

RAW 264.7 큰포식세포에서 상백피 및 상지 에탄올 추출물의 항염증 활성 비교

김윤영 · 양윤경¹ · 김동민 · 김지연*

서울과학기술대학교 식품공학과, ¹승의여자대학교 식품영양학과

Anti-inflammatory effects of ethanolic mulberry extract on the murine macrophage cell line, RAW 264.7

Yunyoung Kim, Yoon Kyoung Yang¹, Dongmin Kim, and Ji Yeon Kim*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

¹Department of Nutritional Science and Food Management, Soongui Women's College

Abstract The aim of this study was to compare the anti-inflammatory effects of ethanol extracts of root peel and spear of mulberry (RME and SME, respectively) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. Both extracts significantly inhibited the production of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and interleukin-6 (IL-6). However, prostaglandin E₂ (PGE₂) levels decreased in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated with SME. Additionally, the extracts reduced inducible NO synthase (iNOS) expression and cyclooxygenase-2 (COX-2) in mRNA levels. Although ROS production was lower in the RME-treated cells than in the SME-treated cells, the levels of other inflammatory parameters, including IL-6 and PGE₂, and mRNA levels of iNOS and COX-2 reduced more in the SME-treated cells. These results indicate that SME showed higher anti-inflammatory activities than RME. Therefore, SME can be used as a functional food ingredient to enhance health.

Keywords: root peel of Mulberry ethanol extract, spear of Mulberry ethanol extract, anti-inflammatory, RAW 264.7 cell

서 론

염증은 물리적인 상처나 미생물에 감염되었을 때 일어나는 정상적인 생체의 방어메커니즘의 일종이며 이 염증작용을 통하여 발병요인을 중화시키거나 제거하고 손상된 조직을 복구시켜 정상적인 구조와 기능을 하게 한다(1). 만성염증은 암, 신경계질환, 대사이상, 심장병 등과 같은 만성 질환과 폭 넓게 연관되어 있고, 이는 산화스트레스와 밀접한 상호작용이 있다(2-4). 염증의 병리메커니즘은 사이토카인 상호작용과 많은 전구 염증 유전자의 유도에 의해 조절되는 복잡한 과정이다(5). 여러 면역 관련 세포 중 탐식세포는 인체전반에 걸쳐 분포하고 있고, 염증과정에서 백혈구 유주에 앞서 병원체에 대항하는 즉각적인 방어를 제공함으로써 중요한 역할을 한다. RAW 264.7 세포는 항염증 소재의 효능을 검증하고, 전구 염증 매개인자들의 유도를 주도하는 신호전달경로의 억제효능을 가진 소재를 평가하기 위한 실험모델로 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 이 경우 지방질다당류(lipopolysaccharide)를 이용하여 과도한 염증을 유도한 모델을 이용하고 있

다. 지방질다당류는 그람 음성세균의 세포막을 구성하는 물질로서, 내독소로 작용을 한다(6). 이러한 지방질다당류는 큰포식세포를 활성화 시키고, 활성화된 큰포식세포는 산화질소(II)(nitric oxide) 및 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂) 같은 염증인자는 물론 인터류킨-6 (interleukin-6), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α) 같은 전염증성 인자를 생성한다(7). 전염증성 사이토카인들은 iNOS (inducible NO synthase) 발현을 유발하고 산화질소(II) 생산을 일으킬 수 있다. 또한 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현은 세포손상, 고통, 부종 및 열, 신생혈관 형성 및 전이 같은 종양생성과 깊은 관련이 있다(8-10). 따라서 이러한 염증 매개 인자의 효율적인 억제제가 항염증 활성을 가진 식품소재 개발의 중요한 전략으로 보인다.

