

채진목 에탄올 추출물의 항염증 효과 검증

이진영·유단희·주다혜·김소라·조희선*·주성현**·채정우*†

호서대학교 한방화장품과학과, *(재)경기도산림환경연구소, **경북대학교 임학과
(2016년 10월 27일 접수, 2017년 3월 17일 수정, 2017년 3월 24일 채택)

Anti-inflammatory Effects of *Amelanchier asiatica* Fruits Ethanol Extract

Jin-Young Lee, Dan-Hee Yoo, Da Hye Joo, So-Ra Kim, Hui-Seon Jo*, Sung-Hyun Joo**, and Jung-Woo Chae*†

Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, 20 Hoseo-ro, Baebang-eup, Asan,
Chungcheongnam-do 31499, Korea

*Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan, Gyeonggi-do 52319, Korea

**Department of forestry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

(Received October 27, 2016; Revised March 17, 2017; Accepted March 24, 2017)

요약: 본 연구에서는 채진목의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 대한 채진목 70% 에탄올 추출물의 효과를 살펴보았다. 채진목 70% 에탄올 추출물의 대식세포에서의 세포 독성 측정 을 MTT assay를 수행하였다. 세포 독성을 측정할 결과, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 96%의 세포 생존율을 나타 내었다. 항염증 활성을 효과적으로 검증하기 위해, LPS로 유도된 대식세포 내 NO 생산을 억제하는 효과를 Griess의 방법으로 조사하였다. 그 결과, 채진목 70% 에탄올 추출물에서 NO의 생성이 농도 의존적으로 저해되 었음을 확인하였다. 채진목 70% 에탄올 추출물을 western blot을 이용하여 단백질 발현을 측정할 결과 처리한 세포군에서 농도가 증가함에 따라 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량이 감소하여 최고 농도인 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 84.3%, 56.2%의 발현 억제를 보여주었다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 mRNA 발현량을 측정할 결과 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현량이 감소하여 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 89.8%, 84.9%로 나타내었다. 이러한 결과로 보아 채진목 70% 에탄올 추출물의 항염증에 관한 그 효능 을 확인할 수 있었고, 따라서 채진목 70% 에탄올 추출물이 천연 항염증 소재로써 가능성이 있다고 판단된다.

Abstract: This study investigated the anti-inflammatory activities and cell viability of *Amelanchier asiatica* (*A. asiatica*) 70% ethanol extracts against RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS). Cell toxicity test on macrophage cells (RAW 264.7) was performed by 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay and results showed 96% cell viability at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. Anti-inflammatory activity was examined via the inhibitory tests on the production of LPS induced NO in RAW 264.7 cells by Griess assay. The result showed that the extract inhibited NO production in concentration dependent manner. The iNOS and COX-2 protein expression inhibitory effects were confirmed by western blot and by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). From the former they were decreased by 84.3%, 56.2% at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, respectively, and from the latter decreased by 89.8%, 84.9% at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. In conclusion, this study showed the anti-inflammatory effects of *A. asiatica* extracts. Thus, this could be applied to an anti-inflammatory agent.

Keywords: *Amelanchier asiatica*, iNOS, COX-2, NO, anti-inflammatory

† 주 저자 (e-mail: forest1004@Korea.kr)
call: 031)8008-6658

1. 서 론

최근 경제와 과학 기술의 발달로 인해 평균 수명이 연장되어 고령자의 인구 비율이 증가하고 있는 추세이며, 외식문화가 발달하면서 수산물이나 야채 등과 같은 농작물을 주로 이용하던 우리나라의 식생활 문화를 변화시켜 암, 당뇨병, 비만 및 혈관성 질환 등의 식습관 질환이 자치하는 비율이 매년 증가하고 있다[1]. 또한 최근 산업화, 도시화가 심화되면서 주거환경 및 생활의 변화, 유전적 영향, 환경오염 등에 의해 발생하는 화학적, 생물학적 유해인자들에 대한 노출에 의해 다양한 연령층에서 면역조절 이상으로 유발된 염증 반응이나 알러지 및 아토피 질환과 같은 염증성 질환의 발생이 크게 증가하고 있다[2].

