

Lipopolysaccharide로 유도한 대식세포의 염증반응에서 미나리 에탄올 추출물 및 분획물의 항염증 효과

장지훈¹ · 조현우¹ · 이보영² · 유강열² · 윤지영²

¹한약진흥재단
²전주농생명소재연구원

Anti-Inflammatory Effects of *Oenanthe javanica* Ethanol Extract and Its Fraction on LPS-Induced Inflammation Response

Ji-Hun Jang¹, Hyun-Woo Cho¹, Bo-Young Lee², Kang-Yeol Yu², and Ji-Young Yoon²

¹National Development Institute of Korean Medicine

²Jeonju AgroBio-Materials Institute

ABSTRACT The present study examined the anti-inflammatory effects of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) and its fraction on the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophage cells. OJE remarkably reduced protein expression of inducible nitric oxide (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), resulting in inhibition of production of nitric oxide (NO). In order to identify the anti-inflammatory effects of bioactive fractions, OJE was fractionated into hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol fractions. The results show that the ethyl acetate and dichloromethane fractions reduced production of NO without cytotoxicity. Especially, the ethyl acetate fraction effectively reduced protein expression of iNOS and COX-2. Proinflammatory cytokine production was also reduced by ethyl acetate fractions in LPS-induced RAW 264.7 cells. These data suggest that OJE and its fraction possess pharmacological activity and might be useful for development of anti-inflammatory agents or dietary supplements.

Key words: *Oenanthe javanica*, anti-inflammatory, nitric oxide

서 론

체내의 염증 반응은 세균 감염과 같은 자극으로 물리적인 자극이나 화학적인 자극 등 다양한 원인에 의해 발생하며 손상 부위를 복구 또는 재생하려는 기전 중 하나이지만, 만성적 염증반응은 오히려 인간에게 질병을 일으키는 원인이 되기도 한다(1). Lipopolysaccharide(LPS)는 몇몇 gram-negative bacteria에서 외표면에서 찾을 수 있는 glycolipid로서 *in vitro* 실험 시에 염증 관련 실험에서 염증유도제로 사용한다(2).

LPS는 대표적으로 대식세포 또는 단핵구의 toll-like receptor 4(TLR4)를 자극하며, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)-1 β 및 IL-6를 포함한 pro-inflammatory cytokine, nitric oxide(NO) 및 eicosanoid의 분비를 촉진한다. 이러한 염증매개성 물질들이 급성으로 일어나거나 과도한 반응이 이어지게 되면 숙주에 치명적인 결

과를 초래한다고 알려져 있으며, 염증반응 초기에는 NO와 cytokine을 생산하여 생체방어에 중요한 역할을 한다(3). 그중 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase에 의해 형성되며, 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(4-6). 이러한 활성조절은 염증반응을 조절하기 위한 핵심요소로 알려져 있으며, 이를 조절함에 따라 염증반응을 완화시키는 천연소재를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

미나리는 우리 식생활에서 다량으로 섭취되는 식품으로 독특한 향미 및 약리작용으로 인해 기능성 식품 소재나 향신료로서의 활용도가 높은 식품 원료이다. 또한, 예로부터 숙취 해소 및 배변활동을 개선시키는 작용이 있다고 알려져 있다(7). 최근 연구에 따르면 미나리는 미네랄 중에서 칼륨이 많이 함유되어 있으므로 소금을 많이 먹는 우리 식단에 적합하며, 비교적 풍부한 carotene, 엽록소와 섬유질 등을 함유하고 있어 장의 활동을 촉진한다고 보고되었고, 미나리 추출물에서 분리된 persicarin은 간을 보호하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(8).

최근 보고에 따르면 미나리즙이 과산화지질과 알코올을 급여한 흰 쥐에서 혈중 및 간 조직의 지질 함량을 감소시키

Received 12 September 2016; Accepted 31 October 2016

Corresponding author: Ji-Young Yoon, Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju, Jeonbuk 54810, Korea
E-mail: yjy@jami.re.kr, Phone: +82-63-711-1092

고, 간 조직에서 항산화 효소의 활성을 증가시켜 알코올성 지방간 및 간 보호 효과에 효능이 있음을 보고하였다(9). 하지만 항염증에 관한 연구는 미흡함에 따라 본 연구에서는 미나리 추출물이 LPS에 의해 염증반응이 유도된 대식세포에서 항염증 작용 및 생리활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출

미나리 원시료는 미나리재배농가인 전주 미나리 작목반에서 생산하는 논미나리를 100 g 구입하여 적용하였다. 구입한 미나리 100 g을 대형 건열 건조기(SAM-DR 1700, Samgongsa, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 60°C에서 4일간 건조를 하였고, 그중 건조된 미나리 30 g을 micro hammer-cutter mill(MHK Trading Co., Bucheon, Korea)을 이용하여 50 mesh로 분쇄하였다. 분쇄된 미나리 분말을 100% 에탄올을 이용해 70°C에서 3시간 동안 3회 추출한 후, filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 얻어진 여과액은 감압농축기(N-1100 series, EYELA, Tokyo, Japan)에서 농축하여 에탄올 추출물 9 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수에 현탁시킨 후, 현탁액과 헥산을 1:1 비율로 분획 깔때기에 넣고 헥산층과 물층으로 분획하였으며, 분획된 헥산층을 다시 감압 농축하여 시료를 얻었다. 이상의 동일한 과정을 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 가하여 각각 분획물을 얻었고, 농축이 완료된 추출물은 동결건조기(Ilsin, Incheon, Korea)를 이용하여 건조 시료로 제조하였다.