뽕나무는 예로부터 한방에서 당뇨, 각기, 부종, 기침 및 가래 등의 치료에 널리 사용되어 왔고(11,12) 현대에 들어 친환경, 웰빙 수요의 급속한 증가로 그 효능과 친환경적인 성격으로 누에 사육 이외의 기능성 식·의약품, 화장품 등의 원료로서의 이용 가능성이 높아지고 있다(13). 또한 뽕나무에서 얻어진 재료들은 식용 자원으로 많이 사용되어지고 있는데, 뽕잎 떡, 뽕잎 차, 뽕잎 국수, 뽕잎 음료 등의 가공 식품의 형태로 제조하여 농가 소득을 향상시킬 수 있는 자원으로 알려지고 있다(14). 뽕나무의 어린 가지는 상지라고 하여 긴원기둥 모양을 나타내며 그 길이는 다양하고 지름은 0.5-1 cm이다. 외면은 노르스름한 회색 또는 회갈색이고 여러 개의 연한 갈색의 작은 점 모양의 피공 및 가는 세로무늬가 있으며 회백색의 반월형 엽흔과 활갈색의 엽아가 보인다(11). 뽕나무에서 기원한 상지에 관해서는 암, 항고혈압, 항염증 및 항당뇨 성분인 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol), 레스베

*Corresponding author: Ji Yeon Kim, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6740
Fax: +82-2-976-6460
E-mail: jiyeonk@seoultech.ac.kr
Received January 2, 2017; revised March 1, 2017;
accepted March 5, 2017

라트롤(resveratrol) 및 모라신(moracin) 등이 함유되어 있음을 보고한 바가 있다(15,16). 상백피에 관해서는 산화방지(17), 항암(18), 동맥경화 개선(19) 등의 활성에 대한 연구가 보고된 바 있다. 이와 같이 뽕나무는 부위별로 다양한 생리활성과 기능성 물질을 함유하고 있어 이들 추출물을 이용한 성인병 예방용 기능성 소재 및 식품을 개발할 가치가 매우 크다. 부위별 뽕나무의 생리활성에 대한 연구로 동맥경화, 혈압, 항고지혈, 항염, 산화방지 효과 및 항균작용 등에 대한 자료가 보고되었다(11). 현재까지 다양한 뽕나무 추출물의 생리활성이 보고되었음에도 불구하고, 상지와 상백피 추출물의 염증 억제 효과를 비교한 연구는 미비하다. 따라서 본 연구에서는 RAW 264.7 세포를 이용하여 상지 및 상백피 추출물이 염증인자 산화질소(II), 프로스타글란딘 E₂, 전염증인자인 인터류킨-6, 종양괴사인자- α 의 억제 뿐 만아니라 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 염증 유발과 관련된 iNOS, COX-2 mRNA의 발현 억제를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 연구에 사용된 상지 및 상백피는 2012년 6월 경북 영천에서 채배한 것으로 봄에 잎이 내돋지 않은 때에 청잎뽕 뽕나무로부터 채취 후 곧바로 50°C 이하 열풍건조기(COBP-15S, Shinheung, Cheongju, Korea)에서 건조한 것을 재료로 사용하였다. 뽕나무 부위 즉, 상지 및 상백피의 기능성 물질 함량 분석을 위한 에탄올추출물의 조제는 다음과 같이 실시하였다(12). 먼저 상지 및 상백피(20 g)에 80% 에탄올수용액 500 mL씩을 가하여 초음파추출기(Power Sonic 420, Hwashintech, Gwangju, Korea)로 1시간씩 2회 추출한 후 여과(Whatman No. 2, Maidstone, England) 후 감압농축기(Rotary Evaporator N-1000S-W, Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 감압 농축된 추출물은 -20°C 냉동고에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

세포배양

본 연구에서 사용한 쥐의 큰포식세포인 RAW 264.7 세포(KCLB 40071)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 10% 소태아혈청(FBS), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)과 1% HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)가 함유된 돌베코수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 배지는 1-2일에 한 번씩 교체하였으며, 5% 이산화탄소(CO₂)가스가 존재하는 37°C 배양기에서 진행되었다.

세포독성평가

RAW 264.7세포의 상지 및 상백피에 대한 세포생존율 평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 방법을 통해 분석하였다. 세포를 1×10⁵ cells/mL의 농도로 하여 96 well plate의 각 well에 180 μ L씩 분주하고, 24시간 배양하여 세포를 부착시켰다. 부착된 세포에 상지 및 상백피 추출물을 각각 1,000 μ g/mL에서부터 2배씩 희석하여 최종농도 8 μ g/mL까지 배지에 20 μ L 첨가하여 37°C 에서 24시간 배양하였다. 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 녹인 MTT 시약(5 mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 20 μ L씩 첨가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 용액을 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO)를 100 μ L씩 처리하여 교반기(150 rpm, 5분)에서 교반 후 마이크로판독기(micro-plate reader)

