에서 4.3 pg/mL로 생성량을 감소시켰다. CBF는 5.3~5.0 pg/mL로 생성이 감소되었으며, 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다. 100  $\mu$ g/mL 농도에서 CWF 51.2%, CEF 47.8%, CBF 42%로 TNF- $\alpha$  생성 저해 효과를 나타냈으며 분획용매에 따른 유의적 차이는 없었다(Fig. 4A).

IL-1 $\beta$ 의 생성 저해 효과를 측정된 결과, 산수유 분획물은 IL-1 $\beta$ 의 생성을 LPS 단독처리군(121.5 pg/mL)에 비해 유의적으로 감소시켰으며(p<0.05), CWF는 농도 의존적으로 생성량이 감소되었고, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 CWF(69.2 pg/mL, inhibition; 42%)와 CBF(74.9 pg/mL, inhibition; 37%)는 유사한 생성저해 효과를 보였으며, CEF(39.5 pg/mL, inhibition; 67%)는 가장 높은 IL-1 $\beta$  생성 저해효과를 보였다(Fig. 4B). IL-1 $\beta$ 는 생체에서 매우 낮은 농도로 작용하며 T-cell의 활성화, B-cell의 성숙 등에 관련하는 것으로 알려져 있다. 반면 염증반응이나 상처 또는 면역학적 자극을 주었을 때는 대량으로 생산되어 인체 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있다(23).

TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 와 마찬가지로 대표적인 염증성 사이토카인의 하나인 IL-6의 생성에서도 산수유 분획물은 LPS 처리로 증가된 IL-6을 효과적으로 감소시켰다(Fig. 4C). 특히 CEF 100  $\mu$ g/mL 농도(85.7 pg/mL)에서는 58%의 저해효과를 나타냈다. IL-6는 B cell이 plasma cell로 분화되는 마지막 단계를 활성화시키고, 염증병변에서 증가하는 것으로 알려져 있다(23).

분획물을 이용한 천연물의 항염증 효과를 검증한 대부분의 연구가 폴리페놀 계열의 화합물 추출이 용이한 EtOAc 용매 분획물에 대하여 집중되어져 왔다. 그러나 본 실험에서는 산수유 분획물은 EtOAc 뿐만 아니라 water와 butanol

용매의 분획물에서도 우수한 항산화 활성 및 항염증 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 각 분획에 있는 산수유의 유효성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되며, 이를 이용한 기능성 식품으로써의 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

### 요약

산수유에 함유된 유효성분을 극성이 다른 용매로 계통 분획하여 얻은 추출물(water 분획물, CWF; EtOAc 분획물, CEF; butanol 분획물, CBF)의 항산화활성 및 항염증 효과를 확인하였다. 그 결과, 모든 분획물은 농도가 증가함에 따라 자유 라디칼 소거능이 증가하였으며, 특히 가장 높은 폴리페놀 함량(179.3 mg TAE/g)이 확인된 CEF의 경우 대조군으로 사용된 BHA와  $\alpha$ -tocopherol보다 뛰어난 자유 라디칼 소거활성(DPPH: RH<sub>50</sub>; 25.1  $\mu$ g/mL, ABTS: RC<sub>50</sub>; 36.1  $\mu$ g/mL)이 확인되었다.

Mouse macrophage RAW 264.7 cell을 사용하여 NO, PGE<sub>2</sub> 및 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)의 생성 억제 측정을 통한 항염증 효과 분석 결과, 산수유 분획물(CWF, CEF, CBF)은 용매에 따른 유의적 차이 없이 처리 농도 범위(1~100  $\mu$ g/mL)에서 NO, PGE<sub>2</sub> 및 염증성 cytokine 생성을 유의적으로 억제하였다.

CWF와 CEF는 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 CWF(0.5  $\mu$ M)와 CEF(1.2  $\mu$ M)는 LPS 비처리군과 유사하게 NO 생성을 억제하였다. 100  $\mu$ g/mL 농도에서 가장 높은 염증성 cytokine 생성 억제 효과는 CWF가 TNF- $\alpha$ 의 생성을 51.2%, CEF가 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성을 각각 67%와 58% 억제하여, 산수유 분획물의 뛰어난 항염증 효과가 확인되었다.

### References

1. Tepe B, Sokmen A (2007) Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. *Bioresource Technol*, 98, 3076-3079
2. Kim YJ, Son DY (2011) Hot water leaves extracts of *Zizyphus jujube* exert antioxidative effects in vitro and cytotoxicity in human cancer cell lines. *Hort Environ Biotechnol*, 52, 635-640
3. Albina JE, Reichner JS (1995) Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz*, 3, 46-64
4. Lee SJ, Lim KT (2008) Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 via p38 mitogen activated protein kinase in lipopolysaccharide stimulated RAW

- 264.7 cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 377, 45-54
5. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J Immunol, 144, 1425-1431
  6. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ (1993) Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. Korean J Pharmacogn, 24, 177-182
  7. Park YK, Whang WK, Kim HI (1995) The antidiabetic effects of extracts from *Cornus officinalis* seed. Chung-Ang J Pharm Sci, 9, 5-11
  8. Seo YB, Kil GJ, Lee YK, Lee YC (2002) Study on the effects of corni fructus about the anti-allergic action. Korean J Herbology, 17, 1-11
  9. Kim YD, Kim HK, Kim KJ (2003) Antimicrobial activity of solvent fraction from *Cornus officinalis*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 829-832
  10. Kim OK (2005) Antidiabetic and antioxidative effects of corni fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Oil Chemists Soc, 22, 157-167
  11. Tian G, Zhang T, Yang F, Ito Y (2000) Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 886, 309-312
  12. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-243
  13. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
  14. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radi Biol Med, 26, 1231-1237
  15. Park HJ, Kim SM, Kim MJ, Yu CY, Park SM, Eom SH, Cho DH (2007) Changes of antioxidant activity in *Juglans mandshrica* Maxim. leaves by far infrared irradiation. Korean J Medicinal Crop Sci, 15, 266-270
  16. Ahn SI, Heung BJ, Son JY (2007) Antioxidative activities and nitrite-scavenging abilities of some phenolic compounds. J Korean Food Cookery Sci, 23, 19-24
  17. Kim YJ, Son DY (2012) Antioxidant and inhibitory effects of korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1371-1377
  18. Branen AL (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Am Oil Chem Soc, 52, 59-63
  19. Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991) Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. FASEB J, 5, 2304-2312
  20. Bosca L, Zeini M, Traves PG, Hortelano S (2005) Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. Toxicol, 208, 249-258
  21. 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
  22. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J, 6, 3051-3064
  23. Son JH, Kim HJ, Park TS, Jung MS (2011) Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (*Cheongdo Bansi*). J Appl Biol Chem, 54, 71-78