

그라비올라(*Annona muricata*) 잎 에탄올 추출물의 항염증 효과

조은지¹ · 이정희^{1,2} · 성낙윤¹ · 변의홍¹

¹공주대학교 식품공학과
²토담(주)

Anti-Inflammatory Effects of *Annona muricata* Leaf Ethanol Extracts

Eun-Ji Cho¹, Joeng Hee Lee^{1,2}, Nak-Yun Sung¹, and Eui-Hong Byun¹

¹Department of Food Science and Technology, Kongju National University
²Teodam

ABSTRACT This study was focused on the anti-inflammatory activities of *Annona muricata* leaf ethanol extracts (AME). Inflammation of macrophages was induced by lipopolysaccharide (LPS) treatment, and various inflammation-mediated factors [cytokines and nitric oxide (NO)] were measured. AME treatment significantly reduced LPS-induced NO, cytokine levels [interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α and IL-1 β], and expression of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 in a dose-dependent manner. Mechanical studies showed that AME treatment inhibited activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor (NF)- κ B in macrophages treated with LPS. From these results, AME treatment strongly inhibits LPS-induced inflammation through inhibition of NF- κ B activation, suggesting AME could be a potential candidate for treatment of inflammatory disease as a nutraceutical drug.

Key words: *Annona muricata* leaves, macrophage, cytokine, mitogen-activated protein kinase, nuclear factor- κ B

서 론

세균 감염 등의 물리적 또는 화학적 외부 자극이 발생하게 되면 우리 몸은 자기 방어 및 유지를 위하여 체내 면역세포들을 활성화시키고, 활성화된 면역세포들은 cytokine 및 nitric oxide(NO) 등을 분비하여 외부에서 유입되는 병원성 항원을 무력화시키는 일을 수행한다. 그러나 과도한 면역반응은 만성 염증반응을 일으킨다. 지속적인 염증반응은 점막 손상을 촉진하여 통증, 부종, 발열 등 기능장애를 유발하며, 그 결과 체내 면역체계의 불균형이 초래되어 아토피, 알레르기, 암 등의 발병을 촉진시키고 만성 조직성 염증 질환 및 자가 면역 질환의 유병률을 증가시킨다. 따라서 염증반응의 조절은 체내 면역체계의 유지 및 생명현상의 조절을 위해 매우 중요한 수단이다(1).

인체 내 염증반응에 관여하는 주된 세포는 대식세포이며, 대식세포는 외부 자극에 의해 활성화되고 활성화된 대식세포는 cytokine 등과 같은 염증매개 물질의 분비를 촉진시켜 염증반응을 가속화한다(2). 그람 음성세균의 외막에 존재하고 내독소로 작용하는 lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포

포의 대표적인 mitogen으로써 미량으로도 충분히 염증반응을 일으킬 수 있다. LPS 자극은 감염 초기에 대식세포에서 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1 β 및 IL-6와 같은 염증성 cytokine, NO, prostaglandins E(PGE₂) 등의 분비를 촉진시키고, 이러한 염증매개인자들의 과도한 분비에 의하여 초기 국소 염증반응은 전신성 염증반응으로 확대된다(3,4). 따라서 이러한 초기 염증관련 인자들의 분비억제를 통하여 전신 염증반응을 조절할 수 있으며, 현재 천연물을 이용하여 이러한 염증관련 초기인자들을 억제하고 기전을 분석하고자 하는 다양한 연구들이 이미 수행되고 있다.

그라비올라(*Annona muricata*)는 목련목 포포나무과에 속하며, 일반적으로 가시여지(soursop)라고 불린다. 중앙아메리카에 널리 분포하며 예로부터 진정, 살충, 혈압강하, 해열, 천식, 통증 완화 등의 목적으로 이용해 왔으며, 특히 잎은 남미 원주민들 사이에서 주로 종양의 치료에 사용되어왔다(5,6). 이후 그라비올라 잎 추출물의 항암활성에 대하여 과학적인 근거를 찾는 연구들이 다양하게 이루어졌으며, 현재까지 대장암, 간암, 위암 등 12종의 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다(7). 그라비올라 잎(leaves)에는 섬유질, 단백질, 지방, 탄수화물, 비타민 B 등의 성분이 풍부하게 존재한다. 그중 아노나세오스(annonaceous) 및 아세트제닌(acetogenins) 등의 성분이 췌장암, 전립선암, 난소암, 폐암, 간암 등을 포함한 12가지 유형의 암세포를 죽인다고