(Eon Microplate Spectrophotometer, BioTekInstruments, Inc., Vermont, USA)를 이용하여 560 nm에서 측정하였다. 이때 측정된 흡광도는 살아 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소 작용에 의해 MTT가 formazan으로 환원된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례한다. 상지 및 상백피 추출물로 전 처리한 세포의 생존율은 생존하는 시료 무첨가군의 생존율의 평균값에 대한 상대적인 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

Cell viability (%)

$$= \frac{(\text{O.D. value of treated well} - \text{O.D. value of the blank})}{(\text{O.D. value of untreated well} - \text{O.D. value of the blank})} \times 100\%$$

산화질소(II) 생성

배양액내의 산화질소(II)함량 측정은 아질산염(nitrite)를 산화질소(II) 생산의 지표로 이용한 Griess 반응을 이용하여 실시하였다. 각 세포들을 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL 농도로 180 μ L 분주한 다음 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양한 후 추출물을 최종농도가 10 μ g/mL가 되도록 처리하였다. 24시간 후, 처리한 well에 지방질다당류를 최종농도 2 μ g/mL가 되도록 제조하여 20 μ L씩 처리한 뒤, 48시간 동안 배양하였다. 추출물의 상층액을 100 μ L씩 새 plate에 옮긴 후 Griess 시약(reagent) 100 μ L를 넣었다. 이 때 Griess 시약은 5% phosphoric acid와 1% salfanilamide의 혼합용액과 0.1% naphthylethylenediamine 용액을 각각 10 mL씩 섞어서 제조하였다. 10분 동안 배양시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 이용하여 표준검량 곡선을 작성하였고 함량 계산에 이용하였다.

사이토카인 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양한 후 추출물을 10 μ g/mL 농도로 처리하였다. 24시간 후 지방질다당류(2 μ g/mL)를 처리하여 48시간 배양한 후, 세포배양 상층액을 취하여 프로스타글란딘 E₂, 인터류킨-6, 종양괴사인자- α 사이토카인의 생산량을 측정하였다. 측정은 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

활성산소종(Reactive oxygen species) 측정

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 세포 안으로 침투할 때, 가수분해에 의해 dichlorofluorescein diacetate (DCF-H)로 전환이 되고 활성산소종과 반응하여 dichlorofluorescein (DCF)로 산화해 녹색의 형광을 발하게 된다. RAW 264.7 세포를 1×10⁵ cells/mL 농도로 96 black well plate에 분주한 후 24시간 배양시켰다. RAW 264.7 세포가 부착된 96 black well plate에 상지, 상백피 에탄올 추출물을 24시간 처리하였다. 인산완충생리식염수로 2번 씻어 내준 후, DCF-DA를 1 mM의 농도로 1시간 동안 처리한 후 지방질다당류를 처리하여 48시간 배양시켰다. 이후 형광 분광 광도계(Fluorescent spectrophotometer) (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용해서 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 측정 하였다.

COX-2와 iNOS mRNA 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 최종농도가 1×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양한 후 추출물을 10 μ g/mL 농도로 처리하였다. 24시간 후 지방질다당류(2 μ g/mL)를 처리하여 48시간 배양한 후, 세포 배양조건을

사이토카인 RAW 264.7세포에서 총 RNA는 TRIzol 시약(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 추출하였다. RNA의 농도는 BioSpec-nano 분광 광도계(Mecasys Corp., Daejeon, Korea)를 이용해 260/280 nm의 흡광도로 측정하였다. cDNA는 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 합성하였다.

표적 유전자에 대한 primer 세트는 COX-2; 5'-ACCAACGCT-GCCACAACCT-3', 5'-GGTTGGAACAGCAAGGATTT-3', iNOS; 5'-ACCTAGGAGCATCCCAAGT-3', 5'-CAGCGCATACCACT-TCAGC-3', β -actin; 5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3', 5'-CGT-CATCCATGGCGAACT-3'이다.