실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin은 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay), Griess reagent system은 Promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였다. Tripure Isolation Reagent는 Roche(Basel, Switzerland)에서 구입하였다. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Taqman Universal Master Mix II, Alexa Fluor 514 antibody는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. iNOS, COX-2, GAPDH, IκBα, p-IκBα antibodies는 Cell Signaling Technology Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS), dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포배양

연구에 사용한 마우스 대식세포주 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 penicillin/streptomycin 100 unit/mL와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 incubator에서 배양하였다.

세포 생존율 분석

미나리 용매별 추출물 및 분획물의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성 효과를 측정하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96 well plate에 3×10⁵ cells/well로 분주하고 미나리 용매별 분획물을 농도별로 처리하였다. 24시간 배양한 후에 각각 세포 배양액 용량의 10%의 MTS 용액을 첨가한 다음 37°C에서 2시간 배양한 후 microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Grödig, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 농도 측정

미나리 용매별 추출물 및 분획물을 농도별로 전처리하고 30분 후에 LPS(500 ng/mL)를 각 세포에 처리하여 24시간 후 배양액에 분비된 NO를 측정하였다. 96 well plate에 세포 배양액과 Griess reagent(Promega)를 1:1로 혼합하여 넣고 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6) mRNA 발현 분석

RAW 264.7 세포를 6 cm 배양 용기에 1×10⁵ cells/dish씩 분주한 후 24시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 미나리 용매별 분획물을 농도별로 세포에 전처리하고 30분 후에 LPS(500 ng/mL)를 처리한 뒤 24시간 동안 배양한 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 Tripure Isolation Reagent(Roche)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 5 μg의 total RNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)을 이용해 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA 1 μL를 Taqman primer 1 μL, Taqman Universal Master Mix II(Thermo Fisher Scientific) 10 μL, 3차 증류수 8 μL와 함께 real-time PCR을 수행하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 TaqMan gene은 <http://www.life-technologies.com>에서 주문 후 사용하였고, 분석하고자 하는 유전자 특이적 gene의 정보는 Table 1에 나타내었다. 또한, real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초, 어닐링 온도 60°C에서 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

Immunoblotting 분석

미나리 용매별 추출물 및 분획물의 항염증 효과를 확인하기 위해 western blot을 이용하여 iNOS와 COX-2, IκBα,

Table 1. TaqMan gene information of cytokines for real-time PCR

| Gene symbol | Gene description | TaqMan gene expression assay number | Reference sequence |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| TNF- α | Tumor necrosis factor-alpha | Mm00443258_m1 | NM_013693.3 |
| IL-1 β | Interleukin-1 beta | Mm01336189_m1 | NM_008361.3 |
| IL-6 | Interleukin-6 | Mm00446190_m1 | NM_031168.1 |
| Hprt1 | Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (reference gene) | Mm01545399_m1 | NM_013556.2 |

p-I κ Ba 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 미나리 용매별 분획물을 농도별로 처리한 실험군과 대조군을 iNOS, COX-2는 24시간 배양 I κ Ba, p-I κ Ba는 30분 배양 후 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, protease inhibitors (completeTM, Roche), 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF과 10 mM EDTA를 함유하는 완충제를 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000 \times g로 4°C에서 30 분간 원심분리하여 단백질이 포함된 상층액을 얻은 후 Bradford method를 이용해 정량하였다. 정량한 단백질 20 μ g을 10% SDS-PAGE에 전기 영동시킨 후 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)으로 옮겼다. 그리고 membrane은 5% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 T-TBS(0.1% Tween 20+ TBS) 용액을 사용하여 상온에서 2시간 동안 blocking을 실시하였다. iNOS, COX-2, GAPDH에 대한 1차 항체를 membrane에 노출시키고 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit 또는 anti-mouse IgG를 반응시키고 ECL detection reagents(Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

Immunofluorescence 분석

I κ Ba의 degradation 정도를 확인하기 위하여 immunofluorescence 실험방법을 이용하여 I κ Ba와 핵을 염색하여 단백질의 양을 측정하였다. Cover slip에 세포를 분주하여 24시간 배양 후에 샘플 및 LPS(500 ng/mL)를 처리하고 30분이 지난 다음 그룹별로 PBS로 세척을 3회하고, 3.7% formaldehyde로 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 다시 PBS로 세척을 3회하고, 형광물질이 들어갈 수 있도록 0.5% triton X-100을 15분간 처리한 후, 3% BSA로 실온에서 1시간 동안 blocking을 하였다. 그런 후에 1% BSA에 든 anti-I κ Ba(1:100) 및 DAPI를 처리하고 4°C에서 밤새 반응하였다. 그 후 마지막으로 PBS로 3회 세척 후 cover slip을 fluorescence solution(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)으로 고정한 다음 fluorescence microscope(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 관찰하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치±표준편차 (mean±SD)로 나타내고, 각 실험군과의 유의성의 차이는

SPSS(18.0, Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 패키지 프로그램을 활용 Duncan's multiple range test로 분석하여 P-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

미나리 에탄올 추출물 및 분획물 추출 수율

추출 전 건조 시료와 동결건조가 완전히 진행된 시료를 대상으로 수득률은 Table 2와 같다.

