

잣피 추출물들의 항산화 및 항염증에 미치는 영향

진중현¹ · 권한울^{2,3} · 하예진² · 허석현⁴ · 이정민^{2,5}

¹경희대학교 동서의학대학원 노인학과, ²경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과
³한국인삼연구원, ⁴한국건강기능식품협회
⁵경희대학교 임상영양연구소

Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Effect of *Pinus koraiensis* Cone Shell Extracts

Joong Hyun Jin¹, Han Ol Kwon^{2,3}, Yejin Ha², Seok Hyun Heo⁴, and Jeongmin Lee^{2,5}

¹Department of Gerontology, ²Department of Medical Nutrition, and
⁵Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University
³Korea Ginseng Research Institute, Korea Ginseng Corporation
⁴Korea Health Supplements Association

ABSTRACT The present study examined the anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Pinus koraiensis* (PK) cone shell extracts *in vitro*. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of PK cone shell extracted with hot water, 20% ethanol (EtOH), or 50% EtOH were examined using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging assay, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities, as well as nitric oxide (NO) and anti-inflammatory cytokine measurements. The 20% EtOH extract of the PK cone shell decreased the NO and inflammatory cytokines secretion, and increased the ABTS radical scavenging, SOD, CAT, and GPx activities. This indicates that the 20% EtOH extract of the PK cone shell would be helpful in inflammation and oxidation systems. Therefore, the 20% EtOH extract of PK cone shell has great potential as a useful health food.

Key words: ABTS radical scavenging, oxidant enzyme, nitric oxide, anti-inflammatory cytokines

서 론

인체는 생활환경에 의한 스트레스와 세포 내에서의 화학 반응에서 발생하는 산화, 변성, 손상으로 인해 산화적 스트레스가 발생되고 그 부산물로 인하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생되는데, 그 종류로는 hydrogen peroxide, superoxide radical, peroxy radical, hydroxyl radical 등이 생성된다(1,2). 이렇게 산화적 스트레스로 인해 활성산소종의 과 생성 및 신체 내 항상성 유지반응 중 항산화 유지 시스템의 붕괴로 활성산소종을 제거하지 못하고 제거되지 않은 활성산소종은 정상세포에 손상을 유발하여 정상세포의 기능 저하 또는 세포의 사멸과 괴사를 유발시키고, 이에 따라 손상된 세포로 인하여 신체 내에서 염증반응이 발생되고 염증반응이 지속되면 만성염증으로 발전하여 퇴행성 질환, 심혈관계 질환, 알츠하이머, 암 등의 질병을 초래하게 된다(3,4).

염증반응은 신체 내로 침투한 외부의 항원 및 내부의 불필

요한 요소를 제거하기 위하여 신체에서 나타나는 반응으로 항원의 제거작용과 함께 회복 및 수복작용이 동시에 이루어지는 반응이다(5). 그러나 염증반응이 지속되면 만성염증반응이 발생되는데 이로 인하여 퇴행성 질환, 심혈관계 질환, 암 등의 질병이 발생하기 때문에 염증반응을 조절하는 것은 매우 중요한 기능이다(6). 염증반응은 항원제시세포(antipresenting cell, APC) 중 대식세포와 수지상세포 등과 같은 식균작용을 가진 세포에 의하여 항원을 직접 대식작용을 통하여 제거하거나 nitric oxide(NO), interferon- γ 등의 cytokines을 분비하여 항원을 제거하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(7). 또한, 면역세포들에서 분비된 cytokines은 면역세포를 자가 활성화시키거나 다른 면역세포들을 활성화시켜 활성화된 세포에서 cytokine과 chemokine 등의 생리활성 물질들을 분비하여 염증반응을 지속하게 한다. 이때 cytokine은 염증반응을 조절할 수 있는 매개체가 되는데 cytokine이 과도하게 분비되면 염증반응에서 만성염증으로 발전하게 되는 것으로 알려져 있다(8,9). 이 때문에 염증반응을 조절하여 만성염증으로의 발전을 예방하는 것이 중요하다 할 수 있다.

