

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of *Desmodium heterocarpon* Extract in RAW 264.7 Cells

Su Hyeon Lee¹, Kyong-Suk Jin¹, Yu Ri Son^{1,2}, Hyun Ju Kwon^{1,2,3} and Byung Woo Kim^{1,2,3*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University Graduate School, Busan 47340, Korea

³Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received November 8, 2017 / Revised February 9, 2018 / Accepted February 9, 2018

Desmodium heterocarpon is one of vines belongs to Fabaceae family, mainly distributed in Asian countries such as Korea and Japan. This study was conducted to explore new nutraceutical resources from the plant kingdom possessing biological activities. To fulfill this purpose, the anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *D. heterocarpon* ethanol extract (DHEE) were evaluated by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay, reactive oxygen species (ROS) scavenging activity assay, nitric oxide (NO) inhibitory activity assay, and the analysis of related protein expressions by Western blot hybridization. DHEE exhibited potent anti-oxidative activity as confirmed by DPPH radical scavenging capacity against DPPH similar with ascorbic acid, a well-known anti-oxidative agent, used as a positive control. DHEE also effectively suppressed hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced ROS on RAW 264.7 murine macrophage cells. Furthermore, DHEE induced the expression of the anti-oxidative enzyme heme oxygenase 1 (HO-1), and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) as a dose dependent manner. DHEE inhibited lipopolysaccharide (LPS) induced nitric oxide (NO) formation as a consequence of inducible NO synthase (iNOS) down regulation. Taken together, these results suggest that DHEE has anti-oxidative and anti-inflammatory activities and thus appears to be useful sources as potential anti-oxidant and anti-inflammatory agents. The identification of active compounds that confer biological activities of DHEE might be needed.

Key words : Anti-inflammatory activity, anti-oxidative activity, *Desmodium heterocarpon*

서 론

우리 몸은 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이뤄 생체 내 항상성을 유지하고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면 산화적 스트레스가 유발된다[33]. 특히 생명체의 대사 과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 매우 강력한 산화력을 가지고 있기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하여 세포손상을 일으킬 뿐 아니라, 세포 내 주요 염증 유발 인자를 활성화 시킴으로써 염증을 초래한다[7]. 이러한 산화적 스트레스는 암, 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병 등 생체 내에서 발생하는 수 많은 질환의 원인이 될 뿐 아니라, 노화를 일으키는 직·간접적인 원인물질로 작용한다[4, 5, 12, 26, 28].

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme을 분해하여 담록소, 일산화탄소 및 2가 철 이온 등을 생성하는데 관여하는 속도 조절 효소로서 산화적 스트레스에 대한 보호작용을 하고, 세포와 조직의 항염증성 활성화에 기여한다[19]. HO-1이 매개하는 세포 보호 작용은 산화적인 스트레스에 민감한 조직에 결정적인 역할을 한다[30]. HO-1의 산물인 빌리루빈은 부종형성, 백혈구의 흡착과 이동을 억제하고 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)의 생성을 감소시키는 것으로 보고되었다[22].

HO-1의 발현은 일차적으로 전사단계에서 조절되며 전사인자 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 이루어진다고 알려져 있다[31]. 전사인자로서의 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 향진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다[3, 9].

체내의 염증반응은 외부로부터 침입한 병원성 물질이나 조직의 손상에 대한 방어작용으로 나타나는데, 이는 정상적인 조직의 구조와 기능을 회복하기 위해 필수적으로 일어나는 반응으로 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 염증 촉진성 매개체의 생성은 감소되고, 항염증성 매개체는 증가됨으로써 스스로 염증반응이 제한되는 조절과정을 가지고 있다[15].

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2900, Fax : +82-505-182-6951

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

그러나 염증반응 조절과정에 이상이 생겨 만성적인 염증상태가 유지될 경우 조직손상을 촉진하여 식도, 위, 대장, 방광 그리고 전립선암으로의 진행을 유도하게 된다[8].

