

RAW 264.7 대식세포와 염증유도 동물모델에서 산겨릅나무 추출물의 항산화 및 항염증 효과

이초은 · 정현희 · 조진아 · 이선영

충남대학교 식품영양학과

In Vitro and *In Vivo* Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Acer tegmentosum* Maxim Extracts

Cho-Eun Lee, Hyeon-Hee Jeong, Jin-Ah Cho, and Sun Yung Ly

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

ABSTRACT *Acer tegmentosum* Maxim (ATM) is known as traditional medicine for treatment of hepatic disorders such as hepatitis, related-inflammatory disease, and hepatic cancer. In this study, we evaluated the antioxidant and anti-inflammatory effects of ATM extracted with 80°C water or 95% ethanol. Antioxidant activities of ATM extracts were measured based on DPPH and ABTS radical scavenging activities, total polyphenolic compound contents, and ferric reducing antioxidant power. The anti-inflammatory effects of ATM extract were assayed on release of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)- α , and interferon (IFN)- γ from lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages. In these experiments, 95% ethanol extract of ATM showed stronger antioxidant and anti-inflammatory effects than water extract. Therefore, we determined the effects of ATM ethanol extract on an animal model of sepsis. Seven days oral gavage of ATM ethanol extract followed by LPS stimulation reduced the protein levels of TNF- α and IFN- γ in serum as well as mRNA levels of TNF- α and interleukin-6 in intestinal epithelial cells. In addition, ATM ethanol extract reduced DNA damage in mouse lymphocytes. These results indicate that ATM extract has strong antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* and *in vivo* effects and may be developed as a potential food material for prevention of inflammatory diseases.

Key words: *Acer tegmentosum* Maxim, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, animal model of sepsis

서 론

인간을 비롯한 모든 생물체에서는 생체 내 정상세포의 생화학 반응이나 여러 환경오염 및 화학물질에 노출되어 생성된 산화적 스트레스 요인인 superoxide radical, hydroxyl radical, peroxy radical, hydrogen peroxide 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 이러한 ROS는 세포막 손상, 단백질 분해 등을 일으켜 세포 손상을 초래할 뿐 아니라 염증반응과 연결되어 있으므로 만성 염증반응이 유도되어 심장병, 당뇨병, 관절염, 알츠하이머, 파킨슨병 등과 같은 다양한 질환의 원인이 되기도 하며, DNA 손상에 따른 발암 과정에도 깊은 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(1,2).

염증반응은 생체 내로 유입된 바이러스, 박테리아 등 외부항원의 자극에 의해 손상을 입었을 때 그 손상에 대해 재생하려는 조직반응(3)이지만 그 정도가 과도하거나 장기화

되면 각종 질환을 유도하기 때문에 생명현상 유지를 위해서 염증반응의 조절은 매우 중요하다. 염증반응에서 대식세포는 중요한 역할을 하는데, 대식세포는 모든 조직에 분포하면서 병원체와 암세포에 대해 방어능력을 가질 뿐만 아니라, 염증유발물질이 세포 내로 유입될 때 대식세포가 빠르게 활성화되어 nitric oxide(NO), tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1 β , IL-6와 같은 다양한 염증 유발 cytokine과 생리활성물질을 분비하여 면역반응을 극대화시킨다(4-6). 이후 여러 선행연구에서는 천연 항산화 물질이나 일부 식물 추출물들이 염증반응 유발 물질인 lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 RAW 264.7 세포에서 COX-2나 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 감소시켰으며, 동시에 TNF- α , IL-6 등의 염증성 매개물질들의 합성을 억제시키는 효과를 보였다고 하였다(7,8).

산겨릅나무(*Acer tegmentosum* Maxim)는 단풍나무과(Aceraceae)의 낙엽활엽 소교목으로서 참겨릅나무, 별나무, 산청목, 봉목, 정혜적으로 알려져 있으며 국내 중부이북의 고산지대와 만주, 우수리강 유역의 일부 산지에만 분포하고 있다(9). 이 식물에서 추출해낸 추출물의 주성분인 salidroside는 위의 손상과 통증을 억제하는 성분으로 보고되었

Received 22 September 2016; Accepted 28 October 2016

Corresponding author: Sun Yung Ly, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
E-mail: sunly@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6838

다. 산겨릅나무는 quercetin, catechin 등과 같은 페놀계 화합물을 포함하고 있어(10), 간 보호(11,12), 항염증(13), 항산화(14)의 효능이 일부 보고되어 있다. 그러나 대부분의 연구는 간 보호 효과에 대한 것으로 그치며, 특히 산겨릅나무 추출물의 항염증 효과에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성과 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과를 비교한 후 효능이 더 뛰어난 추출물을 이용하여 LPS로 염증을 유도한 동물 모델에서 항염증 및 DNA 손상 감소 효과를 검토하고자 하였다. 더 나아가 동물의 장점막세포를 취하여 염증성 사이토카인 발현 억제 효과를 통해 산겨릅나무 추출물이 장 면역력 강화에 긍정적인 영향을 미치는지를 확인함으로써 산겨릅나무 추출물의 세포 보호의 기능적 소재로서 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

산겨릅나무 시료 및 추출

본 연구에 사용한 산겨릅나무는 강원도 홍천에서 수거된 산겨릅나무의 가지로서, 분쇄(Super Grinder JL-1000, Joy Life Co., Busan, Korea)하여 동결건조(SFDSM12-60Hz, Samwon Freezing Engineering Co., Seoul, Korea) 한 후 사용하였다. 시료의 에탄올 추출물을 얻기 위해 95% 에탄올을 가하여 상온에서 일주일간 교반 추출하였다. 추출액은 여과지(Advantec No.2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 40°C에서 감압 농축하여 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다. 시료의 열수 추출물은 산겨릅나무 건조분말 시료에 증류수를 가하여 80°C에서 1시간 동안 3회 반복 추출한 후 여과하였다. 여액을 모아 rotary vacuum evaporator(EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co.)로 40°C에서 감압 농축한 후 -20°C에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