염증 반응은 체내에서 여러 가지 형태의 이물질이 외부로부터 침입하였거나 조직이 감염되어 생긴 물리적, 화학적 자극의 피부 손상을 방어하기 위하여 반응하는 현상을 말한다. 하지만 이러한 생체 방어 반응이 과잉으로 일어나면 염증 조직 주위에 있는 정상 조직을 손상시켜 염증 질환을 일으킨다[3]. 염증 반응이 일어날 때 자극에 의해 과잉 생성된 염증 매개인자로 tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β 등과 같은 염증 유도 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 발현을 유도하고[4], inducible nitric synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 암호화하는 유전자의 발현을 자극시켜 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PEG₂) 등의 염증 인자가 생성된다[5]. 일반적인 NO는 박테리아를 사멸시키거나 중양을 제거하는 중요한 역할을 하지만 NO의 과잉형성은 염증을 유발시켜 유전자를 변형시키거나 조직 및 신경의 손상을 일으킨다[6].

현재 개발되어진 일부 합성 염증 억제제는 그 효능과 부작용이 아직 확실히 검증되지 않아 안전성 면에서 문제점이 있으며, 가격이 고가라는 한계점이 있다. 그로 인해 면역 작용을 천연물질에서 찾아 면역력을 강화하거나 회복시키려는 연구에 대한 관심이 부각되고 있다. 특히 각종 식물의 뿌리, 열매, 꽃, 나무껍질, 뿌리껍질, 줄기, 잎, 종자 등의 모든 부위로부터 유래된 각종 한약재의 경우 오랜 처방으로 증명된 안전성과 효능을 인정받고 있으며, 건강식품, 건강보조식품, 바이오 식품, 한방화장품 등의 원료로 다양한 제품에 사용되고 있다. 각 소재로부터 유효성분을 분리하여

생리활성을 과학적으로 검증하는 연구가 진행되어지면 보다 안전하게 피부 트러블을 완화시켜 줄 수 있는 다양한 천연 소재 개발이 활발하게 진행될 것이다[7,8].

독요나무라 불리는 장미(Rosaceae)과 식물인 채진목(A. asiatica)은 낙엽활엽관목으로 주로 북반구 온대 지역인 한국, 중국, 일본에 널리 분포하고 있으며 미국에서도 생육되고 있는 나무이다[9]. 수피는 얇고 회백색이며, 잎은 호생하고 도란(倒卵)형으로 가는 거치가 있고 처음에는 양면에 선모가 있으나 점차 없어진다. 꽃은 양성이고 얇은 가지 끝에서 이른 봄 4-5월에 총상화로서 아름다운 백색 꽃이 달린다[10]. 전통적으로 한의학에서는 국내에서 자생하고 쉽게 얻을 수 있는 식물들을 약재로 사용해왔다. 채진목의 경우 널리 이용되고 있지는 않지만, 동물들이 그 열매를 먹이로 이용하고 있고, 북미에서 미국 채진목은 식용, 가공품의 재료로 널리 사용되어지고 있다. Chae 등의 연구결과와 같이 채진목의 항산화 활성 및 통풍과 고혈압, 주름개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 식품 및 기능성 화장품의 개발 가능성이 확인되었던 것으로 보아 충분히 생약 또는 천연 소재로 이용 가능성이 있을 것으로 판단된다[9].

따라서 본 연구에서는 채진목에 대한 항염증 효과를 검증함으로써 천연 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 추출

실험에 사용된 채진목 열매는 물향기 수목원에서 채취하였으며, 으갠 시료에 시료 중량의 10배 양의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24 h 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 Eyela evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결건조하여 -20 °C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. 기기 및 시약

세포 독성 측정에 사용된 MTT는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. Western blot에 β

-actin, iNOS, COX-2의 primary antibody와 goat anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Crus (USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 이용한 GoScript™ reverse transcription system은 Promega (USA)에서 구입하여 사용하였다. Rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), microcentrifuge (Gyrozen, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), microplate reader (Tecan, Austria), PCR (Astec, Japan), Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM system (Davinch-k, Korea), UV transilluminator (Biotop, Switzerland)을 사용하였다. Mini-Protean® Tetra cell과 Mini Trans-Blot® cell은 BioRad (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.3. 세포 배양