알려져 있고, 화학 항암 치료제인 adriamycin보다 약 1,000 배 정도 효과가 높다고 보고되고 있으며(8), 씨(seed)에는 항염증 효과가 탁월하다고 알려져 있는 폴리페놀, 플라보노이드, 테르페노이드, 탄닌 등의 유효성분들이 다량 존재한다고 보고되고 있다(9,10). 현재 그라비올라 잎 추출물에 관한 연구들은 항암 효과와 관련하여 다양한 세포에 관한 세포독성 및 기전연구에만 치우쳐져 있고, 그 밖의 생리활성에 관한 연구들은 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서 그라비올라 잎 에탄올 추출물의 항염증 효과를 평가하기 위하여 LPS 처리 대식세포 염증모델에 그라비올라 잎 에탄올 추출물을 병용 처리하면서 염증 매개물질인 NO, iNOS 및 IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine 분비에 미치는 변화를 관찰하였으며, 항염증 기전 분석을 위하여 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 인산화 및 핵 내 nuclear factor(NF)- κ B의 발현에 관하여 관찰하였다.

재료 및 방법

그라비올라 잎 에탄올 추출물(AME)의 제조

본 연구에서 사용된 그라비올라 잎은 (주)토담(Cheonan, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, 추출조건은 다음과 같다. 건조된 그라비올라 잎을 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여 그라비올라 분말 40 g에 800 mL의 에탄올을 가하여 상온에서 24시간 추출하였다. 추출물을 filter paper(No.42, Whatman, Kent, UK)로 여과 후 원심분리(3,200 rpm, 20 min) 하여 상층액을 취하였고 동일한 방법으로 2회 반복하였다. 반복 추출하여 얻은 추출 상층액은 37°C 감압농축기로 농축하였으며, 동결 건조하여 -70°C에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

대식세포 배양

마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위해 100 unit/mL penicillin 및 100 unit/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)을 포함하는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지(Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator(Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

세포 생존율 평가

RAW 264.7 대식세포를 96-well plate에 3×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고 LPS(200 ng/mL)와 AME를 phosphate buffered saline(PBS; Wel Gene, Daegu, Korea)에 용해하여 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 μ g/mL의 농도로 병용 처리하여 24시간 동안 방치하

였다. 세포 생존율 평가를 위하여 well당 30 μ L의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 5 mg/mL 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생성된 formazan을 녹이기 위해서 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co.)를 100 μ L씩 첨가하고 1시간 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구(medium only)의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

NO 유도능 평가

분리된 배양 상등액 100 μ L에 동량의 Griess(Sigma-Aldrich Co.) 시약을 처리하여 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

Cytokine 분비 유도능 평가

48-well plate에 RAW 264.7 대식세포를 5×10^4 cells/well로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, LPS(200 ng/mL)와 PBS에 용해된 AME(62.5, 125, 250 및 500 μ g/mL)를 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하고 배양 상등액을 분리하였다. 분리된 배양 상등액에서 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 의 함량을 측정하였다. Cytokine 함량은 ELISA kit (eBioscience Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 이때 cytokine의 농도는 kit에 포함된 표준용액으로부터 산출된 표준곡선으로부터 계산되었다.

Western blot analysis

RAW 264.7 대식세포를 6-well plate에 2×10^6 cells/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 LPS(200 ng/mL)와 AME를 250 및 500 μ g/mL의 농도로 병용 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 cell lysis buffer(Biosource, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 cell lysate를 분리하였다. 핵 내의 단백질을 분리하기 위하여 상기 수집된 세포에 저장성 완충액[10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride, 10 mM potassium chloride, 0.5 mM dithiothreitol(DTT), 1 μ M leupeptin과 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF)]을 20분간 처리한 후 12,000 \times g에서 1분간 원심분리 하여 세포질과 핵을 분리하였으며, 분리된 핵에 고장성 용액[20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM ethylene diamine tetra acetic acid, 0.5 mM DTT, 1 μ M leupeptin, 0.2 mM PMSF]을 처리하여 10,000 \times g에서 20분간 원심분리 하여 핵단백질을 추출하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사

용하여 단백질 정량을 실시하였고, well당 20 µg의 cell lysate를 10% polyacrylamide gel에 각각 loading 하여 SDS-PAGE로 변성분리 하였다. 이를 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 antibody의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution(skim milk 5%) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 TBST(20 nM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, iNOS, COX-2, p-p38, p-ERK, p-JNK 및 NF-κB의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안 반응시키고, TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat-anti rabbit IgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위하여 Electrochemiluminescence(ECL, Millipore Merck KGaA) reagent를 사용하여 인화하였다.