체내의 면역반응에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포(macrophage)는 염증반응에서 중요한 역할을 하고 있다. 대식세포는 염증 촉진성 사이토카인과 그람 음성 세균의 세포외막 성분인 lipopolysaccharides (LPS) 등의 자극에 노출됨으로써 활성화된다[34]. 대식세포가 활성화되면 염증성 사이토카인을 방출하게 되고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유도하며 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E2 (PGE2)와 같은 염증성 인자가 생성됨으로써 염증반응이 매개된다. 이 과정에서 iNOS에 의한 과도한 NO 생성은 그 자체로 염증유발과 조직손상을 일으킬 뿐만 아니라, 활성산소와 결합하게 되면 보다 반응성이 강한 형태로 전환되어 생체조직의 괴사를 야기할 수 있다[2, 17, 27].

Desmodium heterocarpon (L.) DC.는 콩과(Fabaceae)의 반관목으로 잔디갈고리라고도 불리며, 제주한라산 남쪽지역과 일본, 동남아시아에 분포한다. 높이가 약 10 cm 전후로 자라는데, 줄기는 밑에서 가지가 많이 갈라져서 비스듬히 자라고 줄기와 잎의 뒷면에는 누운털이 있으며 9-10월에 홍자색의 꽃을 피운다. *D. heterocarpon* 메탄올 추출물의 항균, 항산화 활성[1]이 보고된 바 있으며, 동일한 콩과인 *D. podocarpum*의 석유 에테르 분획물의 항진통, 항염증, 해열활성에 대한 연구가 보고되었다[35]. 그러나 *D. heterocarpon*의 에탄올 추출물의 구체적인 효능에 대해서 알려진 바가 없으며, 특히 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 전혀 알려진 것이 없다.

최근 천연물, 한약재를 포함한 다양한 약용식물들에서 생리활성 물질들을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 전 세계적으로 식물자원에서 항암, 항산화 및 항염 등에 효과가 있는 기능성 물질을 다량 함유하는 자원을 선별하는 연구가 다양한 각도에서 진행되고 있다[13]. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *D. heterocarpon*의 에탄올 추출물이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

D. heterocarpon 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *D. heterocarpon* 95% 에탄올 추출물(이하 DHEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-026)하여 사용하였으며 그 추출 과정은 다음과 같다. 건조 및 분쇄한 DHEE를 95% 에탄올을 이용하여 45°C에서 15분간 초음파 추출(sonication) 후 2시간 정지시키는 과정을 하루 10회씩 반복하여 총 3일간 추출을 수행하였다. 추출이 끝난 시료를 여과지에 걸러 고형물을 없애고

45°C에서 감압농축(N-1000SW, EYELA, Tokyo, Japan)한 후 동결 건조(FDU2100, EYELA, Tokyo, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 통한 DHEE의 항산화능 분석

DPPH 라디칼 소거능은 화학적으로 안정화된 자유 라디칼인 DPPH를 소거시키는 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 짙은 자색을 띠는 DPPH 라디칼이 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질을 검색하는데 이용되고 있다[16]. DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 위해 DHEE를 농도별(0.1024-12.8 µg/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 µl와 각 시료 160 µl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, Brea, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 대비하여 자유라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 소거 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH 라디칼 소거능 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 아스코르빈산을 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 세포주의 배양 및 DHEE의 세포독성 분석

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 쥐 대식세포주인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.

활성 분석 수행 전 시료가 지닌 세포독성의 유무 확인과 함께 이후 실험 농도의 결정을 위해 RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 3.0×10^5 개씩 분주하여 부착시킨 후 DHEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 분석하였다. DHEE 처리 24시간 후 WST 시약(Daeil Lab Service, Daejeon, South Korea)이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시키고 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

DHEE의 활성산소종(ROS) 소거능 분석

ROS는 과량 생산 시 DNA, 단백질, 지질 등 생체 내 고분자에 산화적인 변형을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화력의 중요한 지표로 활용된다[18]. H₂O₂는 대표적인 ROS 중 하나로 소재의 항산화능을 규명하기 위

한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[25, 26, 29]. 본 연구에서는 DHEE가 보유한 항산화능을 H_2O_2 로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포주에 세포 침투성 형광 염료인 50 μ M의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고 0.5 mM의 H_2O_2 와 농도 별 시료를 함께 처리한 후 시료의 ROS 생성 억제능의 정도를 multi-plate reader를 이용한 형광 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

항산화 효소 HO-1 및 상위전사인자 Nrf2의 발현 조절능 분석

DHEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1의 일차항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였고, Nrf2와 actin의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후, 50 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전사한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법(chemiluminescence detection system, FluoChem® FC2, AlphaInnotech, San Jose, CA, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