잣나무(*Pinus koraiensis*)는 동북아시아에 분포하는 침

Received 20 June 2017; Accepted 16 August 2017

Corresponding author: Jeongmin Lee, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Korea
E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

엽수의 한 종이며, 잎과 열매에서는 항산화 효과 및 항균 효과가 뛰어나다고 보고되고 있다(10,11). 그러나 잣 열매를 수확 후 잣피(*Pinus koraiensis* cone shell)는 버려지는 부산물로 환경 오염원으로 방치되고 있다. 부산물인 잣피에는 총폴리페놀의 함량이 높다고 보고되고 있다. 총폴리페놀은 항산화 효과와 항암 효과가 뛰어나다고 보고되고 있으며, 이러한 생리활성 물질을 함유한 잣 열매에서 알맹이를 수확 후 버려지는 잣피를 이용하여 항염증 및 항산화 효능을 확인하고 덧붙여, 부산물을 재활용하여 환경 오염원의 배출량을 감소시키며 식품으로 응용할 수 있는 가치가 높은 자원이 될 것으로 생각되어 이 연구를 진행하였다(12).

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 잣피 추출물은 한국인스팜(주)(Hwasun, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 경기도 가평에서 수확한 후 시료를 분말화하여 열수, 20% 주정과 50% 주정에 첨가하여 4시간 동안 95°C에서 환류 추출하였다. 여과지(whatman filter paper No. 6, Whatman, Newton, MA, USA)를 이용하여 추출물을 여과한 후, 여과액을 회전진공농축기로 감압 농축하였다. 농축액을 동결 건조한 다음 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 수득률은 약 2%였다.

세포 배양

RAW264.7 세포는 ATCC(Walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)에 10% fetal bovine serum(HyClone Laboratories), 2 mmol/L glutamine(HyClone Laboratories), sodium pyruvate(HyClone Laboratories), 100 mg/mL penicillin-streptomycin(HyClone Laboratories)을 포함하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 사용하였다.

ABTS assay 항산화능 측정

7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS)와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 ABTS solution을 제조하여 사용하였다. 잣피 추출물들은 각각 18.8, 37.5, 75, 150, 300 µg/mL의 농도로 분주하여 실험을 진행하였으며, 대조군은 vitamin C를 이용하여 흡광도 732 nm에서 ELISA reader(VERSAMACSL-20, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA)를 이용하여 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) 항산화 효소 측정

RAW cell을 96-well plate에 1×10⁶ cells/well로 seeding 하였고, 잣피 추출물들을 각각 0, 1, 5, 10 µg/mL의 농도

로 분주하여 incubator에서 overnight 시켰다. Ice-cold 0.1 M Tris/HCl, pH 7.4 containing 0.5% Triton X-100, 5 mM β-ME, 0.1 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride를 이용하여 세포를 lysis 하여 실험을 진행하였다. Superoxide dismutase Activity Assay kit(BioVision Inc., Milpitas, CA, USA)을 사용하여 SOD Assay Protocol에 따라 실험을 진행하였다. 흡광도 450 nm에서 ELISA reader(VERSA MACSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. RAW cell을 96-well plate에 1×10⁶ cells/well로 seeding 하였고, 잣피 추출물들을 각각 0, 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 분주하여 incubator에서 overnight 시켰다. 상층액을 이용하여 실험을 진행하였다. Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay kit(BioVision Inc.)을 사용하여 Catalase Activity Assay Protocol에 따라 실험을 진행하였다. 흡광도 570 nm에서 ELISA reader(VERSAMACSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. RAW cell을 96-well plate에 1×10⁶ cells/well로 seeding 하였고, 잣피 추출물들을 각각 0, 1, 5, 10 µg/mL의 농도로 분주하여 incubator에서 overnight 시켰다. 상층액을 이용하여 실험을 진행하였다. Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay kit(BioVision Inc.)을 사용하여 Glutathione Peroxidase Activity Assay Protocol에 따라 실험을 진행하였다. 흡광도 340 nm에서 ELISA reader(VERSAMACSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

NO 측정

RAW cell을 96-well plate에 well당 1×10⁴ cells/well씩 분주 후 농도(0, 1, 5, 10 µg/mL)로 잣피 열수, 20% 주정, 50% 주정, 잣송이 초임계 추출물을 처리하고 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 각 5 µg/mL로 분주하여 상층액을 이용하여 실험을 진행하였다. Griess reagent를 이용하여 흡광도 540 nm에서 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