실험에 사용한 세포주인 RAW 264.7 cell은 한국 세포주 은행(Korea cell line bank)으로부터 구입하였으며, 세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, penicillin/streptomycin, trypsin은 Thermo Scientific (USA) 및 Gibco (USA)에서 구입하여 사용하였다. 37 °C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.4. MTT Assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[11]에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 5 × 10⁴ cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4 h 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 30 min간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.5. NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[12]에 따라 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 6-well plate에 RAW 264.7 cell을 1 × 10⁵ cell/mL로 분주하였다. 37 °C CO₂ incubator에서 24 h 배양한 이후 1X PBS로 2번 세척한다. LPS 10 µg/mL을 normal을 제외하고 처리한 후 2 h 이후 농도별로 조절한 시료용액을 처리하여 24 h 배양한 후 상등액을 얻은 후, 동량의 Griess 시약을 첨가하여 96-well plate에서 10 min 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO 억제능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.6. Western Blot을 통한 단백질의 발현 측정

iNOS, COX-2의 활성을 확인하기 위하여 cell line RAW 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1 × 10⁶ cells/well로 cell seeding 후 24 h 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 LPS를 1 µg/mL 농도로 2 h 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48 h 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tab를 가한 100 µL로 용해해서 4 °C 13,200 rpm에서 20 min간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 µL의 단백질을 10% SDS-PAGE사에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기(BioRad, USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1 h blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. iNOS, COX-2, β-actin의 1차 항체를 희석하여 4 °C에서 over night한 다음, 다시 10 min 간격으로 TBST로 3회 세척하였다. iNOS와 COX-2의 2차 항체는 anti-rabbit, β-actin의 2차 항체는 anti-mouse를 사용하고 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 2 h 배양하였다. 3회 washing한 후 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

2.7. RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정

2.7.1. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/well로 cell seeding한 뒤 24 h 동안 배양한 후 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 2 h 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 μL 를 분주하여 20 s간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20 min간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μL 가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20 min간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 13,200 rpm에서 5 min간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Diethylpyrocarbonate (DEPC)를 50 μL 씩 분주하여 녹인 후 96-well plate에 RNA 5 μL 와 멸균수 195 μL 를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 μL , 추출한 RNA (2 μg)와 nuclease free water로 10 μL 를 맞추고 75 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 min간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl_2 , PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 min간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

2.7.2. RT-PCR

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. PCR tube에 5X green GoTaq flexi buffer, MgCl_2 , PCR nucleotide mix (10 mM), primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. GAPDH, iNOS는 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 min, 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 min (40 cycles), COX-2는 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 min (40 cycles)을 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 40 min간 전기영동한 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

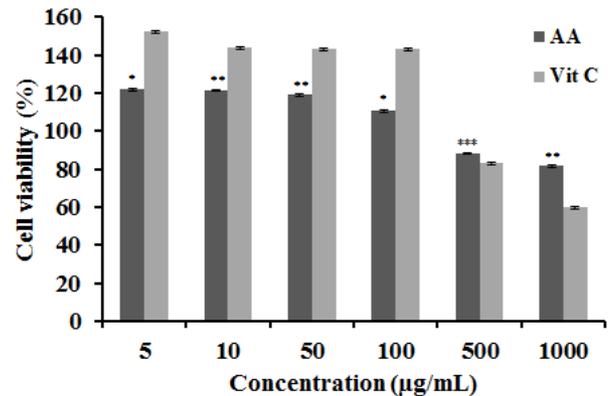


Figure 1. Cell viability of extract from *A. asiatica* in RAW 264.7 cells. Each value represents mean \pm S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.8. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석 (analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존을 확인

채진목 추출물에 의한 대식세포(RAW 264.7)의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인해 보았다. 채진목 추출물이 LPS로 유도된 macrophage cell의 세포 독성을 측정된 결과 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 80% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내었으며, 대조군인 vit. C는 같은 농도인 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60%의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 이하의 western blot 및 RT-PCR을 이용한 단백질 및 mRNA 발현 억제 실험은 80% 이상의 세포 생존율을 보인 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다(Figure 1).