미나리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 cell에서 세포독성 및 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향

미나리 에탄올 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 후 MTS로 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과 500 μ g/mL 이상에서 세포독성이 있는 게 관찰되었고, 1,000 μ g/mL 농도에서는 20% 이상의 독성이 관찰되었다(Fig. 1). NO의 과도한 증가는 염증반응을 유발하게 될 뿐만 아니라 조직의 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다(10). 따라서 추출물 단독 처리에 의한 NO 생성 정도를 측정하기 위해 RAW 264.7 세포에 미나리 추출물을 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL의 농도로 세포에 처리하고 미나리 추출물에 의한 NO 생성 억제 효과를 보기 위해 미나리 추출물을 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/mL의 농도로 세포에 전처리한 후 LPS를 24시간 동안 처리하여 이로 인해 생성되는 NO 양을 측정하였다. LPS만 처리한 군에서는 미나리 에탄올 추출물 단독 처리군과 비교하여 NO의 생성량이 현저하게 증가하였으며, 미나리 에탄올 추출물을 전처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 62.5 μ g/mL 이상에서 농도 의존적으로 유의성 있게 NO의 생성을 억제하였다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해 미나

Table 2. Yield of ethanol extract and fractions from *Oenanthe javanica*

| Extract and fractions | Dried powders (g) | Freeze dried powders (g) | Yield (%) |
|------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------|
| <i>Oenanthe javanica</i> ethanol extract | 30 | 9.00 | 30.00 |
| Hexane fraction | 9 | 2.70 | 30.00 |
| Methylene chloride fraction | 9 | 0.23 | 2.56 |
| Ethyl acetate fraction | 9 | 0.66 | 7.30 |
| Butanol fraction | 9 | 1.36 | 15.15 |

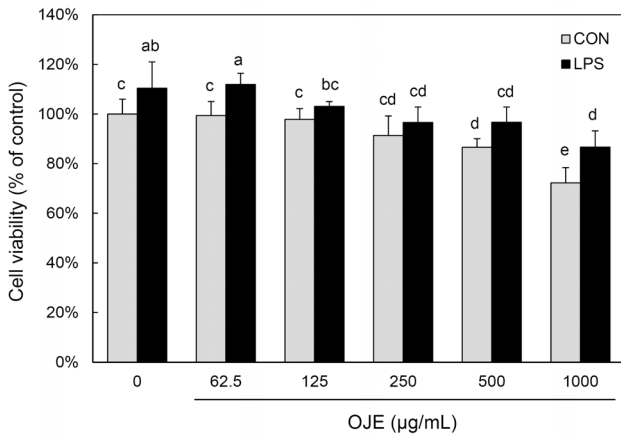


Fig. 1. Effect of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 24 h in the presence or absence of OJE at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control groups, LPS: LPS treated groups.

리 에탄올 추출물이 NO를 효과적으로 억제함으로써 항염증 기능에 관여하는 것을 확인하였다.

미나리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

iNOS는 NO를 합성하는 데 가장 큰 기여를 하는 효소이며 이는 세포 내 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 생성한다. 이렇게 생성된 NO가 과량 생성되면 염증성 cytokine의 발현을 유도하며 조직의 손상, 유전자 변이, 신경세포손상 등을 유발하는 염증 반응을 일으킨다(11,12). 또한, pro-oxidant나 pro-inflammatory stimuli에 의해

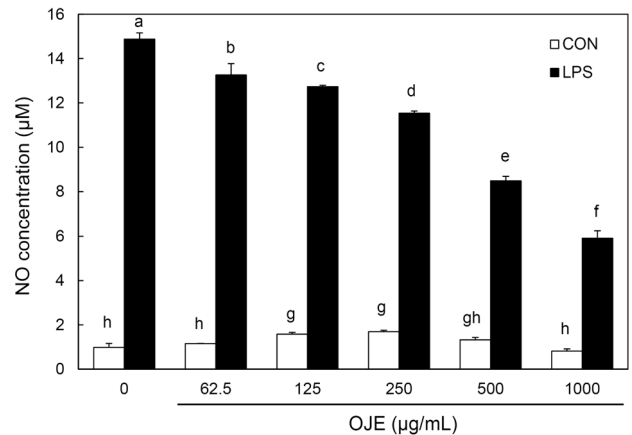


Fig. 2. Effect of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. After pretreatment with the indicated concentration of OJE for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control groups, LPS: LPS treated groups.

MEKK-1, NF-κB의 활성화를 경유하여 생성되는 COX-2는 prostaglandin 합성을 증가시키기 때문에 염증반응에 있어 중추적인 역할을 한다(13).

NO 생성 억제기작에 관한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위하여 Immunoblot 분석을 이용하여 세포질 내의 iNOS 단백질 발현량을 조사하였다. LPS 처리 시에는 iNOS 단백질이 발현이 강하게 유도되었으나, LPS에 미나리 에탄올 추출물을 62.5 µg/mL 이상 처리한 실험군에서 LPS에 의한 iNOS의 발현량이 농도 의존적으로 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한, LPS만 처리한 군에서

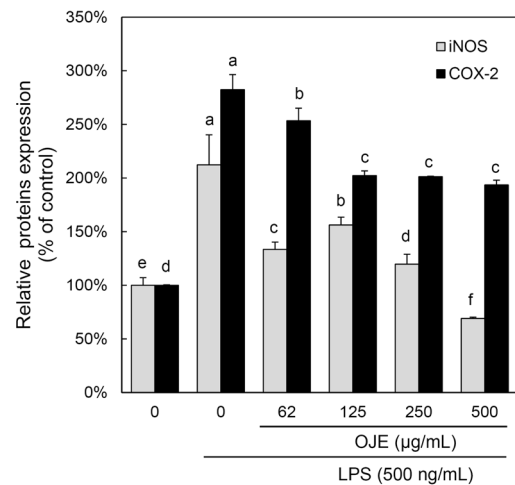
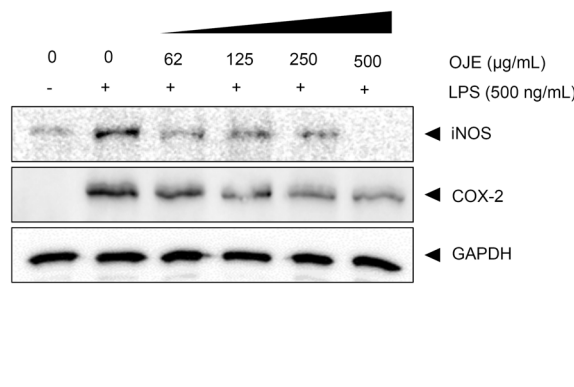