염증성 cytokine 분비량 측정

RAW cell을 96-well plate에 각 well당 1×10⁶ cells/well씩 분주하였다. 양성 대조군으로 lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co.)를 각 5 µg/mL로 처리하여 24시간 후 상층액을 이용해 interleukin(IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor(TNF)-α DuoSet ELISA kit(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 ELISA reader(VERSAMAXSL-20, Molecular Devices)로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 얻어진 결과는 SPSS 22.0 software(IBM, Cambridge, MA, USA)를 이용하여

분석하였으며, 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군 간 평균 차이를 one-way ANOVA로 확인한 후 그룹 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

ABTS assay 항산화능 측정

ABTS 항산화능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 항산화능과 더불어 항산화 실험에서 가장 기초가 되는 실험으로 그중 ABTS 항산화능은 ABTS solution이 항산화 물질에 의하여 반응이 되고, 그 결과물로 탈색된 색을 흡광도로 측정하는 것으로 극성과 비극성 샘플의 소거능 측정이 다 가능하여 적용범위가 넓은 것으로 잘 알려진 Van den berg의 실험방법을 Trolox 대신 항산화제로 잘 알려진 vitamin C로 변형하여 실험에 사용하였다(13,14). ABTS 잣피 추출물을 농도별로 ABTS 항산화능을 측정한 결과 Fig. 1에 나타내었다. Vit. C군과 비교 시 잣피 열수 추출물 150 µg/mL 이상, 20% 주정 추출물 75 µg/mL 이상, 50% 주정 추출물 150 µg/mL 이상에서 Vit. C군의 37.5 µg/mL와 비슷한 항산화능이 있는 것을 확인하였다. 추출물을 처리한 군끼리 비교 시, 특히 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 높아졌음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 잣피 20% 주정 추출물은 자체 항산화능이 높은 것으로 나타났기 때문에 섭취 시 신체의 항산화능에도 도움을 줄 것으로 생각된다. 이는 Dufresne과 Farnworth(15)의 실험에서 총폴리페놀은 항산화 효과에 뛰어나다고 보고되고 있고, 본 실험에서의 잣피는 총폴리페놀의 함량이 높고 그중 20% 주정 추출물이 총폴리페놀의 함량이 더 높을 것으로 생각되어 항산화능이 높게 나온 것으로 생각된다.

SOD, CAT, GPx 항산화 효소 측정

신체 내에서 산화적 스트레스로 인하여 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 반응으로 항산화 효소인 SOD, CAT, GPx와 항산화 물질들의 상호작용으로 인하여 활성산소종은 제거된다. 특히 세포의 세포막에 지질의 산화로 인하여 생성되는 활성산소종을 항산화 효소인 SOD, CAT, GPx의 작용으로 인하여 제거하거나 불활성화시켜 항산화 작용의 반응이 일어나게 된다. 진핵세포에서 SOD는 SOD-1, SOD-2, extracellular-SOD의 세 종류로 나뉘고 각각은 세포의 세포질, 미토콘드리아, 세포외액의 공간에 존재한다(16). SOD와 CAT, GPx는 서로 상호작용으로 활성산소종을 제거하는데 그 반응은 SOD가 활성산소종을 hydrogen peroxide로 전환시키고 catalase에 의해 물과 산소로 전환이 된다(17). 또한, 미토콘드리아에 존재하는 GPx가 SOD가 변환시킨 hydrogen peroxide를 물로 전환시켜 활성산소종을 제거하게 된다(18). 이러한 기전 때문에 항산화 효소는 몸의 항산화적 항상성을 유지하기 위하여 매우 중요한 생체 내의 물질 중 하나이다. RAW cell에 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 SOD 항산화능을 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Cell군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 높음을 확인하였다. 추출물을 처리한 군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 높아졌음을 알 수 있었다. 특히 잣피 20% 주정 추출물 10 µg/mL에서 93.7 ± 1.25%로 가장 높은 값을 나타내었다. RAW cell에 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 CAT 항산화능을 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Cell군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 높음을 확인하였다. 추출물을 처리한 군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 높아졌음을 알 수 있었다. 특히 잣피 20% 주정 추출물 10 µg/mL에서 47.8 ± 5.3 mU/mL로 가장 높은 값을 나타