DHEE의 NO 생성 억제능 분석

대표적인 자유 라디칼 중 하나인 NO는 생체 내에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하나 과잉 생산시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[11]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[25]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 3.0×10^5 개씩 분주하여 부착시킨 후 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 DHEE에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 실험에 사용한 시약은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

DHEE의 항염증 활성 관련 단백질 발현 조절능 분석

iNOS는 세균의 내독소 및 염증성 사이토카인에 의해 강하게 유도된다[6]. 병리적인 조건 하에서 iNOS에 의한 NO의 현저한 증가는 다른 염증성 매개체들과 함께 과도한 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있어 염증 증 손상의 주요 매개체로 인식되고 있다[23]. DHEE의 항염증 활성 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 Western blot hybridization으로 분석하였다. iNOS의 일차항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였고, Actin의 일차항체와 anti-goat와 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후, 50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 HRP가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

통계 분석

실험의 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만(*p*<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

DHEE의 라디칼 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

항산화 작용의 주요 기전 중 하나인 전자공여능은 인체 내에서 생성되는 활성라디칼의 전자를 공여함으로써 활성라디칼에 의한 노화와 질병을 억제한다[20]. 따라서 전자공여능은 항산화 작용의 지표로서 사용되고 있으며 특히 식물 추출물의 항산화능 측정에 많이 사용되고 있다[21]. 먼저 DHEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다. 그 결과 0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 μ g/ml의 DHEE에 의해 DPPH 라디칼 소거능의 정도가 각각 22.02, 30.03, 60.27, 96.09%로 나타나 DHEE가 농도의존적인 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다(Table 1). DHEE에 의한 50% 라디칼 소거 농도를 나타내는 IC₅₀ 값은 1.59 μ g/ml로 양성 대조구로 사용한 아스코르빈산의 IC₅₀ 값인 1.09 μ g/ml와 유사한 정도의 활성을 보였다. 한편 Hasan 등[1]이 수행한 선행연구에서 *D. heterocarpon* 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능의 IC₅₀ 값은 19.14 μ g/ml로 본 연구에서 분석한 DHEE에 비해 매우 낮게 나타나, DHEE가 보유한 항산화능이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 이에

Table 1. DPPH radical scavenging activity of DHEE

Reagent	Concentration (µg/ml)	Scavenging activity (%)
DHEE	0.1024	22.02±0.20
	0.512	30.03±0.35
	2.56	60.27±0.16
	12.8	96.09±0.09
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	26.17±0.26
	2.56	92.11±0.38
	12.8	96.91±0.09

DHEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인하고자 하였다.

DHEE가 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

DHEE가 보유한 항산화능을 세포 수준에서 확인하기 위해 DHEE가 세포 실험 모델체인 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. DHEE를 농도별(0, 10, 25, 50 µg/ml)로 24시간 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 유발하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이후 진행된 항산화능 기전분석에서는 10-50 µg/ml까지의 농도를 사용하였다.

DHEE의 ROS 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거 활성에 의해 DHEE가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 세포주에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂를 처리하여 DHEE에 의한 ROS 소거능을 분석하였다. 세포 내에서 활성산소가 발생되면 DCF-DA가 에스터라제 또는 산화적 가수분해에 의해 DCFH로 탈아세틸화 되고, 비형광성인 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 2',7'-dichloro-fluorescein (DCF)로 전환되는데, 이때 강한 형광을 나타낸다[23]. 이러한 원리를 이용하여 ROS 생성 정도를 측정 한 결과 H₂O₂에 의해 유도된 ROS 생성이 DHEE의 처리에

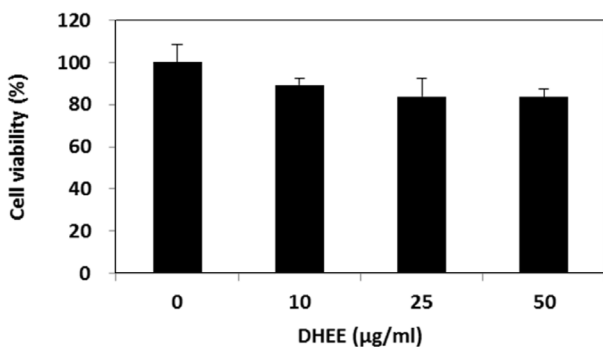


Fig. 1. Effect of DHEE on cell viability in RAW 264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of DHEE for 24 hr and viability was determined by WST assay. Values are represented as the mean ± SD (n=3).