DPPH 라디칼 제거능 및 ABTS 라디칼 제거능 측정

산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물을 시료로 Blois법(15)으로 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 대한 전자공여능을 측정하였다. 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도별로 희석한 시료 1 mL에 0.15 mM DPPH 용액 1 mL를 넣어 교반하여 암실에 방치 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 제거능 측정은 Pellegrini 등(16)의 방법으로 측정하였다. 7 mM ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), Sigma-Aldrich Co.]와 140 mM K₂S₂O₈ (Sigma-Aldrich Co.) 용액을 잘 혼합하여 absolute ethanol과 1:88 비율로 섞은 ABTS solution 용액을 사용하였다. 농도별로 희석한 시료 50 µL에 ABTS solution 1 mL를

혼합하여 암소에서 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 제거능과 ABTS 라디칼 제거능을 농도별로 산출하여 IC₅₀값을 구하였다. 양성대조시료로는 ascorbic acid를 사용하였다.

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 및 총폴리페놀 함량 측정

추출물의 FRAP에 의한 환원력 실험은 Benzie와 Strain법(17)으로 측정하였다. Sodium acetate buffer(pH 3.5, 300 mM)와 10 mM TPTZ(2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 잘 섞어 FRAP reagent를 제조하였다. 농도별로 희석한 시료와 FRAP reagent 900 µL를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조시료로는 ascorbic acid를 사용하였고, 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM의 농도로 제조한 표준물질 FeSO₄·7H₂O의 검량곡선에 따라 FRAP value를 얻었다.

총폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(18)으로 측정하였다. 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co.) 시약과 증류수를 섞은 혼합액과 시료를 1:1로 섞어 암실에서 방치한 후, 20% sodium carbonate(Na₂CO₃, Junsei Chemical Co., Ltd., Chuo-ku, Japan) 3 mL를 가해 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 페놀성 화합물의 함량은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검량곡선에 대입하여 산출하였다.

세포주 및 세포 배양

RAW 264.7 세포(mouse macrophage)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 1% penicillin-streptomycin(Sigma-Aldrich Co.)과 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기(BB 15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

RAW 264.7 세포의 WST assay

96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10⁴ cells/mL의 농도로 100 µL씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL 농도의 시료를 24시간 처리하였다. 배양 후 EZ-Cytox WST assay reagent(Daeil Lab Service Co., Ltd., Seoul, Korea)를 10 µL씩 첨가한 후, 1시간 뒤에 ELISA reader(Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물이 처리된 세포의 생존 정도는 대조구의 생존 정도 대비 %로 나타내었다.

RAW 264.7 세포의 nitric oxide(NO) 및 cytokines(TNF- α , IFN- γ) 분비량 측정

RAW 264.7 세포 현탁액을 4×10^5 cells/mL의 농도로 48 well plate에 500 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 1 μ g/mL 농도의 LPS(from *Escherichia coli* O111:b-4, LPS; Sigma-Aldrich Co.)와 산겨릅나무 추출물을 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포로부터 생성된 NO의 함량은 Griess reagent(Sigma-Aldrich Co.) 시약을 이용하여 측정하였다. 표준물질로는 NaNO₂(sodium nitrite, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다. TNF- α 생성량 측정은 추출물을 처리한 세포의 배양액에서 TNF- α ELISA kit(Cat No. 558534, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. INF- γ 생성량 측정 역시 추출물과의 배양 후 상층액을 얻어 INF- γ ELISA kit(Cat No. 555138, BD Biosciences)을 사용하여 측정하였다. TNF- α 및 INF- γ 모두 흡광도는 450 nm에서 측정하였다.

실험동물 설계 및 시료수집

RAW 264.7 세포를 대상으로 *in vitro* 실험에서 확인한 항염증 효능을 LPS 투여 염증 model mouse에서 확인하고자 동물 실험을 수행하였다. 본 실험에 사용한 동물은 평균 체중이 54.10 ± 3.99 g인 ICR계의 수컷 mouse(Samtako Co., Osan, Korea)로서 사육환경은 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암은 12시간 간격, 조도는 150~300 lux로 유지하였다. 사육기간 동안 일반 고형사료와 물을 충분히 공급하였으며 동물실험의 모든 과정은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 연구계획서 승인(CNU-00724)을 받고 수행하였다. 실험동물은 군당 3마리씩 2군으로 나누어 대조군과 실험군으로 하였다. 실험 전에 같은 조건의 ICR mouse에 LPS를 투여하여 혈중 TNF- α 와 IFN- γ 가 증가하는 것을 확인하였다. 대조군에는 멸균 PBS 100 μ L/mouse를, 실험군에는 95% 산겨릅나무 에탄올 추출물을 100 mg/kg body weight의 용량으로 PBS에 녹여 매일 같은 시간에 7일간 경구투여하였다. 대조군은 C(Control)로, 실험군은 ATE(*Acer tegmentosum* Maxim ethanol extract)로 명명하였다. 마지막 경구투여 후 12시간 절식시킨 동물에 LPS를 2.5 mg/kg B.W 용량으로 복강 투여하였다. LPS 투여 8시간 후에 미정맥에서 혈액을 채혈한 후 소장을 적출하였다. 혈액 일부는 헤파린 처리된 튜브(Heparinized Capillary Tubes; Cat No. 2501, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC., Rockwood, TN, USA)를 이용하여 전혈 상태로 Comet assay에 사용하였고, 나머지 혈액은 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리한 후 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 적출한 소장은 잘라 펼치고 Payer's patch를 제거한 후 3 cm 정도의 크기로 잘라 Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS; Gibco)으로 3회 세척하였다. 소장 절편을 1 mM dithiothreitol

(DTT; Bio-Rad)와 혼합하여 실온에서 10분간 처리하여 점액질을 제거한 후 37°C Shaking water bath(ANY-3D-S, Seoulin Bioscience Co., Seongnam, Korea)에 Dispase II (DISPASE II, Godo Shusei Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 30분간 처리하여 점막세포를 분리하였다. 분리된 점막세포를 수거하여 100 μ m cell strainer(BD Biosciences)에 여과한 후 2,500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 cell pellet을 얻어 RNA 추출에 사용하였다.