3.2. NO 저해활성 측정 결과

본 연구에서는 활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성에 대한 채진목 추출물의 효과를 알아보았다. LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현량을 나타내었

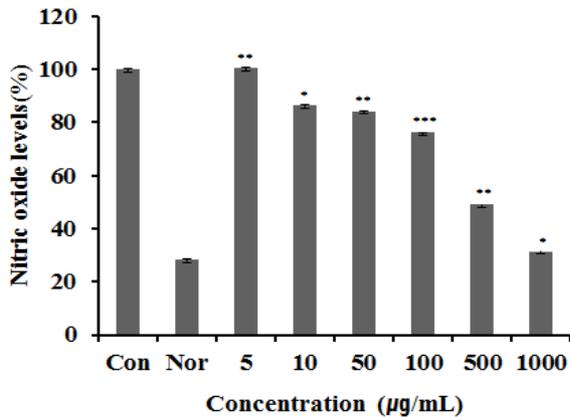


Figure 2. Effect of *A. asiatica* on production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. Each value represents mean ± S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

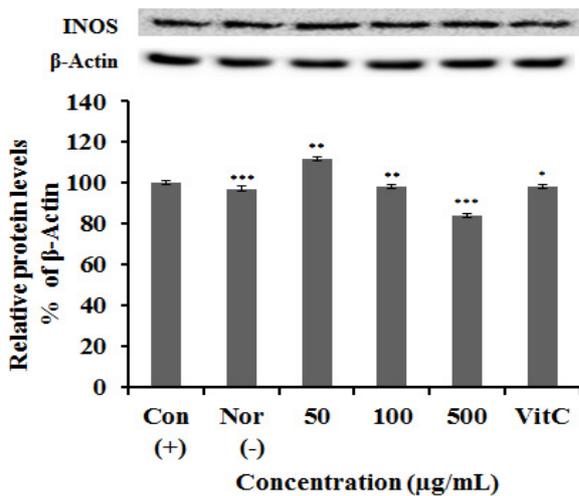


Figure 3. iNOS protein expression rate of extract from *A. asiatica* in RAW 264.7 cells. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/mL of extract from *A. asiatica* and incubation for 24 h. Each value represents mean ± S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

며 채진목 추출물을 처리한 군은 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2). 특히 1,000 µg/mL의 농도에서 31.4%의 저해율을 나타낸 것을 확인하였으며, 대식 세포주에서의 염증발현을 억제시키는 것에 채진목 추출물이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

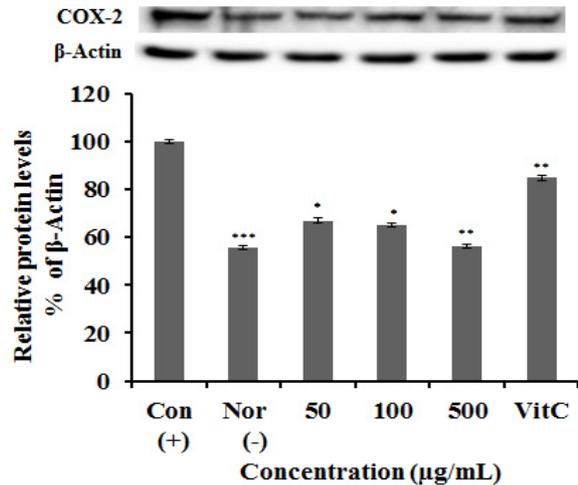


Figure 4. COX-2 protein expression rate of extract from *A. asiatica* in RAW 264.7 cells. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/mL of extract from *A. asiatica* and incubation for 24 h. Each value represents mean ± S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

3.3. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과 측정

염증유발 인자인 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 western blot을 이용하여 실험하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. LPS에 의해 증가된 RAW 264.7 세포에 채진목 추출물을 50, 100, 500 µg/mL의 농도로 처리하여 단백질 발현을 측정한 결과, iNOS와 COX-2 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 500 µg/mL에서 각각 84.3%, 56.2%의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 또한 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 대조군 Vit. C보다 채진목 추출물에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 감소하여 우수한 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 3, 4).