Fig. 3. Effect of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) on LPS-induced p-IκBα, IκBα, iNOS, and COX-2 proteins expression in RAW 264.7 cells. After pretreatment with the indicated concentration of OJE for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS, COX-2, and GAPDH antibodies. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

는 COX-2 발현량이 강하게 유도되었으나, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL 미나리 에탄올 추출물 전처리로 LPS에 의한 COX-2 발현량이 농도 의존적으로 현저히 줄어들었다(Fig. 3). 이를 바탕으로 미나리 에탄올 추출물이 COX-2 및 iNOS 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제함에 따라 항염증 효과를 나타낸다고 생각한다.

미나리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 IκBα 발현에 미치는 영향

iNOS나 TNF-α 유전자의 발현과 관련되어 있는 NF-κB는 바이러스, 박테리아 감염 시 유도되는 염증반응에 의해 활성화되며, 정상상태에서는 세포질에서 비활성 상태인 IκBα, IκBβ, IκBε, p105, p100 등과 결합하여 존재한다. 하지만 LPS의 자극에 의해 IκBα가 인산화 degradation 되면 NF-κB 신호전달이 활성화되고, NF-κB가 핵으로 이동하여 COX-2, iNOS, BclXL, cIAPs 등의 전사를 유도한다(13). 본 실험에서는 IκBα의 phosphorylated form을 측정하여 IκBα degradation에 의한 NF-κB 기전을 확인하였다. RAW 264.7 세포에 LPS 처리 시 p-IκBα 발현이 증가하였고, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL 미나리 에탄올 추출물을 전처리했을 때 LPS에 의해 증가한 p-IκBα 발현량을 억제시켰다(Fig. 3). IκBα의 phosphorylated form과 total form의 발현 양상을 살펴본 결과 p-IκBα의 발현량이 증가함에 따라 상대적으로

IκBα 발현량이 감소하는 것을 관찰하였다. 이는 미나리 추출물이 IκBα의 phosphorylation에 의한 degradation을 감소시키고 NF-κB의 nuclear translocation을 차단하며, 이에 따라 염증반응을 억제하는 것으로 예상된다(Fig. 4).

결과적으로 미나리 에탄올 추출물은 전사인자인 NF-κB의 활성화를 감소시키고, downstream signaling molecule인 iNOS와 COX-2의 전사를 억제하며, NO의 생성을 감소시켜 항염증 효과를 가짐을 유추할 수 있었다.

미나리 용매별 분획물이 RAW 264.7 cell에서 세포독성 및 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향

미나리 에탄올 추출물의 항염증 효과를 규명함에 따라 미나리 에탄올 추출물의 용매별 분획물에 대한 항염증 효과를 조사하기 위해 세포독성 및 NO 생성을 분석하였다. 미나리 용매별 분획물을 62, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 RAW 264.7 cell에 처리하고 24시간 후 MTS로 세포 생존율을 관찰하였다. 미나리 부탄올 분획물은 세포독성이 없고 생존율이 올라가는 경향을 보였으며, 미나리 핵산 분획물은 125 µg/mL 농도 이상에서 세포독성이 나타났으며, 메틸렌클로라이드와 에틸아세테이트는 1,000 µg/mL 농도에서 세포독성이 RAW 264.7 cell에서 세포독성이 관찰되었다(Fig. 5).