립프구 DNA fragmentation 분석(single-cell electrophoresis assay: comet assay)

실험동물들의 림프구 DNA 손상을 측정하기 위해 comet assay를 실시하였으며 그 방법은 선행연구인 Tice 등(19)의 방법을 참고하여 수행하였다. 간략하면 시료로 전혈 5 μ L를 취해 0.5% normal melting agarose(NMA)가 도포된 slide 위에 분주하고 cover glass로 덮어 굳힌 후 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)를 처리하여 DNA의 이중나선을 풀어주었다. Lysis가 끝난 DNA 시료에 대하여 20분간 전기영동을 실시하여 DNA를 unwinding 시켰다. Comet 분석을 위해 20 μ g/mL ethidium bromide로 형광 염색한 후 광학현미경(light microscope DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였으며, Komet 5.5 image analyzing system(Andor, Nottingham, UK)으로 분석하여 손상된 DNA 분절이 핵으로부터 이동해서 생긴 꼬리 부분의 DNA 비율(tail DNA), tail length(TL), 그리고 tail DNA와 tail length로부터 산출된 tail moment(TM)로 나타내었다.

혈청 cytokines(TNF- α , IFN- γ) 분비량 측정

혈청의 염증 관련 cytokine으로 TNF- α 및 INF- γ 생성량을 측정하였다. TNF- α 는 혈청을 1.5배 희석한 후 TNF- α ELISA kit(Cat No. 558534, BD Biosciences)을 이용해 상기한 방법대로 측정하였다. INF- γ 는 혈청을 2배 희석한 후 INF- γ ELISA kit(Cat No. 555138, BD Biosciences)을 이용해 상기한 방법대로 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

장점막세포(intestinal epithelial cell) 용액에 Tri-reagent(BioFACT Co., Daejeon, Korea) 300 μ L를 넣고 5분간 정치한 후, chloroform 60 μ L를 넣고 15분간 정치하여 원심분리 하여 얻은 상층액을 isopropanol 150 μ L와 혼합하였다. 10분간 실온에 정치한 후 12,000 $\times g$ 에서 8분간 원심분리 하여 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet에 75% 에탄올을 300 μ L 넣어 잘 섞은 후 12,000 $\times g$ 에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거한 다음 실온에서 2~3분간 건조시켰다. RNase free water를 70 μ L 넣어 잘 섞은 후 55°C의 water bath에서 15분간 방치시켰다. RNA 정량은 NanoDrop (NanoDrop ONE, Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용

하였다. cDNA 합성은 RT-Kit(M-MLV, RNase H⁻(BioFACT Co., Daejeon, Korea)을 이용하여 제시된 방법대로 하였으며, 역전사에 의한 cDNA synthesis는 50°C에서 60분간, RTase inactivation은 95°C에서 5분간 처리하였다.

TNF- α 와 IL-6 mRNA 발현 측정

장점막세포의 TNF- α 와 IL-6 mRNA의 발현 정도의 측정은 iQTMSYBR[®] Green Supermix(Bio-Rad)를 이용하여 AriaMx Real-Time PCR System(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에서 진행하였다. Initial denaturation은 95°C에서 2분간, denaturing은 95°C에서 10초간, annealing 및 extension은 58°C에서 30초간 진행하여 총 증폭주기는 40 cycle을 실행하였다. 측정 결과는 AriaMX PC Software 1.0 Installer(Agilent Technologies)를 사용하여 분석하였다. 실험에 사용한 primer는 Table 1과 같다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 SPSS/Windows version 21.0 (IBM Corporation, New York, NY, USA)을 사용하여 실시하였으며, 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다. 두 군간 평균값의 차이에 대한 유의성 검증은 Student's *t*-test로 실시하였으며, 그 외의 실험에서는 일원배치 분산 분석(one-way ANOVA) 후 Duncan's multiple range test로 변인 간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은

$\alpha=0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

산겨릅나무 추출물의 항산화 활성

산겨릅나무 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 수율은 각각 10.3%, 5.7%로 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 높은 수율을 나타내었다(데이터 미제시). 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물과 ascorbic acid의 DPPH 및 ABTS 라디칼 제거능을 측정된 결과는 Table 2와 같다.

DPPH 라디칼 제거능을 측정된 결과 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 라디칼 제거능이 증가하는 경향을 보였으며, 50 μ g/mL의 농도에서 각각 48.74 \pm 0.79%, 69.35 \pm 0.30%의 제거능을 나타내었다. Cho 등(20)의 연구 결과에서 산겨릅나무 열수 추출물 50 μ g/mL 농도에서 약 43%의 라디칼 제거능을 나타낸 것으로 보아 본 연구 결과의 열수 추출물이 약 1.13배, 에탄올 추출물이 약 1.61배 높은 항산화능을 나타내었다. 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 IC₅₀값은 각각 50.74 \pm 0.83 μ g/mL, 33.15 \pm 0.73 μ g/mL로 나타나 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 높은 항산화능을 보였다($P<0.001$). 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 제거능을 측정된 결과는 50 μ g/mL의 농도에서 각각 18.19 \pm 0.60%, 42.54 \pm 8.20%였으며, IC₅₀값은 142.74 \pm 9.42 μ g/mL, 62.35 \pm 15.13 μ g/mL였

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Primer	Sequence ¹⁾
β -Actin	Forward	GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG
	Reverse	CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T
TNF- α	Forward	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A
	Reverse	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
IL-6	Forward	CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG
	Reverse	AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG

¹⁾Primers are shown 5' \rightarrow 3'.