3.4. iNOS 및 COX-2 mRNA 발현 억제 효과 측정

염증유발 인자인 iNOS, COX-2 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 실험하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH을 positive control로 사용하였다. LPS에 의해 증가된 RAW 264.7

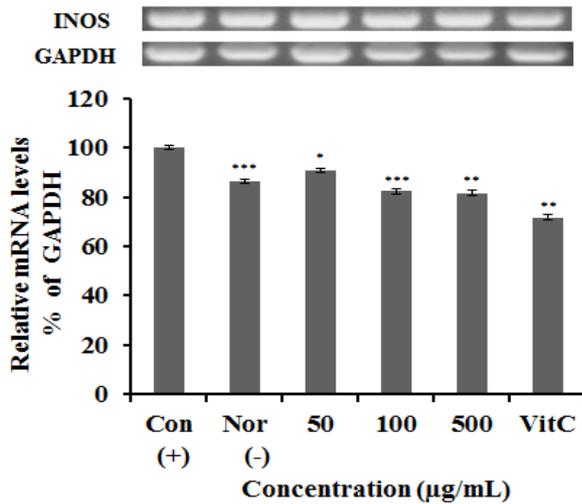


Figure 5. iNOS mRNA expression rate of extract from *A. asiatica* in RAW 264.7 cells. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/mL of extract from *A. asiatica* and incubation for 24 h. Each value represents mean \pm S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

세포에 채진목 추출물을 50, 100, 500 µg/mL의 농도로 처리하여 mRNA 발현을 측정 한 결과, iNOS와 COX-2 mRNA 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 500 µg/mL에서 각각 89.8%, 84.9%의 발현이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Figure 5, 6).

4. 결 론

채진목은 장미과에 속한 낙엽활엽관목으로 중국, 한국, 일본 등에 자생하며 미국에서도 생육하는 등 널리 분포되어 있으나 한의학에서는 자주 쓰이지는 않는다[8]. 장미과에는 아로니아(*Aronia melanocarpa*), 딸기(*Fragaria ananassa*), 산벚나무(*Prunus sargentii*), 라즈베리(*Rubus idaeus* var.), 모과나무(*Chaenomeles sinensis*), 블랙베리(*Rubus frondosa*), 복숭아(*Prunus persica*), 살구나무(*Prunus armeniaca*), 배(*Pyrus pyrifolia* var.), 사과(*Malus domestica*) 등이 있으며[13], 이러한 식물들은 식자재로서 사용되거나 민간 약재로서 이용되었다. 장미과 식물은 항산화[14,15], 항염증[16-18], 항암[19], tyrosinase 저해 활성[20,21], 피부 주름 생성 저해 활성[22] 등을 가진다고 알려져 있으며, 채진목 열매 추출

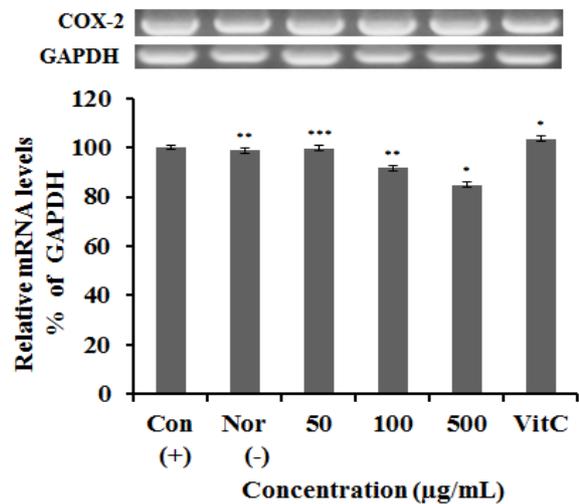


Figure 6. COX-2 mRNA expression rate of extract from *A. asiatica* in RAW 264.7 cells. After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50, 100 and 500 µg/mL of extract from *A. asiatica* and incubation for 24 h. Each value represents mean \pm S.D. of three individual experiments (significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

물에 대한 선행연구에서 높은 항산화력과 elastase 저해 활성을 보인 것[9]을 고려하였을 때 채진목 열매 추출물은 다양한 기능성을 가지고 있을 것으로 사료된다.