통계분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, ver 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

AME의 세포 생존율 평가

AME의 처리가 대식세포의 세포독성에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 RAW 264.7 세포에 농도별 AME를 처리하여 AME에 대한 대식세포의 생존율을 MTT 방법을 통하여 평가하였다(Fig. 1). LPS(200 ng/mL) 및 AME를 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 LPS 처리군 및 AME 처리군 모두에서 유의적인($P < 0.05$) 변화가 나타나지 않았다. 따라서 AME의 처리는 대식세포의 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

AME의 NO 생성 억제 효과

대식세포는 염증반응 시 NO와 같은 활성질소종 및 염증성 cytokine을 대량으로 생산하고 이러한 염증성 매개물질들의 과도한 분비로 인하여 세포손상, 유전자 변이, 신경손상, 조직손상과 같은 병변이 발생하므로 염증반응에서 NO 및 염증성 cytokine의 분비를 억제하는 것은 매우 중요한 수단으로 작용한다. NO는 NO 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유도체이며, 주로 면역반응, 세포독성 및 신경전달에 관여하여 세포 기능 유지에 중요한 역할을 수행한다. 그러나 과도한 NO의 생성은 조직의 손상, 유전자 변이, 신경손상 등을 유발하고 염증반응을 촉진시킨

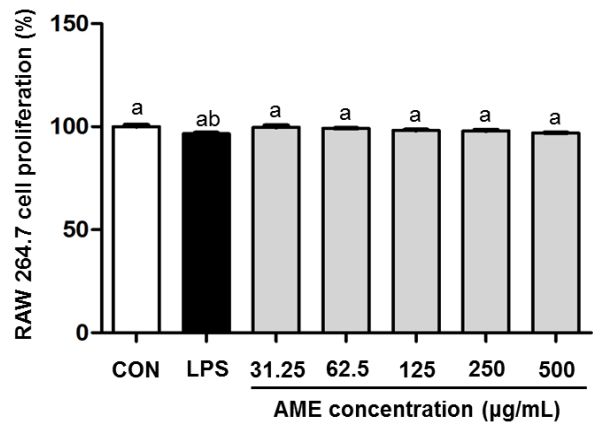


Fig. 1. Cytotoxic effect on *Annona muricata* L. ethanol extracts (AME) in RAW 264.7 macrophage cell. AME were treated at the concentration of 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL and LPS was treated at 200 ng/mL. After 24 h, cell proliferation was measured by MTT assay (n=4), and the results were expressed as mean±SD. Values with different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

다(11).

AME의 처리에 따른 NO 억제능에 관하여 측정하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유발시킨 후 AME를 각각 농도별(62.5, 125, 250 및 500 µg/mL)로 병용 처리하고, 세포 상등액에서 NO의 분비능에 관하여 관찰하였다. LPS 단독 처리구에서 NO의 분비능이 급격히 증가한 것으로 관찰되었고 이러한 결과로 미루어 보아 LPS에 의한 염증반응이 효과적으로 이루어졌음을 알 수 있었으며, AME를 병용 처리하였을 경우 NO의 생성량이 AME 처리 농도에 따라 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). Byun 등(12)의 연구에서 resveratrol의 경우 LPS의 처리에 따라 증가하는 NO 및 iNOS 분비를 감소시켜 항염증에 효과가 있었다는 결과와 유사하게 본 연구에서도 AME의 처리는 LPS로 유발된 염증반응에서 NO의 분비를 유의적으로 감소시켜 줌으로써 항염증 활성에 기여하는 것으로 판단된다.