미나리 용매별 분획물을 62.5, 125, 250, 500 µg/mL의

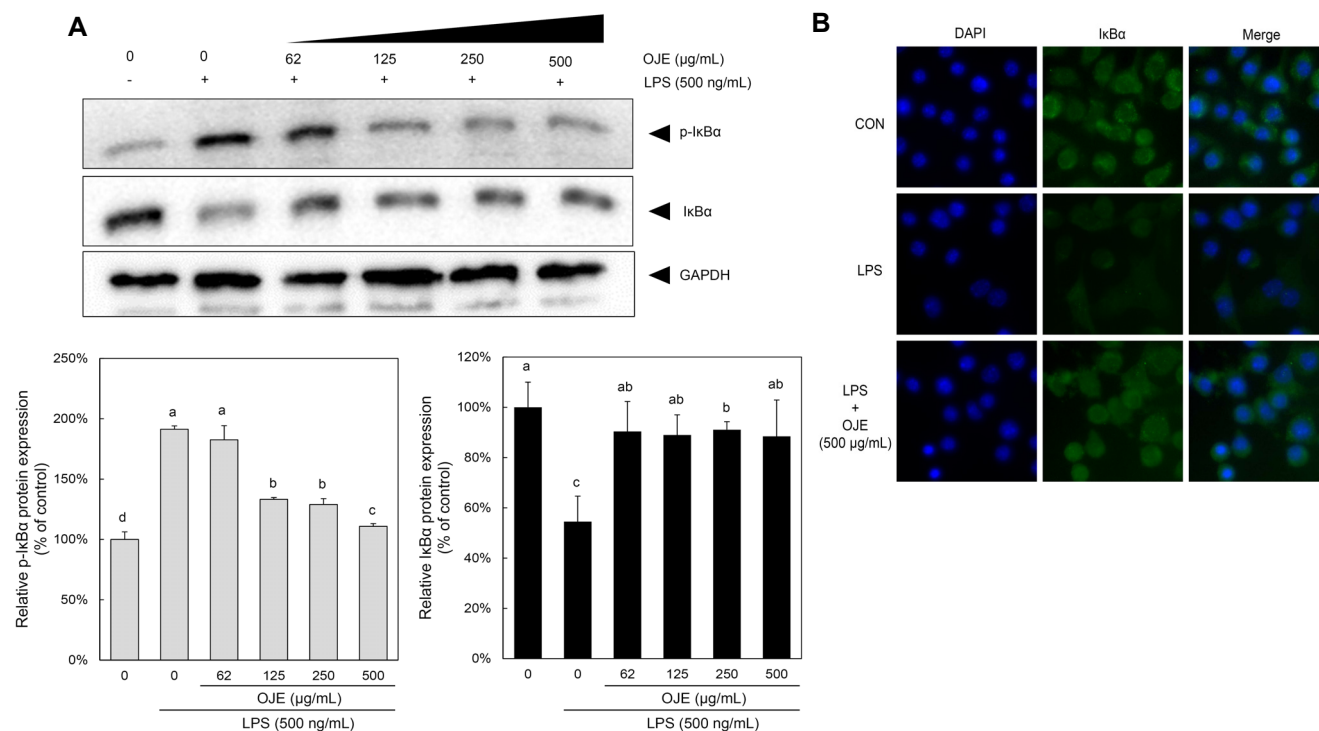


Fig. 4. Effect of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) on IκBα degradation in LPS-induced RAW 264.7 cells. After pretreatment with the indicated concentration of OJE for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with LPS (500 ng/mL) for 30 min. Degradation of IκBα was visualized with (A) immunoblotting and (B) immunofluorescence staining with anti-IκBα antibody. Green: IκBα. Blue: DAPI (nuclei). Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

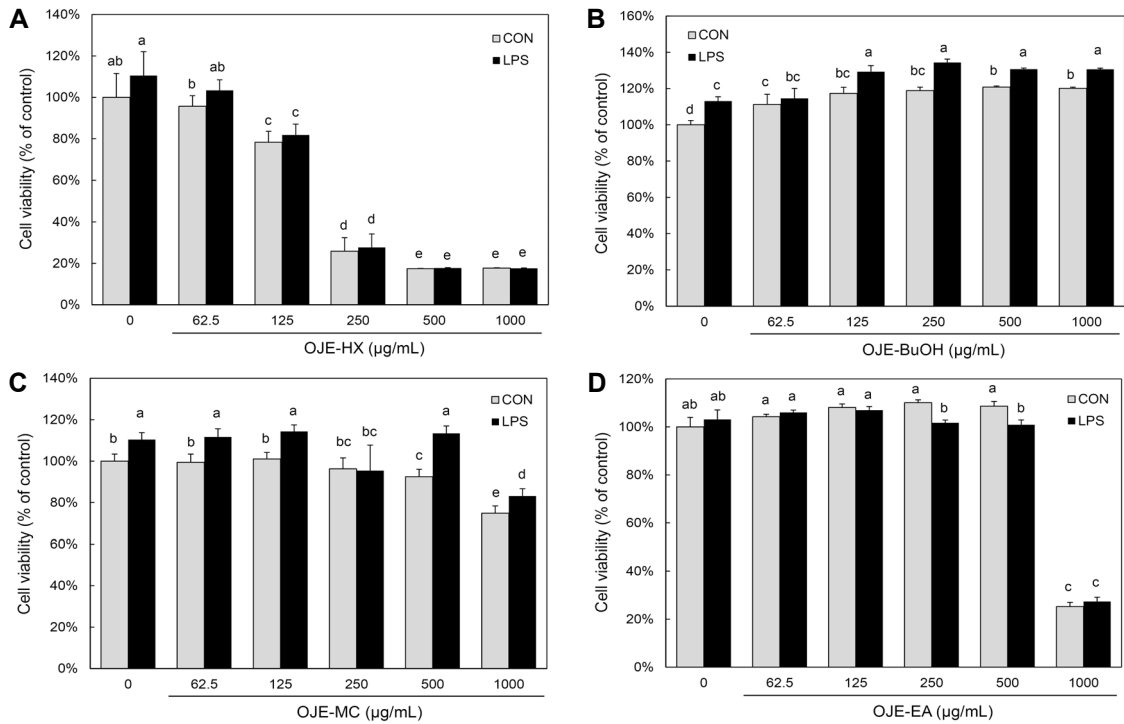


Fig. 5. Effect of *Oenanthe javanica* fractions on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 24 h in the presence or absence of (A) OJE-HX (*n*-hexane), (B) OJE-BuOH (butyl alcohol), (C) OJE-MC (methylene chloride), and (D) OJE-EA (ethyl acetate) at indicated dose. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control groups, LPS: LPS treated groups.