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of *Acer tegmentosum* Maxim extracts

	Samples	Concentration (μ g/mL)	Scavenging activity (%)	IC ₅₀ (μ g/mL) ¹⁾	<i>t</i> -value
DPPH radical scavenging activity	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim water extracts	50	48.74 \pm 0.79 ²⁾	50.74 \pm 0.83	27.487 ^{***}
	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim 95% ethanol extracts	50	69.35 \pm 0.30	33.15 \pm 0.73	
	Ascorbic acid	5	36.69 \pm 3.68	6.67 \pm 0.81	
ABTS radical scavenging activity	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim water extracts	50	18.19 \pm 0.60	142.74 \pm 9.42	7.814 ^{**}
	<i>Acer tegmentosum</i> Maxim 95% ethanol extracts	50	42.54 \pm 8.20	62.35 \pm 15.13	
	Ascorbic acid	5	10.11 \pm 0.31	22.90 \pm 1.56	

¹⁾The concentration in μ g/mL required for 50% reduction of DPPH and ABTS radical.

²⁾Mean \pm SD (n=3).

^{***} $P<0.001$, ^{**} $P<0.01$.

Table 3. FRAP value and total polyphenol contents of *Acer tegmentosum* Maxim extracts

Sample	FRAP value (mM)	Polyphenol contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ GAE) ¹⁾
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim water extracts	0.19 \pm 0.01 ²⁾	118.91 \pm 2.18
<i>Acer tegmentosum</i> Maxim 95% ethanol extracts	0.42 \pm 0.01	196.92 \pm 1.53
<i>t</i> -value	-33.365 ^{***}	-50.736 ^{***}

¹⁾GAE: gallic acid equivalents.

²⁾Mean \pm SD (n=3).

^{***}*P*<0.001.

다. 앞에서 보고된 DPPH 라디칼 제거능에서 보인 결과와 마찬가지로 산겨릅나무 열수 추출물보다 에탄올 추출물의 항산화 효과가 더 높은 것으로 나타났다(*P*<0.01). ABTS 라디칼 제거능보다 DPPH 라디칼 제거능이 모든 추출물에서 높게 나왔는데 이 차이는 DPPH는 자유라디칼이고, ABTS는 양이온 자유라디칼이므로 항산화 성분의 화학적 특성에 따라 각 라디칼과 결합하는 활성에 차이가 있기 때문(21)이라고 보고 있다.

FRAP와 총페놀 함량을 측정한 결과는 Table 3에 나타났다. DPPH 라디칼 제거능이나 ABTS 라디칼 제거능과는 달리 FRAP는 환원제에 의해 산성 pH에서 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 전환되는 과정을 이용하여 시료의 항산화 활성을 평가하게 된다(22,23). 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 FRAP value는 각각 0.19 \pm 0.01 mM, 0.42 \pm 0.01 mM로 산겨릅나무 에탄올 추출물의 FRAP value가 열수 추출물보다 높았다(*P*<0.001). Gallic acid equivalents(GAE)로 표시한 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 총폴리페놀 함량은 각각 118.91 \pm 2.18 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 196.92 \pm 1.53 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었다.

본 연구에서 산겨릅나무 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 총폴리페놀 함량 및 FRAP value가 더 높게 나왔는데, 이는 Sánchez-González 등(24)이 총폴리페놀 함량과 FRAP

value가 높은 상관관계가 있다고 보고한 것과 일치한다. Choi 등(25)의 연구에서는 산겨릅나무 열수 추출물 및 에탄올의 총폴리페놀 함량이 각각 171.93 \pm 2.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 152.69 \pm 1.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났으나 본 연구에서는 에탄올 추출물의 총폴리페놀 함량이 더 높게 나타났다. 이는 Choi 등(25)의 연구에서는 산겨릅나무 에탄올 추출물은 70% 에탄올로 24시간 동안 추출했지만, 본 연구에서는 95% 에탄올로 일주일간 추출하는 등 에탄올의 농도 및 추출 시간이 다르기 때문으로 판단된다. 산겨릅나무와 마찬가지로 단풍나무과인 신나무의 추출물 및 분획물을 대상으로 항산화 실험을 시행한 Han 등(26)의 선행연구 결과와 비교하여 볼 때 전반적으로 산겨릅나무 추출물이 더 강한 활성을 나타내었다.

RAW 264.7 세포에서 세포 독성 평가

산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 세포독성 실험은 WST assay를 통해 측정하였으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 대조군에 비하여 세포생존율이 90% 이상인 시료 농도를 무독성 안전 농도로 간주하는데, 산겨릅나무 열수 추출물은 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 보여 독성은 없는 것으로 확인되었다. 산겨릅나무 95% 에탄올 추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 제외한 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 보여 독성이 없었으나 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 세포생존율이 87.65%로 약간 낮게 나타났다. 그러나 본 연구에서는 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 농도 범위 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 시료로 사용하였다.