AME의 염증성 cytokine 생성 억제 효과

염증반응에서 활성화된 대식세포는 NO와 더불어 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 등의 염증성 cytokine을 대량으로 분비하게 하며, 이러한 cytokine의 과도한 분비는 인체 내 면역체계의 균형을 파괴하여 다양한 질병을 유발한다(13,14). 그 중 IL-6는 단핵세포와 대식세포에 의해 분비되며, B cell 활성화에 관여하고 항체 분화를 촉진시키며, T cell의 증식과 분화를 유도시킨다. TNF-α는 염증반응을 유도하는 LPS 처리에 의하여 분비되는 주요 cytokine으로 면역 세포의 성장과 분화에 주로 작용하며, 대식세포의 활성화, apoptosis, necrosis 등의 세포 사멸에 관여하고 염증반응의 개시, 전개에 있어서 매우 중요한 역할을 수행하는 대표적인 cytokine이다(15,16). IL-1β는 단핵구, 대식세포, B cell, 수지상 세

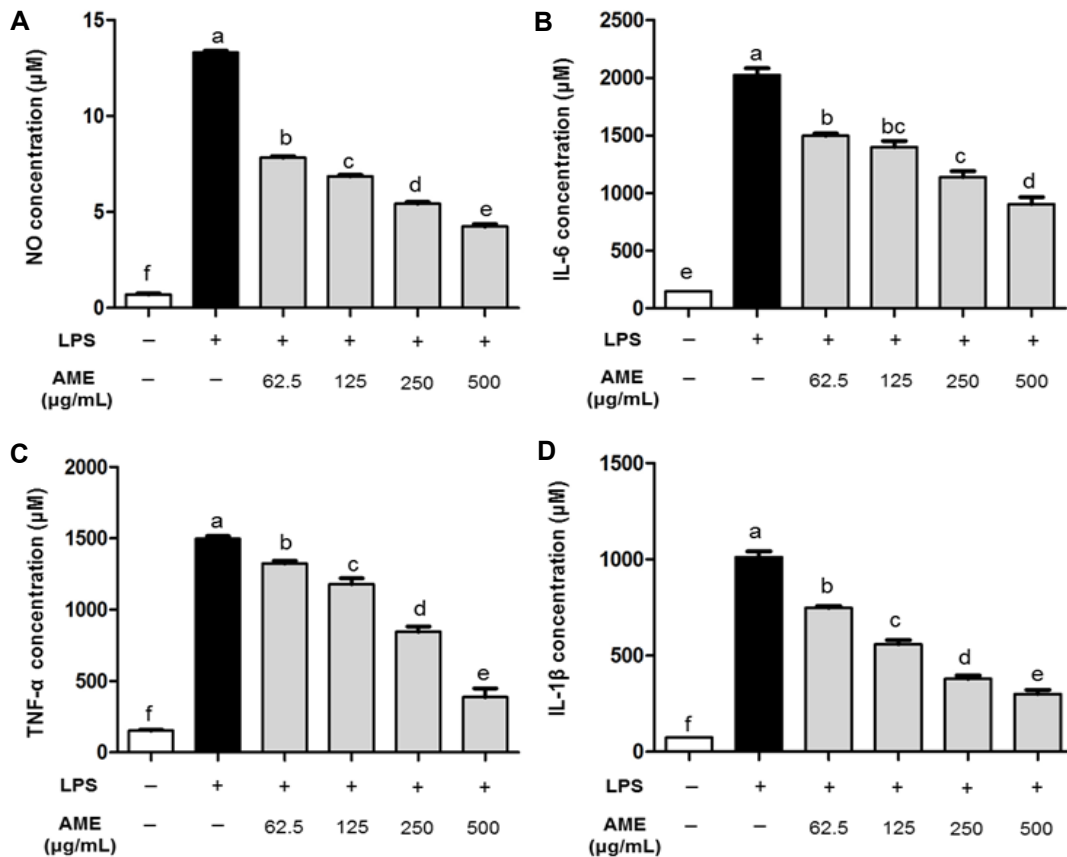


Fig. 2. Inhibitory effect of AME on the production of nitric oxide (A), IL-6 (B), TNF- α (C), and IL-1 β (D) in RAW 264.7 cell. Cells were treated with concentrations of AME (62.5, 125, 250, 500 μ g/mL) in the presence or absence of LPS (200 ng/mL) for 24 h. Values with different letters (a-f) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

포, 내피세포 및 호중구에서 분비되며 TNF- α , IL-6와 함께 분비되는 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로서 대식세포의 포식 작용, 미생물 사멸, T cell의 활성화, B cell의 성숙, 자연살해세포(natural killer cell)의 활성을 유도하는 역할을 수행한다(17). 본 연구에서 이러한 염증성 cytokine의 생성 및 억제에 미치는 AME의 영향에 관하여 알아보기 위하여 LPS 처리된 RAW 264.7 대식세포에 AME를 농도별(62.5, 125, 250 및 500 μ g/mL)로 병용 처리하여 cytokine 분비량을 측정하였다.