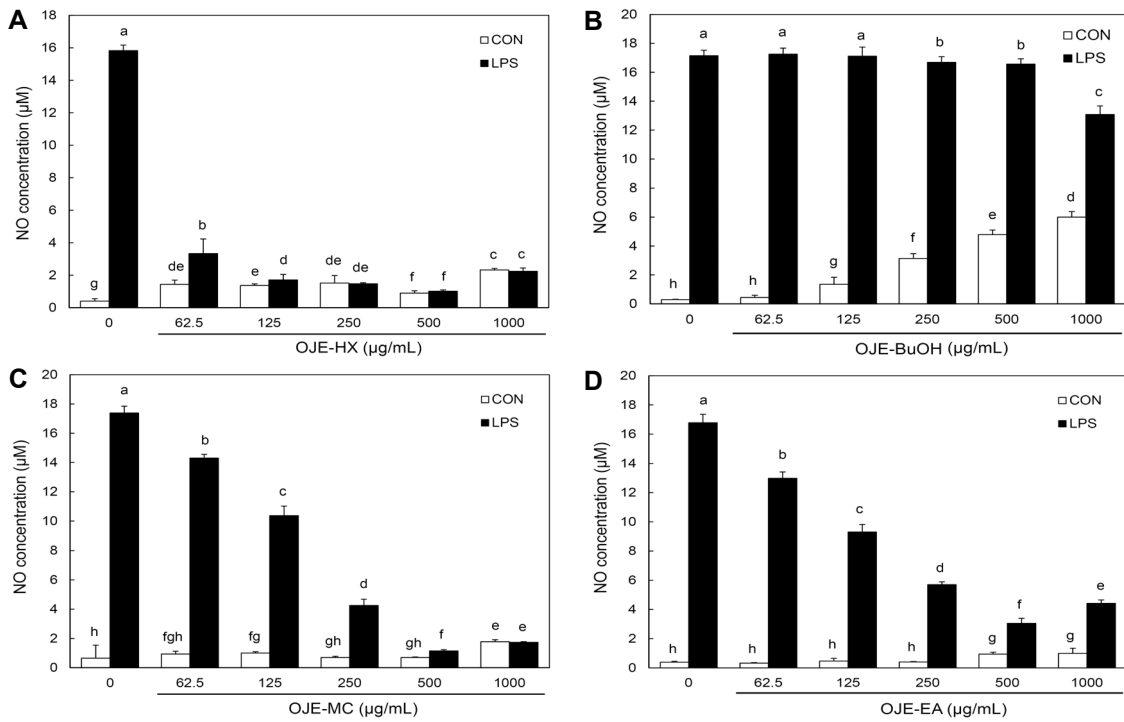


Fig. 6. Effect of *Oenanthe javanica* fractions on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentration of (A) OJE-HX (*n*-hexane), (B) OJE-BuOH (butyl alcohol), (C) OJE-MC (methylene chloride), and (D) OJE-EA (ethyl acetate) for 30 min before being incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for LPS treated group. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. CON: control groups, LPS: LPS treated groups.

농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO 양을 측정하였을 때 LPS 단독 처리군은 미나리 용매별 분획물 단독 처리군과 비교하여 NO의 생성량이 현저하게 증가하였으며, 미나리 헥산 분획물을 전처리하고 LPS를 처리한 실험군에서는 62.5 µg/mL 이상에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였지만 세포독성에 따른 NO의 감소인 것을 확인하고 추후 실험에서 제외하였다. 또한, 미나리 부탄올 분획물을 전처리하고 LPS를 처리한 실험군도 NO의 감소가 유의성 있게 나타나지 않아 추후 실험에서 제외하였다. 미나리 메틸렌클로라이드 분획물과 에틸아세테이트 분획물은 62.5 µg/mL 이상에서 농도 의존적으로 유의성 있게 LPS에 의해 증가한 NO의 생성을 감소시켰다(Fig. 6). 이를 바탕으로 미나리 에탄올 추출물의 용매별 분획물 중 메틸렌클로라이드 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서만 항염증 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

미나리 용매별 분획물이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향

미나리 용매별 분획물이 NO 생성 억제작용에 관여하는지 알아보기 위해 immunoblot 분석을 이용하여 세포질 내에 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 조사하였다. LPS 처리 시에는 iNOS 단백질의 발현이 높게 증가하였고, LPS를 처

리하기 전 미나리 용매별 분획물을 62.5 µg/mL 이상 전처리한 실험군에서 LPS에 의한 iNOS의 발현량이 농도 의존적으로 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A). 메틸렌클로라이드 그룹에 비해 에틸아세테이트 그룹이 낮은 농도에서도 iNOS의 발현량을 확연히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 그뿐만 아니라 LPS 처리 시 증가한 COX-2 발현량이 미나리 에틸아세테이트 분획물 전처리 그룹에서 62.5, 125, 250, 500 µg/mL 농도의 미나리 용매별 분획물 전처리에 따라 현저히 감소하였다(Fig. 7B). 하지만 미나리 메틸렌클로라이드 분획물 전처리 그룹은 LPS에 의해 증가한 COX-2의 발현량이 감소하지 않았다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 미나리 용매별 분획물 중 에틸아세테이트 그룹이 iNOS 및 COX-2의 발현을 가장 강하게 저해함으로써 NO의 생성을 억제함에 따라 항염증 효과를 나타낸다고 생각한다.

미나리에서 분리한 성분인 persicarin과 isorhamnetin-3-O-galactoside는 septic shock를 유도한 마우스 모델과 endothelial cell에서 면역세포의 recruit 하는 단백질을 감소시켜 염증을 완화시키는 것으로 보고가 되었다(14,15). 하지만 본 연구에서처럼 용매별 분획물을 이용하여 RAW 264.7 세포에서 항염증 기전을 조사한 것은 없는 것으로 알려져 있다.