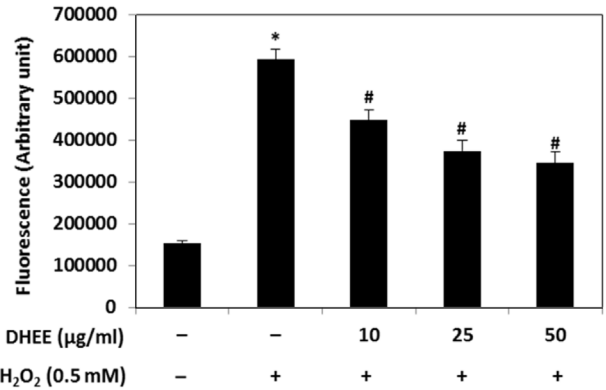


Fig. 2. ROS scavenging activity of DHEE in RAW 264.7 cells. ROS scavenging activity of DHEE against H₂O₂ was analyzed using a cell permeable probe, DCF-DA. Values are represented as the mean ± SD (n=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and H₂O₂- induced control (-/+), respectively (p<0.05).

의해 농도의존적으로 저해되었다(Fig. 2). 즉, DHEE가 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다.

DHEE가 항산화 효소 HO-1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

HO-1은 여러 세포 유형에서 생존이나 스트레스 반응과 관련된 신호전달 경로를 통해서 전사인자인 Nrf2를 통해 발현이 조절된다[32]. 정상적인 상태에서 Nrf2는 세포질에서 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)에 결합되어 비활성화 상태로 존재하지만, 세포가 활성화되면 Keap1으로부터 방출 되고 핵으로 이동하여 ARE에 결합함으로써 HO-1과 같은 항산화 효소의 발현을 조절한다[24]. 상기 실험에서 DHEE에 의해 ROS가 감소되는 것이 확인됨에 따라 DHEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보기 위해 HO-1 및 Nrf2의 발현 정도를 Western blot hybridization을 통해 분석하였다. 10-50 µg/ml의 시료를 6시간 동안 처리한 후 단백질의 발현을 분석한 결과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 HO-1의 발현이 농도의존적으

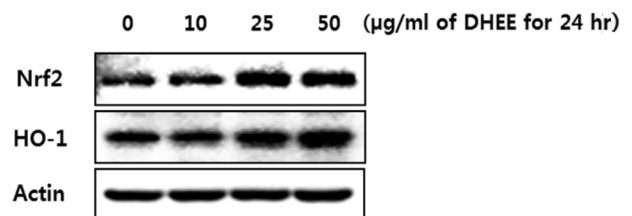


Fig. 3. Modulation of the representative anti-oxidative enzyme, HO-1 and its upstream transcription factor Nrf2 protein expression in RAW 264.7 cells by DHEE. Protein expression was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

로 증가되었으며, 상위 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현 또한 농도의존적으로 증가됨을 보여 HO-1의 발현 변화와 유사하게 나타났다. 따라서 DHEE는 RAW 264.7 세포주에서 Nrf2를 전사시켜 HO-1 단백질 발현을 유도함으로써 산화적 스트레스에 대한 항산화 활성을 나타낼 가능성을 확인하였다. 한편 HO-1의 발현 증가를 유도하는 전사인자 Nrf2의 상세 조절 기전은 이후 Nrf2의 인산화 및 핵 내 이동 여부 등의 추가적인 연구를

통해 규명해야 할 것으로 판단된다.