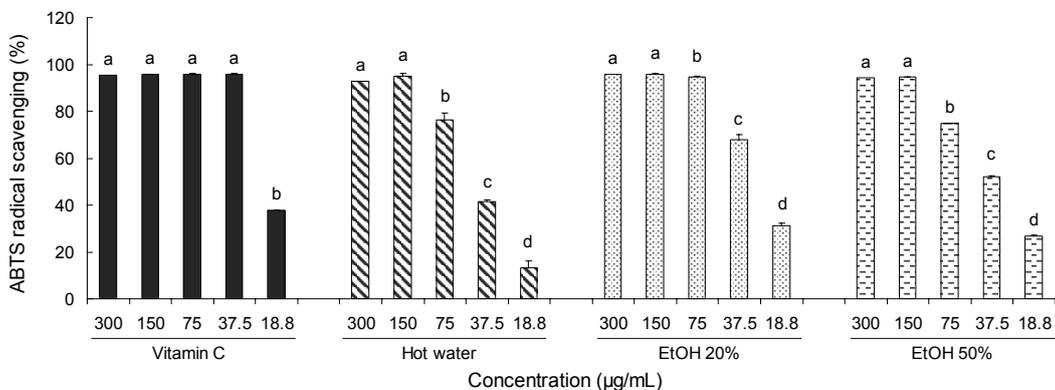


Fig. 1. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on ABTS radical scavenging activity. Vitamin C, treated vitamin C; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. ABTS radical scavenging activity was measured by ELISA reader. All data are mean±standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

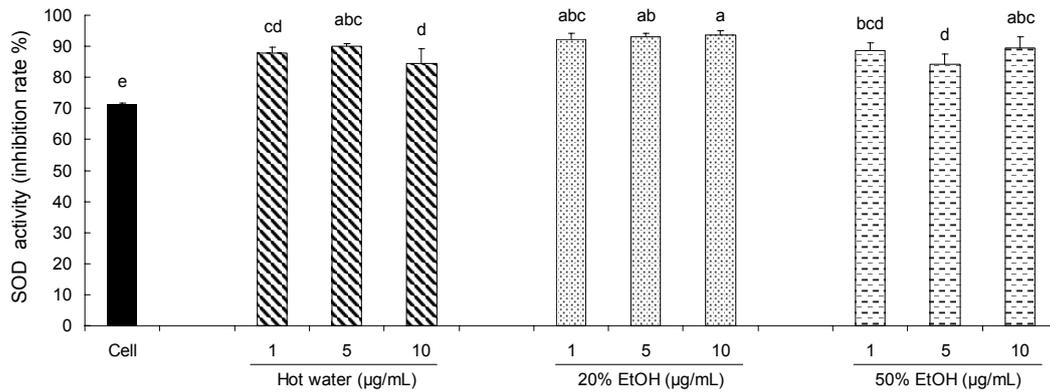


Fig. 2. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on SOD activity in RAW cell. Cell, cell only; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. RAW cell (1×10^6 cells/well) were incubated with various concentration (1, 5, 10 µg/mL). After 24 h of culture, SOD activity was measured by ELISA reader. All data are mean±standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

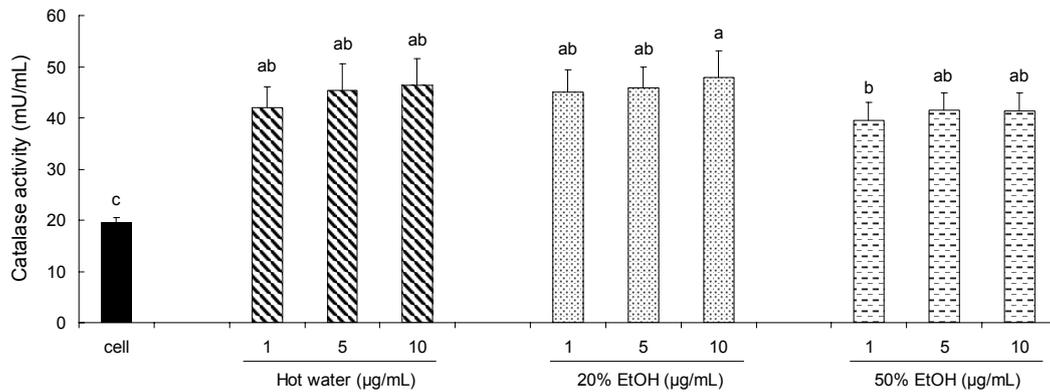


Fig. 3. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on CAT activity in RAW cell. Cell, cell only; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. RAW cell (1×10^6 cells/well) were incubated with various concentration (1, 5, 10 µg/mL). After 24 h of culture, CAT activity was measured by ELISA reader. All data are mean±standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