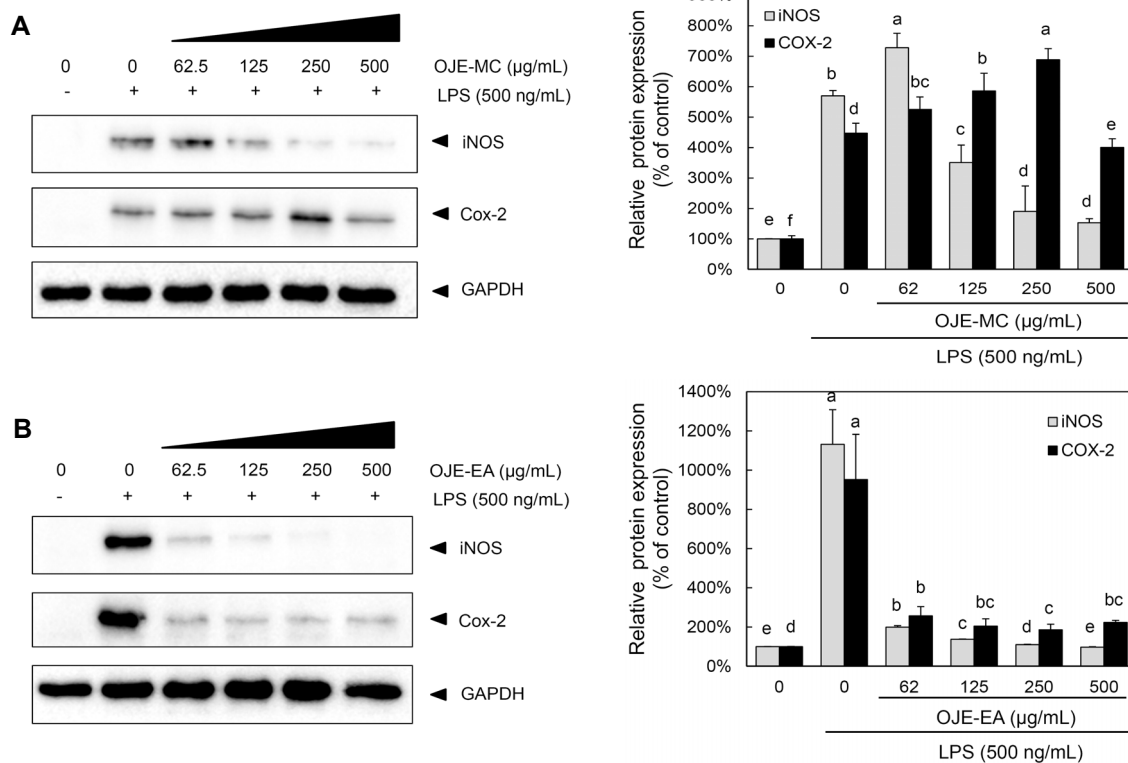


Fig. 7. Effect of *Oenanthe javanica* ethanol fractions (OJE) on LPS-induced iNOS and COX-2 proteins expression in RAW 264.7 cells. After pretreatment with the indicated concentration of (A) OJE-MC and (B) OJE-EA for 30 min, RAW 264.7 cells were treated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with iNOS, COX-2, and GAPDH antibodies. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