RAW 264.7 세포에서 산겨릅나무 추출물의 항염증 효과

산겨릅나무 열수 및 에탄올의 항염증 측정 결과는 Fig. 2에 나타내었다. NO는 반응성이 강한 이원자 자유라디칼로, NO를 형성하는 iNOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환하면서 NO를 생성하는데, 이것은 인체에서 중요한 생리적 혹은 병적인 반응에 관여한다(27). LPS는 그람음성 세균의 세포벽 물질로서 산화적 스트레스를 유발하며 면역세포 등을 자극하여 NO 생성을 증가시킨다고 알려져 있다

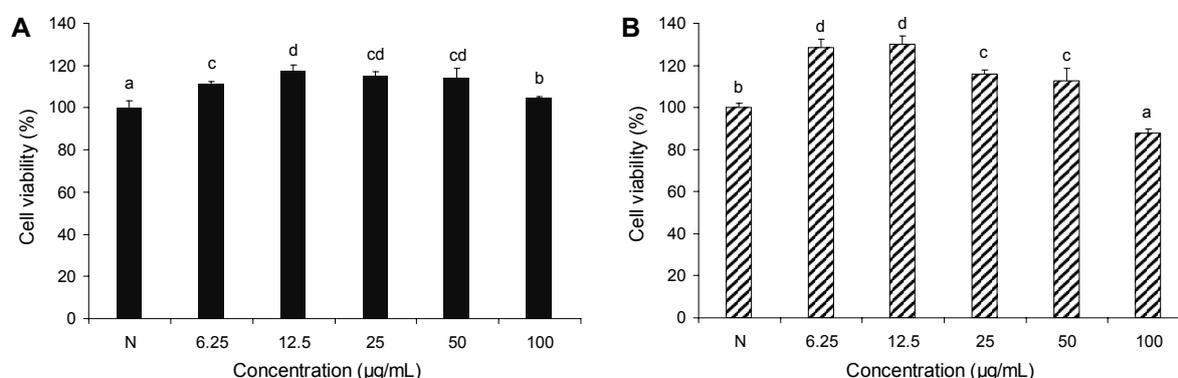


Fig. 1. Effect of the (A) water (closed bar) and (B) 95% ethanol (hatched bar) extracts of *Acer tegmentosum* Maxim on RAW 264.7 cell viability. RAW 264.7 macrophages were treated with water and 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Treated cells were estimated by the WST assay. Each bar represents the mean \pm SD. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$. N: normal.

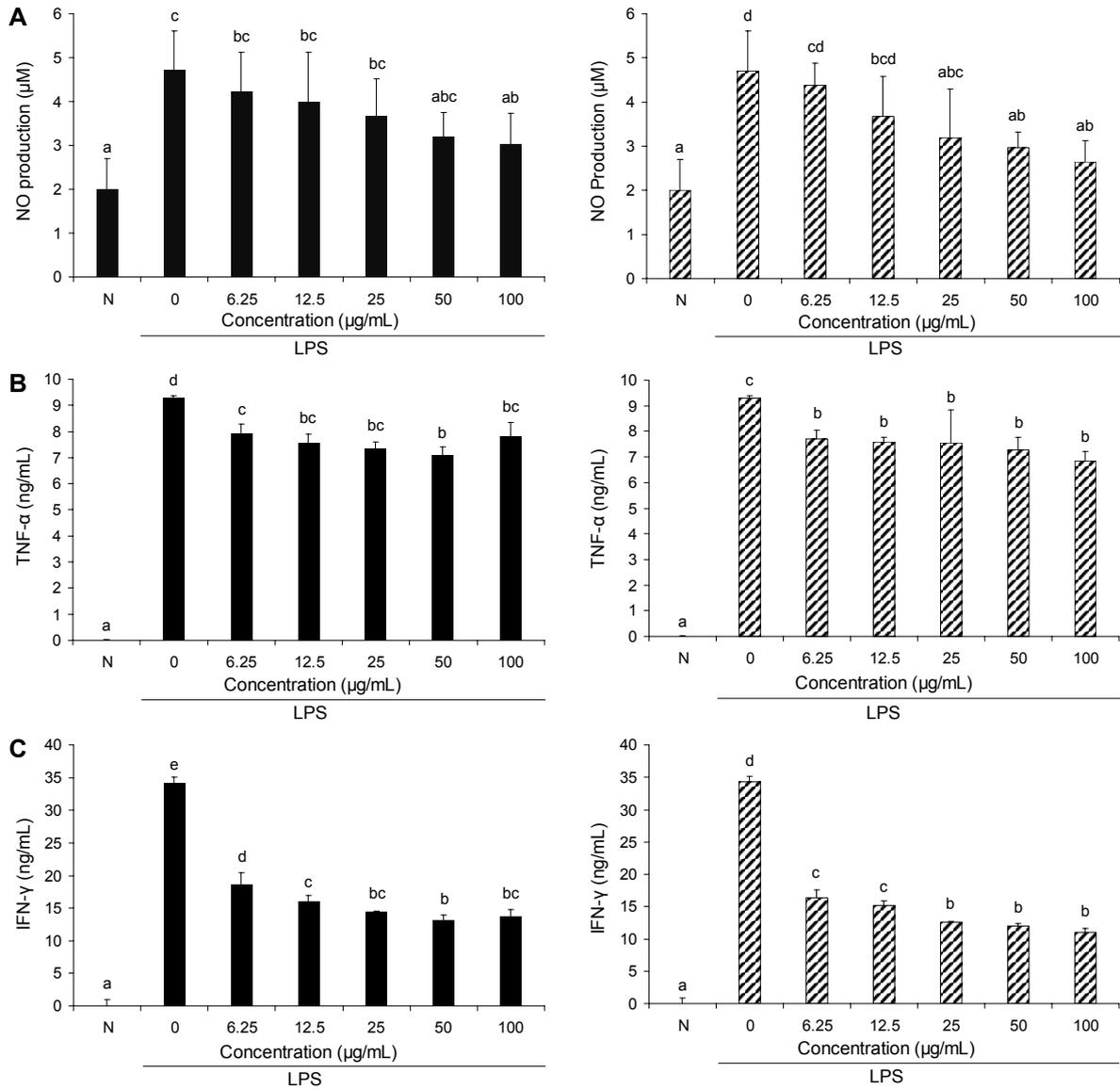


Fig. 2. Effect of the water (closed bar) and 95% ethanol (hatched bar) extracts of *Acer tegmentosum* Maxim on (A) NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, (B) TNF- α production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, (C) IFN- γ production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were treated with water and 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Each bar represents the mean \pm SD. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$. N: normal.