모든 PCR 분석은 Light cycler 96 (Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 분석하였다. 95°C에서 10분 동안 초기변성 후에 95°C 10초, 60°C 30초 동안 2단계에 걸쳐서 40 cycle을 진행하여 증폭 하였다. PCR 결과로부터 각각의 유전자의 상대적인 정량분석은 베타액틴(β -actin)에 대한 조사하고자 하는 유전자의 PCR 생성물의 상대적인 비율로 계산한 뒤, Δ CT법을 이용하여 mRNA 생성량을 계산하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 3회 반복으로 실시한 평균과 표준편차로 나타내었으며, 각 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 20.0 (Statistical Package for Social, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석하였으며, 평균±표준오차(S.E.)로 나타내었다. 군간 분석 항목별 차이는 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)를 수행한 후, 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

세포독성평가

상백피, 상지 추출물이 세포에 미치는 독성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 1,000 μ g/mL부터 2배 씩 희석한 추출물을 처리하여 MTT 시험을 진행하였다(Fig. 1(A)). 그 결과 상백피, 상지 추출물 모두 1,000 μ g/mL과 500 μ g/mL에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였고 8-16 μ g/mL 처리시 세포에 독성을 미치지 않음을 확인하여, 이후 실험 조건은 세포 생존에 영향을 미치지 않는 최고농도인 10 μ g/mL 농도로 설정하여 진행하였다.

산화질소(II), 프로스타글란딘 E₂ 생성 억제 효과

상백피 및 상지 추출물의 산화질소(II), 프로스타글란딘 E₂ 생성 억제 효과에 대해서는 Fig. 1에 나타내었다. 지방질다당류 처리군 시 대조군 0.39±0.12 μ M에 비해 31.17±2.27 μ M로 산화질소(II) 생성이 유의하게 증가하였다. 상백피, 상지 추출물 모두 유의하게 산화질소(II) 생성을 억제하였으며 두 추출물간의 유의한 차이는 발견되지 않았다($p < 0.05$). 상지 추출물 처리는 프로스타글란딘 E₂ 생성량을 유의하게 감소시켰으며, 지방질다당류로 자극시키지 않은 대조군과 거의 동일한 수준으로 감소시켰다. 하지만 상백피 추출물은 프로스타글란딘 E₂ 생성량을 감소시키지 못하였다.

염증성 사이토카인(인터류킨-6, 종양괴사인자- α) 측정

상백피, 상지 추출물의 염증성 사이토카인 생성량 저하 효과를 확인하기 위해 인터류킨-6와 종양괴사인자- α 분비 수준을 측정하였다(Fig. 1). 지방질다당류 처리에 의해 인터류킨-6 생성량이 현저하게 증가했으며, 상지, 상백피 추출물 처리 모두 인터류킨-6

생성량이 유의하게 감소하였다. 하지만 상백피 추출물 처리군의 인터류킨-6 생성량은 약 75 pg/mL 감소한 반면, 상지 추출물 처리군에서는 약 450 pg/mL 감소한 것으로 확인되어 상지 추출물의 염증성 사이토카인 억제 능력이 통계적 유의성을 가지며 훨씬 우수한 것으로 확인되었다($p < 0.05$). 종양괴사인자- α 역시 지방질다당류군에서 생성량이 대조군에 비해 유의적으로 증가($p < 0.05$)하였으나 상지 추출물은 종양괴사인자- α 생성량을 감소시키지는 못하였고 상백피 군에서는 지방질다당류군보다 유의적으로 증가하였다. 종양괴사인자- α 는 I κ B kinase (IKK)와 nuclear factor kappa B (NF- κ B)의 신호전달을 받아 발현된다(20). 따라서 종양괴사인자- α 의 발현을 조절하는 상위 조절분자의 활성 및 단백질 발현 정도를 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

활성산소종 측정

활성산소종 발생에 관한 상백피, 상지 추출물의 영향 비교에 관한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 추출물을 24시간 전처리하고 지방질다당류로 유도된 활성산소종을 시료 및 지방질다당류 무첨가군의 흡광도 평균값에 대한 상대적인 백분율로 표시하였다. 측정 결과, 지방질다당류를 처리하지 않은 군에 비해 처리한 군에서 활성산소종 양이 12% 증가함을 보였고 상백피 추출물은 지방질다당류유도 군 대비 활성산소종 양을 35% 감소시켰으며, 상지 추출물 또한 지방질다당류에 의한 활성산소종의 생성을 12% 감소시켜 지방질다당류 비처리군과 동일한 수준의 활성산소종 생성을 보였다. 이 두 추출물 중 상백피 추출물이 상지 추출물보다 활성산소종 생성을 유의하게 더 억제함을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

본 연구에서 활성산소종 생성량으로 확인한 산화방지 효과는 상백피 에탄올 추출물이 더 좋은 효과를 보였다. 본 연구결과와 유사하게 Khan 등(21)의 연구에 의하면 상백피 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 상지 추출물보다 높은 것으로 나타났고, α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH), 하이드록실 라디칼 제거(hydroxyl radical scavenging) 등의 실험에서 상백피 추출물의 효과가 상지 추출물의 효과보다 높은 것으로 나타났다.