염증 반응은 체내에서 여러 가지 형태의 이물질이 외부로부터 침입하였거나 조직이 감염되어 생긴 물리적, 화학적 자극의 피부 손상을 방어하기 위하여 반응하는 현상을 말한다[3]. 염증반응에서 대식세포(macrophage)는 LPS나 interferon- γ 등의 자극을 받으면 염증 반응의 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)를 활성화시킨다. NF- κ B는 평상시에는 인산화된 inhibitor kappa B (I κ B)와 결합하여 불활성 상태이나, 자외선, cytokine, ROS, 항원, 이온화 등의 자극을 받으면 I κ B가 탈인산화되어 분리되고 NF- κ B가 활성화된다. 활성화된 NF- κ B는 핵으로 이동하여 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TRP- α), iNOS, COX-2 등 염증 반응을 유도하는 유전자의 발현을 촉진시킨다[23-25].

염증으로 인하여 발현된 iNOS는 L-arginine에서 NO를 합성하며[26], 생성된 NO는 항바이러스 및 항균 물질로서의 활성을 가지며 생체 내의 신호전달 물질로서의 역할을 하나 과도하게 생성된 NO는 염증반응을 심

화시키며 돌연변이 및 DNA 손상을 입힌다[27-29]. COX는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환하는 과정에 관여하는 효소로 COX-1은 대부분의 조직에서 항상 발현하여 위장관 보호, 신장 기능 조절 등 신체의 항상성 유지에 관여하며, COX-2는 염증 자극에 의해 발현되어 염증매개체인 PGE₂를 생산한다[30,31].

Yang 등은 같은 장미과에 속한 아로니아 열매 열수 추출물을 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell line에 처리하였을 시 NO 및 PGE₂의 생성이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였으며, 이러한 염증인자를 생성하는 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 역시 억제되는 것을 확인한 바 있다[17]. 아로니아 열매에 함유된 폴리페놀이 LPS로 유도된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것[18]과 Chae 등이 채진목 열매 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 항산화능이 높다고 보고한 것[9]을 고려하면 채진목에 함유된 폴리페놀에 의하여 iNOS와 COX-2의 발현이 억제되어 NO 및 PGE₂의 생성을 억제할 수 있다고 판단된다.

Reference

1. D. H. Jeong, K. B. W. R. Kim, B. K. Kang, S. A. Jung, H. J. Kim, H. Y. Jeong, S. W. Bark, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*, *KSBB Journal*, **27**(6), 325 (2012).
2. Y. Heo and H. A. Kim, Correlation between skin prick test and enzyme-linked immunosorbent assay using serum for identification of subjects positive to major respiratory allergens, *J. Env. Hlth. Sci.*, **34**(5), 369 (2008).
3. D. H. Jeong, K. B. W. R. Kim, B. K. Kang, S. A. Jung, H. J. Kim, H. Y. Jeong, S. W. Bark, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory activity of the *Undaria pinnatifida* water extract, *J. Appl. Biol. Che.*, **55**(4), 221 (2012).
4. J. K. Kundu and Y. J. Surh, Gearing the journey to cancer, *Mutat. Res.*, **659**(1-2), 15 (2008).
5. M. Miyataka, K. A. Rich, M. Ingram, T. Yamamoto, and R. J. Bing, Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2,