(28). 따라서 본 연구에서는 LPS를 처리하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유도하여 NO를 과생성하는 조건을 형성한 후, 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물을 처리하여 NO 생성 억제에 미치는 영향을 측정하였다. LPS만 단독적으로 처리한 대조군에서 생성된 NO 농도는 $4.71\pm 0.90\ \mu\text{M}$ 로 LPS를 처리하지 않은 정상대조군 $2.01\pm 0.69\ \mu\text{M}$ 보다 2.3배 이상 높아($P<0.05$) LPS에 의해 염증반응이 충분히 유도되었음을 확인하였다. LPS와 산겨릅나무 열수 추출물로 함께 처리한 군에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서만 LPS 단독 처리군보다 NO 생성이 유의하게 억제되었으나, 산겨릅나무 95% 에탄올 추출물 처리군에서는 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서

LPS 단독 처리군보다 NO 생성이 유의하게 억제되었다.

TNF- α 측정 결과 LPS만 단독적으로 처리한 음성대조군에서 $9.29\pm 0.10\ \text{ng/mL}$ 로 높은 TNF- α 분비량을 보였으며 산겨릅나무 추출물 처리 시 TNF- α 분비는 음성대조군에 비하여 두 추출물의 모든 농도에서 유의하게 감소했다($P<0.05$). 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물을 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 $7.07\pm 0.42\ \text{ng/mL}$, $7.27\pm 0.62\ \text{ng/mL}$ 의 분비를 보여 음성대조군 대비 각각 24%, 22%의 억제 효과를 보였다. Yu 등(13)은 RAW 264.7 세포는 LPS 처리로 TNF- α 의 mRNA 수준이 증가하였으나, 산겨릅나무 70% 에탄올 추출물을 처리함에 따라 TNF- α 의 mRNA 수준이

크게 감소하였다고 보고하였는데 이는 본 연구 결과와 유사하였다.

추출물 처리가 INF- γ 억제에 영향을 미치는지 확인하기 위해 실험을 수행한 결과 LPS만 단독적으로 처리한 음성대조군에서 34.26 ± 0.85 ng/mL로 높은 INF- γ 분비량을 보였으나 LPS와 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물을 함께 처리한 모든 농도에서 INF- γ 분비량이 유의하게 억제되었으며 ($P < 0.05$), 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 억제 효과가 높았다. 따라서 본 연구에서의 항염증 실험 결과로 보아 산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물은 염증 관련 사이토카인들을 억제함으로써 염증 질환 예방에 효과적인 것으로 판단되며, 산겨릅나무 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

LPS 염증 유도 동물 모델에서 산겨릅나무 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효과

산겨릅나무 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 실험과 RAW 264.7 세포에서의 실험 결과를 종합해 보았을 때 산겨릅나무 열수 추출물보다 산겨릅나무 에탄올 추출물의 효과가 우수하였으므로 산겨릅나무 에탄올 추출물만을 이용하여 동물실험을 통하여 생리활성을 확인하였다.

Comet assay를 이용한 산겨릅나무 에탄올 추출물의 LPS에 의한 산화적 DNA 손상 억제 효과에 대한 결과는 Table 4에 나타내었다. Tail DNA의 경우 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았지만 대조군보다 낮은 경향을 보였다($P = 0.061$). Tail length는 산겨릅나무 에탄올 추출물 투여군이 대조군보다 유의하게 짧았으며($P < 0.01$), tail moment 역시 산겨릅나무 에탄올 추출물 투여군이 대조군보다 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 이상의 결과에서 산겨릅나무 에탄올 추출물은 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있는 것으로 판단되었다.

TNF- α 는 대식세포에서 합성되고 감염, 염증에 관여하여

Table 4. Levels of DNA damage expressed as tail DNA, tail length, and tail moment in mouse whole blood treated 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim

Treatment ¹⁾	C	ATE	P-value
Tail DNA (%)	10.8 ± 1.23 ²⁾	7.41 ± 1.91	0.061
Tail length (μm)	39.4 ± 5.25	21.38 ± 2.15	0.005
Tail moment	5.41 ± 1.18	2.68 ± 1.20	0.049

¹⁾C (Control): treated with LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h, ATE: treated with 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (100 mg/kg body weight) for seven days and LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h.

²⁾Mean \pm SD (n=3).

종양괴사인자로 암세포 괴사, 조직손상, 다른 사이토카인의 발현 등에 역할을 하는 사이토카인이며(29,30), INF- γ 는 내재 면역반응에 관여하는 대식세포를 활성화시키는 역할을 하는 사이토카인으로 알려져 있다(31). LPS로 염증을 유도한 실험동물 모델의 혈청에서 TNF- α 및 INF- γ 의 농도를 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. TNF- α 의 생성량은 LPS만 투여한 대조군보다 시료를 함께 투여한 실험군에서 대조군의 35%로 유의하게 낮게 나타났다($P < 0.01$). INF- γ 생성량은 대조군보다 실험군에서 대조군의 약 10%로 유의하게 낮게 나타났다($P < 0.05$). 동물 실험 결과 1주일 정도의 단기간 산겨릅나무 에탄올 추출물의 투여로 TNF- α 와 INF- γ 와 같은 염증 관련 cytokine의 생성이 억제되어 산겨릅나무 에탄올 추출물은 염증 질환 예방에 효과적인 기능성 소재로 판단된다. Jin 등(32)의 연구에서 rat의 스트레스를 높이기 위하여 강제수영실험을 하였는데, 산겨릅나무 70% 에탄올 추출물을 처리한 후 강제수영실험을 시킨 실험군은 추출물을 처리하지 않고 강제수영실험만 시킨 대조군보다 IL-6 및 TNF- α 분비량을 유의적으로 억제하는 효과를 보였다. 다만 고농도의 산겨릅나무 에탄올 추출물은 세포 독성을 나타낼 수 있으므로 향후 안전성에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다.