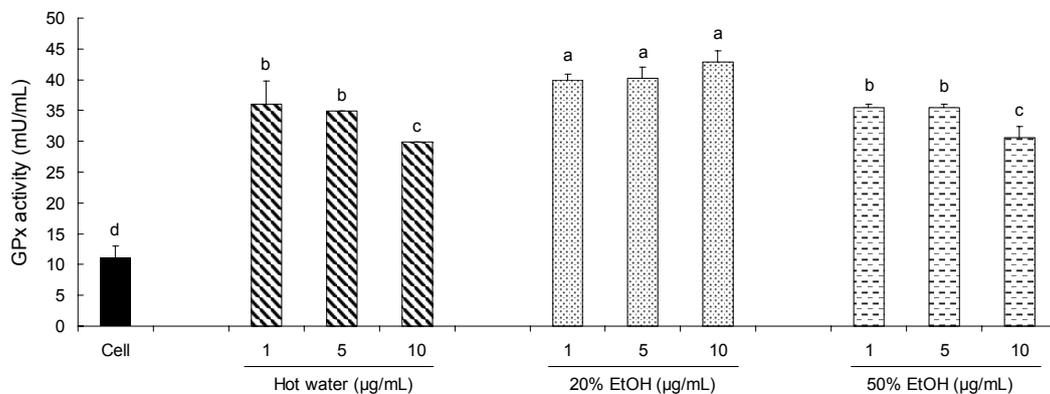


Fig. 4. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on GPx activity in RAW cell. Cell, cell only; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. RAW cell (1×10^6 cells/well) were incubated with various concentration (1, 5, 10 µg/mL). After 24 h of culture, GPx activity was measured by ELISA reader. All data are mean±standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

내었다. RAW cell에 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 GPx 항산화능을 관찰한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Cell군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 높음을 확인하였다. 추출물 처리군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 높아졌음을 알 수 있었다. 특히 잣피 20% 주정 추출물 10 µg/mL에서 42.8±1.8 mU/mL로 가장 높은 값을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 잣피 20% 주정 추출물을 섭취 시 항산화 효소의 활성을 증가시켜 신체의 항산화 반응에 관한 항상성을 유지하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 이는 Dufresne와 Farnworth (15)의 실험에서 총폴리페놀은 항산화 효과에 뛰어나다고 보고되고 있고, 본 실험에서의 잣피는 총폴리페놀의 함량이 높고 그중 20% 주정 추출물이 총폴리페놀의 함량이 더 높을 것으로 생각되어 항산화 효소의 활성이 높게 나온 것으로 생각된다.

NO 측정

NO는 L-arginine으로부터 합성되는데 constitutive NO synthase(cNOS)와 inducible NO synthase(iNOS)의 두 가지 종류로 나뉘며 cNOS는 특히 신경세포에 존재하며 칼슘으로 활성화되어 소량의 NO를 생산하며, iNOS는 간세포와 면역세포에서 염증성 자극이나 면역적 자극에 의하여 다량으로 합성이 되는 것으로 알려져 있다(19,20). 특히 NO는 혈관의 수축과 이완에 영향을 주어 혈압을 조절하는 역할뿐 아니라 염증반응과 면역반응에서 외부로부터의 자극으로 인하여 다량 생산되어 외부에 침투한 항원이나 세균, 그리고 신체 내의 암세포에 대하여 독성을 가지고 공격하여 신체를 방어하는 물질로 잘 알려져 있다(21,22). 하지만 NO는 과량으로 존재하면 패혈증성 쇼크, 고혈압, 발작 등과 신경 관련 퇴행성 질환 등에서 많이 나타난다. 이렇기에 염증반응 시