NO 분비능 억제 실험 결과와 유사하게 LPS 단독 처리구에서 염증성 cytokine의 분비능이 급격히 증가한 것으로 나타나 LPS의 처리에 의한 염증반응이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었고, LPS와 AME의 병용 처리구에서는 IL-6, TNF- α 및 IL-1 β 분비능이 AME의 처리 농도에 따라 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 경향으로 나타났다(Fig. 2B, 2C, 2D).

과도한 면역반응에 의하여 생성되는 염증성 cytokine (IL-6, TNF- α 및 IL-1 β)의 증가는 세포손상 및 조직손상 뿐만 아니라 지속적인 면역체계 불균형을 초래하여 자가면역질환, 알레르기, 아토피 반응 등을 유발할 수 있으므로 염증성 cytokine 조절은 면역체계의 균형을 유지하기 위한 중

요한 수단이다(2). 본 연구에서는 AME의 처리는 LPS로 유발된 염증반응에서 염증성 cytokine의 분비를 억제시켜줌으로써 항염증 활성화에 기여하는 것으로 판단된다.

AME의 iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

iNOS는 외부 자극이나 pro-inflammatory cytokine 등에 자극을 받게 되면 hepatocytes, smooth muscle cells, bone marrow cells, monocytes, macrophages 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생성시켜 세포독성, 유전자 변이, 신경손상, 조직손상 등과 함께 혈관투과성을 증가시켜 염증반응을 심화시킨다(18).

또한, cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid로부터 prostaglandins(PGs)을 생합성하는 효소로 COX-1과 COX-2 두 가지의 isoform으로 존재한다. COX-1은 체내 대부분의 조직에 항상 발현되어 있어 혈소판의 형성, 위장세포의 보호 및 신장 기능의 유지 등의 생리적인 역할을 통해 항상성을 조절하며, COX-2는 염증반응이 일어날 때 분비되는 cytokines에 의해 유도되어 염증관련 PGs의 생합성에 관여한다. COX-2는 다양한 종류의 PGs 중 prostaglandin E₂(PGE₂)를 과량 생성할 수 있는데, 이는 곧 염증반응의 증가로 이어진다. 또한, 많은 연구를 통해 COX-2에 의한