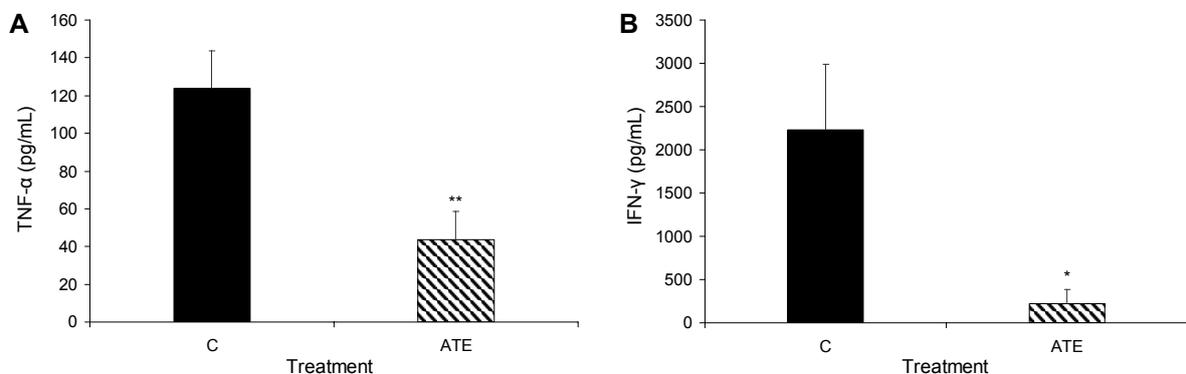


Fig. 3. Effect of the 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim on serum TNF- α production (A) and IFN- γ production (B) in LPS-stimulated ICR mouse. ICR mice were treated with 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (100 mg/kg body weight) for seven days and LPS (2.5 mg/kg body weight) for 8 h. Each bar represents the mean \pm SD, n=3 (each group). Mean with an asterisk is significantly different from control by Student's *t*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). C: Control (treated with PBS for seven days and LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h), ATE: treated with 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (100 mg/kg body weight) for seven days and LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h.

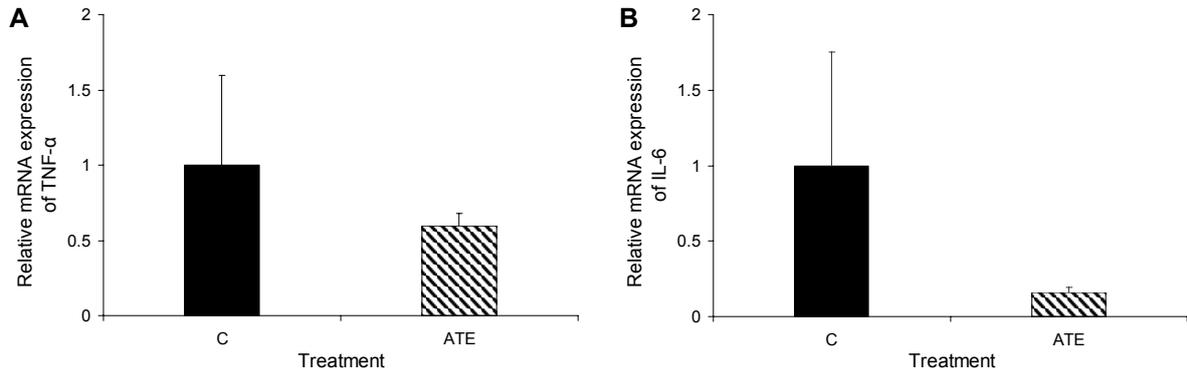


Fig. 4. Effect of the 95% ethanol extract of *Acer tegmentosum* Maxim on (A) relative mRNA expression of TNF- α and (B) relative mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated ICR mouse intestinal epithelial cells. Effects of *Acer tegmentosum* Maxim ethanol extract on the cytokine expression and production of inflammatory mediators in ICR mice. Total RNA was prepared from the intestinal epithelial of ICR mice were treated with 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (100 mg/kg body weight) for seven days and LPS (2.5 mg/kg body weight) for 8 h and qPCR was performed. Each bar represents the mean \pm SD, n=3 (each group). C: Control (treated with PBS for seven days and LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h), ATE: treated with 95% ethanol extracts of *Acer tegmentosum* Maxim (100 mg/kg body weight) for seven days and LPS 2.5 mg/kg body weight for 8 h.

산겨릅나무에 대한 간 보호 효과(11,12)는 잘 알려져 있지만, 인간 면역세포의 약 70~80%가 밀집되어 있는 장점막 세포에서의 면역기능과 연관된 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 따라서 산겨릅나무 에탄올 추출물이 장점막세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써 염증 증상을 완화시킬 수 있는지 알아보기 위하여 장점막세포에서 대조군과 실험군의 TNF- α 와 IL-6의 상대적인 mRNA 발현량을 비교하였으며 결과는 Fig. 4와 같다. LPS 처리로 인해 발현이 높아진 ICR mouse의 장점막세포에서 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현은 산겨릅나무 에탄올 추출물에 의해 감소하는 경향을 보였다. 대조군 대비 실험군의 TNF- α mRNA 발현량은 59%, 대조군 및 실험군의 IL-6 mRNA 발현량은 16%로 산겨릅나무 에탄올 추출물은 LPS에 의해 증가한 TNF- α 및 IL-6의 mRNA 발현을 억제하는 경향을 보였으며 TNF- α 보다 IL-6의 mRNA 발현이 더 크게 나타났다. 소화기관의 점막에 분포하는 세포 중 10~50%는 대식세포이며, 이 세포가 활성화되면 TNF- α 와 IL-6 등을 분비한다(33). 대식세포는 LPS 처리 시 NF- κ B를 활성화하여 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 와 같은 사이토카인들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(34). 그러므로 산겨릅나무 추출물을 투여 받은 mouse의 소장점막세포에서 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현량이 감소하였다는 사실은 산겨릅나무 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인의 유전자 발현 단계를 조절하여 이들 사이토카인의 생성을 억제할 수 있음을 의미하며, 장의 염증 증상 완화에 대한 긍정적인 영향을 확인하기 위해서는 더욱 많은 추가 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