- Hypertension*, **39**(3), 785 (2002).
6. D. J. Stuehr, H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise, and C. F. Nathan, Purification and characteriazation of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: and FAD and FMN containing flavoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**(17), 7773 (1991).
7. G. H. Park, J. Y. Lee, D. H. Kim, Y. J. Cho, and B. J. An, Anti-oxidant and antiinflammatory effects of *Rosa multiflora* root, *J. Life Sci.*, **21**(8), 1120 (2011).
8. J. Ge, D. Wang, R. He, H. Zhu, Y. Wang, and S. He, Medicinal herb research: serum pharmacological method and plasma pharmacological method, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(9), 1459 (2010).
9. J. W. Chae, J. S. Kim, B. S. Jo, S. A. Kang, H. J. Park, S. H. Joo, S. S. Chun, and Y. J. Cho, Biological activity of ethanol extracts from *Amelanchier asiatica* Fruits, *J. Appl. Biol. Chem.*, **54**(4), 238 (2011).
10. H. S. Park, Characteristic and breeding methods from *Amelanchier asiatica*, *Landscaping tree*, **86**, 21 (2005).
11. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, **47**(4), 936 (1987).
12. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
13. S. Jung, C. Jusudurai, M. Staton, Z. Du, S. Ficklin, I. Cho, A. Abbott, J. Tomkins, and D. Main, GDR (genome database for *Rosaceae*): integrated web resources for *Rosaceae* genomics and genetics research, *BMC Bioinform.*, **5**(1), 130 (2004).
14. E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park, Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Phytomedicine*, **10**(6), 544 (2003).

15. K. S. Kim and S. K. Roh, Comparative study of anti-oxidant activity of apple and pear peel, *Korean J. Plant Res.*, **26**(3), 347 (2013).
16. H. Oku, Y. Ueda, and K. Ishifuro, Antipruritic effects of the fruits of *Chaenomeles sinensis*, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**(7), 1031 (2003).
17. H. Yang, K. H. Oh, and Y. C. Yoo, Anti-inflammatory effect of hot water extract of *Aronia* fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **44**(1), 7 (2015).
18. G. T. T. Ho, M. Bräunlich, I. Austarheim, H. Wangenstein, K. E. Malterud, R. Slimestad, and H. Barsett, Immunomodulating activity of *Aronia melanocarpa* polyphenols, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(7), 11626 (2014).
19. H. Gao, L. Wu, M. Kuroyanagi, K. Harada, N. Kawahara, T. Nakane, K. Umehara, A. Hirasawa, and Y. Nakamura, Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* Koehne and their activities in JB6 mouse epidermal cells, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(11), 1318 (2003).
20. Y. M. Kim, J. Yun, C. K. Lee, H. Lee, K. R. Min, and Y. Kim, Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **277**(18), 16340 (2002).
21. K. H. Kim, D. M. Kim, S. R. Yu, and H. S. Yook, Antioxidant and whitening activities of various cultivars of Korean unripe peaches (*Prunus persica* L. Batsch), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(2) 156 (2012).
22. Y. A. Jang, S. I. Yeo, and J. T. Lee, The research of pharmacological activation for sanguisorbae radix fractions as cosmetic material, *Kor. J. Herbology.*, **27**(2), 43 (2012).
23. C. F. Nathan, Secretory products of macrophages, *J. Clin. Invest.*, **79**(2), 319 (1987).
24. P. A. Baeurele and T. Henkel, Function and activation of NF- κ B in the immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, **12**(1), 141 (1994).
25. H. S. Yi, S. K. Heo, H. J. Yun, J. W. Choi, J. H. Jung, and S. D. Park, Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of draconis resina in mouse macrophage cells, *J. Herbology. Korea*, **23**(2), 179 (2008).
26. C. Nathan, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, **6**(12), 3051 (1992).
27. S. H. Snyder and D. S. Bredt, Biological roles of nitric oxide, *Sci. Am.*, **266**(5), 68 (1992).
28. R. Iyengar, D. J. Sutehr, and M. A. Marletta, Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and *N*-nitrosamines : precursors and role of the respiratory burst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**(18), 6369 (1987).
29. S. Guo, P. Qiu, G. Xu, X. Wu, P. Dong, G. Yang, J. Zheng, D. J. McClements, and H. Xiao, Synergistic anti-inflammatory effects of nobiletin and sulforaphane in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, *J. Agr. Food Chem.*, **60**(9), 2157 (2012).
30. M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett, Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**(1), 24 (1996).
31. B. D. Golden and S. B. Abramson, Selective cyclooxygenase-2 inhibitor, *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, **25**(2), 359 (1999).