COX-2와 iNOS mRNA 발현량 측정

상백피, 상지 추출물의 염증 반응 관련 mRNA 발현 억제를 확인하기 위해 RT-PCR을 이용하여 COX-2와 iNOS mRNA 발현량을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 COX-2에서 지방질다당류 처리군의 COX-2 mRNA 생성량 증가는 4.23±0.08배, iNOS의 mRNA 증가는 3.29±0.22로 현저히 증가되는 결과를 확인하였으며, 상지, 상백피 추출물 모두 COX-2와 iNOS mRNA 발현량을 유의하게 감소시켰다. 특히, 상백피 추출물 보다 상지 추출물이 COX-2와 iNOS mRNA 생성량을 유의하게 감소시킨 것으로 확인되었다($p < 0.05$).

지방질다당류는 탐식세포에서 인터류킨, 종양괴사인자- α 와 같은 염증매개인의 생산 촉진과 iNOS, COX-2와 같은 염증매개인자 생성 효소의 발현을 촉진한다(22,23). 특히 염증과정 중에 COX-2와 iNOS에 의해 산화질소(II), 프로스타글란딘 E₂가 생성되는데(24,25), COX-2는 큰포식세포와 활막세포 같은 염증세포에서 감염, 상처, 스트레스 인자에 의해 아라키도닉산(arachidonic acid)으로부터 발생하는 많은 양의 프로스타글란딘을 생성시켜 침해 수용체를 활성화하고 염증상태로 유도하며(26,27), iNOS 또한 산화질소(II)를 합성하는 NO synthase (NOS)의 나머지 두 가지 형태인 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)와 다르게 다양한 염증 유도 사이토카인 등에 의해 노출되는 경우에만 발현한다(28). 이번 연구에서는 상백피 및 상지 추출물의 처리는