요 약

산겨릅나무 80°C 열수 및 95% 에탄올 추출물을 제조하여 항산화 및 항염증 효과를 확인한 결과 추출물은 우수한 항산

화 효과를 나타내었고 RAW 264.7 세포에서도 항염증 효과를 보였으며, 그중 95% 에탄올 추출물의 효능이 더 큰 것으로 나타났다. 따라서 효능이 더 뛰어난 산겨릅나무 에탄올 추출물을 이용하여 *in vivo* 실험에서 추출물의 세포 보호 효과 및 항염증 효능을 재확인하였다. ICR mouse에 일주일 간 100 mg/kg B.W 산겨릅나무 에탄올 추출물을 경구투여한 후 LPS를 처리하여 염증반응 및 산화적 스트레스를 유도시켜 Comet assay, serum tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interferon- γ , 장점막세포에서의 TNF- α 와 interleukin-6에 대한 생성능을 측정하 결과 산겨릅나무 에탄올 추출물은 DNA 손상을 억제하였으며 사이토카인 생성을 유익적으로 억제하여 항산화와 항염증 효과를 보였다. 따라서 본 연구에서 사용한 산겨릅나무의 에탄올 추출물은 산화적 스트레스 및 염증을 억제하는 효과를 나타내는 세포보호 기능적 소재로서 가능성이 있는 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 충남대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Co., New York, NY, USA. p 968.
- Olefsky JM, Glass CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246.
- Valledor AF, Comalada M, Santamaria-Babi LF, Lloberas J, Celada A. 2010. Macrophage proinflammatory activation

- and deactivation: a question of balance. *Adv Immunol* 108: 1-20.
5. Jung SH, Kim SJ, Jun BG, Lee KT, Hong SP, Oh MS, Jang DS, Choi JH. 2013. α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE₂ production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 147: 208-214.
 6. Yu A, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD, Choi HD. 2012. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1671-1676.
 7. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9: 1042-1048.
 8. Lee EJ, Kim C, Kim JY, Kim SM, Nam D, Jang HJ, Kim SH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH, Jung SH, Ahn KS. 2012. Inhibition of LPS-induced inflammatory biomarkers by ethyl acetate fraction of *Patrinia scabiosaeifolia* through suppression of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 282-291.
 9. Kim T. 1996. *The woody plants of Korea in color*. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Korea. p 476.
 10. Park KM, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR. 2006. Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* maxim. *Arch Pharm Res* 29: 1086-1090.
 11. Lee S, Moon G. 2010. Effects of mixture with *Hovenia dulcis* Thunb and *Acer tegmentosum* Maxim on liver failure induced by D-galactosamine in rats. *J Korean Orient Int Med* 31: 11-24.
 12. Lee SB, Woo HJ. 2010. A study of the inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Max. on fibrogenesis in hepatic stellate cell line T6. *J Korean Orient Int Med* 31: 346-355.
 13. Yu T, Lee J, Lee YG, Byeon SE, Kim MH, Sohn EH, Lee YJ, Lee SG, Cho JY. 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *J Ethnopharmacol* 128: 139-147.
 14. Tung NH, Ding Y, Kim SK, Bae K, Kim YH. 2008. Total peroxyl radical-scavenging capacity of the chemical components from the stems of *Acer tegmentosum* Maxim. *J Agric Food Chem* 56: 10510-10514.
 15. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 16. Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379-389.
 17. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
 18. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
 19. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.
 20. Cho EK, Jung KI, Choi YJ. 2015. Anti-diabetic, alcohol metabolizing enzyme and hepatoprotective activity of *Acer tegmentosum* Maxim. stem extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1785-1792.
 21. Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
 22. Lee HR, Jung BR, Park JY, Hwang IW, Kim SK, Choi JU, Lee SH, Chung SK. 2008. Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. *Korean J Food Preserv* 15: 445-449.
 23. Arano MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73: 239-244.
 24. Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 90: 133-139.
 25. Choi JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung YT, Lee IS, Park JH, Kim HJ. 2013. Antioxidant and alcohol degradation activities of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim.. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 378-383.
 26. Han SS, Lo SC, Choi YH, Kim MJ, Kwak SS. 1999. Antioxidative compounds in extracts of *Acer ginnala* Max. *J Crop Sci Biotechnol* 7: 51-57.
 27. Lee HJ, Lee CW, Choi MS, Son DJ, Hong JT. 2006. Effects of esthetic essential oils on LPS-induced nitric oxide generation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 32: 111-116.
 28. Yoshitake J, Kato K, Yoshioka D, Sueishi Y, Sawa T, Akaike T, Yoshimura T. 2008. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric Oxide* 18: 223-228.
 29. Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. *J Immunol* 135: 3972-3977.
 30. Beutler B, Cerami A. 1987. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316: 379-385.
 31. Hayward AR, Chmura K, Cosyns M. 2000. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J Infect Dis* 182: 1001-1004.
 32. Jin BM, Lee GH, Hyun KY. 2014. Antidepressant effect of *Acer tegmentosum* Maxim on forced swimming test in the rat. *J KAIS* 15: 6739-6745.
 33. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2046-2050.
 34. Ji G, Zhang Y, Yang Q, Cheng S, Hao J, Zhao X, Jiang Z. 2012. Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF- κ B following AMP kinase activation in RAW 264.7 macrophages. *PLoS ONE* 7: e53101.