NO의 조절은 아주 중요한 역할을 한다. RAW cell에 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 NO 생성능을 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. RAW cell에 LPS를 처리하였을 때 NO의 생성이 과도하게 발생되어 염증이 발생되었음을 확인하였다. LPS군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 낮음을 확인하였다. 추출물을 처리한 군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 낮아졌음을 알 수 있었는데, 특히 잣피 20% 주정 추출물 1 µg/mL에서 18.4±7.5 µM로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 잣피 20% 주정 추출물은 NO의 분비량을 감소시키기 때문에 염증반응에서 과염증반응으로의 발전을 막고 염증을 조절하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 이는 잣피의 주요성분인 phytoncide 중 limonene이란 성분은 면역역과 염증에서의 효능이 뛰어나고 림프구 증식능의 증가 또는 억제 작용이 보고되고 있어, 특히 잣피 20% 주정 추출물에서 limonene 성분이 많이 추출되어 염증반응을 조절할 수 있게 도움을 주는 것으로 생각된다(23).

Cytokine 측정

염증은 생체를 외부항원 또는 내부 불필요한 물질로부터 방어하기 위한 기전 중 하나로 손상에 대한 회복 및 재생하려는 반응을 포함하고 있다. 염증에서는 면역세포들이 생산하여 분비하는 매개물질이 있는데 그 물질 중 하나가 염증성 cytokine이며 cytokine은 염증반응의 조절과 면역반응을 조절하는 데 아주 중요한 역할을 하는 매개물질이다(24). 그렇기에 과도한 염증은 몸을 회복하여 치유하려는 목적을 벗어나 오히려 몸에 암, 심혈관질환 등 만성 염증성 질환을 유도하기 때문에 염증을 조절하는 것은 신체의 건강을 유지하기 위하여 필수 조건 중 하나이다(25). RAW cell에 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 cytokine 생성능을 관찰

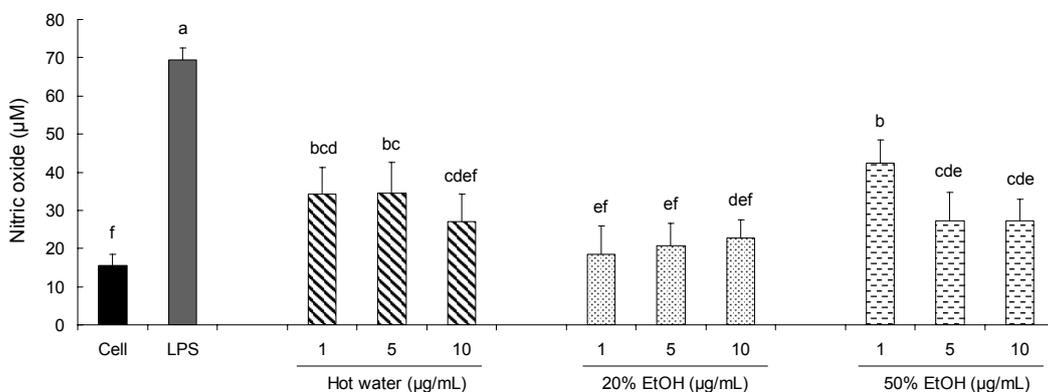


Fig. 5. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW cell. Cell, cell only; LPS, LPS only; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. RAW cell (1×10^6 cells/well) were incubated with various concentration (1, 5, 10 µg/mL) with LPS (5 µg/mL). After 24 h of culture, NO release was measured by ELISA reader. All data are mean±standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