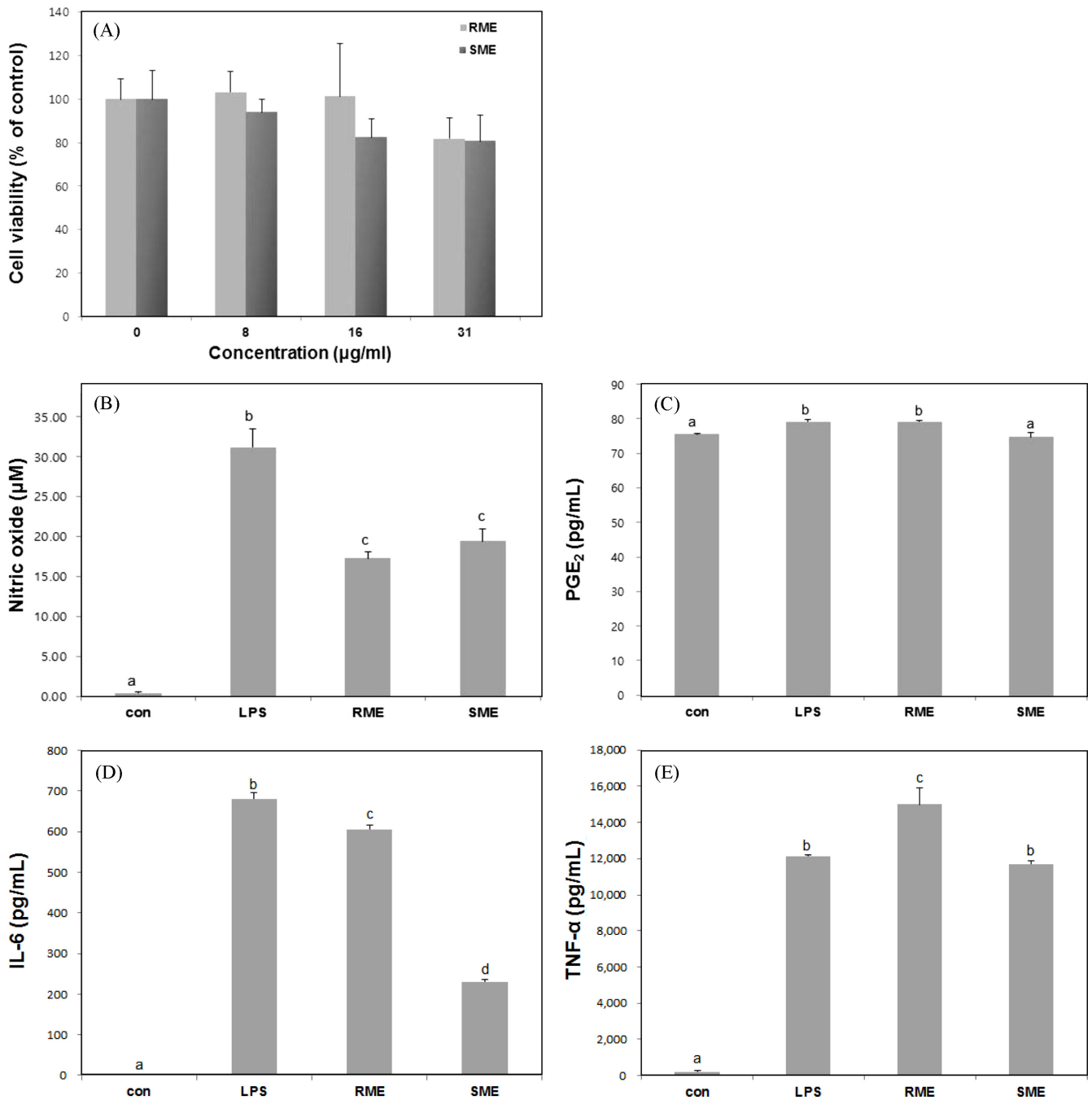


Fig. 1. Cytotoxicity of ethanol extracts of root peel and spear of *Morus alba* L. (RME and SME, respectively) in RAW 264.7 cells (A). Nitric oxide (NO) (B), PGE₂ (C), IL-6 (D) and TNF-α (E) levels in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells treated with RME and SME. Representative data from three experiments are shown. Data are given as mean±SD. Different letters on bars indicate significant differences, as determined using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

지방질다당류로 자극한 RAW 264.7 세포에서 전구 염증 매개인자들의 유전자 발현을 억제함으로써 염증반응을 촉발하는 전구 염증 매개인자들의 생산을 감소시킬 것으로 확인되었다. 특히 상백피, 상지 추출물을 비교한 결과, 상지 추출물이 상백피 추출물보다 프로스타글란딘 E₂, 인터류킨-6 생성량과 COX-2, iNOS mRNA 발현량을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 상지 추출물이 항염증 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 본 연구는 상백피 및 상지 추출물의 항염증 활성을 mRNA 수준에서만 진행하

였는데 다음 연구에서는 관련 효소 활성도 및 단백질 수준에서의 변화를 제시하는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 추후 상백피, 상지 추출물에 함유된 성분들을 분석하여 해당 성분들의 차이에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다. 이로써 상지 추출물이 효과적인 항염증 효과를 보이는 건강기능식품 소재로서 개발 가능성을 가지고 있으며, 향후 연구는 상지 추출물의 염증완화 메커니즘을 통한 관련 질환에 효과가 있는지 정확한 작용메커니즘 확인 등의 분석실험이 필요할 것으로 생각된다.

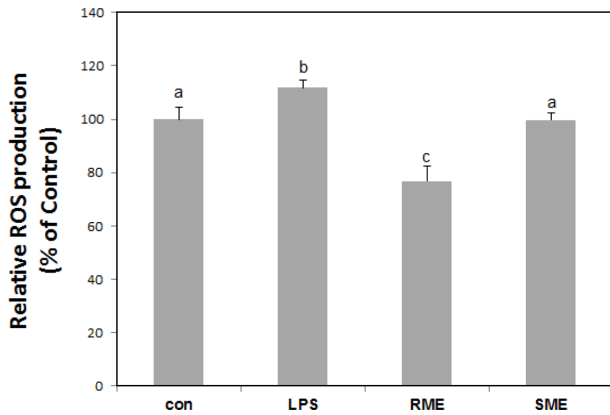


Fig. 2. Reactive oxygen species (ROS) levels in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells treated with ethanol extracts of root peel and spear of *Morus alba* L. (RME and SME, respectively). Representative data from three experiments are shown. Data are given as mean±SD. Different letters on bars indicate significant differences, as determined using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