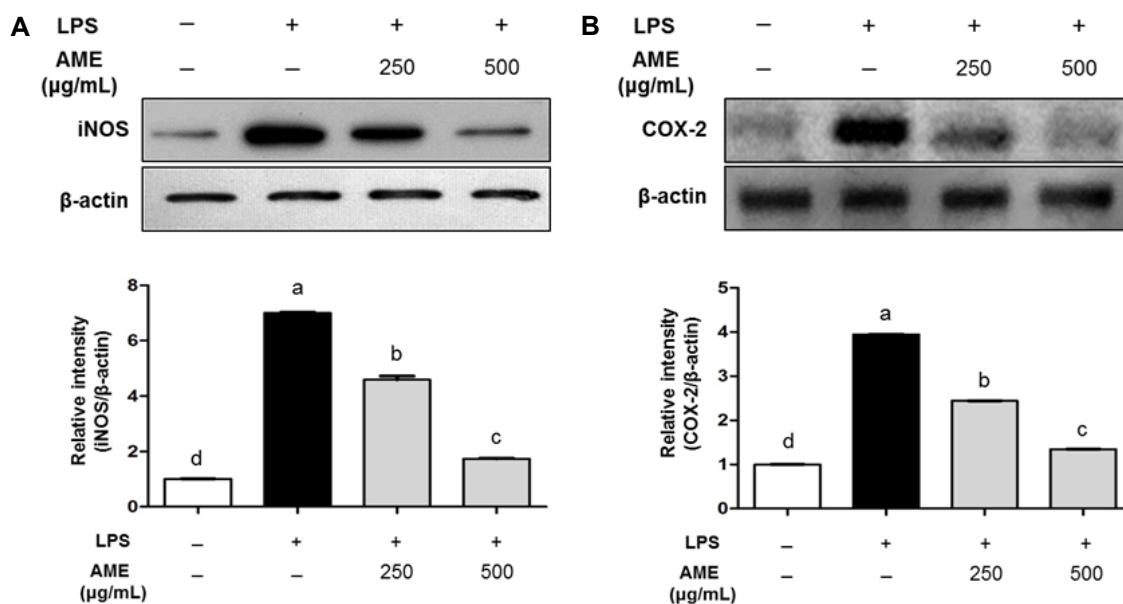


Fig. 3. Inhibitory effect of AME on the expression of iNOS (A) and COX-2 (B) in RAW 264.7 cells. Cells were treated with the concentrations of AME (250, 500 µg/mL) in the presence or absence of LPS (200 ng/mL) for 24 h. Equal amounts of protein (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotted with iNOS, COX-2, and β-actin antibodies. Values with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

PGE₂의 과다생성이 NO의 생성과 관련되어 있다고 보고되었기에 iNOS와 더불어 염증반응에 있어서 중요한 인자로 인식되고 있다(19).

본 연구에서 AME의 처리가 iNOS 및 COX-2 발현에 미치는 영향에 관하여 평가하기 위하여 LPS 처리된 RAW 264.7 세포에 AME를 250 및 500 µg/mL의 농도로 처리하여 세포 내 iNOS 및 COX-2의 발현을 측정하였다. iNOS 및 COX-2의 발현은 LPS 단독 처리군에서 가장 높게 발현되는 것으로 관찰되었으며, AME 및 LPS의 병용처리군에서는 AME의 처리에 따라 발현량이 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것으로 관찰되었다. 따라서 AME의 처리는 LPS로 유발된 염증반응에서 iNOS 및 COX-2의 발현 억제를 통하여 NO 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

AME의 MAPKs 및 NF-κB의 인산화에 미치는 영향

MAPK는 LPS와 같은 염증성 자극으로 인해 발현되는 대표적인 세포 내 신호전달 인자이다. MAPKs에 속하는 대표적인 단백질에는 extracellular regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH₂-protein kinase(JNK) 및 serine/threonine protein kinase(p38) 등의 3종이 있으며, 활성화된 MAPKs는 NF-κB로 염증성 신호를 전달하여 염증성 매개 단백질 발현 및 세포 소기관에 영향을 주게 된다(20,21). MAPKs 단백질 중 ERK는 여러 자극 인자에 의해 다각적으로 활성화되는 반면에 p38과 JNK는 염증성 자극(LPS) 및 cytokine(TNF-α)과 같은 인자에 특이적으로 활성화된다. 따라서 염증물질 자극 시 MAPK의 인산화가 증가하며 이러한 신호전달을 억제함으로써 항염증 기전을 확인할 수 있다.

NF-κB는 외부 자극에 의해 cytokine 및 chemokine 등의 다양한 염증관련 인자들의 합성을 조절하는 전사인자이다. NF-κB는 세포질에서 Iκ-B와 결합하여 안정된 상태를 유지하고 있으나 LPS와 같은 염증성 물질에 의하여 자극이 전달되면 MAPKs의 신호전달 체계가 활성화되며 결국 NF-κB를 활성화 형태로 변화시키고 핵 내 이동성을 증가시켜 iNOS, COX-2 및 염증성 cytokine 등의 다양한 유전자 발현을 증가시킨다(22). 따라서 염증반응의 신호전달 체계에서 MAPKs 및 NF-κB의 활성화에 따른 인산화 반응은 염증과정을 더욱더 가속화하게 된다.