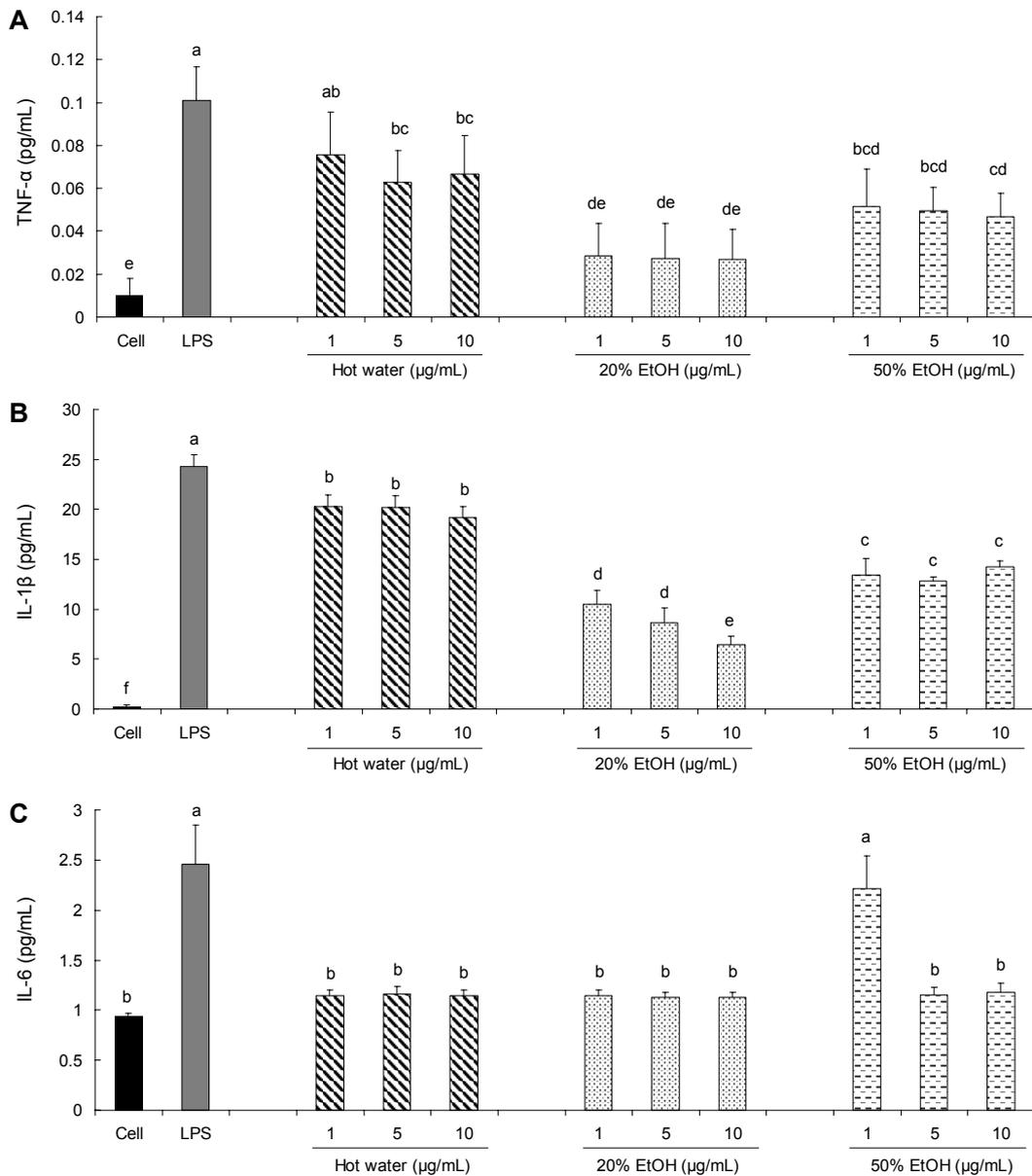


Fig. 6. Effect of *Pinus koraiensis* (PK) cone peel extracts on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW cell. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-6. Cell, cell only; LPS, LPS only; Hot water, PK cone peel hot water extract; 20% EtOH, PK cone peel 20% EtOH extract; 50% EtOH, PK cone peel 50% EtOH extract. RAW cell (1×10^6 cells/well) were incubated with various concentration (1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) with LPS (5 $\mu\text{g/mL}$). After 24 h of culture, NO release was measured by ELISA reader. All data are mean \pm standard deviation (SD), each was performed in triplicate (n=3). Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6A에서 RAW cell에 LPS를 처리하였을 때 TNF- α 의 생성이 과도하게 발생되어 염증이 발생되었음을 확인하였다. LPS군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 열수 추출물 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 낮음을 확인하였다. 추출물을 처리한 군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 낮아졌음을 알 수 있었다. 특히 잣피 20% 주정 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 0.026 ± 0.014 pg/mL로 가장 낮은 값을 나타내었다. Fig. 6B에서