요 약

상백피 및 상지 에탄올 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포를 사용하여 시험하였다. 상백피, 상지 추출물의 활성산소종, 산화질소(II), 프로스타글란딘 E₂, 인터류킨-6, 종양괴사인자- α 등의 생성능과 COX-2, iNOS mRNA 발현을 확인하였다. 산화질소(II) 생성량은 두 추출물 모두 유의하게 비슷한 정도로 감소시켰으나, 활성산소종 생성에서는 상백피 추출물이 상지 추출물 보다 억제 효과가 높게 나타났다. 프로스타글란딘 E₂와 인터류킨-6 생성에서는 상지 추출물의 억제 효과가 강하게 나타났으며, COX-2와 iNOS mRNA 발현량 또한 상지 추출물의 상백피에 비해 유의하게 감소시킴을 확인하였다. 본 연구에서 확인한 결과로 상백피, 상지 추출물 모두 염증 매개인자 발현 억제체를 통해 항염증 효과를 가짐을 알 수 있었으며, 상지 추출물이 상백피 추출물 보다 염증 완화 효과가 강한 것으로 나타났다. 향후에는 상백피 및 상지 추출물의 주요 활성 성분들의 차이와, 염증완화 메커니즘을 통한 관련 질환에 효과가 있는지 정확한 작

용메커니즘 확인 등의 분석실험이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 연구사업(세부과제번호: R0002111)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 29: 1-14 (2011)
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 787-95 (2002)
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24: 25-29 (2003)
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaB phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br. J. Pharmacol.* 139: 11-20 (2003)
- Kim BH, Lee YT, Kang KH. Codonopsis Lanceolata inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* 24: 80-84 (2010)
- Ou TT, Kuo CY, Chyau CC, Lee HJ, Peng JS, Wang CJ. Improvement of lipopolysaccharide-induced hepatic injuries and inflammation with mulberry extracts. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1880-1886 (2013)
- Cho BK, Yin HH, Fang CZ, Ha HO, Kim SJ, Jeong SI, Jang SI. Synergistic Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and Luteolin in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 119-125 (2015)
- Cho BO, Ryu HW, So Y, Lee CW, Jin CH, Yook HS, Jeong YW, Park JC, Jeong IY. Anti-Inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Biomol. Ther.* 22: 288-294 (2014)
- Jeon YJ, Song KS, Han HJ, Park SH, Chang W, Lee MY. Rosmarinic acid inhibits chemical hypoxia-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Arch. Pharmacol. Res.* 37: 907-15 (2014)
- Ojha D, Mukherjee H, Mondal S, Jena A, Dwivedi VP, Mondal