본 연구에서 AME의 처리에 의한 항염증 활성 기전을 알아보기 위하여 LPS로 처리된 RAW 264.7 대식세포에 AME를 250 및 500 µg/mL의 농도로 처리하고 MAPKs의 인산화 및 핵 내 NF-κB의 발현에 관하여 관찰하였을 때 LPS 단독 처리군에 비하여 AME의 병용처리군에서 MAPKs의 인산화가 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것으로 관찰되었으며, 핵 내 NF-κB의 발현 또한 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

따라서 AME의 처리에 따른 항염증 기전은 대식세포 내부의 MAPKs 및 NF-κB 신호전달 체계를 억제하여 NO, 염증성 cytokine, iNOS, COX-2의 발현을 억제하는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 그라비올라 잎 에탄올 추출물(AME)의 항염증 효과에 관하여 알아보기 위하여 LPS에 의해 유도되는 대식세포

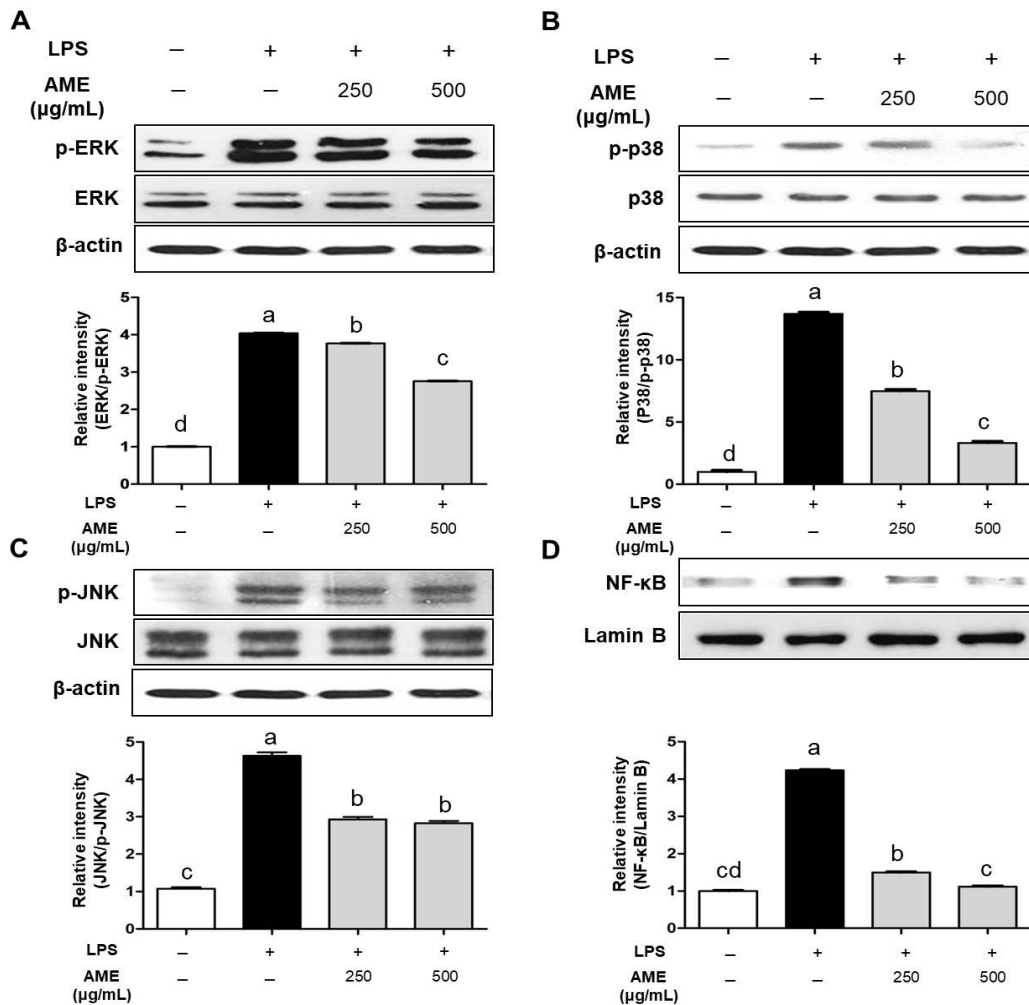


Fig. 4. Inhibitory effect of AME on the phosphorylations of MAPKs and expression of NF- κ B in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of AME (250, 500 μ g/mL) for 30 minutes before LPS (200 ng/mL). After 30 min, cells lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analysis was performed using each specific antibody of MAPKs (phospho-ERK1/2, phospho-p38 and phospho-JNK1/2), and NF- κ B (p65). Values with different letters (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