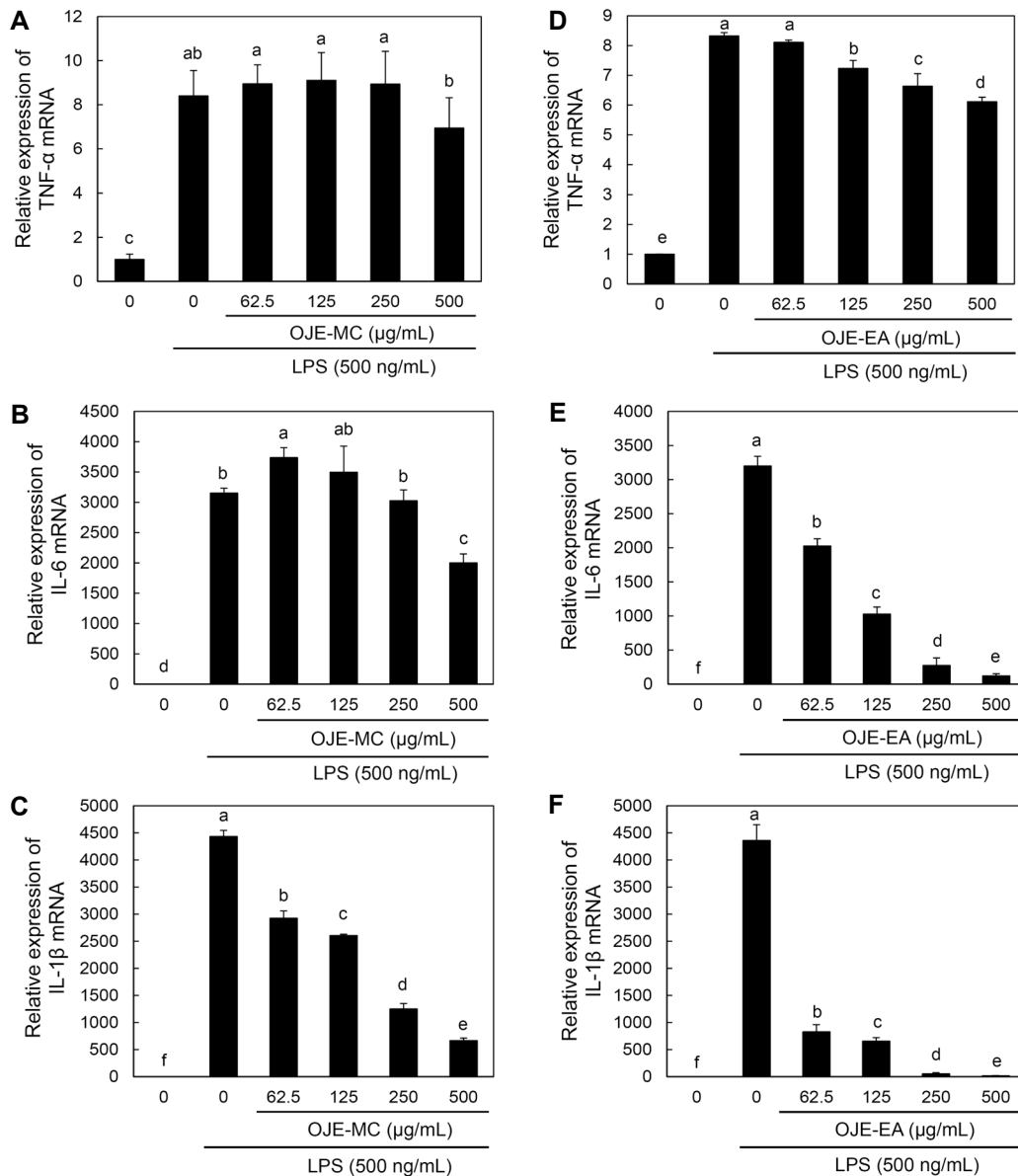


Fig. 8. Effect of *Oenanthe javanica* methylene chloride and ethyl acetate extract on pro-inflammatory expressions in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of OJE-MC (methylene chloride) of TNF- α mRNA (A), IL-6 mRNA (B) and IL-1 β mRNA (C) and OJE-EA (ethyl acetate) of TNF- α mRNA (D), IL-6 mRNA (E) and IL-1 β mRNA (F) for 30 min before being incubated with LPS (500 ng/mL) for 24 h. Gene expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were measured by real time PCR. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations from three separate experiments. Different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

미나리 용매별 분획물이 염증성사이토카인 mRNA 발현에 미치는 영향

미나리 용매별 분획물이 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도되는 각종 전염증성 및 염증성 cytokine들의 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 전염증성 및 염증성 cytokine의 mRNA 발현에 대한 미나리 용매별 분획물의 영향을 관찰하였다. 미나리 용매별 분획물을 전처리한 후 LPS로 자극하여 24시간 후에 세포를 수집하고 세포 내 mRNA를 추출 분리하여 real time-PCR 방법을 이용하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현량을 확인해 보았다. 그 결과 미나리 메틸렌클

로라이드 분획물 처리군에서 TNF- α 는 LPS 단독처리군과 비교하여 차이가 없었으며, IL-6는 500 μ g/mL 농도에서 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었고, IL-1 β 는 62.5 μ g/mL 농도에서부터 농도 의존적으로 상기의 mRNA 발현량이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 미나리 에틸아세테이트 분획물 처리군에서 TNF- α 는 LPS 단독처리군과 비교하여 125 μ g/mL 농도에서부터 농도 의존적으로 감소하였고, IL-6, IL-1 β 는 62.5 μ g/mL 농도에서부터 농도 의존적으로 상기의 mRNA 발현량이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 실험 결과 에틸아세테이트 분획물 처리군에

서 염증 관련 mRNA의 발현이 감소된 것으로 미루어 보아 에틸아세테이트 분획물에서 염증 관련 mRNA를 감소시킬 수 있는 생리활성 물질이 다량 함유된 것을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 미나리 에탄올 추출물 및 그 분획물의 항염증 효과를 알아보기 위해서 LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포에 대해 추출물이 미치는 항염증 효과를 살펴보았다. 미나리 에탄올 추출물은 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성을 억제함으로써 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 감소시켰고, 결과적으로 NO 생성을 억제하였다. 또한, 미나리 에탄올 추출물의 핵산, 부탄올, 에틸아세테이트 그리고 메틸렌클로라이드 분획물을 처리했을 때 에틸아세테이트와 메틸렌 클로라이드 분획물 전처리 실험군에서 LPS에 의해 유도된 NO의 형성이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 그중 미나리 에틸아세테이트 분획물은 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량 및 전염증성 사이토카인을 현저히 감소시킴에 따라 우수한 항염증 효과를 확인하였다. 따라서 본 연구 결과는 미나리 에탄올 추출물, 그 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 염증을 완화시키는 유효성분이 많은 것을 규명하였고 향후 에틸아세테이트 분획물에서 어떠한 유효성분이 있는 지에 대해 추후 실험이 필요할 것으로 보인다. 또한, 이러한 항염증 효능을 규명함으로써 향후 기능성 식품 소재로의 이용 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 전주시 기능성 식품 등 개발 연구지원사업에 의해 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
2. Moran AP, Prendergast MM, Appelmek BJ. 1996. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16: 105-115.
3. 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.
4. Kim DH, Park SJ, Jung JY, Kim SC, Byun SH. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Hwangnyenhaedok-tang* in LPS-activated macrophage cells. *Kor J Herbal* 24: 39-47.
5. Lee TH, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim J. 2007. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF- κ B trans-activation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells* 23: 398-404.
6. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211: 24-32.
7. Jo HW, Lee SH, Nam DH, Kim JY, Lim SK, Lee JS, Park JC. 2008. Antioxidant activity and phytochemical study on the aerial parts of *Oenanthe javanica*. *Korean J Pharmacogn* 39: 142-145.
8. Park JC, Kim JY, Lee YJ, Lee JS, Kim BG, Lee SH, Nam DH. 2008. Protective effect of *Oenanthe javanica* extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji* 52: 316-321.
9. Lee E, Park YH, Lim SC. 2005. Effects of *Oenanthe javanica* Sap on lipid composition, liver function and oxidative capacity in oxidized fat and ethanol fed rats. *Korean J Plant Resour* 18: 343-350.
10. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
11. Lim H, Shin S. 2010. Effects of the essential oil components from *Ligusticum chuanxiong* on proinflammatory mediators of RAW264.7 macrophage cells. *Nat Prod Sci* 16: 259-264.
12. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10: 291-316.
13. Kranzhöfer R, Browatzki M, Schmidt J, Kübler W. 1999. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor- κ B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 826-828.
14. Kim TH, Ku SK, Bae JS. 2013. Anti-inflammatory activities of isorhamnetin-3-O-galactoside against HMGB1-induced inflammatory responses in both HUVECs and CLP-induced septic mice. *J Cell Biochem* 114: 336-345.
15. Kim TH, Ku SK, Bae JS. 2013. Persicarin is anti-inflammatory mediator against HMGB1-induced inflammatory responses in HUVECs and in CLP-induced sepsis mice. *J Cell Physiol* 228: 696-703.