RAW cell에 LPS를 처리하였을 때 IL-1 β 의 생성이 과도하게 발생되어 염증이 발생되었음을 확인하였다. LPS군과 비교 시 잣피 추출물을 농도별로 처리하였을 때 EO 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 낮음을 확인하였다. 추출물들을 처리한 군끼리 비교 시 잣피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 낮아졌음을 알 수 있었다. 특히 잣피 20% 주정 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 6.48 ± 0.77 pg/mL로 가장 낮은 값을 나타내었다. Fig. 6C에서 RAW cell에 LPS를 처리하였을 때 IL-6의 생성이 과도하게 발생하여 염증이

발생하였음을 확인하였고, LPS군과 갯피 추출물들의 비교 시 갯피 50% 주정 추출물 1 µg/mL를 제외한 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 낮음을 확인하였다. 추출물들을 처리한 군끼리 비교 시 갯피 열수 추출물과 갯피 20% 주정 추출물군이 비교적 낮은 농도에서 유의적으로 낮아졌음을 확인할 수 있었고, 특히 갯피 20% 주정 추출물 10 µg/mL에서 1.12±0.05 pg/mL로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 갯피 20% 주정 추출물은 염증 조절에 도움을 줄 수 있는 역할을 할 것이라 생각되며 나아가 면역반응의 조절 또한 영향을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 이는 갯피의 주요성분인 phytoncide 중 limonene이란 성분은 면역과 염증에서의 효능이 뛰어나고 림프구 증식능의 증가 또는 억제 작용이 보고되고 있어, 특히 갯피 20% 주정 추출물에서 limonene 성분이 많이 추출되어 염증반응을 조절할 수 있게 도움을 주는 것으로 생각된다(23).

요 약

본 연구에서는 갯피 열수, 20% 주정, 50% 주정 추출물들이 항염증과 항산화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 ABTS 항산화능과 SOD, CAT, GPx 항산화 효소, NO의 분비량, 염증성 cytokine의 분비량을 살펴보고자 하였다. 갯피 열수, 20% 주정, 50% 주정 추출물 중 20% 주정 추출물이 항산화능, 항산화 효소 활성 증가, NO의 분비량 감소, 염증성 cytokine 분비량을 감소시켜 염증반응과 항산화 반응에 도움을 주어 내부에서 생성된 활성산소종과 외부로부터 침입한 미생물, 감염된 세포나 종양세포 등을 효과적으로 제거할 수 있을 것이라 예상할 수 있었다. 이는 염증뿐만 아니라 면역반응에서도 영향을 미칠 것이라 생각되며 염증조절 및 항산화 반응에 긍정적인 변화를 보였으므로 추후 염증 조절제로서 기능성 식품의 상업화에 기초 자료가 되어 국내 기능성 소재로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

REFERENCES

1. 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: 44-48.
2. Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radical in biology and medicine*. Oxford University Press Co., New York, NY, USA. p 968.
3. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
4. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
5. Olefsky JM, Glass CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72: 219-246.
6. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.

7. Valledor AF, Comalada M, Santamaría-Babi LF, Lloberas J, Celada A. 2010. Macrophage proinflammatory activation and deactivation: A question of balance. *Adv Immunol* 108: 1-20.
8. 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 NFκB signalling in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 147: 208-214.
9. 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.
10. Lee JH, Yang HY, Lee HS, Hong SK. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*. *J Microbiol Biotechnol* 18: 497-502.
11. Su XY, Wang ZY, Liu JR. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chem* 117: 681-686.
12. Karas D, Ulrichová J, Valentová K. 2017. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food Chem Toxicol* 105: 223-240.
13. Van den Berg R, Haenen GRMM, Van den Berg H, Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66: 511-517.
14. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radic Biol Med* 2: 419-444.
15. Dufresne CJ, Farnworth ER. 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 12: 404-421.
16. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
17. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
18. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
19. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. 1989. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 170: 1769-1774.
20. Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. 1987. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-565.
21. Ioannidis I, de Groot H. 1993. Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: Evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J* 296: 341-345.
22. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL. 1990. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212: 462-471.
23. Del Toro-Arreola S, Flores-Torales E, Torres-Lozano C, Del Toro-Arreola A, Tostado-Pelayo K, Guadalupe Ramirez-Dueñas M, Daneri-Navarro A. 2005. Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int Immunopharmacol* 5: 829-838.
24. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically.

- cally as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.
25. Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Johansson C, Schmidt PT, Herulf M, Lundberg JO, Hellstrom PM. 2006. Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus nonresponders. *World J Gastroenterol* 12: 3368-3392.