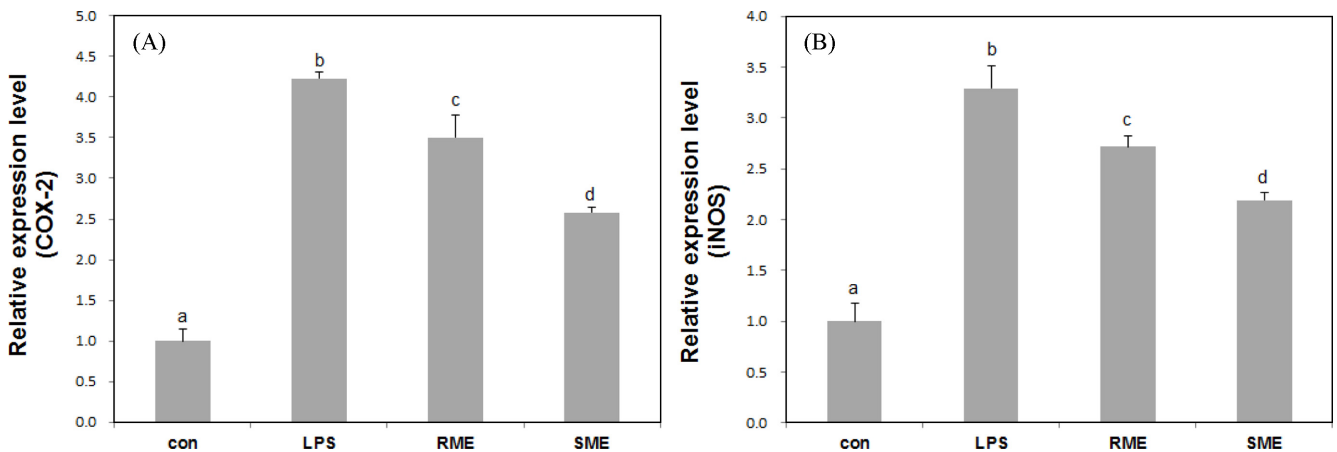


Fig. 3. mRNA expression levels of COX-2 (A) and iNOS (B) lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells treated with ethanol extracts of root peel and spear of *Morus alba* L. (RME and SME, respectively). Data are given as mean±SD. Different letters on bars indicate significant differences, as determined using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

- KC, Malhotra B, Samanta A, Chattopadhyay D. Anti-inflammatory activity of *odina wodier* roxb, an Indian folk remedy, through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Plos One* 25: e104939 (2014)
11. Choi SW, Lee YJ, Ha SB, Jeon YH, Lee DH. Evaluation of biological activity and analysis of functional constituents from different parts of mulberry (*Morus alba* L.) tree. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 823-831 (2015)
 12. Kim JS, Ha TY, Ahn JY, Kim HK, Kim S. Composition and quantitative analysis of stilbenoids in mulberry (*Morus alba* L.) leaves and fruits with DAD/UV HPLC. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 124-128 (2008)
 13. Kim YM. Chemical components and physiological activities of different part from mulberry (*Morus alba*). *Food Ind. Nutr.* 17: 28-35 (2012)
 14. Kim HB, Koh SH, Oh NK, Jeong JS, Sung GB, Hong IP, Chung IM, Lee KG. Agronomic Characteristics and anti-oxidant capacity of mulberry genetic resources conserved by jeollabuk-do. *Korean J. Seric. Sci.* 49: 60-66 (2007)
 15. Oh H, Ko EK, Jun JY, Oh MH, Park SU, Kang KH, Lee HS, Kim YC. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba*. *Planta Med.* 68: 932-934 (2002)
 16. Choi SW, Jang YJ, Lee YJ, Leem HH, Kim EO. Analysis of functional constituents in mulberry (*Morus alba* L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. *Prev. Nutr. Food Sci.* 18: 256-262 (2013)
 17. Choi EY, Choi TB. The effect of fermented mori cortex extracts on antioxidant activity and melanin inhibitory activity. *J. Kor. Soc. Cosm.* 17: 495-499 (2011)
 18. Jeong JH, LEE JM, LEE CH, Cho JH, Jang JB, LEE KS. Anti-tumor metastatic effect and activation of innate immunity by extract of mori radice cortex. *J. Korean Obstet. Gynecol.* 22: 31-40 (2009)
 19. Hong SH, Chai HY, Kim TM, Lee NJ, Kim DK, Cho JH, Park JH, Kim YB, Kang JK, Hwang SY. Therapeutic effects of mulberry root-bark (*Mori radice Cortex*) ethanol extract on atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Lab. Anim. Res.* 21: 273-279 (2005)
 20. Garcia-Bonilla L, Benakis C, Moore J, Iadecola C, Anrather J. Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance. *Front. Neurosci.* 8:16-34 (2014)
 21. Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MN, Alam AH. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res. Notes* 6:24 (2013)
 22. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2-10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 367-375 (2002)
 23. Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br. J. Surg.* 80: 289-297 (1993)
 24. Posadas I, Terencio MC, Guilln I, Ferrndiz ML, Coloma J, PayM, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361: 98-106 (2000)
 25. Won SJ, Park HJ, Lee KT. Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by salidroside through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 39: 110-117 (2008)
 26. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142 (1991)
 27. Li JJ, Zhu CG, Yu B, Liu YX, Yu MY. The role of inflammation in coronary artery calcification. *Ageing Res. Rev.* 6: 263-70 (2007)
 28. Liu CJ, Lin JY. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. *Food Chem. Toxicol.* 50: 3032-3039 (2012)