포 염증모델에 AME를 병용 처리하여 다양한 염증매개인자들의 분비능 및 염증억제 기전에 관하여 알아보았다. LPS의 처리에 따라 염증반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 AME를 병용 처리하였을 때, NO 및 염증성 cytokine(IL-6, TNF- α 및 IL-1 β)의 분비능이 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것을 확인하였다. 또한, AME의 처리에 따라 염증반응의 매개인자인 iNOS 및 COX-2 발현이 유의적으로($P < 0.05$) 감소하는 것으로 나타났으며, 이러한 항염증 활성의 기전에 관하여 분석한 결과 염증성 단백질 발현의 전사인자인 NF- κ B와 MAPKs 신호전달 경로 억제를 통하여 추출물의 항염증 활성이 나타난다는 사실을 관찰할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통하여 AME의 처리는 염증반응의 전사인자인 NF- κ B의 발현을 조절함으로써 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하고, 염증성 매개인자인 NO 및 cytokine(IL-6, TNF-

α 및 IL-1 β)의 분비를 억제한다고 판단된다.

REFERENCES

- Jeong DH, Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Ahn DH. 2014. Anti-inflammatory activity of *Sargassum micracanthum* water extract. *J Appl Biol Chem* 57: 227-234.
- Yoon YI, Chung MY, Hwang JS, Goo TW, Ahn MY, Lee YB, Han MS, Yun EY. 2014. Anti-inflammatory effect of *Oxya chinensis sinuosa* ethanol extract in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Life Sci* 24: 370-376.
- Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. 2013. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbology* 28: 67-73.
- Choi MW, Kim JI. 2013. Anti-inflammatory effect of ethyl

- acetate fraction isolated from *Undaria pinnatifida* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 46: 384-392.
5. Alassane W, Yanjun Z, Caux C, Brouard JP, Pousset JL, Bodo B. 2004. Annomuricatin C, a novel cyclohexapeptide from the seeds of *Annona muricata*. *Comptes Rendus Chimie* 7: 981-988.
 6. Liu N, Yang HL, Wang P, Lu YC, Yang YJ, Wang L, Lee SC. 2016. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *J Ethnopharmacol* 2: 210-217.
 7. Yang C, Gundala SR, Mukkavilli R, Vangala S, Reid MD, Aneja R. 2015. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis* 16: 656-665
 8. Liu HX, Huang GR, Zhang HM, Wu JR, Yao ZJ. 2007. *Annonaceous acetogenin* mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 3426-3430.
 9. Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DD, Pierre K, Théophile D. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 151: 784-790.
 10. Mahibalan S, Sharma R, Vyas A, Beshra SA, Begum S. 2013. Assessment of extraction techniques for total phenolics and flavonoids from *Annona muricata* seeds. *J Indian Chem Soc* 90: 2199-2205.
 11. Jeong H, Sung M, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. 2012. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 888-894.
 12. Byun EB, Sung NY, Park JN, Yang MS, Park SH, Byun EH. 2015. Gamma-irradiated resveratrol negatively regulates LPS-induced MAPK and NF- κ B signaling through TLR4 in macrophages. *Int Immunopharmacol* 25: 249-259.
 13. Choe SI, Park SJ, Byun SH, Lee JB, Park MK, Kim SC. 2009. Effects of *Spatholobi* Caulis MeOH extract on the production of NO and pro-inflammatory cytokines in LPS-activated Raw264.7 cells. *Kor J Herbology* 24: 21-27.
 14. Han HS. 2013. Anti-inflammatory effect of Angelicae Gigantis Radix water extract on LPS-stimulated mouse macrophages. *Kor J Herbology* 28: 113-119.
 15. Kim SY, Jo MJ, Hwangbo M, Back YD, Jeong TY, Cho IJ, Jee SY. 2013. Anti-inflammatory effect of *Stevia rebaudiana* as a results of NF- κ B and MAPK inhibition. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 26: 54-64.
 16. Yoo YC, Lee GW, Cho YH. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 macrophages. *J Life Sci* 26: 338-345.
 17. Kim DH, Lee JR, Byun SH, Shin SW, Kwon YK, Kim SC. 2006. Inhibitory effect of *Stephaniae tetrandrae* Radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide action RAW 264.7 cells. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 20: 902-908.
 18. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, Hase K, Kadota S. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J Ethnopharmacol* 77: 209-217.
 19. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3228-3232.
 20. Cobb MH, Goldsmith EJ. 2000. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* 25: 7-9.
 21. Caivano M. 1999. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Lett* 429: 249-253.
 22. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.