DHEE가 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 L-arginine을 기질로 하여 NO 합성효소에 의해 생성되는 무기 유리체로 지속적인 염증의 진행에 의한 종양형성 촉진, 면역반응, 혈관이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하는 인자 중 하나로 인식되고 있다[14]. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 LPS에 의해 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진한다. 이는 대식세포에서 LPS나 사이토카인에 의해 염증성 매개물질들이 과잉 생산되는 중요한 메커니즘이 된다[10]. DHEE가 강한 항산화 활성을 보유하고 있음이 상기의 실험을 통해 밝혀짐에 따라 DHEE가 항염증 활성 또한 나타내는지 알아보기 위해 NO 생성 저해능을 분석하였다. 먼저 DHEE가 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 10-200 µg/ml의 시료 처리에 의해 세포독성을 유발하지 않았다(Fig. 4A). 다음으로 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포주에서 농도별 DHEE의 처리에 따른 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 10-200 µg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해활성과 함께 iNOS 발현이 저해됨을 확인하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 한편 Zhu 등[35]이 수행한 선행연구에서 *D. podocarpum*의 에탄올 추출물로부터 얻은 petroleum ether fraction의 항염증 효능을 분석하였으나, 본 연구의 결과와 직접적인 비교에는 어려움이 있으며 본 연구의 결과를 통해 DHEE가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 항염증 활성을 보유함을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(B0010792) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Al Hasan, A., Hasan, C. M. and Azam, A. T. M. Z. 2011. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of *Desmodium heterocarpon*. *Bangladesh Pharm. J.* **14**, 0301-4606.
2. Albina, J. E. and Reichner, J. S. 1995. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz.* **3**, 46-64.
3. Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. 2003. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887-895.
4. Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A. M. and Gaetano, C. 2013. Oxidative stress and

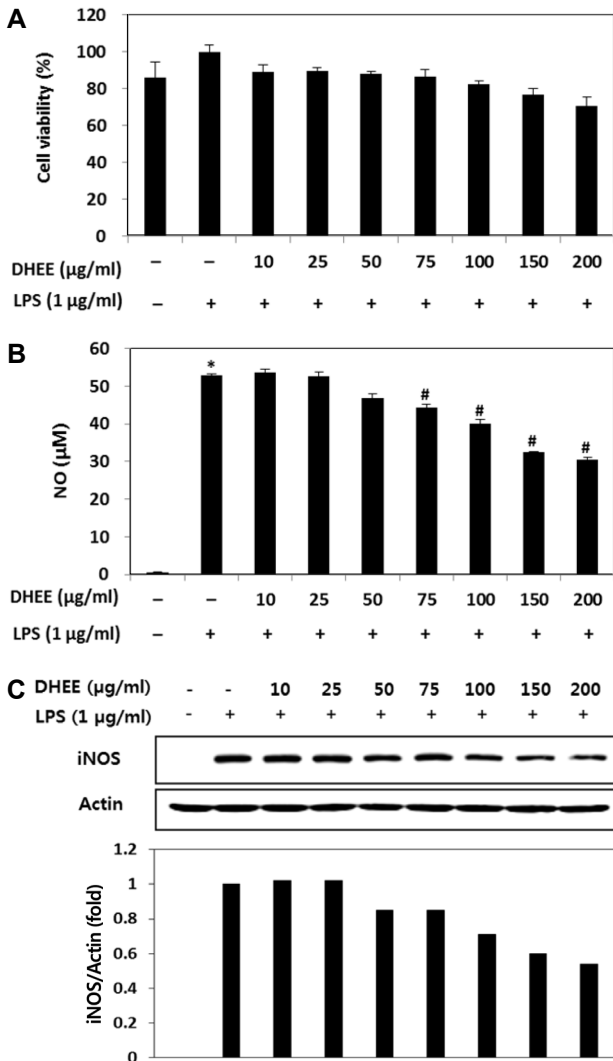


Fig. 4. Effect of DHEE on cell viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A) Cells were treated with the indicated concentration of DHEE with or without LPS for 24 hr, and viability was determined by WST assay. (B) Modulation of LPS-induced NO formation by DHEE was analyzed by Griess reaction. (C) iNOS protein expression was analyzed by Western blot hybridization. (A, B) Values are represented as the mean ± SD (n=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and LPS-induced control (-/+), respectively (p<0.05). (C) Actin was used as an internal control.

- epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17643-17663.
5. Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319-5341.
 6. Guha, M. and Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**, 85-94.
 7. Harman, D. 2009. Origin and evolution of the free radical-theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* **10**, 773-781.
 8. Hofseth, L. J. and Ying, L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1765**, 74-84.
 9. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-322.
 10. Jung, Y. S., Eun, C. S., Jung, Y. T., Kim, H. J. and Yu, M. H. 2013. Anti-inflammatory effects of *Picrasma Quassidides* (D.DON) BENN leaves extract. *J. Life Sci.* **23**, 629-636.
 11. Kalyanaraman, B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox. Biol.* **1**, 244-257.
 12. Khansari, N., Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **3**, 73-80.
 13. Kim, H. J., Ahn, M. S., Kim, G. H. and Kang, M. H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* extracts prepared from different aerial part. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 799-804.
 14. Kim, J. Y., Jung, K. S. and Jeong, H. G. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**, 321-326.
 15. Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787-795.
 16. Lee, S. G., Jeong, H. J., Lee, E. J., Kim, J. B. and Choi, S. W. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **43**, 200-205.
 17. Lee, S. J. and Lim, K. T. 2008. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1 β and interleukin-6 via p38 mitogenactivated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn. Schmi. Arch. Pharmacol.* **377**, 45-54.
 18. Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 1-4.
 19. Li, L., Grenard, P., Nhieu, J. T., Julien, B., Mallat, A., Habib, A. and Lotersztajn, S. 2003. Heme oxygenase-1 is an anti-fibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* **125**, 460-468.
 20. Lipinski, B. 2011. Hydroxy radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2011**, 809696, 9 pages.
 21. Muller, N., Myint, A. M. and Schwarz, M. J. 2011. Inflammatory biomarkers and depression. *Neurotox. Res.* **19**, 308-318.
 22. Nakao, A., Otterbein, L. E., Ovehaus, M., Sarady, J. K., Tsung, A., Kimizuka, K., Nalesnik, M. A., Kaizu, T., Uchiyama, T., Liu, F., Murase, N., Bauer, A. J. and Bach, F. H. 2004. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* **127**, 595-606.
 23. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
 24. Nguyen, T., Huang, H. C. and Pickett, C. B. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.* **275**, 15466-15473.
 25. Park, C. M., Park, J. Y., Noh, K. H., Shin, J. H. and Song, Y. S. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 834-842.
 26. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17-34.
 27. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
 28. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603-1616.
 29. Saw, C. L., Wu, Q., Su, Z. Y., Wang, H., Yang, Y., Xu, X., Huang, Y., Khor, T. O. and Kong, A. N. 2013. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. *Biopharm. Drug Dispos.* **34**, 303-311.
 30. Schipper, H. M. 2000. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp. Gerontol.* **35**, 821-830.
 31. Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E. and Bonkovsky, H. L. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
 32. Srisook, K., Kim, C. and Cha, Y. N. 2005. Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1674-1687.
 33. Videla, L. A. and Fernandez, V. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch. Biol. Med. Exp.* **21**, 85-92.
 34. Xie, Q. W., Whisnant, R. and Nathan, C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**, 1779-1784.
 35. Zhu, Z. Z., Ma, K. J., Ran, X., Zhang, H., Zheng, C. J., Han, T., Zhang, Q. Y. and Qin, L. P. 2011. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *J. Ethnopharmacol.* **1333**, 1126-1131.

초록 : RAW 264.7 세포에서 *Desmodium heterocarpon* 추출물의 항산화 및 항염증 활성

이수현¹ · 진경숙¹ · 손유리^{1,2} · 권현주^{1,2,3} · 김병우^{1,2,3*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 대학원 생명응용학과, ³동의대학교 공과대학 바이오응용공학부)

*Desmodium heterocarpon*은 콩과에 속하는 덩굴식물로 주로 한국, 일본 등의 아시아 국가에 분포되어 있다. 본 연구에서는 식물에 존재하는 신규 기능성 소재 개발의 일환으로 *Desmodium heterocarpon* 에탄올 추출물(DHEE)의 항산화 및 항염증 생리활성을 DPPH 라디칼 소거능, ROS 소거능, NO 생성 억제능 및 관련 단백질 발현을 통해 분석하였다. 먼저 DHEE의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능을 통해 분석한 결과 높은 소거활성을 보여 DHEE가 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주에서 H₂O₂에 의해 유도된 ROS에 대한 DHEE의 소거능을 분석한 결과 농도의존적인 강한 ROS 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화 효소 중 하나로 항산화능 보유 천연물에 의해 발현이 유도되는 HO-1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현이 DHEE의 처리에 의해 유의적으로 증가됨을 보였다. 한편 DHEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 DHEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 확인하였으며 향후 잠재적인 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 추후 계속적인 연구를 통해 활성 물질의 규명이 필요할 것으로 보인다.